



# **Methodenentwicklung zur automatisierten Hochdurchsatz-Biodiversitätsforschung unter Invertebraten**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)**

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

angenommene

**Dissertation**

von

**M.Sc. Lorenz Wührl**

geb. in Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung:

Hauptreferent:

Korreferenten:

15.07.2024

Prof. Dr. Christian Pylatiuk

Prof. Dr. Christian Greiner

Prof. Dr. Rudolf Meier

**Lorenz Wühl**

*Methodenentwicklung zur automatisierten Hochdurchsatz-Biodiversitätsforschung unter Invertebraten*

Dissertation,

Referenten: Prof. Dr. Christian Pylatiuk, Prof. Dr. Christian Greiner und Prof. Dr. Rudolf Meier

Betreuer: Prof. Dr. Christian Pylatiuk

**Karlsruher Institut für Technologie**

*Biomedical Engineering & Robotics (BER)*

Institut für Automation und angewandte Informatik

Fakultät für Maschinenbau

Hermann-von-Helmholtz-Platz 1

76344 Eggenstein-Leopoldshafen

# Zusammenfassung

Der Rückgang der biologischen Vielfalt, insbesondere bei Insekten, stellt eine erhebliche Bedrohung dar. Die Artenvielfalt ist essenziell für Ökosysteme, beeinflusst die Landwirtschaft und hat direkte Auswirkungen auf den Menschen. Trotzdem sind viele Insektenarten unbekannt und es fehlt an Expert:innen für deren Erforschung. Zur Untersuchung der Biodiversität und Identifizierung neuer Arten werden Insekten mit Fallen gefangen und in Ethanol konserviert. Diese Massenproben können mehrere 10.000 Insekten beinhalten. Durch eine genaue Auswertung dieser Proben können neue Arten beschrieben, Veränderungen der Biodiversität, bspw. aufgrund des Klimawandels, festgestellt und dementsprechend Gegenmaßnahmen ergriffen werden. Momentan wird die Auswertung meist manuell durchgeführt, was sehr langsam ist und die Einbeziehung mehrerer Expert:innen erfordert. Ein weiterer Lösungsansatz bietet die Klassifizierung der Insekten anhand ihrer DNA, genauer gesagt des sogenannten DNA-Barcodes. Dazu werden die Insekten vereinzelt und jeweils individuell anhand des DNA-Barcodes bestimmt. Dies ist aufgrund der Vereinzelung zeitintensiv. Zudem sind die Kosten mit etwa 0,10 \$ pro Insekt nicht zu vernachlässigen. Das Ziel dieser Dissertation ist es, Methoden zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung unter Insekten zu entwickeln. Hierbei sollen potenzielle Bereiche für die Automatisierung identifiziert werden, um Arbeitsabläufe zu beschleunigen und neue Möglichkeiten zur Erforschung der Biodiversität zu schaffen. Die Forschungsfragen konzentrieren sich auf die Eignung kostengünstiger Hochdurchsatzmethoden und darauf, Implementierungsmöglichkeiten für gefundene Anwendungsbereiche aufzuzeigen. Die Arbeit identifiziert drei Bereiche, die für die Automatisierung in der Biodiversitätsforschung geeignet sind: Bildgebung, Handhabung und Klassifizierung der Insekten. Der Hauptteil gliedert sich in mehrere Teile. Im ersten Teil, Probenvorbereitung, wird ein System zur Vorsortierung der Insekten-Massenproben vorgestellt. Das System nutzt eine lineare Bewegung und verschiedene Siebgrößen, um die Proben in unterschiedliche Größenfraktionen zu untergliedern. Diese Vorsortierung ist notwendig, um nachgelagerte Prozessschritte zu vereinfachen. Anschließend wird ein Konzept zur teilautomatisierten Bildgebung vorgestellt. Das *Open Source* Mikroskop, das 'Entomoscope', wird entwickelt, um schnell und mit minimalen Kosten einheitliche Bilder von Insekten in Ethanol aufnehmen zu können. Es werden zwei Versionen des Entomosopes vorgestellt: das 'Standalone Entomoscope', ein Mikroskop, das außer einem externen Netzteil keine weitere Hardware benötigt, sowie das 'Plug-In Entomoscope', das zum Betrieb einen PC oder Laptop benötigt, dafür aber mit geringerem Aufwand und kostengünstiger aufgebaut werden kann. Weiterhin wird

im zweiten Teil ein teilautomatisiertes System zur multiperspektivischen Bildgebung vorgestellt. Der 'DiversityScanner-360°' dient der Digitalisierung von Insekten bis 3 mm und fertigt automatisiert Bilder aus einer frei wählbaren Anzahl an Perspektiven an. Dazu wird das Insekt in eine Bildgebungszelle gepumpt und mit einer um die Zelle rotierenden Kamera aufgenommen. Im dritten Teil der Arbeit werden Methoden zur vollautomatisierten Bildgebung und Handhabung entwickelt. Der 'DiversityScanner' kombiniert Methoden zur Handhabung und Bildgebung und eignet sich damit zum vollautomatisierten Fotografieren und Sortieren von Insekten mit einer maximalen Größe von 3 mm. Das System erkennt in einer Petrischale ausgebreitete Insekten in Ethanol, markiert sortierbare Insekten, nimmt ein Detailbild auf und sortiert diese anschließend mit einer automatisierten Pipette in eine 96er Mikrotiterplatte. Weiterhin werden Handhabungswerkzeuge untersucht und verglichen, um auch größere Insekten automatisiert sortieren zu können. Der vierte Teil der Dissertation untersucht Methoden, mit denen die angefertigten Bilder zur Klassifizierung der Insekten genutzt werden können. Dazu werden verschiedene Modelle des maschinellen Lernens genutzt und es wird untersucht, welche weiteren morphometrischen Merkmale anhand der Bilder ermittelt werden können. Zusammenfassend bildet diese Dissertation eine Grundlage zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung unter Insekten mit kostengünstigen und verfügbaren Methoden, die dazu beitragen können, Wissenslücken zu schließen und somit den Schutz der Biodiversität effektiv zu gestalten.

# Abstract

The decline of biodiversity, particularly among insects, poses a significant threat. Species diversity is essential for ecosystems, influences agriculture, and has direct impacts on humans. However, many insect species remain unknown, and there is a lack of experts to study them. Insects are captured with traps and preserved in ethanol to examine biodiversity and identify new species. These bulk samples can contain tens of thousands of insects. Through careful analysis of these samples, new species can be described, changes in biodiversity due to, e.g., climate change can be identified, and appropriate countermeasures can be taken. Currently, evaluation is mostly manual, which is very slow and requires the involvement of multiple experts. Another approach offers the classification of insects based on their *Deoxyribonucleic acid* (DNA), specifically using DNA barcoding. Insects are individually separated and identified based on their DNA barcode. However, this process is time-consuming due to the manual separation required. Additionally, costs, at around \$0.10 per insect, cannot be ignored. The aim of this dissertation is to develop methods for automating biodiversity research among insects. The focus is on identifying potential areas for automation to accelerate workflows and on creating new possibilities. Research questions concentrate on the suitability of cost-effective, high-throughput methods and demonstrating implementation possibilities for identified application areas. The dissertation identifies three areas suitable for automation in biodiversity research: imaging, handling, and classification of insects. The main part is divided into several sections. In the first part, sample preparation, a system for pre-sorting mass samples is introduced. The system uses linear motion and various sieve sizes to divide the samples into different size fractions, simplifying downstream processes. Subsequently, a concept for semi-automated imaging is presented. The open-source photomicroscope, the 'Entomoscope,' is developed to capture uniform images of insects in ethanol quickly and at a minimal cost. Two versions of the Entomoscope are presented: the 'Standalone Entomoscope,' a photomicroscope that requires only an external power supply, and the 'Plug-In Entomoscope,' which requires a PC or laptop for operation but can be set up more easily and inexpensively. Furthermore, in the second part, a semi-automated system for multiperspective imaging is presented. The 'DiversityScanner-360°' digitizes insects up to 3 mm and automatically captures images from a user-selected number of perspectives. The insect is pumped into an imaging chamber, and a camera moves around the chamber. In the third part of the dissertation, methods for fully automated imaging and handling are developed. The 'DiversityScanner' combines handling and imaging methods, suitable for fully automated photography and sorting of insects up to a maximum size of 3 mm. The system detects insects spread in ethanol on a Petri dish, marks

sortable insects, captures a detailed image, and then individually sorts them into a 96-well microplate using an automated pipette. Additionally, handling tools are examined and compared to automate the sorting of larger insects. The fourth part of the dissertation investigates methods for using the captured images for insect classification. Machine learning models are utilized, and additional morphometric features that can be determined from the images are examined. In summary, this dissertation provides a foundation for automating biodiversity research among insects with cost-efficient and available methods that contribute to closing knowledge gaps and thus making biodiversity protection more effective.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen haben. Besonders danke ich meinem Betreuer, Christian Pylatiuk, für seine wertvolle Unterstützung, seine kontinuierliche Motivation und seine beständige Hilfe während des gesamten Prozesses. Ebenso möchte ich Veit Hagenmeyer, dem Leiter des Instituts, meinen Dank aussprechen, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Promotion am Institut für Automation und angewandte Informatik (IAI) durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt auch Rudolf Meier und Christian Greiner für die Begutachtung meiner Dissertation sowie Anne Meyer für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses. Zudem danke ich Ralf Mikut, dem Leiter des Fachgebiets Automatisierte Bild- und Datenanalyse (AIDA), und Markus Reischl, dem Gruppenleiter während meines ersten Promotionsjahres in der Gruppe Maschinelles Lernen für Hochdurchsatzverfahren und Mechatronik (ML4HOME).

Ein großes Dankeschön geht auch an Andreas Hofmann, den wissenschaftlich-administrativen Geschäftsführer des Instituts, sowie an Marina Djordjevic, Manuela Lang, Bernadette Lehmann und Carola Roth aus dem Leitungsteam Administration für ihre unverzichtbare organisatorische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich für die Unterstützung meiner Kolleginnen und Kollegen am IAI bedanken, die auf vielfältige Weise direkt oder indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich den Kolleginnen und Kollegen meiner Gruppe Biomedical Engineering & Robotics (BER) – Onur Karabiyik, Nathalie Klug, Damyan Nikolov, Lisa Petani und Hossein Shirali – für die gemeinsame Zeit und die gegenseitige Unterstützung. Des Weiteren danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Fachgebiets AIDA: Stephan Allgeier, Andreas Bartschat, Maximilian Beichter, Luca Deininger, Patricia Dold, Nils Friedrich, Matthias Hertel, Vojtěch Kumpošt, Carola Krug, Thomas Lautenschlager, Katharina Löffler, Nicole Merkle, Stefan Meisenbacher, Oliver Neumann, Kaleb Phipps, Tim Scherr, Angelo Yamachui Sitcheu, Marian Turowski, Manuel Treutlein und den Kollegen aus ML4HOME Moritz Böhland, Hawo Höfer, Friedrich Münke, André Orth, Marcel Schilling, Jan Schützke und Yanke Wang. Vielen Dank für viele tolle Kooperationen, Gespräche und Kaffeepausen. Ein besonderer Dank gilt noch dem *Scribble Squad* Roman Bruch und Luca Rettenberger, das

gemeinsame Arbeiten an unseren Dissertationen hat das Schreiben um ein Vielfaches erleichtert. Außerdem möchte ich Felix Dehon, Claudia Greceanu, Moritz Lindmüller, Daniel Moser, Klaus-Martin Reichert und Stefan Vollmannshauser danken.

Auch allen studentischen Hilfskräften und Absolventinnen und Absolventen von Abschlussarbeiten, die ich während meiner Doktorarbeit betreuen durfte und die mich unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen: Iain Ahrens, Nahid Bente Akther, Nick Böse, Patrick Blum, Waldemar Flaum, Matthias Giersch, Nick Göller, Leonard Keller, Florian Lapp, Kirsten Rotmann, Aliena Schwarz, Tuba Tarhan und Michael Wickberg – ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich meinen tiefsten Dank an Jana, meine Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, sowie meinen Freunden aussprechen. Eure stete Ermutigung, eure Unterstützung, eure Ratschläge sowie euer Verständnis als auch die gemeinsam verbrachte Zeit waren und sind eine stetige Quelle der Motivation und Kraft für mich.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Danksagung</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation	1
1.1.1 Biodiversitätsforschung unter Insekten	2
1.1.2 Gängige Fangmethoden für Insekten	3
1.1.3 Konventionelle Bestimmungsmethoden für Insekten	7
1.2 Zielsetzung und Forschungsfragen	10
1.3 Gliederung der Arbeit	11
<b>2 Untersuchung zum Potenzial der Automatisierung</b>	<b>13</b>
2.1 Vision der automatisierten Biodiversitätsforschung	13
2.2 Handhabung, Vereinzelung und Sortierung	13
2.3 Bildgebung	15
2.4 Klassifizierung	16
2.5 Potenzial von <i>Open Science</i> und <i>Open Source</i>	16
2.6 Prozesskette zur Erforschung von Insekten	17
<b>3 Grundlagen</b>	<b>21</b>
3.1 Grundlagen der Robotik	21
3.2 Grundlagen der Handhabung	23
3.3 Grundlagen zur Bildgebung kleiner Objekte	24
3.3.1 Optische Sensoren	24
3.3.2 Objektive	28
3.3.3 Schärfentiefe	29
3.3.4 <i>Focus Stacking</i>	31
3.3.5 Beleuchtung	32
3.4 Grundlagen zur Bildklassifizierung mit maschinellem Lernen	32

<b>I</b>	<b>Probenvorbereitung: Größenfraktionierung von Insekten in Ethanol</b>	<b>35</b>
	<b>Übersicht Teil I</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Fraktionierung von Insektenproben</b>	<b>39</b>
4.1	Stand der Technik zur Fraktionierung von Insektenproben	40
4.2	Konzept und Methoden	41
4.3	Aufbau der vorgeschlagenen Methode zur Fraktionierung von Insektenproben	43
4.4	Evaluierung des Systems zur Fraktionierung von Insektenproben	46
4.5	Diskussion und Ausblick	46
<b>II</b>	<b>Teilautomatisierte Bildgebung von Insekten in Ethanol</b>	<b>49</b>
	<b>Übersicht Teil II</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Konzept zur teilautomatisierten Bildgebung: Entomoscope</b>	<b>53</b>
5.1	Stand der Technik zur manuellen und teilautomatisierten Bildgebung von Insekten in Ethanol	55
5.2	Konzept und Methoden	56
5.3	Aufbau der Entomoscope Versionen	57
5.3.1	Standalone Entomoscope: Teilautomatisiertes Bildgebungssystem mit integriertem Steuerelement	58
5.3.2	Plug-In Entomoscope: Teilautomatisiertes Bildgebungssystem mit externem Steuerelement	64
5.4	Evaluierung des Standalone und Plug-In Entomoscopyes	70
5.5	Diskussion und Ausblick	71
<b>6</b>	<b>Konzept zur teilautomatisierten, multiperspektivischen Bildgebung: DiversityScanner-360°</b>	<b>75</b>
6.1	Stand der Technik zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten	77
6.2	Konzept und Methoden	78
6.3	Aufbau des DiversityScanner-360°	79
6.4	Evaluierung des DiversityScanner-360°	86
6.5	Diskussion	87
<b>III</b>	<b>Automatisierte Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol</b>	<b>91</b>
	<b>Übersicht Teil III</b>	<b>93</b>

<b>7</b>	<b>Konzept zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten: DiversityScanner</b>	<b>95</b>
7.1	Stand der Technik zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten	95
7.2	Konzept und Methoden	98
7.3	Aufbau des DiversityScanners	99
7.4	Evaluierung des DiversityScanners	110
7.4.1	Methodik zur Evaluierung des Handhabungsprozesses	110
7.4.2	Ergebnisse der Evaluierung	111
7.5	Diskussion und Ausblick	115
<b>8</b>	<b>Neue Methoden zur Handhabung mit dem DiversityScanner</b>	<b>121</b>
8.1	Stand der Technik zur Handhabung von Insekten > 3 mm	121
8.2	Konzept und Methoden	122
8.3	Implementierung der Handhabungswerkzeuge	123
8.4	Evaluierung und Ergebnisse	126
8.5	Diskussion und Ausblick	129
<b>IV</b>	<b>Potenzial der Bildanalyse zur Klassifizierung und Untersuchung von Insekten</b>	<b>131</b>
	<b>Übersicht Teil IV</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Klassifizierung mittels neuronaler Netze</b>	<b>135</b>
9.1	Stand der Technik zur Klassifizierung von Insekten mit neuronalen Netzen	135
9.2	Material und Methoden	136
9.3	Ergebnisse der Klassifizierung	139
9.4	Diskussion	142
<b>10</b>	<b>Ermittlung morphometrischer Merkmale anhand von Bildern</b>	<b>145</b>
10.1	Stand der Technik zur Bestimmung der Biomasse und morphometrischer Merkmale	145
10.2	Material und Methoden	146
10.3	Evaluation und Diskussion	147
<b>11</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>149</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
A.1	Anforderungen an ein System zur Größenvorsortierung von Insekten-Massenproben in Ethanol	156
A.2	Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur Bildgebung von Invertebraten in Ethanol	158
A.3	Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur multiperspektivischen Bildgebung von Invertebraten (< 3 mm) in Ethanol	161

A.4 Anforderungen an ein automatisiertes System zur Bildgebung von Invertebraten (< 3 mm) in Ethanol . . . . .	165
<b>Abbildungsverzeichnis . . . . .</b>	<b>171</b>
<b>Tabellenverzeichnis . . . . .</b>	<b>173</b>
<b>Eigene Veröffentlichungen . . . . .</b>	<b>175</b>
Hauptpublikationen . . . . .	175
Weitere Publikationen . . . . .	176
<b>Betreute Abschlussarbeiten . . . . .</b>	<b>177</b>
<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>179</b>

# Abkürzungen

<b>AP</b>	Austrittspupille
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>CAD</b>	<i>Computer Aided Design</i>
<b>CCD</b>	<i>Charge-Coupled Device</i>
<b>CLI</b>	<i>Comand-Line Interface</i>
<b>CMOS</b>	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
<b>CNN</b>	<i>Convolutional Neural Network</i>
<b>CoC</b>	<i>Circle of Confusion</i>
<b>CoL</b>	<i>Catalogue of Life</i>
<b>COI</b>	Cytochrom-Oxidase I
<b>DIY</b>	<i>Do It Yourself</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DoF</b>	<i>Depth of Field</i>
<b>EFL</b>	elektrisch fokussierbare Linse
<b>ENIMAS</b>	<i>Entomoscope Imaging Software</i>
<b>EP</b>	Eintrittspupille
<b>EPDM</b>	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk
<b>FE</b>	Fokusebene
<b>FDM</b>	<i>Fused Deposition Modeling</i>
<b>FWC</b>	<i>Full Well Capacity</i>
<b>GPIO</b>	<i>General Purpose In- and Output</i>
<b>GUI</b>	<i>Graphical User Interface</i>
<b>IAI</b>	Institut für Automation und angewandte Informatik
<b>i<sup>2</sup>c</b>	<i>Inter-Integrated Circuit</i>
<b>LED</b>	<i>Light Emitting Diode</i>
<b>MOSFET</b>	<i>Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor</i>
<b>MP</b>	Megapixel
<b>ONT</b>	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
<b>OSF</b>	<i>Open Science Framework</i>
<b>OSH</b>	<i>Open Source Hardware</i>
<b>OSS</b>	<i>Open Source Software</i>
<b>PC</b>	<i>Personal Computer</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxan
<b>PP</b>	Polypropylen
<b>PWM</b>	Pulsweitenmodulation

<b>RGB</b>	Rot-Grün-Blau
<b>ROI</b>	<i>Region of Interest</i>
<b>SCARA</b>	<i>Selective Compliance Assembly Robot Arm</i>
<b>SE</b>	Sensorebene
<b>SMD</b>	<i>Surface Mounted Device</i>
<b>SPI</b>	<i>Serial Peripheral Interface</i>
<b>SSD</b>	<i>Solid State Drive</i>
<b>SVM</b>	Support Vector Machine
<b>TCP</b>	<i>Tool Center Point</i>
<b>USB</b>	<i>Universal Serial Bus</i>
<b>WEF</b>	<i>World Economic Forum</i>

# 1 Einleitung

In diesem Einleitungskapitel wird, nach der Motivation und der Zielsetzung, welche auch die Forschungsfragen umfasst, die Gliederung der Arbeit dargelegt.

## 1.1 Motivation

Der Rückgang der biologischen Vielfalt, die sogenannte Biodiversität, stellt unsere Gesellschaft vor große Herausforderungen. Daher wird dieser auch im globalen Risikobericht 2023 [1] des *World Economic Forum (WEF)* als einer der größten Bedrohungen der nächsten zehn Jahre eingestuft. Insgesamt wird geschätzt, dass rund 80 % aller Tierarten der Wissenschaft noch unbekannt sind [2]. Wird die Fauna, also die Summe aller Tiere auf der Erde betrachtet, zeigt sich, dass Arthropoden (Gliederfüßler, zu denen auch die Insekten gehören) einen Großteil der Biomasse ausmachen [3]. Gleichzeitig sind nach dem *Catalogue of Life (CoL)* im Reich der Tiere (Animalia) mehr als dreiviertel der beschriebenen Tierarten Arthropoden (rund 1.172.200 Arten). Davon sind rund eine Millionen der beschriebenen Arten Insekten [4]. Dies stellt jedoch bei den Insekten nur einen Bruchteil der tatsächlichen Artenvielfalt dar [5]. Diese Zahlen zeigen deutlich, dass ein effektiver Schutz der gesamten Biodiversität auch einen effektiven Schutz der Biodiversität unter Insekten nicht außer Acht lassen kann. Dazu müssen wirksame Maßnahmen getroffen werden, um die biologische Vielfalt zu schützen. Dies erfordert auch Methoden, um die Wirksamkeit dieser Maßnahmen beurteilen zu können [6]. Zudem spielen Insekten eine wichtige Rolle in vielen Ökosystemen. Dabei sind sie beispielsweise für die Bestäubung [7–9] und die Kompostierung [10, 11] ein wichtiger Bestandteil von Ökosystemen oder dienen als Nahrungsquelle [12] für andere Tiere. Damit haben sie auch einen immensen Einfluss auf den Menschen, beispielsweise als wichtiger Bestandteil landwirtschaftlicher Nutzflächen [13, 14]. Um Insekten jedoch effektiv schützen zu können und um beispielsweise Effekte des Klimawandels, wie die Einwanderung invasiver Arten nachvollziehen zu können, ist eine genaue Artenkunde notwendig. Für charismatische Taxa, wie Schmetterlinge oder Libellen, ist diese bereits zum Großteil vorhanden. Bei sogenannten *'dark taxa'* ist das nicht der Fall. Dabei handelt es sich um Gruppen von Arthropoden mit kleiner Körpergröße, von denen weniger als 10 % der Arten beschrieben sind und deren Diversität 1.000 Arten überschreitet [15]. Die Erforschung dieser Gruppen ist aufgrund ihres enormen Artenreichtums und der geringen Größe sehr aufwendig und daher langsam. Aus diesem Grund werden sie derzeit häufig ignoriert oder nur einige Spezies

werden für Studienzwecke ausgewählt [15, 16]. Ein Überblick über alle Arten ist in dieser Gruppe so jedoch nicht möglich. Hinzukommt ein zunehmender Mangel an Expert:innen.

Dringend notwendig sind demnach Methoden, mit denen Insekten, insbesondere solche aus *dark taxa*, schnell, einfach und kostengünstig bestimmt werden können. Unbekannte Arten können so beschrieben und die Wissenslücke verkleinert werden. Hierzu bietet sich die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Biologie, Ingenieurwesen und Informatik an. Durch die interdisziplinäre Kombination von Methoden aller Fachrichtungen lässt sich bislang ungenutztes Potenzial ausschöpfen. Im Feld der Biologie bietet die Ermittlung des DNA<sup>1</sup>-Barcodes die Möglichkeit, Arten eindeutig zu bestimmen. Dieser ursprünglich sehr teure Prozess wird durch Verwendung neuer Technologien immer kosteneffizienter [17] und eignet sich inzwischen auch zur Prozessierung von Massenproben, wie sie zur Untersuchung der Biodiversität unter Insekten geläufig sind. Im Ingenieurwesen können Methoden der Automatisierung Verwendung finden, um bislang manuell ausgeführte und sich wiederholende Prozesse zu beschleunigen. Zudem schafft die Informatik mit Methoden der Bildverarbeitung und insbesondere mit Methoden des maschinellen Lernens neue Möglichkeiten für die Erforschung der Biodiversität unter Insekten.

### 1.1.1 Biodiversitätsforschung unter Insekten

Ein weitgreifendes Verständnis der Biodiversität, also bspw. welche Arten zu welcher Zeit an welchem Ort vorkommen und wie häufig diese anzutreffen sind, welche bekannten Arten zurückgehen oder welche neuen, invasiven Arten vorkommen, ist für ihren Erhalt essenziell. So werden schon seit langem Insekten gesammelt und konserviert. Grundsätzlich wird dabei auf zwei Konservierungsmethoden zurückgegriffen: Nass- und Trockenkonservierung [18]. Während zur Trockenkonservierung die Insekten einzeln präpariert werden müssen, eignet sich die Nasskonservierung auch für Massenproben, bei denen oft mehrere tausend Individuen in einem Behälter vorzufinden sind (vgl. Abbildung 1.1). Als Konservierungsmittel wird dabei häufig Ethanol mit einer Konzentration von 80 % verwendet [18–20]. Eine Konzentration von 80 % Ethanol ist dabei ein Kompromiss. Zum besseren Erhalt der *DNA* sind höhere Konzentrationen zu bevorzugen, während zum Erhalt der Formbarkeit der Proben für morphologische Untersuchungen eine geringere Konzentration besser geeignet ist. Zudem bietet Ethanol mit einer Konzentration von 80 % den Vorteil, dass es im Vergleich zu höheren Konzentrationen langsamer verdunstet [20]. Zur Identifizierung der Proben war lange das manuelle Vereinzeln und die morphologische Untersuchung der Insekten die einzige Methode. Problematisch hierbei zeigt sich, dass die enorm große Anzahl beschriebener Spezies unmöglich von einer Person unterschieden werden kann. Daher spezialisieren sich Taxonom:innen

---

<sup>1</sup> Im deutschen Sprachgebrauch korrekter ist Desoxyribonukleinsäure (DNS). Da jedoch bestimmte Verfahren, wie das DNA-Barcoding, ausschließlich im englischsprachigen geprägt sind, wird in der vorliegenden Arbeit zur Konsistenz ausschließlich DNA als Abkürzung verwendet.



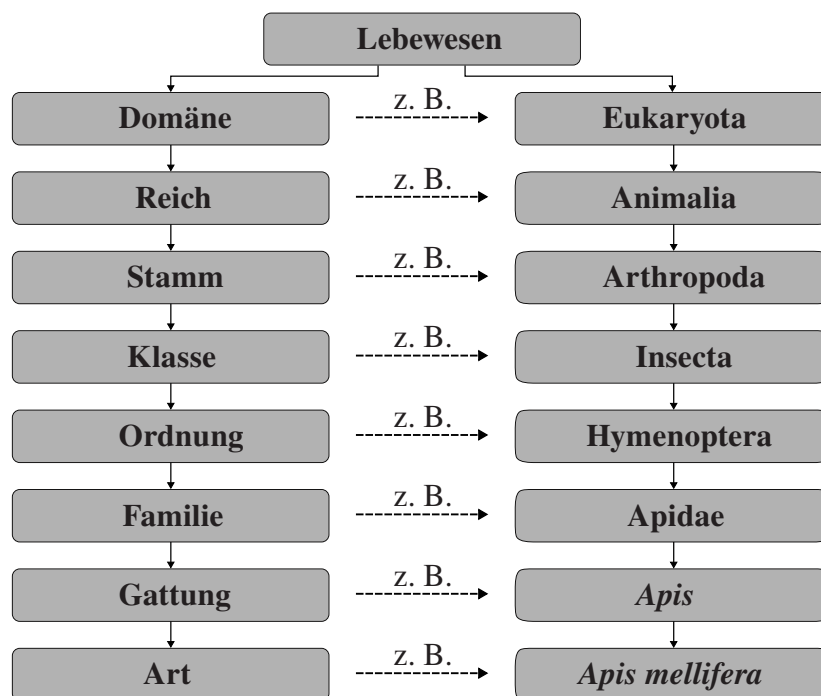
**Abbildung 1.1:** Insekten-Massenprobe. Mehrere tausend Insekten verschiedenster Größen werden in Ethanol konserviert. Die Vereinzelung und Klassifizierung stellen einen sehr aufwendigen und momentan fast ausschließlich manuell durchgeführten Prozess dar.

häufig auf eine bestimmte Ordnung oder Familie. Zur vollständigen Auswertung solcher Massenproben werden daher viele Expert:innen benötigt. Anfang der 2000er Jahre wurde mit dem DNA-Barcoding eine neue Methode gefunden, um Lebewesen anhand einer kurzen, standardisierten DNA-Sequenz aus einem bestimmten Gen eindeutig zu identifizieren [21]. Bis heute hat sich diese Methode zu einer kostengünstigen Möglichkeit entwickelt, Tiere und insbesondere Insekten eindeutig zu identifizieren [17].

Die Untergliederung von Lebewesen wird häufig in der von Carl von Linné ursprünglich beschriebenen taxonomischen Klassifizierung vorgenommen. Dabei werden sie hierarchisch in taxonomische Niveaus untergliedert (vgl. Abbildung 1.2). Von Lebewesen bis Art, findet so eine immer feinere Untergliederung statt. Für die jeweiligen Niveaus existieren zudem noch Unterstufen [22].

### 1.1.2 Gängige Fangmethoden für Insekten

Zum Fangen fliegender Insekten werden verschiedene Fallen genutzt. Beispielsweise Netzfallen, Schalenfallen, Lichtfallen, Pheromonfallen und Klebefallen [18]. Die im Umfang der vorliegenden Arbeiten entwickelten Methoden beziehen sich auf Proben, die entweder mittels Netzfallen, im Speziellen Malaise Fallen oder Schalenfallen, gesammelt werden. Auch wenn die Methoden teilweise oder mit Anpassungen auf mit anderen Fallen gesammelte Massenproben übertragbar sind, wird im Folgenden darauf verzichtet, alle Arten von Fallen im Detail vorzustellen. Der Fokus wird daher auf Malaise Fallen und Schalenfallen gelegt. Der Ansatz, Insekten zu fangen und zu töten, scheint zu Beginn kontraproduktiv, um die Erhaltung und den Schutz von Insekten voranzutreiben. Durch ihre geringe Größe, die vielen Arten und



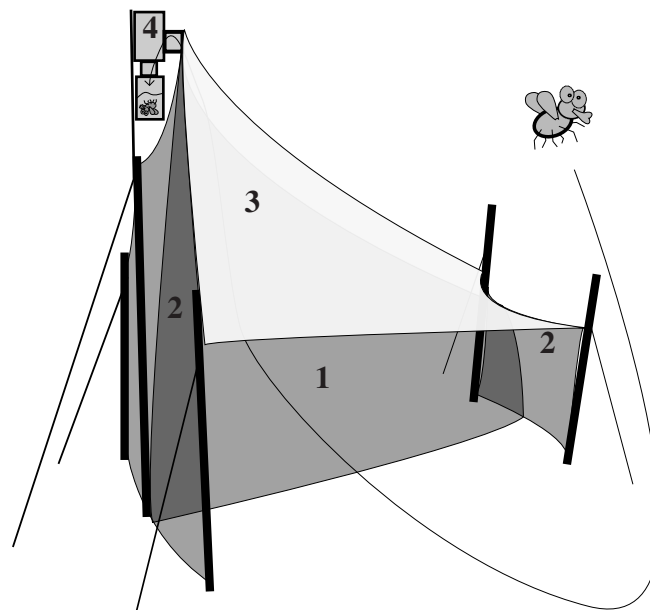
**Abbildung 1.2:** Taxonomische Systematik der Lebewesen. Von Domäne zu Art wird immer feiner untergliedert [22]. Rechts ist beispielhaft die Systematik zur westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) dargestellt [4].

der hohen Quantität, ist eine Untersuchung im Feld jedoch kaum oder nur mit sehr großem Aufwand realisierbar.

## Malaise Falle

Eine der gängigsten Fallen zum Fangen fliegender Insekten ist die Malaise Falle. Erstmals beschrieben wurde die Falle von René Malaise im Jahr 1937 [23]. Mittlerweile existieren viele verschiedene Varianten der Malaise Falle (bspw. [24–27]). Heute genutzte Fallen basieren häufig auf dem Entwurf von Townes (1962, [24]), den er 1972 [26] weiterentwickelt hat [28]. Sie besteht aus einem Zelt aus Netz, das an den Seiten geöffnet ist (vgl. Abbildung 1.3). Insekten treffen im Flug auf die in der Mitte der Falle vertikal verlaufende Trennwand (1). Diese, sowie die Stirnnetze der Falle (2) sind aus einem dunklen, sehr feinmaschigen Netz ( $< 200 \mu\text{m}$  [20]) gefertigt. Das Dach des Zeltes (3) hingegen wird häufig aus einem helleren Netz gleicher Maschenweite gefertigt. Die Verwendung eines weißen Netzes für das Dach der Falle soll die positive Phototaxis der Insekten nutzen und so verhindern, dass sie die Falle an den Seiten verlassen und ihre Tendenz nach oben zu wandern verstärken [20]. Allerdings besteht die Gefahr, dass die weiße Farbe Taxa anzieht, die für gewöhnlich Blüten anfliegen. Dieser Effekt kann die Fangmengen erhöhen, aber auch einen Einfluss auf die Verteilung der gefangenen Taxa haben [28]. Der hell-dunkel-Unterschied sowie die Tendenz fliegender Insekten Hindernissen nach oben auszuweichen [29] führen dazu, dass sie entlang der Trennwand nach oben geleitet werden. Am oberen Ende des Giebels der Falle ist ein

mit Ethanol gefüllter Sammelbehälter (4) befestigt. In diesem Behälter werden die Insekten getötet und konserviert. Der Sammelbehälter besteht häufig aus zwei an der Gewindeseite miteinander verbundenen Polypropylen (PP) Flaschen, wie sie in der Biologie häufig zur Aufbewahrung von Proben verwendet werden. Die obere Flasche ist dabei fest mit der Falle verbunden. Die untere wird mit Ethanol befüllt und meist zusätzlich verdunkelt an die obere Flasche geschraubt. Dies ermöglicht ein schnelles Auswechseln des Probenbehälters. Die Verdunklung dient zum Schutz der Proben vor direkter Sonneneinstrahlung und somit dem Schutz der DNA [20].



**Abbildung 1.3:** Malaise Falle nach Townes [26] mit (1) Trennwand (dunkel), (2) Stirnnetze (dunkel), (3) Dachnetz (hell), (4) Ethanol gefüllter Sammelbehälter, modifiziert nach [18]. Insekten treffen im Flug auf die Trennwand und fliegen nach oben. Durch das schräg angestellte Dach werden sie in Richtung des Fangbehälters geleitet. Dort werden sie in Ethanol konserviert.

Die Anzahl gefangener Insekten, sowie die zugehörige Biomasse hängen stark vom Standort der Falle, der Art der Falle, der Jahreszeit und dem Wetter ab [20, 29]. In Tabelle 1.1 sind verschiedene Studien und die Anzahl gefangener Insekten pro Tag bzw. die gefangene Masse pro Tag aufgeführt. Aufgrund der ausschließlich manuell ausgeführten Evaluation sind trotz der Vielzahl an Malaise Fallen Studien, nur wenige Studien verfügbar, in denen die Auswertung vollständiger Fallen vorgenommen wird. Häufig wird die Effizienz von Malaise Fallen ausschließlich für einzelne Taxa untersucht [30–33]. Die größte Datengrundlage nutzt die Studie von Karlsson et al. (2019) [20], die insgesamt 38 vollständig ausgewertete Malaise Fallen Massenproben umfasst. Den größten Durchschnittswert von gefangenen Insekten pro Tag beschreiben ebenfalls Karlsson et al. (2019) [20] mit 477 Insekten pro Tag. Gleichzeitig beobachtet er jedoch auch den kleinsten Minimalwert von nur zwei Insekten pro Tag. Den

größten Maximalwert weist die Studie von Steinke et al. (2017) [34] mit 3.214 Insekten pro Tag auf. Auch wenn die geringe Anzahl verfügbarer Studien schlecht eine Mittelwertbildung zulassen, zeigt sich bereits, dass starke Unterschiede beobachtet werden können. Außerdem zeigt sich, dass es möglich ist, dass eine einzige Massenprobe bereits nach zwei Wochen nahezu 45.000 Insekten beinhalten kann.

**Tabelle 1.1:** Durchschnittliche Fangzahlen von Malaise Fallen verschiedener Quellen in 'Insekten pro Tag' (gerundet auf ganzzahlige Werte) bzw. 'Masse pro Tag'. Soweit bekannt wird zudem der Maximalwert und Minimalwert mit angegeben. NaN (Not a Number) - Wert wird in der Studie nicht genannt.

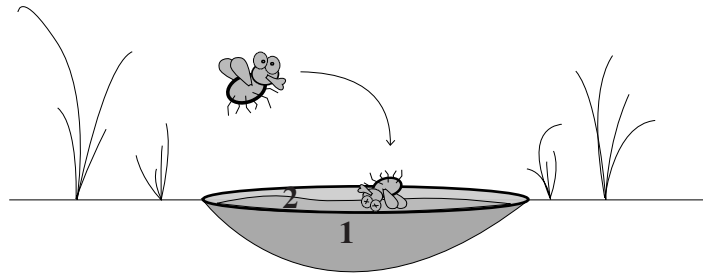
Quelle	Ø Insekten pro Tag	Max Min	Ø Masse pro Tag [g]	Max [g] Min [g]
Karlsson et al., 2019 [20]	477	3.025 2	NaN	- -
Uhler et al., 2022 [28]	NaN	- -	3,05	- -
Matthews and Matthews, 1971 [29]	259	749 36	NaN	- -
Steinke et al., 2017 [34]	75	3.214 3	NaN	- -

Malaise Fallen sind durch ihren Aufbau für den Fang fliegender Insekten konzipiert, weshalb ein Großteil der gefangenen Taxa auch diesen zuzuordnen ist. Größere fliegende Insekten, wie Libellen und Schmetterlinge, sind in Malaise Fallen Proben jedoch eher selten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese aufgrund ihrer guten visuellen Wahrnehmung die Falle als Hindernis erkennen und umfliegen. Zusätzlich zu fliegenden Insekten sind in Proben aus Malaise Fallen auch flügellose Taxa zu finden. Dabei handelt es sich einerseits um am Boden lebende Insekten, welche das Netz nach oben krabbeln, und andererseits um Insekten, die andere Insekten als Wirt für den Transport nutzen, sogenannte phoretische Arten [20].

Zusätzlich zu den klassischen Malaise Fallen, existieren mittlerweile auch erste Forschungsergebnisse zu technifizierten Fallen. Dabei gibt es den Ansatz, die Falle um Sensorik zu ergänzen, um Wetter- und Umgebungsdaten zu sammeln und zusätzlich den Fangbehälter automatisiert nach Zeitintervallen zu wechseln [35]. Dieses System bietet zwar eine zeitlich genauere Auflösung der gefangenen Insekten, hält jedoch weiter daran fest, die Insekten für die Studie zu konservieren. Weiterhin existieren aber auch erste Versuche zur Implementierung von Lebendfallen, bei denen die Insekten nicht getötet, sondern nur fotografiert werden [36].

## Schalenfalle

Eine weitere häufig verwendete Fangmethode ist die Verwendung von Schalenfallen [37–40]. Dabei werden farbige Schalen am Probenahmestandort aufgestellt (vgl. Abbildung 1.4) und mit Wasser gefüllt. Zusätzlich werden einige Tropfen Spülmittel hinzugefügt, um die Oberflächenspannung zu reduzieren. Die Form der Schalen ist dabei weniger entscheidend



**Abbildung 1.4:** Schalenfalle mit (1) Fangschale, (2) Seifenwasser. Insekten werden durch die meist farbigen, oft gelben Fallen angezogen. Durch die, durch Seife reduzierte Oberflächenspannung, ertrinken die Insekten in der Flüssigkeit und können später in Ethanol konserviert werden.

als die Farbe. Als Schalen können beispielsweise lackierte Pflanzenuntersetzer [33] oder einfache Kunststoffbehälter [37, 38] verwendet werden. Es werden sowohl runde [37, 38] als auch eckige [33] Formen mit unterschiedlichen Größen ( $0,04 \text{ m}^2$  [37] -  $0,15 \text{ m}^2$  [33]) beschrieben. Die Farben werden so gewählt, dass sie im visuellen Spektrum der Insekten liegen und geläufige Blütenfarben repräsentieren. Im Gegensatz zur Malaise Falle handelt es sich daher um eine aktive Falle, die Insekten gezielt anlockt. Durch die Farbwahl kann so auch in bestimmten Rahmen selektiert werden, was gefangen wird. Grundsätzlich handelt es sich dabei meist aber um blütenbesuchende Insekten [38].

### 1.1.3 Konventionelle Bestimmungsmethoden für Insekten

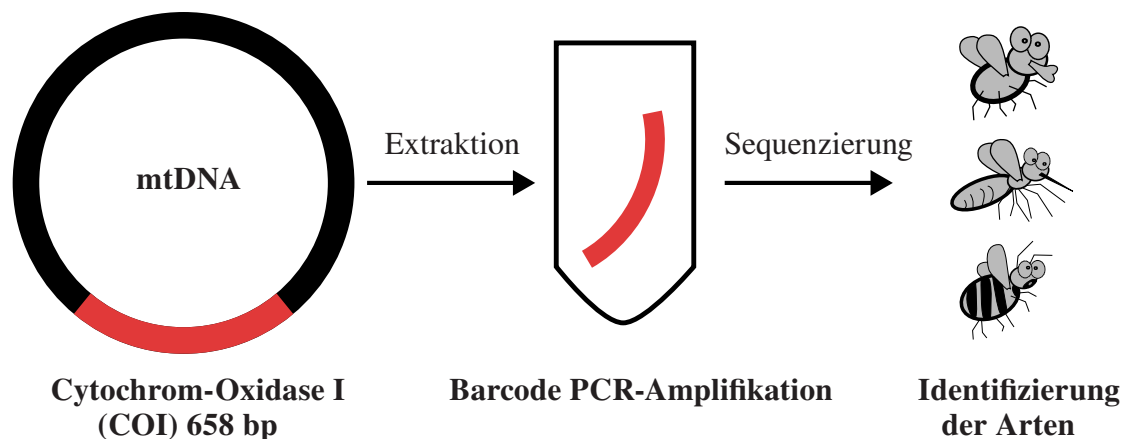
Die Bestimmung von Insekten ist die essenzielle Grundlage, anhand derer die Biodiversität ermittelt werden kann. Dabei stellt die Bestimmung auf Artniveau die größte Herausforderung dar. Die morphologischen Merkmale, anhand derer sich Arten unterscheiden, sind häufig nur unter dem Mikroskop und nach Sezierung erkennbar [16]. Hinzu kommt, dass sich unterschiedliche Entwicklungsstufen sowie männliche und weibliche Tiere einer Art morphologisch stark unterscheiden können [41]. Sämtliche hier beschriebenen Methoden haben den entscheidenden Nachteil, dass die zu bestimmenden Insekten zur Klassifizierung gefangen und getötet werden müssen. Dies stellt insbesondere dann ein Problem dar, wenn beispielsweise in Naturschutzgebieten geforscht werden soll, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch besonders bedrohte Arten in den Fallen landen [6].

### **Bestimmung durch Expert:innen anhand der Morphologie**

Die klassische Bestimmung von Insekten erfolgt für gewöhnlich durch Expert:innen. Diese Taxonominnen und Taxonomen können anhand von morphologischen Merkmalen wie Größe, Farbe, Form, Flügeln, Fühlern und anderen anatomischen Strukturen eine Klassifizierung vornehmen. Dieses Vorgehen erfordert viel Erfahrung, Fachwissen und auch, dass sich Entomolog:innen auf bestimmte Ordnungen oder sogar Familien spezialisieren. Eine genaue Artenkenntnis über mehrere Ordnungen hinweg scheitert an der hohen Anzahl an Insektenarten. Stand 2024 (8. Januar) sind im *CoL* rund 971.600 Insektenarten beschrieben [4]. Diese rund eine Million beschriebener Arten stellen dabei (wie in Kapitel 1.1 beschrieben) allerdings nur einen kleinen Teil der tatsächlich vorkommenden Biodiversität unter Insekten dar. Zur Auswertung von Massenproben sind demnach mehrere Expert:innen notwendig. Dies verlangsamt die ohnehin schon mühsame und dadurch langsame Arbeit noch weiter. Bei der Auswertung von Massenproben ist daher die Sortierung auf Artenebene eher die Ausnahme und häufig auf einige wenige Taxa mit moderater Anzahl an Arten beschränkt. Häufig wird ein zweistufiger Prozess genutzt, um auf Artniveau zu sortieren. Im ersten Schritt werden die Proben in einfach zu unterscheidende Taxa vorsortiert. Dies erfolgt meist durch Para-Taxonomen mit grundlegendem Fachwissen, wie Studierende. Im zweiten Schritt, der deutlich komplexer ist, werden die vorsortierten Proben auf Artniveau sortiert. Diese Methode ist jedoch nur für Taxa geeignet, die wenige Exemplare und wenige Arten beinhalten [16] und hat entscheidende Nachteile. Zum einen werden für die Vorsortierung viele Personen benötigt, um die Aufgabe in angemessener Zeit durchzuführen. Zum anderen ist das Vorsortieren oft ungenau, da diese zeitaufwendige und arbeitsintensive Aufgabe schnell ermüdend ist. [6, 16]. Hinzu kommt, dass beschädigte Insekten und unterschiedliche Entwicklungsstadien dazu führen können, dass es zu Fehlern bei der Klassifizierung kommt oder diese nicht möglich ist [6].

### **Bestimmung mittels DNA**

Zur eindeutigen Klassifizierung von Insekten kann alternativ oder zusätzlich zur Klassifizierung anhand der Morphologie auch deren DNA genutzt werden [6]. Dazu wird der sogenannte DNA-Barcode genutzt [21]. Dabei handelt es sich häufig um eine 658 Basenpaare (bp) lange DNA Sequenz im mitochondrialen Gen, der Cytochrom-Oxidase I (COI). Der grundlegende Prozess ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Die zuvor extrahierte DNA-Sequenz wird mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Amplifikation vermehrt und anschließend sequenziert. Die Barcodes können dann mit Datenbanken abgeglichen werden, um Arten, deren DNA-Barcode bekannt ist, zu identifizieren. Das DNA-Barcoding ist eine schnelle, kosteneffiziente Methode, die zudem skalierbar ist, sodass sie sich zur Identifizierung tausender Insekten eignet [6].



**Abbildung 1.5:** DNA-Barcoding Prozess. Die 658 bp lange DNA-Sequenz im mitochondrialen Gen der COI wird zur Identifizierung von Arten genutzt. Dazu wird mittels PCR die Sequenz vervielfältigt. Anschließend kann eine Artenbestimmung stattfinden. Modifiziert nach [6].

Zur Auswertung von Massenproben werden meist zwei verschiedene Arten der DNA Bestimmung unterschieden. Das DNA-Barcoding einzelner Tiere, sowie das Metabarcoding vollständiger Massenproben.

**DNA-Barcoding einzelner Insekten:** Durch das DNA-Barcoding einzelner Insekten kann der Barcode eindeutig einem Insekt zugeordnet werden. Dafür ist zunächst eine Vereinzelung der Tiere notwendig. Durch die Auswertung vollständiger Massenproben können somit genaue Aussagen über die Abundanz und das Vorkommen einzelner Arten getroffen werden. Zudem können unbekannte Barcodes einem bestimmten Insekt zugeordnet werden, was die Beschreibung neuer Arten ermöglicht. Der von Wang et al. (2018) [42] beschriebene 'umgekehrte Arbeitsablauf', schlägt vor, die Insekten zunächst zu vereinzeln und anschließend deren DNA-Barcode zu bestimmen. Der Prozess der DNA-Extraktion hinterlässt keinen oder nur minimalen Schaden an den Insekten, was eine anschließende morphologische Untersuchung ermöglicht. Die Sortierung auf Artniveau erfolgt schließlich anhand der DNA, was eine höhere Genauigkeit als das manuelle Sortieren ermöglicht. Zudem ist der Prozess zumindest teilweise automatisierbar. Der Nachteil dieser Methode sind die hohen Kosten, die anfallen, wenn die klassische *Sanger*-Sequenzierung genutzt wird. Neue Hochdurchsatzmethoden zur Sequenzierung können die Kosten aber stark reduzieren [42]. Heute können einzelne Barcodes mithilfe von *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) MinION Sequenzierern bereits für unter 0,10 \$ gewonnen werden, die Kosten um ein vollständiges DNA-Labor aufzubauen belaufen sich auf ca. 10.000 \$ [17]. Die Genauigkeit beim Sequenzieren mittels ONT MinION hat sich in den vergangenen Jahren stetig verbessert und ist bei der neuesten Version mit 99 % sehr hoch [43].

**DNA-Metabarcoding:** Beim DNA-Metabarcoding findet keine Vereinzelung der Individuen statt. Stattdessen werden die Massenproben direkt ausgewertet. Die DNA-Extraktion erfolgt

direkt aus der vollständigen Probe [44]. Das Wegfallen der Vereinzelung stellt eine immense Zeitersparnis gegenüber dem DNA-Barcoding einzelner Insekten dar, bringt aber auch Nachteile mit sich. So kann nur festgestellt werden, welche Barcodes in einer Probe vorhanden sind. Eine Zuordnung des Barcodes zu einzelnen Individuen ist nicht möglich. Die Beschreibung unbekannter Arten kann somit ausschließlich anhand des Barcodes, nicht aber anhand der Morphologie erfolgen. Zudem sind auch keine Aussagen über Abundanzen möglich. Weiterhin wird die Massenprobe zur DNA-Extraktion häufig homogenisiert, die Probe somit zerstört [45, 46]. Folgestudien unter Einbeziehung gegebenenfalls zukünftig zur Verfügung stehenden Technologien sind somit nicht möglich. Es bestehen jedoch auch zerstörungsfreie Methoden zur DNA-Extraktion [47, 48]. Die zuvor genannten Limitationen bleiben jedoch bestehen.

## 1.2 Zielsetzung und Forschungsfragen

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Methoden zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung unter wirbellosen Tieren, insbesondere unter Insekten. Dazu soll zunächst das Potenzial zur Automatisierung untersucht und Arbeitsschritte, welche sich in der momentan manuell durchgeführten Arbeit zur Automation eignen, identifiziert werden. Anschließend werden diese untergliedert und individuell betrachtet. Für alle identifizierten Teilgebiete sollen Methoden vorgestellt werden, welche der Automatisierung des Gesamtprozesses zuträglich sind. Zur Evaluierung der Methoden sollen Funktionsmuster aufgebaut werden, die anhand zuvor definierter Anforderungen evaluiert werden. Der Fokus soll dabei auf der Auswertung von Massenproben, welche mittels Malaise Fallen gefangen wurden, liegen. Diese Proben sind häufig vertreten und deren Auswertung stellt aktuell eine große Herausforderung dar, da sie mehrere zehntausend Insekten beinhalten können.

Aus der Zielsetzung ergeben sich drei Forschungsfragen (F1 - F3), welche im Umfang der vorliegenden Dissertation beantwortet werden:

**F1: Wie kann Automatisierung die Biodiversitätsforschung bei wirbellosen Tieren unterstützen, welche Methoden eignen sich dafür und welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein?**

**F2: Wie können teilautomatisierte Systeme die Biodiversitätsforschung bei wirbellosen Tieren unterstützen?**

**F3: Welche Vor- und Nachteile bieten automatisierte Systeme und welche Möglichkeiten zur Implementierung bestehen?**

Zur Beantwortung von F1 sollen Bereiche identifiziert werden, die von einer Automatisierung generell profitieren würden, das heißt, welche durch eine Automatisierung beschleunigt werden könnten und wo durch die Automatisierung Möglichkeiten geschaffen werden, die mit manuellen Methoden bislang nicht vorhanden sind. Weiterhin sollen durch Beantwortung von F1 Methoden identifiziert werden, welche sich zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung eignen. Der Fokus dabei liegt auf der Reduktion der Kosten dieser Methoden und einer auch mit beschränkten Mitteln realisierbaren Reproduktion. Diese Fokussierung ist notwendig, um entwickelte Methoden weltweit und ohne finanzielle Hürden verfügbar zu machen. In Bezug auf die Untersuchung der Biodiversität von Insekten hat dies besondere Relevanz, da ein Großteil dieser in tropischen Regionen des globalen Südens anzutreffen ist. Gerade in diesen Regionen sind die finanziellen Mittel zur Erforschung der Biodiversität häufig stark eingeschränkt.

Durch Beantwortung von F2 soll aufgezeigt werden, wie bereits teilautomatisierte Systeme genutzt werden können, um die Biodiversitätsforschung bei wirbellosen Tieren zu unterstützen. Eine vollständige Automatisierung stellt nicht immer die optimale Lösung dar. Diese Forschungsfrage ist essenziell, um festzulegen, wo genau diese Grenze liegt und um zu beantworten, wo eine vollständige Automatisierung sinnvoll ist und wo (noch) nicht. Dazu sollen die einzelnen Anwendungsbereiche separat betrachtet und die Literatur auf bereits implementierte Methoden hin untersucht werden. Für den Fall, dass keine geeignete Methode existiert oder für den vorgesehenen Anwendungsfall Anpassungen notwendig sind, sollen diese implementiert, beziehungsweise angepasst werden. Zudem soll aufgezeigt werden, welche Vor- und Nachteile teilautomatisierte Systeme haben.

Zuletzt soll F3 beantworten, welche Vor- und Nachteile automatisierte Systeme bieten. Dazu soll untersucht werden, wie ein automatisiertes System implementiert werden kann, welche Komponenten dafür benötigt werden und was für Entomolog:innen relevante Funktionen eines solchen Systems sind.

## 1.3 Gliederung der Arbeit

**Kapitel 1** fokussiert sich auf eine Einleitung der Thematik. Diese beinhaltet die Motivation, die zudem die biologischen Grundlagen darlegt. Daraus ergibt sich die Zielsetzung, die die Forschungsfragen umfasst.

**Kapitel 2** untersucht mögliche Anwendungsbereiche, in denen Automatisierung in der Biodiversitätsforschung unterstützend wirken kann, bzw. neue Möglichkeiten eröffnet. Dazu werden verschiedene derzeit manuell durchgeführte Prozessschritte betrachtet, wie die Bildgebung, die Handhabung und die Klassifizierung und untersucht, in welchem Rahmen eine Automatisierung möglich ist. Zudem wird das Potenzial von *Open Science* und *Open Source* dargelegt und aufgezeigt, warum genau diese Herangehensweise für die Biodiversitätsforschung ideal

erscheint. Zuletzt wird eine Prozesskette zur automatisierten, systematischen Erforschung der Biodiversität unter Insekten vorgeschlagen.

**Kapitel 3** erläutert die für das Verständnis der Dissertation notwendigen technischen Grundlagen und umfasst Grundlagen zu Robotik, Handhabung, der Bildgebung kleiner Objekte und zur Klassifizierung mit maschinellem Lernen.

Anschließend ist die vorliegende Dissertation in vier Abschnitte untergliedert (I-IV). Diese Abschnitte befassen sich jeweils mit einzelnen Prozessschritten der vorgeschlagenen Prozesskette.

**Teil I** (Probenvorbereitung: Größenfraktionierung von Insekten in Ethanol) befasst sich mit der Vorbereitung der Insekten-Massenproben für die weitere Untersuchung. Dabei steht die Fraktionierung der Massenproben nach Größe der Insekten im Vordergrund (**Kapitel 4**), da dieser Schritt für viele folgende Prozessschritte eine Spezialisierung der Methoden auf verschiedene Größenklassen erlaubt.

**Teil II** (Teilautomatisierte Bildgebung von Insekten in Ethanol) beschreibt neue Entwicklungen zur teilautomatisierten Bildgebung von Insekten in Ethanol. Dieser Zwischenschritt hin zur vollständig automatisierten Bildgebung ermöglicht eine schnelle Reproduktion der Systeme und ist aufgrund der wenigen notwendigen Komponenten kostengünstig zu implementieren. In **Kapitel 5** werden zwei Versionen des 'Entomosscopes' vorgestellt und evaluiert. Zudem wird im folgenden Kapitel, **Kapitel 6**, die multiperspektivische Bildgebung untersucht. Auch hierfür wird eine neue Methode vorgestellt und implementiert. Der 'DiversityScanner-360°' ist ein System, welches Insekten aus Ethanol aus einer unbegrenzten Anzahl von Perspektiven abbilden kann.

**Teil III** (Automatisierte Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol) umfasst zwei Kapitel (Kapitel 7 und Kapitel 8). Beide Kapitel befassen sich mit der Methodenentwicklung zur vollautomatisierten Bildgebung. **Kapitel 7** legt dabei den Fokus auf die automatisierte Handhabung und Bildgebung mit einem neuen System, dem 'DiversityScanner'. Es wird der Stand der Technik untersucht und anschließend der DiversityScanner vorgestellt. **Kapitel 8** umfasst zudem neue Methoden zur Handhabung, die sich zur Integration in den DiversityScanner eignen.

**Teil IV** (Potenzial der Bildanalyse zur Klassifizierung und Untersuchung von Insekten) beschreibt in zwei Kapiteln, wie die generierten Bilder zur Klassifizierung mittels neuronaler Netze eingesetzt werden können (**Kapitel 9**) und wie eine Bestimmung morphometrischer Merkmale anhand der Bilder erfolgen kann (**Kapitel 10**).

**Kapitel 11** schließt die Arbeit mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse der vorangegangenen Teile und legt das Potenzial der entwickelten Methoden für die Biodiversitätsforschung unter Insekten dar. Dazu werden die Forschungsfragen anhand der gewonnenen Erkenntnisse beantwortet. Zuletzt wird ein Ausblick gegeben.

## 2 Untersuchung zum Potenzial der Automatisierung

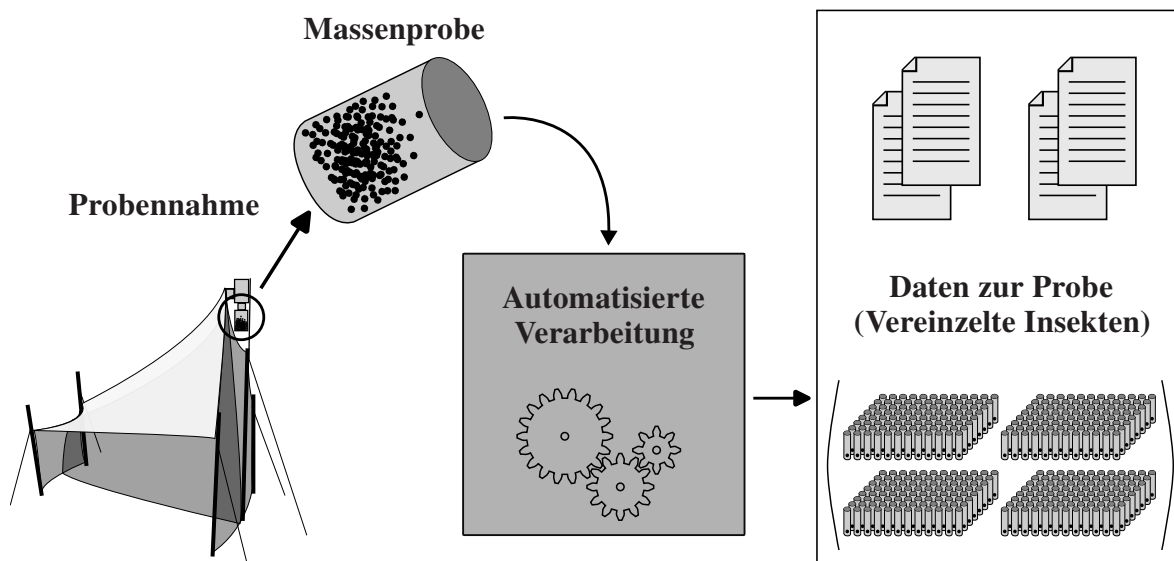
Um geeignete Strategien zur Unterstützung der Biodiversitätsforschung unter Insekten durch Automatisierung zu entwickeln, bedarf es zunächst einer Analyse, an welchen Stellen genau diese eingesetzt werden kann. Dazu wird zunächst die Vision der automatisierten Biodiversitätsforschung betrachtet. Daraus resultieren die Bereiche, welche das größte Potenzial bieten. Zuletzt wird eine Prozesskette zur Erforschung von Insekten vorgestellt. Diese umfasst verschiedene Aspekte der Automatisierung und legt dar, wo genau diese eingesetzt werden können, um einen effizienten Ablauf zur Untersuchung von Massenproben zu gewährleisten.

### 2.1 Vision der automatisierten Biodiversitätsforschung

Zur Erarbeitung potenziell geeigneter Prozessschritte zur Automation wird die Vision eines automatischen Systems zur Auswertung von Insekten-Massenproben (vgl. Abbildung 2.1) betrachtet. Die mittels Fallen gefangenen Insekten werden ohne Vorsortieren in eine Auswertungseinheit gegeben und vollständig automatisiert verarbeitet. Die Auswertungseinheit liefert alle Daten zur Probe. Diese beinhalten wichtige Faktoren, wie die gefangenen Arten, deren Häufigkeit (Abundanz) und Informationen beispielsweise zur Körperlänge oder Biomasse. Weiterhin umfassen diese Daten Bilder der einzelnen Insekten. Zusätzlich von Vorteil, aber nicht immer notwendig, ist eine Vereinzelung der Massenproben. Die gewonnenen Daten können digital ausgewertet werden und in Datenbanken für alle zugänglich gespeichert werden.

### 2.2 Handhabung, Vereinzelung und Sortierung

Als erster Schritt lässt sich hierbei die automatisierte Handhabung der Massenproben identifizieren. Für viele Prozesse stellt das Vereinzeln der Proben einen notwendigen Schritt in der Vorbereitung dar. Insbesondere für das *Deoxyribonucleic acid* (DNA)-Barcoding einzelner Insekten (vgl. Kapitel 1.1.3) ist es ein unerlässlicher Schritt. Die manuelle Durchführung ist



**Abbildung 2.1:** Vision der automatisierten Insekten-Biodiversitätsforschung. Gesammelte Proben werden automatisch verarbeitet. Dabei werden möglichst viele Daten zu den einzelnen Tieren gesammelt. Es werden unter anderem die Art, Biomasse, Größe und Bilder des Insekts erfasst. Anschließend liegen die Daten zur analysierten Probe vor. Weiterhin ist eine Vereinzelung der Proben anzustreben. Dies ist allerdings nicht für alle Anwendungsfälle notwendig.

zeitaufwendig und monoton. Demnach werden Methoden benötigt, um Insekten aus Massenproben automatisch handhaben zu können. Dies erlaubt Parallelisierung und damit eine Reduktion der notwendigen Verarbeitungszeit pro Probe, ohne den Einsatz von mehr Personal. Die automatisierte Handhabung von Objekten, welche sich in Größe und Form stark voneinander unterscheiden, wie es bei Insektenproben der Fall ist, stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Die Form und die Varianz der Insekten sind vorgegeben und lässt sich nicht beeinflussen. Die Größenunterschiede können jedoch eingeschränkt werden, wenn der Handhabung eine Größensortierung vorgelagert wird.

Die Kategorisierung der Insekten in Größenklassen ermöglicht eine anwendungsfallorientierte Entwicklung. Hierzu werden vier Größenklassen definiert, welche die gesamten in Malaise Fallen Proben vorkommenden Insektengrößen abdecken.

1. **Insekten < 3 mm:** Insekten dieser Größenkategorie machen einen Großteil der in Malaise Fallen Proben vorkommenden Insekten aus [49]. Durch die geringe Größe und hohe Anzahl stellen Insekten dieser Größenkategorie eine besondere Herausforderung dar. Die manuelle Sortierung findet häufig mit Pipetten unter Vergrößerung statt.
2. **Insekten von 3 mm - 8 mm:** Die manuelle Pipettierung von Insekten dieser Größenklasse ist nur eingeschränkt möglich. Häufig werden stattdessen Pinzetten verwendet. In der Entomologie werden dazu Federstahlpinzetten mit eng zulaufender Spitze genutzt [18].
3. **Insekten von 8 mm - 15 mm:** Die manuelle Sortierung ist für Insekten dieser Größenklasse nicht mit Pipetten möglich und wird daher mit Federstahlpinzetten durchgeführt.

4. **Insekten > 15 mm:** Insekten dieser Größenkategorie sind in Malaise Fallen Proben seltener vertreten. Aufgrund der Größe ist eine manuelle Sortierung mit Federstahlpinzetten relativ einfach [18]. Problematisch zeigt sich jedoch, dass sich in den Beinen der Insekten häufig kleinere Insekten verfangen.

## 2.3 Bildgebung

Die Bildgebung von Insekten ist bislang kein fester Bestandteil der Prozessierung von Massenproben, findet aber zur Beschreibung neuer Arten Verwendung. Sie bietet für die Automatisierung jedoch enorme Vorteile. Automatisierte Systeme müssen über geeignete Sensorik verfügen, um die zu automatisierende Aufgabe zufriedenstellend leisten zu können. Zur Erfüllung der häufig komplexen Aufgabenstellungen im Bereich der automatisierten Biodiversitätsforschung bieten sich dazu Kameras als Sensorik an. Diese liefern Daten, aus denen viele Informationen extrahiert werden können. Diese Informationen bieten wiederum viele Möglichkeiten zur Automatisierung der Prozesse. Zudem bieten Bilddaten den Vorteil, dass sie durch den Menschen meist leicht interpretiert werden können.

Unter Betrachtung der klassischen Vorgehensweise zur Untersuchung von Massenproben lassen sich zwei Bereiche identifizieren, welche sich unter Zuhilfenahme einer bildgestützten Sensorik potenziell zur Automatisierung eignen. Dabei handelt es sich um die Objekterkennung zur Vereinzelung der Insekten sowie die Klassifizierung der Insekten anhand von morphologischen Merkmalen. Die Anforderungen an die Bildgebung unterscheiden sich für beide Anwendungsfälle. Die **Bildgebung zur Klassifizierung** erfordert hochauflösende Detailaufnahmen der Insekten, um alle wichtigen, zur Klassifizierung notwendigen morphologischen Strukturen abzubilden. Zur automatisierten Klassifizierung anhand von Bildern ist es wichtig, dass die Detailaufnahmen nur ein Insekt abbilden. Auch hierfür ist die im vorangegangenen Kapitel (Kapitel 2.2) vorgenommene Unterteilung in Größenklassen von Nutzen. Die Optik zur Aufnahme der Detailbilder kann damit für jede Größenklasse festgelegt werden. Kleine Insekten der ersten Größenkategorie ( $< 3$  mm) können dadurch ebenso abgebildet werden wie diejenigen der größten Größenklasse ( $> 15$  mm), ohne dass entweder ein Großteil des Bildes nur Hintergrund darstellt, die Insekten sehr weit auseinander liegen müssen oder das Insekt im Bild abgeschnitten wird. Zudem muss auf eine geeignete Belichtung geachtet werden, um sowohl helle als auch dunkle Strukturen gut abbilden zu können. Weiterhin müssen Reflexionen vermieden werden. Die **Bildgebung zur Objekterkennung** stellt andere Anforderungen an die Bildgebungseinheit. Um einzelne Insekten sicher voneinander und vom Hintergrund unterscheiden zu können, ist ein möglichst hoher Kontrast notwendig. Zudem muss ein Bereich abgebildet werden können, in dem möglichst viele Insekten ausgebreitet werden können.

## 2.4 Klassifizierung

Die Klassifizierung der Insekten kann grundsätzlich auf zwei Arten automatisiert werden. Entweder durch eine Automatisierung der Klassifizierung anhand morphologischer Merkmale oder durch Automatisierung des DNA-Barcoding Prozesses. Die vollständige Automatisierung des DNA-Barcodings ist aus biologischer Sicht jedoch nicht notwendig, da viele Prozesse parallelisiert werden können, wodurch mit geringem zeitlichem und personellem Aufwand schnell große Proben verarbeitet werden können. Dies gilt jedoch nicht für die Vereinzelung der Insekten in Vorbereitung für das DNA-Barcoding einzelner Tiere. Diese stellt bislang einen Engpass dar und kann durch die automatisierte Handhabung (vgl. Kapitel 2.2) unterstützt werden. Gegenteilig dazu würde die Klassifizierung anhand morphologischer Merkmale stark von Automatisierung profitieren. Die Notwendigkeit, viele Expert:innen zu konsultieren, um eine vollständige Massenprobe zu klassifizieren, würde wegfallen. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Digitalisierung der Insekten (vgl. Kapitel 2.3). Anhand der Bilddaten kann dann eine Klassifizierung vorgenommen werden. Erste Studien hierzu (bspw. [50]) zeigen, dass sich die Verwendung von Methoden des maschinellen Lernens dazu eignen könnten.

## 2.5 Potenzial von *Open Science* und *Open Source*

Die Erforschung der Artenvielfalt unter Insekten ist weltweit ungleich verteilt. Eine Publikation von Sánchez-Bayo et al. (2019) [51] untersucht den Rückgang von Insekten. Dabei wurden Studien zum Rückgang von Insekten gesammelt und unter anderem grafisch auf einer Weltkarte verzeichnet. Es fällt auf, dass ein Großteil der durchgeführten Studien in Europa oder Nordamerika angesiedelt sind. Tropische Regionen mit sehr hoher Biodiversität sind kaum vertreten. Diese ungleiche Verteilung lässt sich nicht nur bei Studien zum Rückgang der Biodiversität feststellen, sondern betrifft auch die Anzahl beschriebener Arten. Obwohl in tropischen Regionen eine deutlich höhere Biodiversität geschätzt wird, ist ein Großteil der Arten für gemäßigte Regionen wie große Teile von Europa und der USA beschrieben [5]. Die Gründe dafür sind vielschichtig, ein Grund ist jedoch mit Sicherheit auch die Verfügbarkeit von Forschungsmitteln und somit der Zugang zu Methoden zur Erforschung der Biodiversität nach Stand der Technik. Der Zugang zu Forschungsmitteln ist in Ländern mit geringem Einkommen oft schwierig [52].

Einen möglichen Lösungsansatz bietet *Open Science*. Die Offenlegung sämtlicher Forschungsergebnisse zu Methoden der Erforschung der Biodiversität und die Publikation der Ergebnisse in wissenschaftlichen *Open Access* Zeitschriften reduzieren finanzielle Hürden im Zugang zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen. Dies allein ist jedoch noch nicht zielführend, da bei der Entwicklung der Methoden auch in Betracht gezogen werden muss, dass die Verwendung teurer Soft- und Hardware in ressourcenschwachen Institutionen nicht immer möglich ist.

Daher sollte die Entwicklung neuer Methoden zur Erforschung der Biodiversität auf Elemente von *Open Source Software* (OSS) und *Open Source Hardware* (OSH) zurückgreifen. Während OSS schon weit verbreitet ist, folgt in den vergangenen Jahren auch immer mehr OSH [53]. Die Konzeption und Realisierung von selbstgebaute Labor-Equipment ist keine neue Idee. Fortschrittliche Technologien wie der 3D-Druck sowie Mikrocontroller wie Arduino und Einplatinencomputer wie der Raspberry Pi eröffnen jedoch neue, vielversprechende Möglichkeiten [52, 54]. Das beginnt bei einfachen Bedarfsgegenständen wie Trichtern und Probenhaltern, kann aber auch kostenintensives Equipment wie beispielsweise Zentrifugen ersetzen. Auch wenn selbst entwickelte Soft- und Hardware Nachteile mit sich bringt, wie z. B. fehlende Garantie und technischer Support, überwiegen die Vorteile. Insbesondere der Preis ist dabei ausschlaggebend. Selbst entwickelte Hardware kostet häufig nur 1 % - 10 % von kommerziell verfügbaren Systemen und ist daher viel leichter zugänglich. Aber auch die bessere Anpassbarkeit von Systemen auf spezifische Anwendungsfälle ist deutlich einfacher, wenn beispielsweise alle notwendigen *Computer Aided Design* (CAD)-Dateien vorliegen [52].

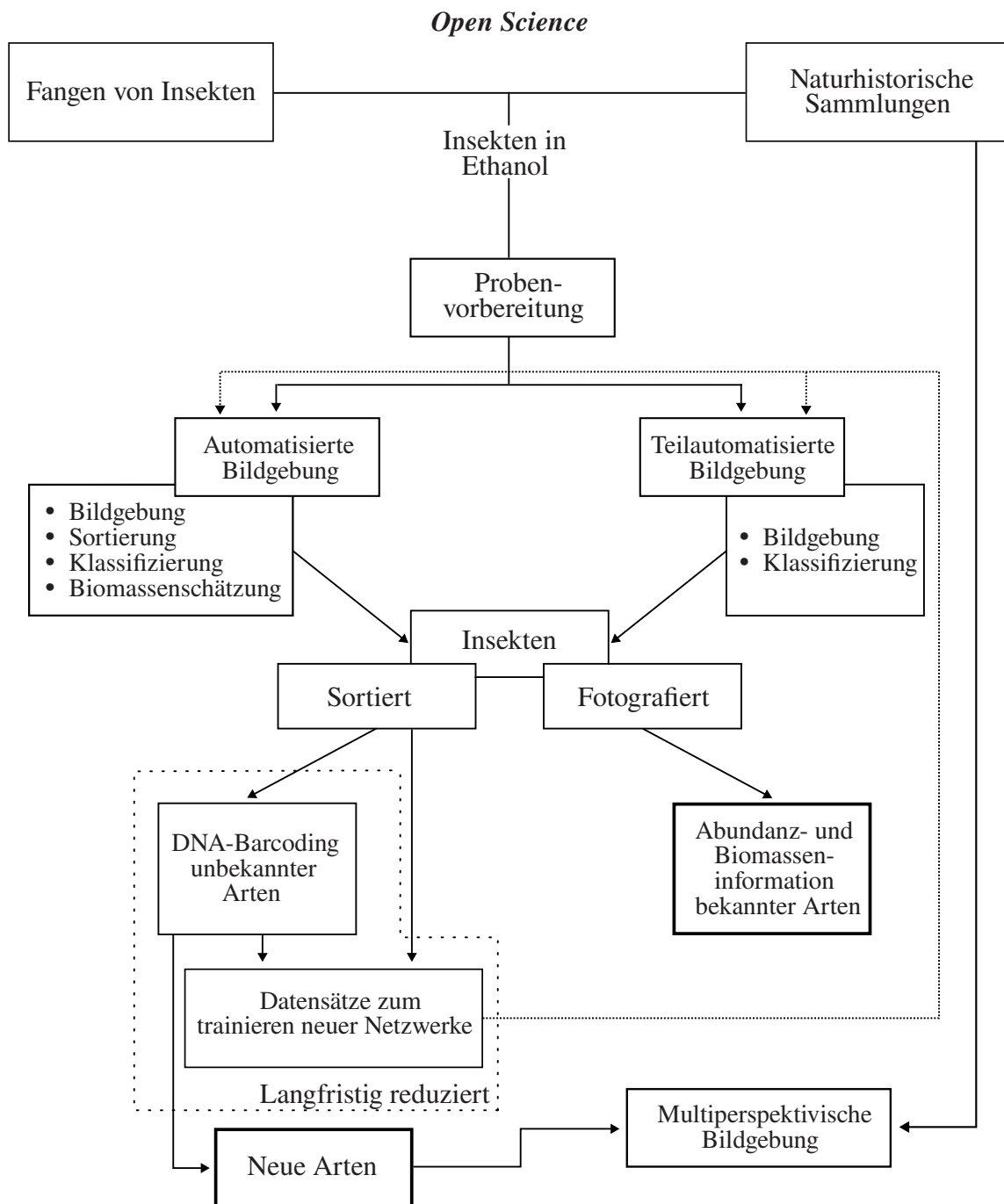
## 2.6 Prozesskette zur Erforschung von Insekten

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wührl, L. Keller, N. Klug, H. Shirali, R. Meier, und C. Pylatiuk, „Automated handling of biological objects with a flexible gripper for biodiversity research,” *at - Automatisierungstechnik*, Vol. 72, Nr. 7, S. 672–678, 2024. doi: 10.1515/auto-2023-0238.

Die in den vorangegangenen Abschnitten (Kapitel 2.2 bis Kapitel 2.5) als potenziell hilfreich vorgestellten Methoden zur automatisierten Biodiversitätsforschung werden im Folgenden in einer Prozesskette zusammengefasst (vgl. Abbildung 2.2). Diese nutzt alle beschriebenen Komponenten, um einen möglichst hochautomatisierten Ablauf zur Bearbeitung von Massenproben zu gewährleisten. Die gesamte Prozesskette steht unter dem Aspekt von *Open Science* und soll ausschließlich Komponenten bestehend aus OSS und OSH beinhalten (ausgenommen sind Komponenten für das DNA-Barcoding).

Insekten-Massenproben in Ethanol werden entweder durch Fangen gewonnen oder aus naturhistorischen Sammlungen genutzt. Diese werden anschließend zur Weiterverarbeitung vorbereitet. Insbesondere die Fraktionierung nach Größe wird dabei vorgenommen. Die Proben werden dann mittels automatisierten (DiversityScanner vgl. Kapitel 7) oder mittels teilautomatisierten Systemen (Entomoscope vgl. Kapitel 5) weiterverarbeitet. Beide Prozesse liefern fotografierte und klassifizierte Proben. Der DiversityScanner sortiert die Proben zusätzlich noch automatisiert und bietet die Möglichkeit zur Volumenabschätzung. Unbekannte Insekten können mittels DNA-Barcoding eindeutig bestimmt werden. Zusammen mit den Bildern



**Abbildung 2.2:** Vorgeschlagene Prozesskette zur automatisierten Erforschung der Biodiversität unter Insekten, modifiziert nach [55]. Insekten-Massenproben in Ethanol werden mittels automatisierter oder teilautomatisierter Bildgebung digitalisiert und anhand der Bilder klassifiziert. Ist dies nicht möglich, werden sie mittels DNA-Barcoding eindeutig identifiziert und dem Bild die Art zugeordnet. Auf diese Weise kann der Datensatz erweitert werden. Neue Arten und Insekten aus naturhistorischen Sammlungen können mittels multiperspektivischer Bildgebung digitalisiert werden.

können neue Datensätze generiert werden, die sich zum Training neuronaler Netze eignen. Durch die Erweiterung der Datensätze und ein erneutes Training der neuronalen Netze kann die Anzahl an Insekten, die mittels DNA-Barcoding klassifiziert werden müssen, über die Zeit reduziert werden. Zusätzlich ist zu erwarten, dass durch die automatisierte und dadurch schnellere Auswertung neue Arten entdeckt werden. Diese können durch multiperspektivische Bildgebung (DiversityScanner-360° - vgl. Kapitel 6) automatisiert digitalisiert werden. Die Digitalisierung kann ebenfalls direkt aus naturhistorischen Sammlungen erfolgen.



## 3 Grundlagen

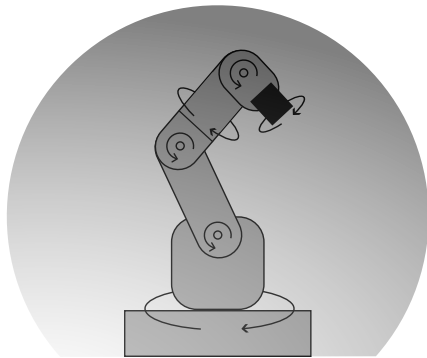
Dieses Kapitel liefert die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendigen technischen Grundlagen und umfasst Grundlagen der Robotik und der Handhabung sowie zur Bildgebung kleiner Objekte.

### 3.1 Grundlagen der Robotik

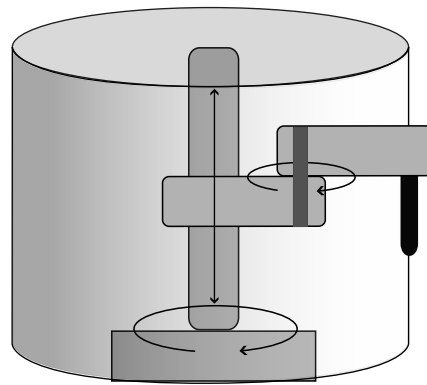
Roboter eignen sich zur Automatisierung manuell ausgeführter Aufgaben und lassen sich anhand verschiedener Merkmale untergliedern. So kann beispielsweise eine Untergliederung in stationäre und mobile Robotersysteme vorgenommen werden [56]. Da im Umfang der vorliegenden Dissertation ausschließlich stationäre Robotersysteme relevant sind, wird im Folgenden nur darauf eingegangen. Insbesondere liegt dabei der Fokus auf Handhabungsgeräten. Diese haben die Aufgabe, einen Effektor (z. B. Handhabungswerkzeug, Sensor, Bearbeitungswerkzeug) im Raum zu bewegen. Dabei ist der Effektor die Komponente, welche mit der Umgebung interagiert [56, 57]. Ein definierter Punkt auf dem Effektor, bspw. die Spitze einer Pipette, wird dabei als *Tool Center Point* (TCP) bezeichnet und dient als Referenzpunkt für die Positionierung [57]. Zur Bewegung der Achsen können verschiedene Antriebsarten Verwendung finden. Diese können je nach Anwendungsfall Vor- oder Nachteile haben. Eine Untergliederung der Antriebsarten kann in elektrisch, hydraulisch und pneumatisch erfolgen [56]. Ein weiteres wichtiges Merkmal zur Unterscheidung von robotischen Systemen ist die verwendete Kinematik. Die Kinematik beschäftigt sich mit der Geometrie und den zeitabhängigen Aspekten der Bewegung, ohne die dabei auftretenden Kräfte zu berücksichtigen. Sie definiert die Position des Effektors relativ zur Roboterbasis sowie die Einstellung der Gelenkparameter, einschließlich Drehwinkeln und Translationen [56]. Hierbei kann zwischen der seriellen und parallelen Kinematik unterschieden werden. Die serielle Kinematik besteht aus einer Verbindung von Komponenten, welche über Gelenke bzw. Achsen hintereinander geschaltet sind. Die Bewegung des TCP wird durch die aufeinanderfolgende Bewegung der Gelenke erreicht. Bei der parallelen Kinematik hingegen resultiert die Bewegung des TCP aus der gleichzeitigen Bewegung parallel angeordneter Gelenke [57, 58]. Durch die parallele Anordnung sind parallele Kinematiken deutlich steifer als serielle [58].

Häufig verwendete Kinematiken sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Knickarmroboter, wie in Abbildung 3.1a dargestellt, finden Verwendung in der Industrieautomatisierung. Mit in

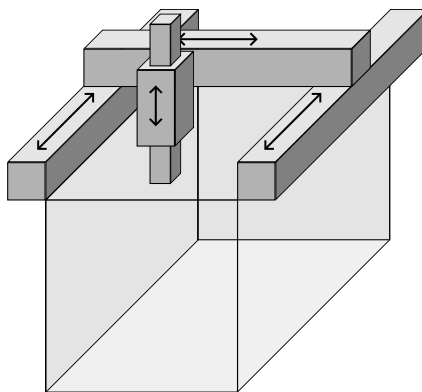
der Regel sechs Drehachsen wird ein nahezu kugelförmiger Arbeitsraum um die Roboterbasis erreicht. Es handelt sich um eine serielle Kinematik, die sich durch eine sehr hohe Beweglichkeit auszeichnet. In Abbildung 3.1b ist ein *Selective Compliance Assembly Robot Arm* (SCARA) Roboter dargestellt. Dieser Manipulator kombiniert meist mehrere Drehachsen mit einer Linearachse. Somit ergibt sich ein im Idealfall zylinderförmiger Arbeitsraum, der jedoch durch bspw. notwendige Kabelführungen eingeschränkt werden kann. SCARA-Manipulatoren zeichnen sich durch mögliche hohe Geschwindigkeiten und Beschleunigungen aus, sind in ihrer Beweglichkeit jedoch eingeschränkter als Knickarmroboter.



(a) Knickarmroboter mit nahezu kugelförmigem Arbeitsraum.



(b) SCARA Roboter mit zylindrischem Arbeitsraum.



(c) Portalroboter mit quaderförmigem Arbeitsraum.

**Abbildung 3.1:** Verschiedene Roboterbauformen: (a) Knickarmroboter mit serieller Kinematik, der sich ergebende Arbeitsraum ist nahezu kugelförmig. Der Roboter verfügt ausschließlich über Rotationsachsen; (b) *Selective Compliance Assembly Robot Arm* (SCARA)-Roboter mit serieller Kinematik und horizontaler Gelenkarmstruktur, der sich ergebende Arbeitsraum ist zylindrisch. Der Roboter verfügt über eine Linearachse und mehrere Rotationsachsen; (c) Portalroboter mit Kombination aus paralleler und serieller Kinematik, der sich ergebende Arbeitsraum ist quaderförmig. Der Roboter verfügt ausschließlich über Linearachsen. Modifiziert nach [58, 59].

Zuletzt ist in Abbildung 3.1c das Funktionsprinzip eines Portalroboters dargestellt. Der Portalroboter kombiniert eine parallele mit einer seriellen Kinematik und stellt eine Variante der kartesischen Manipulatoren dar, die in der Regel für jede Achse nur eine Linearführung nutzen. Durch die Parallelisierung mehrerer Achsen kann die Steifigkeit erhöht werden. Der

sich ergebende Arbeitsraum ist quaderförmig. Der Portalroboter zeichnet sich dadurch aus, dass die kartesischen Koordinaten des TCP jeweils durch eine einzige Linearachse bestimmt werden. Dies ermöglicht eine einfache und intuitive Steuerung [58, 59].

Die Bewegung der verschiedenen Achsen eines Roboters kann entweder synchron oder asynchron erfolgen. Bei der synchronen Bewegung werden alle Achsen des Roboters gleichzeitig und in einem koordinierten Tempo bewegt, während bei der asynchronen Bewegung die Achsen unabhängig voneinander und zu unterschiedlichen Zeiten bewegt werden. Die Positionierung des Endeffektors kann dabei auf zwei Arten realisiert werden. Entweder mittels Vorwärts- oder Rückwärtskinematik. Die Vorwärtskinematik berechnet die Position und Orientierung des Endeffektors basierend auf den Gelenkstellungen, während die Rückwärtskinematik die Gelenkstellungen berechnet, die erforderlich sind, um eine bestimmte Position und Orientierung des Endeffektors zu erreichen. Die Rückwärtskinematik ist dabei nicht immer eindeutig lösbar und kann, insbesondere bei vielen Achsen, auch viele Lösungen besitzen [57, 59].

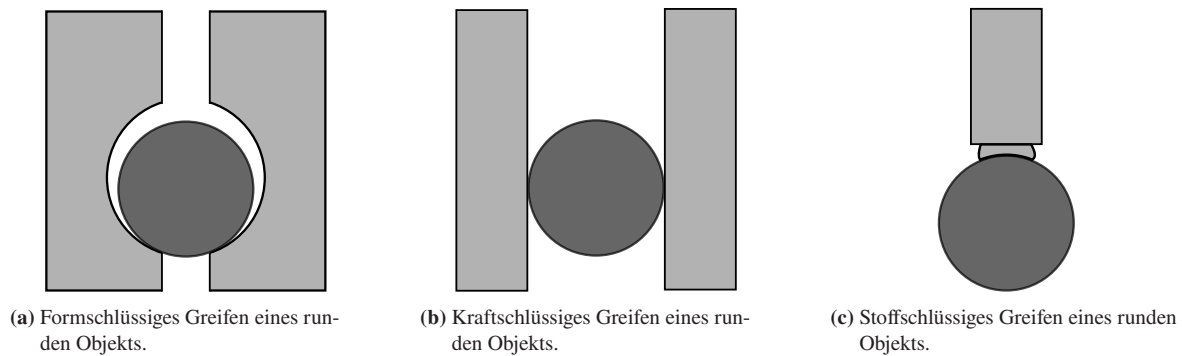
In Bezug auf die Steuerung von Robotern gibt es verschiedene Ansätze, darunter Punkt-zu-Punkt-Steuerung und Bahnsteuerung. Bei der Punkt-zu-Punkt-Steuerung wird der Roboter direkt zu vordefinierten Punkten geleitet, der Weg ist nicht entscheidend und wird häufig so gewählt, dass die notwendige Zeit für die Bewegung minimiert wird. Bei der Bahnsteuerung hingegen wird der Roboter entlang einer definierten Bahn oder Trajektorie bewegt [57, 59].

## 3.2 Grundlagen der Handhabung

Handhabungswerkzeuge und insbesondere Greifer stellen einen häufig verwendeten Effektor robotischer Systeme dar und bilden die Schnittstelle zwischen Handhabungsobjekt und Handhabungsgerät [59]. Bei der Entwicklung und Auswahl eines geeigneten Endeffektors spielen zahlreiche Faktoren eine Rolle, darunter das handzuhabende Objekt, die Handhabungseinrichtung und die spezifische Handhabungsaufgabe [60].

Die Kategorisierung von Handhabungswerkzeugen kann grundsätzlich auf der Grundlage einer Vielzahl von Merkmalen erfolgen. Eine mögliche Herangehensweise ist die Betrachtung des Wirkprinzips. Hierbei können verschiedene Wirkprinzipien identifiziert werden, darunter mechanische, fluidische, elektrostatische, adhäsive und magnetische Prinzipien. Zusätzlich kann zwischen verschiedenen Arten des Griffs unterschieden werden, nämlich kraftschlüssigem, formschlüssigem und stoffschlüssigem Griff. Bei formschlüssigen Greifern erfolgt die Erfassung des zu handhabenden Objekts durch ein Umschließen desselben. Das Objekt wird dabei zwischen den Greifbacken positioniert, wobei nur minimale Kontaktkräfte wirken, die hauptsächlich auf die Gewichtskraft zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu beruht der Kraftschluss darauf, dass Reibkräfte genutzt werden, um Objekte zu halten. Hierbei erfolgt der Kontakt punktuell, linear oder flächig. Zuletzt nutzen stoffschlüssige Greifer molekulare oder atomare Kräfte, bspw. durch die Bildung von Flüssigkeitsbrücken oder den Einsatz von

Klebstoffen [60, 61]. Die verschiedenen Greiferprinzipien sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Bei allen Greiferprinzipien muss darauf geachtet werden, dass die Handhabung zu keiner Beschädigung des Handhabungsobjekts führt. Insbesondere bei kraftschlüssiger Handhabung ist es daher wichtig, sicherzustellen, dass das Handhabungsobjekt den aufgebrachten Kräften standhalten kann und diese entsprechend reguliert werden können.



**Abbildung 3.2:** Verschiedene Greiferprinzipien nach Wirkprinzip. (a) Formschlüssiges Greifen eines runden Objekts. Außer der Gewichtskraft und den Beschleunigungskräften wirken keine weiteren Kräfte auf das Handhabungsobjekt; (b) Kraftschlüssiges Greifen eines runden Objekts. Die Haltekraft wird durch Reibkräfte zwischen dem Handhabungswerkzeug und Handhabungsobjekt aufgebracht, im Fall eines runden Objekts und bei geraden Greifbacken, ist der Kontakt punktförmig; (c) Stoffschlüssiges Greifen eines runden Objekts. Die Haltekraft wird durch molekulare oder atomare Kräfte aufgebracht. Modifiziert nach [61].

Ein Greifer besteht aus verschiedenen Grundelementen. Diese beinhalten einen Flansch, der zur Verbindung mit dem Handhabungssystem dient, einem Greifergehäuse, welches verschiedene Funktionen erfüllen kann, wie die Integration des Antriebs, oder die Aufnahme von Sensoren und das Haltesystem, welches in Kontakt mit dem Handhabungsobjekt steht [59].

### 3.3 Grundlagen zur Bildgebung kleiner Objekte

Wie in Kapitel 2.3 dargelegt, bietet die Bildgebung großes Potenzial zur automatisierten Biodiversitätsforschung. Insbesondere die Aufnahme von Detailfotos kleiner Objekte bringt dabei einige Herausforderungen mit sich. Im Folgenden werden die Grundlagen zur Bildgebung kleiner Objekte erläutert. Diese umfassen Grundlagen zu Kamerasensoren und Objektiven, erläutern die Begriffe der Schärfentiefe und Einflussfaktoren auf diese sowie die Idee hinter dem *Focus Stacking*. Zuletzt werden noch verschiedene Beleuchtungsarten vorgestellt.

#### 3.3.1 Optische Sensoren

Optische Sensoren werden verwendet, um optische Signale und die darin enthaltenen Informationen in elektrische Signale umzuwandeln [62, 63]. Dazu wandeln sie die von einem Objekt reflektierten oder abgegebenen Photonen in ein elektrisches Signal um [64]. Optische

Quellen können ultraviolettes Licht, sichtbares Licht oder Infrarotlicht sein [62]. Da für die vorliegende Arbeit nur sichtbares Licht relevant ist, wird im Folgenden nur auf Sensoren für sichtbares Licht eingegangen. Optische Sensoren bieten den großen Vorteil, dass die Messung berührungslos und schnell erfolgen kann. Zusätzlich haben sie eine große Reichweite und eine geringe Störanfälligkeit [62].

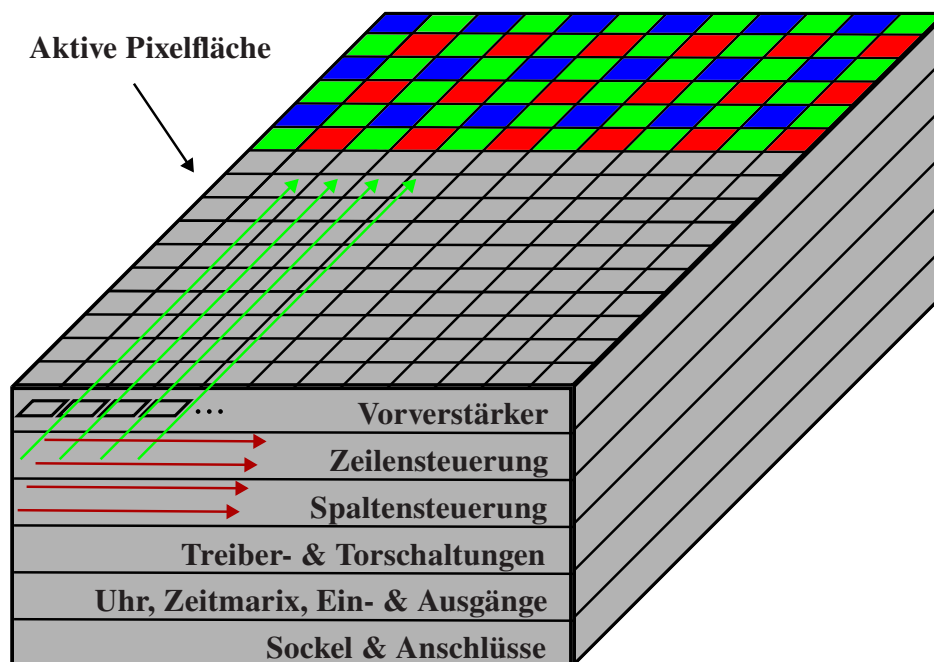
Der Aufbau digitaler optischer Sensoren basiert auf Pixeln, einzelnen Bildelementen, welche die Photonen möglichst unabhängig von den daneben gelegenen Pixeln erfassen sollen. Dabei ist eine Anordnung in einer Linie oder als Array möglich [64, 65]. Sensoren für sichtbares Licht basieren meist auf Silizium-Halbleitern [65] und können Wellenlängen von 350 nm - 1100 nm detektieren, während sie ein Maximum bei 800 nm aufweisen [63, 65]. In Kameras finden als digitale optische Sensoren zwei Bauarten Anwendung: *Charge-Coupled Device* (CCD) und *Complementary Metal-Oxide-Semiconductor* (CMOS) Sensoren, wobei CCD Sensoren mittlerweile fast vollständig durch CMOS Sensoren abgelöst sind und nur noch selten Verwendung in Spezialanwendungen finden, für die ihre Eigenschaften, wie das tendenziell niedrigere Rauschen [63], unbedingt notwendig sind [65].

Zunächst werden, bei beiden Sensortypen identisch, Photonen durch das Halbleitermaterial absorbiert und in Elektronen umgewandelt. Dies erfolgt während der sogenannten Integrationszeit. Die Anzahl erzeugter Elektronen pro Pixel ist dabei proportional zu den auf das Pixel auftreffenden Photonen [62–65]. CCD und CMOS Sensoren unterscheiden sich in der Weise, wie die durch das Halbleitermaterial erzeugte elektrische Ladung ausgelesen wird. CCD Sensoren nutzen dazu eine analoge Schaltlogik. Die während der Integrationszeit erzeugten Elektronen werden zunächst im Pixel gespeichert. In der anschließenden Auslesephase findet ein Ladungstransport über die Pixel hinweg statt. Dazu werden sie sequenziell über die Transfergates hin zum Ausleseverstärker transportiert und durchlaufen anschließend alle denselben Ausleseverstärker. Dies führt zu einer sehr hohen Signalhomogenität [63, 65]. CMOS Sensoren hingegen besitzen für jedes Fotoelement (Pixel) einen eigenen Steuer- und Auslesekanal mit Ausleseverstärker, der direkt adressiert werden kann [62]. Abbildung 3.3 zeigt den Aufbau eines CMOS Sensors im Schnitt.

Die Ladungsspannungswandlung erfolgt somit direkt am Pixel, wodurch kein aufwendiger Ladungstransfer mehr notwendig ist. Dies ermöglicht auch ein schnelleres Auslesen und eine höhere Bildwiederholrate [65].

Zur Beschreibung von optischen Sensoren finden verschiedene Parameter Anwendung, unter anderem:

- **Spektraler Detektionsbereich:** Beschreibt, welche Wellenlängen ein Sensor detektieren kann. Dieser ist abhängig vom verwendeten Halbleitermaterial. Bspw. Silizium ca. 350 nm - 1100 nm, Germanium 800 nm - 1800 nm [63, 65].



**Abbildung 3.3:** Aufbau eines CMOS Sensors. Der Sensor umfasst eine aktive Pixelfläche, die das einfallende Licht einfängt und in elektrische Signale umwandelt. Diese Signale werden durch einen Vorverstärker verstärkt, um eine verbesserte Bildqualität zu gewährleisten. Die Zeilen- und Spaltensteuerung synchronisiert den Lesevorgang über den Sensor und wählt die entsprechenden Zeilen und Spalten aus, um die Daten zu erfassen. Die Treiber- und Torschaltung steuert den Datenfluss und die Pixelaktivität, einschließlich des Taktgebers, der Zeitmatrix und der Ein- und Ausgänge. Schließlich erfolgt die Verbindung des Sensors mit dem Hauptsystem über einen Sockel und entsprechende Anschlüsse, die die Kommunikation mit anderen Geräten ermöglichen. Modifiziert nach [62]. Zudem zeigt die Sensoroberfläche im hinteren Bereich das Bayer-Schema zur Ermöglichung der Aufnahme von Farbbildern [63].

- **Quanteneffizienz:** Gibt an, wie viel elektrischer Strom aus einem Watt optischer Leistung, die auf den Sensor trifft, erzeugt wird [63].
- **Dynamikbereich:** Der maximale optische Signalpegel, den ein Detektor erfassen kann, definiert den Punkt, an dem der Detektor gesättigt ist und sein elektrischer Ausgangswert nicht weiter ansteigt. Ein erweiterter dynamischer Bereich kann durch die Erhöhung des maximalen Signalpegels erreicht werden [63, 65].
- **Format:** Beschreibt den physischen Aufbau des Sensors. Sensoren können entweder als Liniensensor aufgebaut sein, der eine einzelne Zeile von Sensorelementen verwendet, oder als Matrixsensor, der ein Array von Sensorelementen nutzt [63].
- **Geschwindigkeit:** Definiert, wie schnell einzelne Bilder hintereinander ausgelesen werden können. Sie hängt unter anderem von der verwendeten Sensortechnologie, der Integrationszeit und der Auflösung ab [63, 65].
- **Belichtungstechnologie:** Unter der Belichtungstechnologie kann verstanden werden, wie die Belichtung der einzelnen Pixel erfolgt. Es werden zwei Technologien unterschieden: *Global Shutter* und *Rolling Shutter*. CCD Sensoren sind bauartbedingt

immer *Global Shutter* Sensoren, das bedeutet der Beginn und das Ende der Belichtung aller Pixel des Sensors erfolgt gleichzeitig. Bei CMOS Sensoren kann die Belichtung ebenso erfolgen, zusätzlich kann jedoch auch das Prinzip eines *Rolling Shutter* realisiert werden. Die Belichtung aller Pixel ist gleich lang, sie findet jedoch zeilenweise nacheinander statt. *Global Shutter* Sensoren eignen sich demzufolge für die Bildgebung von sich bewegenden Objekten. Die Bewegung kann bei *Rolling Shutter* Sensoren zu einer Verschiebung im Bild führen. Der Schaltungsaufwand pro Pixel ist bei CMOS Sensoren mit *Global Shutter* Technologie jedoch höher, was zu einer Verringerung der lichtempfindlichen Fläche und damit zu einer Verringerung der Empfindlichkeit pro Pixel führt [65].

- **Pixelgröße:** Gibt die Größe eines einzelnen Pixels an und stellt einen Kompromiss aus der maximalen aktiven Sensorgröße und der gewünschten Ortsauflösung dar. Große Pixel haben eine höhere *Full Well Capacity* (FWC), können demnach mehr Elektronen speichern, bevor sie überlaufen. Dies resultiert in einem höheren Dynamikbereich bei größeren Pixeln. Zudem tendieren Sensoren mit größeren Pixeln zu einem besseren Flächennutzungsgrad (*Fill Factor*), also einem höheren Verhältnis an photoaktiver Fläche zu nicht photoaktiven Bereichen. Kleinere Pixel hingegen bieten eine höhere Ortsauflösung bei gleicher Sensorfläche [65]. Für CMOS Sensoren liegt die Pixelgröße zwischen  $< 3 \mu\text{m} - 8 \mu\text{m}$  [62], für CCD Sensoren zwischen  $2 \mu\text{m}$  und  $30 \mu\text{m}$  [65].
- **Auflösung:** Gibt die Anzahl an Pixel in x- und y-Richtung des Sensors an. Für Linien-sensoren besteht sie nur aus einem Wert [65].

Weiterhin spielen für viele Bauelemente zutreffende Parameter wie Größe, Gewicht und Preis zur Beschreibung und insbesondere beim Vergleich verschiedener Sensoren eine wichtige Rolle [63].

Alle beschriebenen Technologien liefern jedoch nur monochrome Bilder. Zur Erzeugung von Farbbildern muss eine spektrale Aufspaltung des Lichts entsprechend der verschiedenen Farben erfolgen. Hierzu kann entweder vor jedem Pixel ein Farbfilter angebracht werden oder es findet eine prismatische Aufspaltung des Bildes statt. Die einzelnen Farbanteile werden dann von verschiedenen Sensoren erfasst. Da sich so jedoch die Brennweite ändert, sind solche Sensoren nicht mit Objektiven, welche für monochrome Sensoren entwickelt sind, kompatibel. Zudem ist der notwendige Bauraum größer und es werden mehrere Sensoren benötigt. Aus diesem Grund haben sich Sensoren mit einzelnen Farbfiltern vor den Pixeln weitgehend durchgesetzt. Da einzelne Pixel so jedoch nur für einzelne Farben zuständig sind, reduziert sich die räumliche Auflösung. Ein gängiges Schema zur Anordnung der Farbfilter ist das Bayer-Schema (vgl. Abbildung 3.3). Dabei werden immer vier Pixel zur Darstellung eines Rot-Grün-Blau (RGB) Farbwerts herangezogen. Der sich so ergebende Farbwert setzt sich aus einem roten, zwei grünen und einem blauen Wert zusammen. Die Verwendung von zwei

Grünwerten ist der höheren spektralen Empfindlichkeit des menschlichen Auges für grünes Licht nachempfunden [63, 65].

### 3.3.2 Objektive

Um mit digitalen Sensoren Bilder aufnehmen zu können, wird eine vorgelagerte Optik benötigt. Diese verfolgt das Ziel, das zu fotografierende Objekt auf dem Sensor abzubilden. Diese Optik kann im einfachsten Fall aus nur einer Linse bestehen, kann je nach Anwendungsfall aber auch viele optische Komponenten beinhalten. Zunächst muss eine Verbindung zwischen der Optik und dem Sensorgehäuse hergestellt werden. Hierzu bieten verschiedene Hersteller viele verschiedene Systeme, die meist auf Bajonettverschlüssen basieren. Im Bereich von *Machine Vision* Anwendungen haben sich jedoch einige standardisierte Schraubanschlüsse durchgesetzt. Von klein nach groß sind das beispielsweise das M12x0.5 Gewinde, der C-/Cs-Mount oder der F-Mount [65].

Zur Unterscheidung von Objektiven finden verschiedene Parameter Verwendung, einige dieser Parameter werden im Folgenden kurz erläutert.

- **Brennweite:** Die Brennweite eines Objektivs ergibt sich aus der kollektiven Wirkung aller optischen Elemente und kann sowohl negative als auch positive Werte annehmen [63]. Wird nur eine Linse betrachtet, ist die Brennweite der Abstand der optischen Hauptebene der Linse zu dem Punkt (Brennpunkt) auf der optischen Achse, auf dem sich parallel auf die Linse auftreffende Strahlen hinter dieser bündeln [62, 63]. Der Abbildungsmaßstab eines Objektivs steigt mit seiner Brennweite, Teleobjektive haben daher große, Weitwinkelobjektive kleine Brennweiten [62]. Besitzt ein Objektiv eine feste Brennweite, kann der Abbildungsmaßstab nicht angepasst werden. Demzufolge kann nicht an das Objekt heranzoomt werden. Objektive mit verstellbarer Brennweite hingegen, ermöglichen das Heranzoomen an Objekte und verändert die Bildgröße bei festgelegtem Objektabstand [63].
- **Vergrößerung:** Die Vergrößerung eines Objektivs wird durch das Verhältnis zwischen Bildgröße und Objektgröße definiert und ist von der Objektentfernung abhängig. Die Definition dieses Parameters ist demnach nur dann sinnvoll, wenn die Objektentfernung, bei der ein Objekt scharf abgebildet wird, für ein Objektiv nicht verändert werden kann, demnach keine Fokussierung am Objektiv möglich ist [63].
- **Aperturblende:** Die Blende eines Objektivs beschränkt den maximalen Winkel des Strahlenbündels, welches durch die Optik in den Bildraum geführt werden kann und beschränkt somit die Lichtmenge, welche in den Bildraum geführt wird. Zudem nimmt sie Einfluss auf die Schärfentiefe (vgl. Kapitel 3.3.3) und Aberrationen, hat jedoch keinen Einfluss auf die Bildgröße [65].

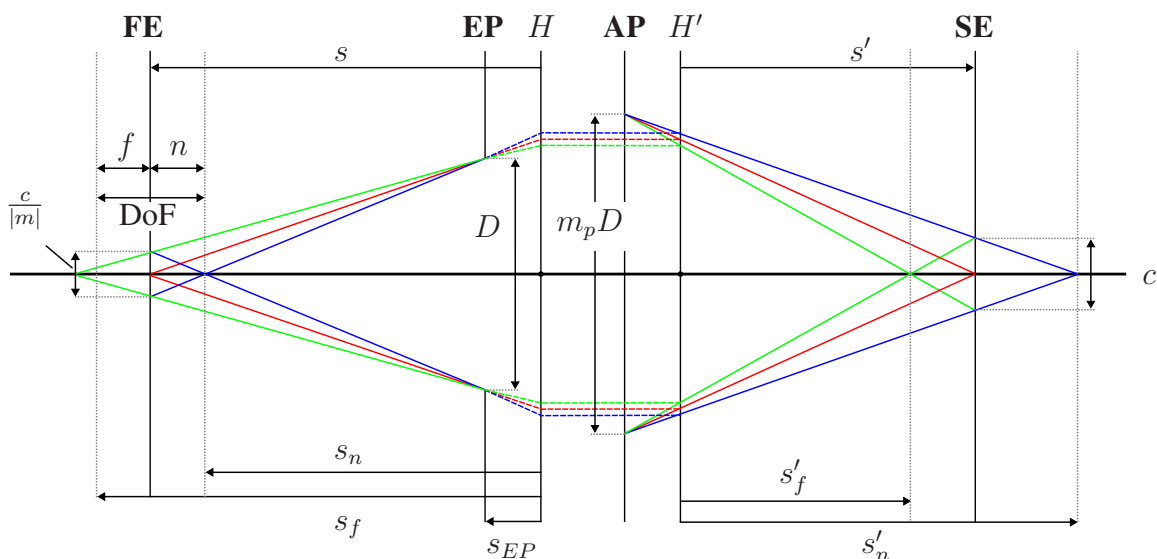
- **Sichtfeld:** Das Sichtfeld, welches mit einer definierten Kombination aus Objektiv und Sensor abgebildet werden kann, beschreibt den abgebildeten Objektbereich für einen definierten Objektabstand [63].
- **Telezentrie:** Durch die Verwendung von Optiken zur Abbildung von Objekten in der Objektebene auf der Bildebene, kann es zu Abbildungsfehlern kommen. Häufig ist dabei die Verzeichnung, insbesondere bei kurzen Brennweiten. Objektive können jedoch telezentrisch ausgelegt werden und entweder bildseitig, objektseitig oder beidseitig telezentrisch sein. Die Strahlengänge beidseitig telezentrischer Optiken, verlaufen sowohl auf der Objektseite als auch auf der Bildseite parallel. Sowohl die Eintrittspupille (EP) als auch die Austrittspupille (AP) liegen demnach im Unendlichen. Objektseitige Telezentrie führt zu einer Minimierung der Verzeichnung und zu einem konstanten Abbildungsmaßstab, auch wenn das abzubildende Objekt aus der Fokusebene (FE) heraus bewegt wird, sich aber noch im Bereich der Schärfentiefe (vgl. Kapitel 3.3.3) befindet [62, 65]. Der abbildbare Durchmesser eines objektseitig telezentrischen Objektivs ist immer kleiner als der freie Durchmesser des Objektivs, was bei größeren Objekten hohe Objektivdurchmesser erfordert [65].

### 3.3.3 Schärfentiefe

Beim Fokussieren kann der Fokus nur auf eine FE eingestellt werden. Trotzdem ist es möglich, einen scharfen, bzw. scharf erscheinenden Bereich auf Bildern abzubilden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges beschränkt ist. Daher ist die Schärfentiefe als die Objektentfernung zu verstehen, die im Bild zu einer akzeptablen Schärfe führt [63, 66, 67].

Abbildung 3.4 zeigt den Strahlengang von drei auf der optischen Achse eines optischen Systems liegenden Punkten. Einer der Punkte liegt genau auf der FE (roter Strahlengang), einer mit dem Abstand  $n$  davor (blauer Strahlengang) und einer mit dem Abstand  $f$  dahinter (grüner Strahlengang). Das optische System wird durch die EP und AP sowie durch die Hauptebenen  $H$  und  $H'$  dargestellt. Die Hauptebenen stellen die Wirkung aller optischen Elemente des Systems dar und kombinieren die Wirkung mehrerer Linsen oder anderer Elemente [67].

Der Punkt des roten Strahlengangs wird als scharfer Punkt durch das optische System auf der Sensorebene (SE) abgebildet. Die Punkte des grünen sowie blauen Strahlengangs werden auf der SE als 'unscharfe' Kreise mit dem Durchmesser  $c$  abgebildet. Dieser wird als Unschärfekreis oder *Circle of Confusion* (CoC) bezeichnet. Ist der Unschärfekreis klein genug, wird er weiterhin als scharfer Punkt wahrgenommen. Die maximale Größe des Unschärfekreises, bevor ein Bildbereich als unscharf empfunden wird, ist abhängig von den Bedingungen, unter denen das Bild betrachtet wird. Einflussfaktoren dabei sind die Vergrößerung des Bildes von



**Abbildung 3.4:** Strahlengang von drei auf der optischen Achse eines optischen Systems mit einer Vergrößerung  $m > 1$  liegenden Punkten. Rot: Strahlengang eines auf der FE liegenden Punktes; grün: Strahlengang eines hinter der FE liegenden Punktes; blau: Strahlengang eines vor der FE liegenden Punktes. Modifiziert nach [65] und [67].

der Sensorgröße auf die Größe des betrachteten Bildes, der Abstand, aus dem das Bild betrachtet wird, sowie das Auflösungsvermögen des Betrachters oder der Betrachterin. Letzteres wird in Linienpaaren pro Millimeter gemessen. Das menschliche Wahrnehmungsvermögen kann fünf Linienpaare (abwechselnd schwarze und weiße Linien) nicht mehr unterscheiden und nimmt nur noch eine graue Fläche wahr. Werte für den maximalen Durchmesser des Unschärfekreises in Abhängigkeit von der Sensorgröße können der Literatur entnommen werden. Bei bekanntem Wert für den maximalen Unschärfekreis  $c$  kann anhand der Vergrößerung des optischen Systems  $m$ , dem Durchmesser der EP,  $D$ , der Entfernung zwischen der vorderen Hauptebene  $H$  und der FE,  $s$ , sowie dem Abstand zwischen der vorderen Hauptebene  $H$  und der EP das *Depth of Field* (DoF) bestehend aus den Distanzen  $f$  und  $c$  anhand der Gleichungen 3.2 und 3.1 ermittelt werden [65, 67].

$$n = \frac{c(s - s_{EP})}{|m|D + c} \quad (3.1)$$

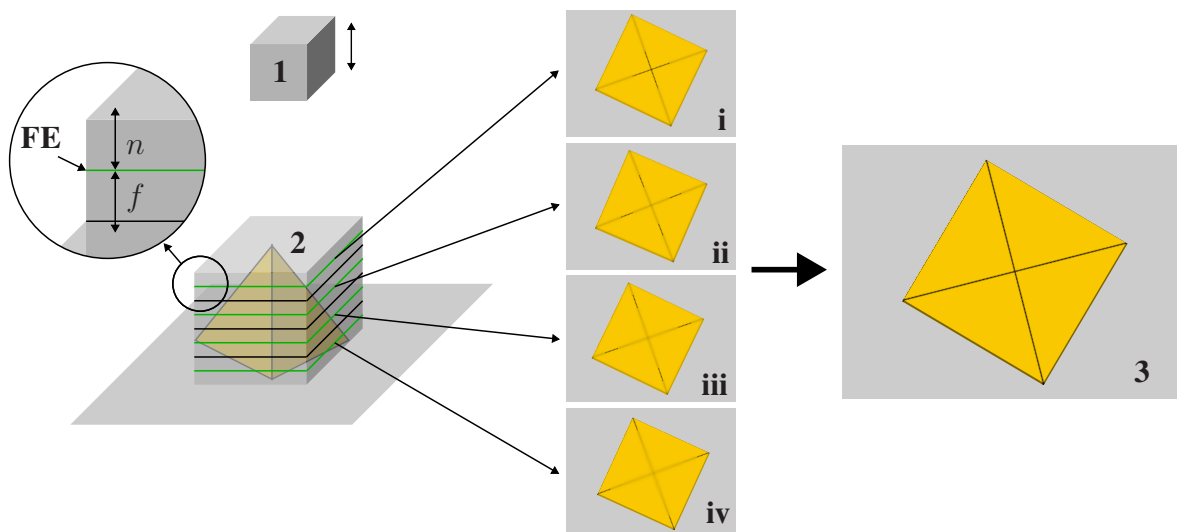
$$f = \frac{c(s - s_{EP})}{|m|D - c} \quad (3.2)$$

Damit haben der Durchmesser der EP, welcher sich aus Blendenzahl und Brennweite ermitteln lässt, die Sensorgröße (fließt in den maximalen Wert für den Unschärfekreis ein) und die Aufnahmeentfernung direkten Einfluss auf die Schärfentiefe. Auch die Pixelgröße beeinflusst die Wahrnehmung der Schärfentiefe. Ist der Unschärfekreis kleiner als die Pixelgröße, kann, obwohl Unterschiede in der Schärfe auf der SE vorliegen, auf dem digitalen Bild kein Unterschied wahrgenommen werden [63]. Zuletzt kann der Aufbau des Sensors Einfluss auf

die Schärfentiefe nehmen. Werden Mikrolinsen vor den Pixeln verwendet, um den Flächennutzungsgrad zu erhöhen, kann das in Kombination mit dem verwendeten Objektiv in eine Reduktion der Schärfentiefe resultieren [65].

### 3.3.4 Focus Stacking

Genügt die Schärfentiefe eines optischen Systems nicht, um alle notwendigen Bereiche in einer Aufnahme abzubilden, können Bilder mit unterschiedlicher FE aufgenommen werden und anschließend zu einem Bild kombiniert werden. In diesem kombinierten Bild geht die Schärfentiefe über das hinaus, was mit nur einem Bild möglich gewesen wäre (vgl. Abbildung 3.5) [65]. *Focus Stacking* findet in der Makrofotografie und auch bereits zur Aufnahme biologischer Proben, wie z. B. Insekten, Verwendung [68–70]. Während des Aufnahmeprozesses wird eine Reihe von Bildern aufgenommen, in denen sich die FE über das abzubildende Objekt hinwegbewegt. Die notwendige Anzahl an Bildern hängt dabei von der Höhe des Objekts und der Schärfentiefe des optischen Systems ab. Wichtig ist, dass die Aufnahmen alle mit denselben Bildparametern (Weißabgleich, Blende, Belichtungszeit) aufgenommen werden. Änderungen dieser Parameter können zu Fehlern bei der Bildverarbeitung und unsauberen Ergebnissen führen [71].



**Abbildung 3.5:** Visualisierung des Ablaufs beim Aufnehmen der Bilder für das *Focus Stacking*. Die Kamera (1), in diesem Fall mit fester Brennweite, wird vom aufzunehmenden Objekt weg bzw. zum aufzunehmenden Objekt hinbewegt. Dabei werden mehrere Fokusebenen (FE) aufgenommen. Das *Depth of Field* (DoF) der einzelnen Bilder (i-iv) deckt damit die gesamte Tiefe des Objektraums (2) ab. Anschließend kann daraus ein in allen Bereichen scharfes Bild (3) erstellt werden.

Zur Erzeugung des Gesamtbilds aus Bildern mit verschiedenen FE sind unterschiedliche Lösungen verfügbar. Neben der manuellen Verarbeitung in Bildbearbeitungsprogrammen

wie Gimp oder Photoshop gibt es unter anderem spezialisierte Software wie Picolay [72] (Freeware) oder kommerzielle Lösungen wie Helicon Focus [73] oder Zerene Stacker [74].

Dabei werden verschiedene Operationen der digitalen Bildverarbeitung genutzt. In einigen Vorverarbeitungsschritten müssen die einzelnen Aufnahmen verschiedener FE zunächst skaliert werden. Je nach verwendetem Objektiv ändert sich beim Fokussieren der Abbildungsmaßstab. Zudem kann eine minimale Verschiebung des Objekts oder der Aufnahmeposition dazu führen, dass die Bilder nicht ideal aufeinanderliegen, weshalb eine Ausrichtung der Bilder notwendig sein kann [71]. Zuletzt müssen scharf abgebildete Regionen im Bild von unscharfen unterschieden werden. Dazu können verschiedene Methoden, bspw. gradienten- oder kontrastbasiert, verwendet werden. Detaillierte Informationen, wie dies erfolgen kann, sind der Literatur zu entnehmen [75–79].

#### 3.3.5 Beleuchtung

Die Beleuchtung stellt einen elementaren Bestandteil bei der Bildaufnahme mit Kameras dar. Insbesondere bei der Makrofotografie von Insekten, bei der kleinste Strukturen abgebildet werden müssen, ist eine geeignete Beleuchtung entscheidend für die Qualität der angefertigten Bilder [80].

Wichtige lichttechnische Größen sind der Lichtstrom, also die Intensität, sowie das Spektrum des Lichtes. Weiterhin stellt die Diffusität einen wichtigen Aspekt der Beleuchtung dar und beschreibt, wie gerichtet das Licht auf das zu fotografierende Objekt trifft. Gerichtetes, bzw. hartes Licht eines punktförmigen Strahlers erzeugt starke Kontraste und wirft harte Schatten. Diffuses Licht hingegen verhindert starke Schatten und Reflexionen auf Oberflächen und kann durch die Vergrößerung der Oberfläche der Lichtquelle erzielt werden. Dafür werden zwei Verfahren genutzt, entweder die Reflexion an einer streuenden Oberfläche oder die Transmission durch einen Diffusor [81]. Die Reflexion an der Oberfläche wird bei Lichtkuppeln (engl. *Light Domes*) genutzt. Um eine möglichst diffuse Beleuchtung zu realisieren, wird Licht von unten in die Kuppel gestrahlt und an der Oberfläche gestreut. Dieses Verfahren wird beispielsweise bei der Fotografie trocken konservierter Insekten eingesetzt [80, 82].

### 3.4 Grundlagen zur Bildklassifizierung mit maschinellem Lernen

Im Kontext der vorliegenden Dissertation beschränkt sich die Klassifikation auf Bilddaten und ist somit Teil der Bildverarbeitung. Das maschinelle Lernen ermöglicht es dabei Computern aus Bildern zu lernen und darin Muster zu erkennen, die bspw. zur Klassifikation der in den Bildern sichtbaren Objekten genutzt werden können. Maschinelles Lernen ist

dabei ein Teilgebiet der künstlichen Intelligenz und umfasst das tiefe Lernen (*deep learning*). Grundsätzlich kann eine Untergliederung in überwachtes (*supervised*), unüberwachtes (*unsupervised*) und bestärkendes (*reinforcement*) Lernen vorgenommen werden. Dabei unterscheiden sich die Eingangsdaten und Anwendungsfälle und es existieren Zwischenstufen. Zur Klassifizierung von Objekten in Bildern findet häufig das überwachte Lernen Verwendung. Bei der Objektklassifikation ordnet ein Klassifikator ein Bild einer bestimmten Klasse<sub>ML</sub><sup>1</sup> zu. Für das Training müssen dazu annotierte Datensätze vorliegen. Das bedeutet, für jede mögliche Klasse<sub>ML</sub> liegt eine Anzahl an Bildern vor, mit der das Netzwerk trainiert, validiert und getestet werden kann [83].

Faltungsneuronale Netze (*Convolutional Neural Networks* (CNNs)) sind leistungsstarke Modelle für die Bildklassifikation. Dabei werden Eigenschaften, wie bspw. Ecken und Kanten genutzt, um Objekte im Bild zu klassifizieren. Sie bestehen aus mehreren Faltungsschichten, gefolgt von jeweils einer Poolingschicht. In den Faltungsschichten werden Filter (Kernel) über das Bild hinweg bewegt, um die Merkmale im Bild zu extrahieren. In einer Faltungsschicht kommen dabei mehrere Kernel zum Einsatz, um verschiedene Merkmale zu erkennen. Hinter den Faltungsschichten befinden sich Poolingschichten, die die Merkmalswerte reduzieren. So werden unter anderem die notwendige Rechenleistung und der Speicherbedarf reduziert. Im letzten Schritt wird in einem *Fully-connected Layer* die Klassifikation anhand der extrahierten Merkmale vorgenommen und die Vorhersage ausgegeben [83, 84]. Zur Bewertung der Qualität eines Klassifikators finden verschiedene Metriken und Visualisierungsformen Verwendung. Eine gängige Methode zur Visualisierung der Ergebnisse von Klassifizierungsproblemen mit mehreren Klassen<sub>ML</sub> ist die Verwendung einer *Confusion Matrix*. Darin werden die vorhergesagten Klassen<sub>ML</sub> über den wahren Klassen<sub>ML</sub> aufgetragen. In Abbildung 3.1 ist exemplarisch eine *Confusion Matrix* für ein Klassifizierungsproblem mit acht Klassen<sub>ML</sub> A - H dargestellt. Die Genauigkeit kann auf der Diagonalen für jede Klasse<sub>ML</sub> abgelesen werden. Falsch zugeordnete Ergebnisse weichen von der Diagonalen ab. Für die Klasse<sub>ML</sub> D werden beispielsweise 95 % richtigerweise der Klasse<sub>ML</sub> D zugeordnet, während fälschlicherweise 3 % der Klasse<sub>ML</sub> B und 2 % der Klasse<sub>ML</sub> F zugeordnet werden. Diese Darstellungsform bietet die Möglichkeit schnell zu sehen, wo die Fehler passieren und ermöglicht so eine detaillierte Analyse des Klassifikators. Zudem können daraus weitere Metriken für die einzelnen Klassen<sub>ML</sub> abgeleitet werden, wie die *Precision* (vgl. Gleichung 3.3), der *Recall* (vgl. Gleichung 3.4) oder der *F1-Score* (vgl. Gleichung 3.5) [85].

<sup>1</sup> Im Kontext des maschinellen Lernens, wird der Begriff 'Klasse' für eine Gruppe gewählt, die als möglicher Ausgabewert definiert ist. Für die vorliegende Dissertation muss darauf geachtet werden, dass keine Verwechslung mit der taxonomischen Ebene 'Klasse' nach Linné auftritt. Aus diesem Grund wird der Begriff Klasse im Kontext des maschinellen Lernens mit dem Index 'ML' versehen.

**Tabelle 3.1:** Exemplarische *Confusion Matrix* zur Visualisierung eines Klassifizierungsproblems mit acht Klassen<sub>ML</sub>.

		Vorhergesagte Klasse <sub>ML</sub>							
		Klasse <sub>ML</sub> A	Klasse <sub>ML</sub> B	Klasse <sub>ML</sub> C	Klasse <sub>ML</sub> D	Klasse <sub>ML</sub> E	Klasse <sub>ML</sub> F	Klasse <sub>ML</sub> G	Klasse <sub>ML</sub> H
Wahre Klasse <sub>ML</sub>	Klasse <sub>ML</sub> A	0,80	0,00	0,10	0,00	0,05	0,04	0,01	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> B	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> C	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> D	0,00	0,03	0,00	0,95	0,00	0,02	0,00	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> E	0,00	0,01	0,00	0,00	0,99	0,00	0,00	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> F	0,03	0,00	0,02	0,00	0,02	0,93	0,00	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> G	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,0	0,95	0,00
	Klasse <sub>ML</sub> H	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

Die *Precision* lässt sich durch folgende Gleichung ermitteln und muss für jede Klasse<sub>ML</sub> separat bestimmt werden:

$$Precision = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch positiv}} \quad (3.3)$$

Anschließend kann daraus die *Precision* für den Klassifikator bestimmt werden. Das gleiche gilt für den *Recall*:

$$Recall = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}} \quad (3.4)$$

und den *F1-Score*, der sich wiederum aus *Precision* und *Recall* berechnen lässt:

$$F1 = \frac{2 * Recall * Precision}{Precision + Recall} \quad (3.5)$$

## **Teil I**

# **Probenvorbereitung: Größenfraktionierung von Insekten in Ethanol**



# Übersicht Teil I

Die automatisierte Bearbeitung von Insekten-Massenproben, wie sie beispielsweise bei der Verwendung von Malaise Fallen zum Fang fliegender Insekten gewonnen werden, stellt eine große Herausforderung dar. Dies liegt vor allem an der beträchtlichen Vielfalt der in den Proben enthaltenen Insekten. Die Proben umfassen Insekten verschiedenster Arten, Gattungen, Familien und Ordnungen mit stark variierenden Phänotypen und Größen (vgl. Abbildung 3.6). Besonders die Unterschiede in der Größe erschweren die Automatisierung der Auswertung solcher Proben. Die Entwicklung von Systemen zur Auswertung von Proben mit definierten Größen reduziert die Komplexität erheblich. Darüber hinaus ist für bestimmte Forschungsfragen bereits vor der Auswertung der Massenproben bekannt, welcher Größenkategorie die Insekten zuzuordnen sind. Die Vorsortierung nach Größe kann somit die Anzahl der zu untersuchenden Insekten erheblich verringern.



**Abbildung 3.6:** Insekten unterschiedlicher Arten, Gattungen, Familien und Ordnungen mit variierender Größe aus einer Malaise Fallen Probe.

Im folgenden ersten Teil der vorliegenden Dissertation wird ein System zur Größenvorsortierung von nass konservierten Insekten-Massenproben entwickelt. Dazu wird zunächst der Stand der Forschung betrachtet und basierend darauf ein einfaches und leicht reproduzierbares Konzept entwickelt und implementiert. Das System nutzt 3D-gedruckte Siebrahmen mit Aluminiumlochblechen mit unterschiedlich großen Löchern, um die Massenproben in die zuvor definierten Größenkategorien  $< 3$  mm,  $3$  mm -  $8$  mm,  $8$  mm -  $15$  mm und  $> 15$  mm zu fraktionieren. Das Sieben erfolgt aus Sicherheitsgründen in Wasser, nicht in Ethanol. Aus

---

diesem Grund muss eine vertikale Bewegung implementiert werden, da die in Ethanol gelagerten Insekten in Wasser nicht zuverlässig absinken. Dazu werden die Siebe an eine mit einem Schrittmotor angetriebene Linearachse montiert. Diese wird genutzt, um die Siebe in Wasser einzutauchen und wieder herauszuheben, um dabei Insekten, welche durch die Perforierungen der Siebe passen auszuspülen. Während eine quantitative Analyse der Ergebnisse noch aussteht, zeigen Versuche bereits, dass eine klare Fraktionierung in unterschiedliche Größenkategorien mit dem System vorgenommen werden kann. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass eine automatisierte Auswertung von Insekten-Massenproben bei den kleinen und sehr abundanten Insekten der Größenklasse  $< 3$  mm beginnen muss, da diese einen Großteil der in der Falle vertretenen Insekten ausmachen [49]. Die vorgeschlagene Methode zur Fraktionierung von Insekten-Massenproben schafft die Grundlage für Systeme zur Erforschung der Biodiversität unter Insekten, welche für bestimmte Größenkategorien spezialisiert sind, und ermöglicht somit eine Einschränkung der Anforderungen und damit eine vereinfachte Implementierung dieser Systeme.

## 4 Fraktionierung von Insektenproben

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- A. Ascenzi, L. Wühl, V. Feng, N. Klug, C. Pylatiuk, P. Cerretti, und R. Meier, „EntoSieve: automated size-sorting of insect bulk samples to aid accurate megabarcoding and metabarcoding,” preprint, doi: 10.22541/au.172769814.48739807/v1, 2024, Zugriff am 04.02.2025.

Die Vorbereitung der Massenproben kann nachfolgende Prozessschritte, wie die Bildgebung und die automatisierte Handhabung, stark vereinfachen. Insbesondere die Größenvorsortierung kann viele Prozesse erleichtern, da die Systeme auf definierte Größenkategorien spezialisiert werden können. Deshalb soll diese im Folgenden genauer betrachtet werden. Dazu werden die Anforderungen an ein System zur Größenvorsortierung in Tabelle 4.1 aufgeführt und in Anhang A.1 detailliert dargelegt. Dabei sind die zu erreichenden Größenklassen, neben der Effizienz und der Unversehrtheit der Proben, als die wichtigsten Anforderungen zu nennen. Zudem ist die Entwicklung eines eigenständigen Systems anzustreben, um die Anpassbarkeit an verschiedene Anwendungen zu gewährleisten. Die Größenklassen sollen den in Kapitel 2.2 definierten Größenklassen von  $< 3$  mm, 3 mm - 8 mm, 8 mm - 15 mm und  $> 15$  mm entsprechen, jedoch auch weiter angepasst werden können. Weiterhin soll eine hohe Effizienz von mehr als 90 % erreicht werden, d.h. dass mindestens 90 % der Insekten, die einer Größenklasse zugehörig sind, auch in dieser vorzufinden sind. Zudem ist ein System zur Größenfraktionierung nur dann nutzbar, wenn die Insekten während des Prozesses nicht beschädigt werden, da ansonsten anschließend keine morphologischen Untersuchungen mehr vorgenommen werden können. Diese Anforderung beinhaltet ebenfalls, dass die Insekten für die Größenvorsortierung nicht getrocknet werden dürfen. Um die Verfügbarkeit des Systems für alle interessierten Forschenden zu ermöglichen, soll das System leicht reproduzierbar sein und ohne besondere Vorkenntnisse nachgebaut werden können. Dazu ist das System als *Open Source* Projekt zu publizieren. Weiterhin soll es eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten und nicht teuer als 500 € sein, um auch in Institutionen mit wenig Platz und eingeschränkten finanziellen Mitteln verwendet werden zu können.

**Tabelle 4.1:** Übersicht über die wichtigsten Anforderungen an ein System zur Fraktionierung von nass konservierten Insekten-Massenproben. Detaillierte Anforderungen sind Anhang A.1 zu entnehmen.

Parameter	Anforderung
Reproduzierbarkeit	Das System soll ohne besondere (technische) Vorkenntnisse aufgebaut werden können.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten.
Größenklassen	Das System soll Insekten-Massenproben in alle definierten Größenklassen (vgl. Kapitel 2.2) fraktionieren können.
Effizienz	Das System soll möglichst effizient sein. Es sollen mindestens 90 % aller Insekten einer Größenfraktion auch in dieser vorzufinden sein.
Zeit	Die Verarbeitungszeit pro Probe soll möglichst kurz sein, 2 h aber nicht überschreiten.
Unversehrtheit der Proben	Das System muss so gestaltet werden, dass die Proben durch das System nicht beschädigt werden. Zudem muss sichergestellt werden, dass die Probe durchgängig in Flüssigkeit verbleibt, um ein Austrocknen zu verhindern.
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 500 € nicht übersteigen.
<i>Open Source</i>	Alle Komponenten des Systems sollen <i>Open Source</i> sein, das beinhaltet sowohl die Hardware als auch die Software.

## 4.1 Stand der Technik zur Fraktionierung von Insektenproben

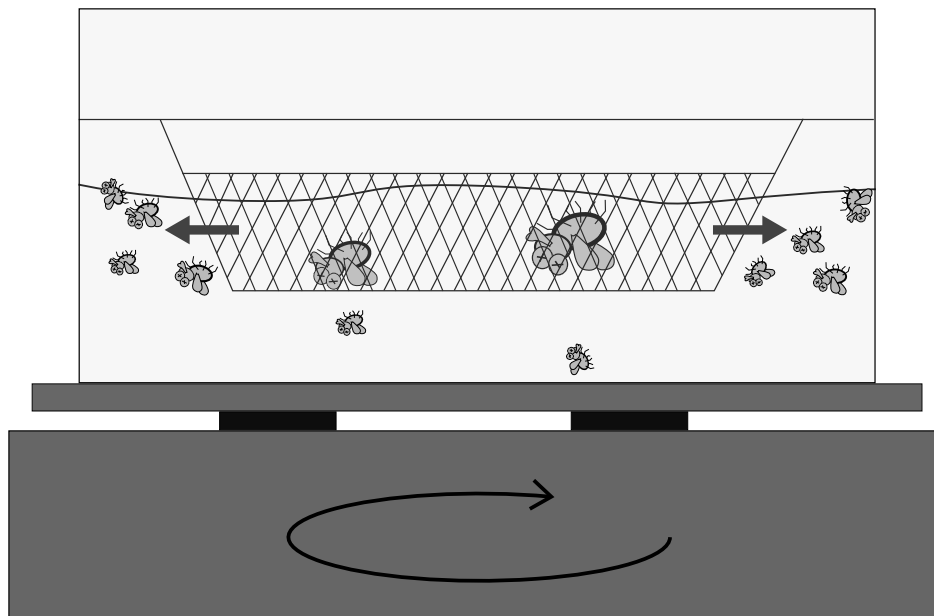
Publizierte Methoden zur Größenfraktionierung von Insekten-Massenproben, wie sie bspw. mit Malaise Fallen gefangen werden, sind in der Literatur kaum vertreten. Ein als 'Fraktionierer' bezeichnetes System dient bspw. dem Aufteilen von Massenproben in zwei einheitliche Teilmengen, jedoch nicht der Größensortierung [87]. Eine weitere Methode wird für die Größenfraktionierung von getrockneten Insekten beschrieben. Elbrecht et al. (2020) [88] nutzen gestapelte Lochsiebe mit 2 mm, 4 mm und 8 mm großen Löchern, um die zuvor bei 50 °C für fünf Tage getrockneten Insekten in vier Fraktionen zu unterteilen. Durch das Trocknen werden die Insekten jedoch beschädigt und eignen sich anschließend nicht mehr zur morphologischen Untersuchung. Elbrecht et al. (2020) [88] nutzen sie jedoch anschließend für das Metabarcoding, weshalb darauf in diesem Fall nicht geachtet werden muss. Die Fraktionierung nass konservierter Insekten, die nicht beschädigt werden sollen, um deren Morphologie anschließend noch untersuchen zu können, stellt eine größere Herausforderung dar. Der *Fractionator* von Buffington und Gates (2008) [89] eignet sich zum Fraktionieren nass konservierter Massenproben in zwei Größenkategorien und wird auch aktuell noch bspw.

zur Abtrennung von Hymenoptera-Familien aus Massenproben eingesetzt. [90]. Buffington und Gates nutzen dazu eine Kunststoffbox mit einem passenden Küchensieb. Das Sieb passt in die Box, ohne sich zu bewegen und hat Abstandshalter an der Unterseite, um einen Abstand zwischen dem Boden der Wanne und dem Sieb zu erzeugen. Zur Fraktionierung wird die Box ca. 5 cm - 6 cm hoch mit Seifenwasser gefüllt und die Massenprobe in das Sieb gegeben. Anschließend wird die Probe auf einem Orbitalschüttler für etwa zwei Stunden bewegt. Dabei soll die Geschwindigkeit so gewählt werden, dass leichte Wellenbewegungen entstehen. Nach der Fraktionierung wird die kleine Fraktion durch einen Filter abgegossen und gut gespült, um die Seife vollständig zu entfernen. Zuletzt wird sie in Ethanol gegeben. Die im Sieb verbleibende, große Fraktion wird zunächst aus dem Sieb geklopft und anschließend mit Wasser vermengt, um damit genau so zu verfahren wie mit der kleinen. Die Effizienz des Systems wird für verschiedene Familien der Ordnung Hymenoptera evaluiert und erreicht 93,53 %, d.h. weniger als 7 % der Insekten der untersuchten Familien sind in der großen Fraktion verblieben. Ob die Insekten während des Sortierprozesses beschädigt werden, untersuchen Buffington und Gates (2008) [89] nicht.

## 4.2 Konzept und Methoden

Das von Buffington und Gates (2008) [89] vorgeschlagene System liefert gute Ergebnisse zur Fraktionierung in zwei Größenkategorien. Die Verwendung des Küchensiebs zur Fraktionierung bestimmt jedoch die Größen der Insekten in den beiden Fraktionen und ist nicht anpassbar. Die von Elbrecht et al. (2020) [88] verwendeten Lochsiebe sind mit verschiedenen großen Löchern verfügbar, haben im Vergleich zum verwendeten Küchensieb jedoch den Nachteil, dass das Sieb nur an der Unterseite Perforierungen aufweist. Vorversuche unter Verwendung von Lochsieben, in Kombination mit einem Orbitalschüttler, wie ihn Buffington und Gates verwenden, zeigen, dass die Insekten nicht zuverlässig absinken und somit ein effizientes Fraktionieren nicht möglich ist, wenn Wasser als Medium verwendet wird. Bei Verwendung des Küchensiebs findet die Sortierung hauptsächlich durch die Wellenbewegung an der Oberfläche und die seitlichen Öffnungen des Siebs statt, wie in Abbildung 4.1 dargestellt.

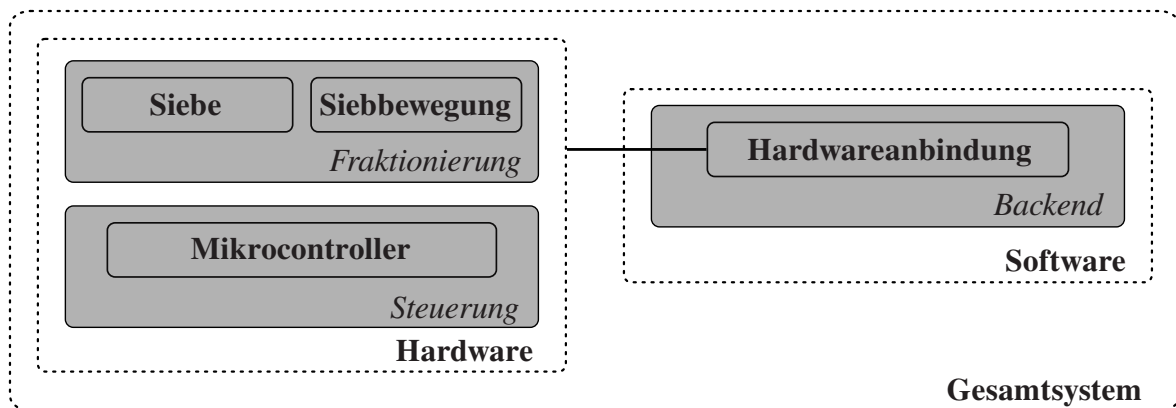
Die Verwendung von Ethanol als Siebmedium wird aufgrund der notwendigen Menge und des damit einhergehenden Sicherheitsrisikos ausgeschlossen, auch wenn die Insekten darin, insbesondere wenn die Konzentration höher ist als die, in der die Insekten gelagert werden (80 %), zuverlässig absinken. Zur Implementierung einer Methode mit Lochsieben unterschiedlicher Perforierungsgrößen muss demnach entweder eine andere Bewegung für das Sieben als durch einen Orbitalschüttler gegeben realisiert werden oder Lochsiebe unterschiedlicher Lochgröße mit seitlichen Öffnungen gefunden werden. Lochsiebe mit Perforierungen ausschließlich auf der Unterseite sind weiter verbreitet und einfach selbst herzustellen. Selbst hergestellte Siebe



**Abbildung 4.1:** *Fractionator* nach Buffington und Gates (2008) [89]. Die Fraktionierung findet aufgrund der im Wasser nicht zuverlässig absinkenden Insekten primär über die Seitenwände des verwendeten Küchensiebs statt.

bieten den Vorteil, dass ggf. notwendige Aufnahmen für die Siebbewegung direkt an das Gehäuse des Siebes selbst implementiert werden können und keine Bearbeitung gekaufter Siebe stattfinden muss. Zusätzlich steigert es die Verfügbarkeit, wenn das System nicht auf spezielle zugekaufte Teile angewiesen ist. Die Verwendung eines Lochsiebs, mit Perforierungen auf der Unterseite und geschlossenen Seitenwänden, erfordert eine vertikale Bewegung. Die Insekten sollen beim Abfließen der Flüssigkeit aus dem Sieb getrennt werden. Kleine Insekten fließen mit ab, während Insekten, die zu groß für die Löcher sind, im Sieb verbleiben.

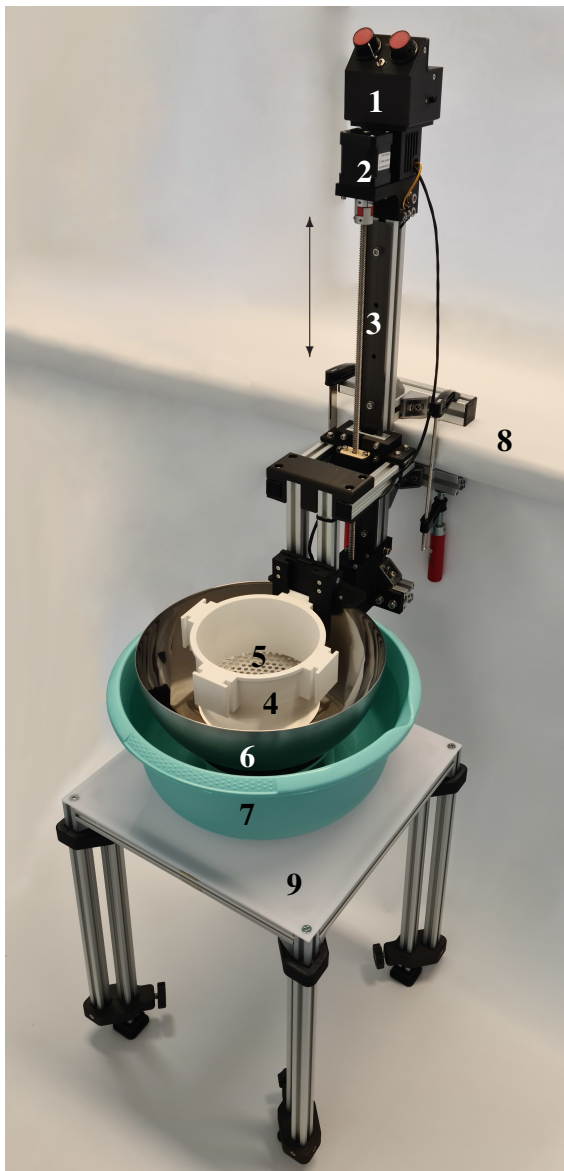
Das Gesamtsystem zur Fraktionierung von Insekten aus Massenproben in definierte Größenklassen kann in verschiedene Teilsysteme untergliedert werden (vgl. Abbildung 4.2). Hardwareseitig müssen Siebe mit einer geeigneten Siebbewegung kombiniert werden. Für den Anwendungsfall sollen selbst hergestellte Lochsiebe verwendet werden, die ausschließlich auf der Unterseite Perforierungen aufweisen und mit einer vertikalen linearen Bewegung kombiniert werden. Diese Bewegung soll automatisiert erfolgen und über einen Mikrocontroller gesteuert werden. Auf dem Mikrocontroller muss eine geeignete Software implementiert werden, um die Hardware anzubinden.



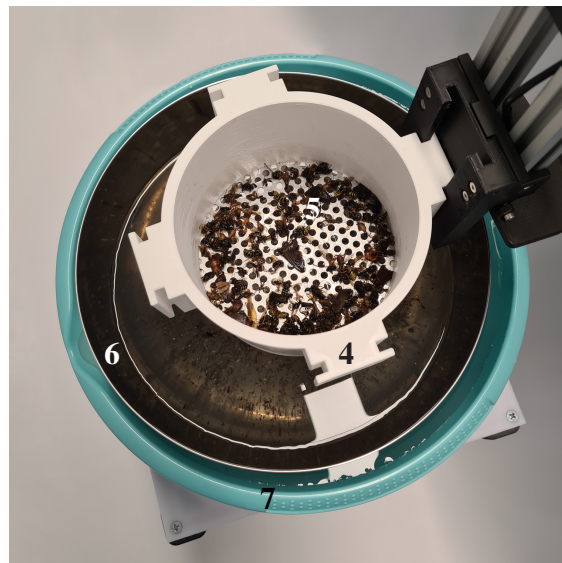
**Abbildung 4.2:** Das Gesamtsystem zur Fraktionierung der Insekten nach Größe umfasst mehrere Teilsysteme. Hardwareseitig muss zunächst ein geeignetes Sieb mit einer passenden Bewegung kombiniert werden. Zudem soll ein mit einem Mikrocontroller die Steuerung realisiert werden. Die Bewegung muss über die Software gesteuert werden.

### 4.3 Aufbau der vorgeschlagenen Methode zur Fraktionierung von Insektenproben

Der Aufbau des Systems zur Fraktionierung von Insektenproben in definierte Größenklassen erfolgt entsprechend der vorgeschlagenen Methode. Das System ist in Abbildung 4.3a dargestellt. Die Siebbewegung wird über einen Arduino Nano in einer Elektronikbox (1) durch zwei Drehregler gesteuert. Diese bieten die Möglichkeit, die Geschwindigkeit und den Hub des Systems einzustellen. Nach Programmstart wird der durch einen Schrittmotor (2) über eine Steilgewindespindel (Ds 8 mm x 10 mm, dryspin, Igus GmbH, Köln, Deutschland) mit passender Flanschgewindemutter (dryspin JFRM, Igus GmbH, Köln, Deutschland) angetriebene und gleitgelagerte Schlitten (drylin W Komplettschlitten WWQ, Igus GmbH, Köln, Deutschland) entlang einer hartanodisierten Aluminiumschiene (drylin W Doppelschiene WSQ, Igus GmbH, Köln, Deutschland) bewegt (3). Zunächst wird über einen unteren Referenzschalter der tiefste Punkt bestimmt, anschließend über den oberen der höchste. Je nach eingestellten Parametern beginnt das System dann mit einer kontinuierlichen Hub- und Senkbewegung des 3D-gedruckten Siebbehälters (4). Als Siebe werden 1 mm starke Aluminiumlochbleche mit unterschiedlichen Perforierungsdurchmessern für die verschiedenen Größenklassen gewählt, da diese günstig (ca. 50 €/m<sup>2</sup>) und weit verbreitet sind. Diese werden rund, mit einem Durchmesser von 138 mm, zugeschnitten und können dann in den Siebbehälter gelegt werden (5). Während des Siebens verbleiben Insekten, die zu groß für die Perforierungen sind im Siebbehälter. Kleinere Insekten werden aus dem Siebbehälter in den inneren Behälter gespült (vgl. Abbildung 4.3b). Dieser verfügt über ein Filter auf der Unterseite, sodass das Wasser, welches sich darin befindet, in den äußeren Behälter (7) abfließen kann, wenn der innere Behälter nach dem Sieben entnommen wird. Die kleine Fraktion verbleibt dann im Filter des inneren Behälters. Der mit Aluminiumstrebenprofilen (30 mm x 30 mm und 20 mm x 20 mm,



(a) Gesamtaufbau zur Fraktionierung von Massenproben.



(b) Sieb gefüllt mit Insekten nach der Fraktionierung.



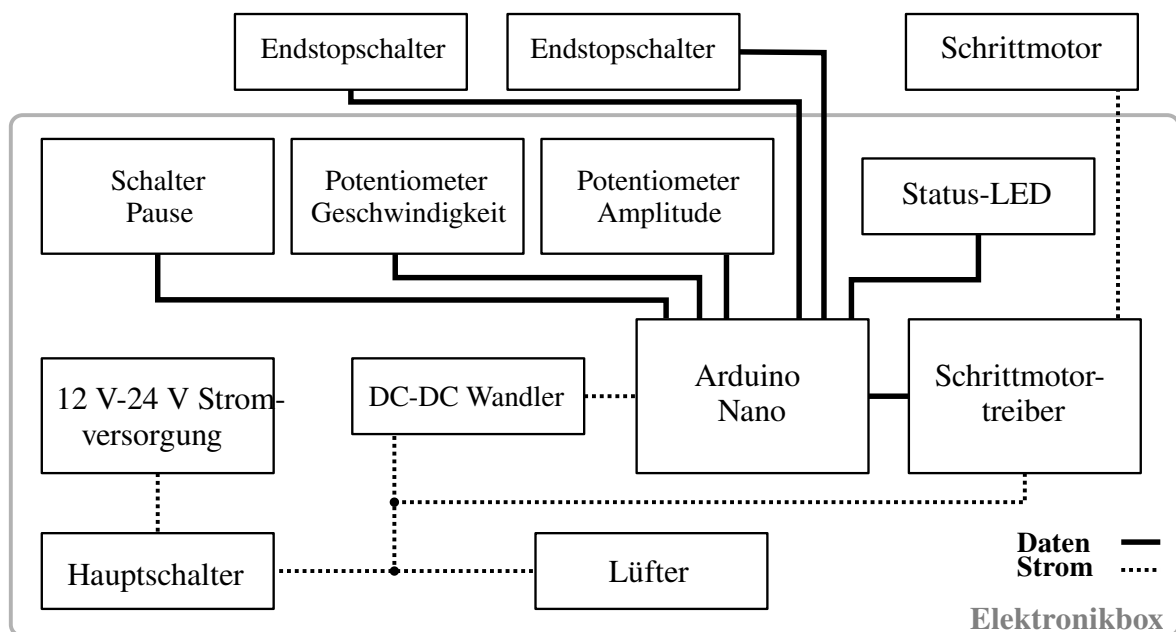
(c) Doppelsiebsystem zum einfachen Wechsel der Siebe.

**Abbildung 4.3:** System zur Fraktionierung von Insekten-Massenproben in definierte Größenklassen. Mit (1) Elektronikbox mit Mikrocontroller und Drehreglern zur Einstellung der Geschwindigkeit und des Hubs, (2) Schrittmotor, (3) Linearführung mit Spindelantrieb, (4) Siebbehälter, (5) Lochsieb, (6) innerer Behälter mit Filter zur Trennung der Insekten vom Wasser, (7) äußerer Behälter. Das System ist am (8) Tisch montiert, um maximale Stabilität zu gewährleisten. Der innere und äußere Behälter stehen auf einem (9) höhenverstellbaren Tisch. Um die Insekten für die nächste Größenkategorie schnell in einen zweiten Siebbehälter überführen zu können, sind die (10) Siebbehälter stapelbar und können mithilfe von (11) Klammern temporär fixiert werden. Modifiziert nach [86].

Bosch Rexroth AG, Lohr am Main, Deutschland) aufgebaute Siebaufbau wird mit Schraubzwingen (8) an einem Tisch befestigt, um maximale Stabilität zu gewährleisten. Die Behälter werden während des Siebens auf einem in der Höhe verstellbaren Tisch (9) platziert. Damit ist das System für unterschiedliche Montagehöhen anpassbar.

Ist die Fraktionierung mit einer Siebgröße abgeschlossen, werden die Insekten aus dem inneren Behälter entfernt und dieser anschließend wieder in den äußeren Behälter gestellt. Die im Siebbehälter verbleibende Fraktion wird anschließend in einen Siebbehälter mit einem Aluminiumlochblech mit größeren Perforierungen überführt. Dazu wird dieser zweite Siebbehälter auf den mit den Insekten gefüllten gestellt und über die in Abbildung 4.3c zu sehenden Klammern (11) fixiert. Anschließend können die Siebbehälter um 180° gedreht werden und die Insekten in den zweiten Siebbehälter gespült werden. Daraufhin kann wieder mit dem Siebprozess begonnen werden.

Der elektronische Aufbau des Systems ist sehr einfach gehalten, um die Anforderung an die Reproduzierbarkeit bestmöglich zu erfüllen. Eine Übersicht aller elektronischen Komponenten ist in Abbildung 4.4 dargestellt.



**Abbildung 4.4:** Schematischer Aufbau aller elektronischer Komponenten des Systems zur Größenvorsortierung von Insekten-Massenproben. Ein Arduino Nano steuert alle Vorgänge. Das System wird mit 12 V - 24 V DC mit Strom versorgt und kann über einen Hauptschalter ein- und ausgeschaltet werden. Ein DC-DC Wandler reduziert die Eingangsspannung auf die nötigen 5 V für den Arduino Nano. Über zwei Potentiometer können Amplitude und Geschwindigkeit eingestellt werden. Über einen Schalter kann das System pausiert werden. Der für die Hubbewegung notwendige Schrittmotor wird über einen Schrittmotortreiber mit dem Arduino Nano verbunden. Die Achse kann mittels Endstopschaltern referenziert werden. Datenkabel sind als durchgezogene Linien visualisiert, Kabel zur Energieversorgung sind gepunktet dargestellt.

Das System verfügt über einen Arduino Nano, der zur Steuerung genutzt wird. Zudem besitzt es einen DC-DC-Spannungswandler, welcher die Eingangsspannung, welche in einem Bereich von 12 V - 24 V liegen kann, auf die notwendige 5 V Versorgungsspannung des Arduino Nanos reduziert. Weiterhin ist der Schrittmotor (Nema 17-1, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) über einen Schrittmotortreiber vom Typ A4988 (Pololu Corporation, Las Vegas, USA) mit dem Arduino verbunden. Zwei Endstopschalter dienen

dem Referenzieren der Achsen. Zudem werden über zwei analoge Eingänge des Arduinos zwei Potentiometer ausgelesen, die zur Steuerung der Geschwindigkeit und Amplitude des Systems genutzt werden. Eine Rot-Grün-Blau (RGB)-*Light Emitting Diode* (LED) wird verwendet, um den Status des Systems anzuzeigen.

## 4.4 Evaluierung des Systems zur Fraktionierung von Insektenproben

Das im Umfang der vorliegenden Promotion entwickelte System wird in Kooperation mit dem Museum für Naturkunde Berlin, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung und der *Sapienza University of Rome, Department of Environmental Biology* evaluiert [86]. Bereits durchgeführte Versuche zeigen, dass eine klare Fraktionierung stattfindet (vgl. Abbildung 4.5), eine quantitative Auswertung steht jedoch noch aus. Pro Siebgröße wurde jeweils zehn Minuten gesiebt. Die Zeit zum Entfernen der kleinen Fraktion aus dem inneren Behälter und die Überführung in Ethanol nahm pro Fraktion weitere fünf Minuten in Anspruch, das Wechseln der Siebgröße erfolgte ebenfalls in rund fünf Minuten.

## 4.5 Diskussion und Ausblick

Die vorgestellte Methode zur Fraktionierung von Insekten aus Massenproben, wie sie bei der Verwendung von Malaise Fallen oder Schalenfallen gewonnen werden, eignet sich zur Unterteilung der Proben in verschiedene Größenklassen. Dabei können die Größenklassen durch die Wahl unterschiedlicher Lochbleche, welche zur Fraktionierung genutzt werden, frei eingestellt werden. Auch ohne quantitative Analyse ist anhand der vorliegenden Ergebnisse ersichtlich, dass eine Fraktionierung stattfindet. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass Insekten anderer Größenkategorien als der Zielkategorie in den Fraktionen vorliegen. Dies kann für die beiden möglichen Fehler K1 und K2 auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden.

K1 - Kleinere Insekten als die Zielgröße befinden sich in der Fraktion.

K2 - Größere Insekten als die Zielgröße befinden sich in der Fraktion.

Für Fehler der Kategorie K1, kann ein Verhaken der kleinen Insekten in den großen dazu führen, dass diese nicht ausgespült werden. Außerdem kommt hinzu, dass der Siebbehälter immer wieder in die Flüssigkeit getaucht wird, in dem sich die kleine, auszuspülende Fraktion befindet. Dabei kommt es auch dazu, dass eigentlich schon ausgespülte Insekten wieder in den Siebbehälter gespült werden. Die durch das Sieben in der Flüssigkeit erzeugte Bewegung führt dazu, dass die Insekten tendenziell im inneren Behälter nach außen treiben. Zudem besitzt



(a) Ergebnis des Siebprozesses, Insekten der Größenkategorie  $> 15$  mm.



(b) Ergebnis des Siebprozesses, Insekten der Größenkategorie 8 mm - 15 mm.



(c) Ergebnis des Siebprozesses, Insekten der Größenkategorie 3 mm - 8 mm.



(d) Ergebnis des Siebprozesses, Insekten der Größenkategorie  $< 3$  mm.

**Abbildung 4.5:** Verschiedene Fraktionen gesiebt mit dem vorgeschlagenen Aufbau. Es sind vier Fraktionen dargestellt:  $> 15$  mm, 8 mm - 15 mm, 3 mm - 8 mm und  $< 3$  mm entsprechen den definierten Größenkategorien.

der Siebbehälter einen 10 mm hohen Rand unterhalb des Siebs, um die Anzahl der zurückgespülten Insekten zu reduzieren. Vollständig verhindern lässt es sich jedoch nicht. Es ist zu erwarten, dass wiederholtes Sieben, mit zwischenzeitlichem Entfernen der kleinen Fraktion aus dem inneren Behälter dazu führt, dass weniger Fehler der Kategorie K1 auftreten. Für Fehler der Kategorie K2 kann die Form der Proben verantwortlich gemacht werden. Ziel ist es, die Proben nach ihrer Körperlänge zu sortieren. Lange, aber schmale Insekten passen jedoch richtungsabhängig durch Löcher, welche deutlich kleiner als deren Länge sind. Um Fehler der Kategorie K2 möglichst gering zu halten, sollte die Siebzeit möglichst kurz gewählt werden. Die optimalen Parameter zum Sieben mit der vorgestellten Methode müssen zukünftig

anhand von Versuchsreihen ermittelt werden und hängen von den gewünschten Größenkategorien und der Toleranz gegenüber Fehlern der Kategorien K1 und K2 ab. Während eine kürzere Siebzeit voraussichtlich zu weniger Fehlern der Kategorie K2 führt, ist zu erwarten, dass sich die Anzahl von Fehlern der Kategorie K1 durch längere Siebzeiten reduzieren lässt. Lange Siebzeiten erhöhen jedoch auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Insekten beschädigt werden. Ähnliche Einschränkungen sind für die gewählte Geschwindigkeit gegeben. Während bei höheren Bewegungsgeschwindigkeiten, aufgrund der erhöhten Strömungsgeschwindigkeit am Sieb, zu erwarten ist, dass die Insekten zuverlässiger ausgespült werden, können zu hohe Geschwindigkeiten dazu führen, dass die Insekten beschädigt werden.

Die an das System gestellten Anforderungen werden nur teilweise erfüllt oder verlangen tiefergehende Analysen der Ergebnisse. Durch den Aufbau aus kommerziell verfügbaren Komponenten und der Verwendung von 3D-gedruckten Teilen ist die Reproduzierbarkeit des Systems gewährleistet. Die Gesamtgröße (200 mm x 425 mm x 670 mm, b x t x h, ohne höhenverstellbaren Tisch und inneren und äußeren Behälter) überschreitet die definierte Gesamtgröße, ist aufgrund der Montage an der Tischkante jedoch nicht kritisch, da das System unabhängig von der Tischgröße ist. Effizienz und Unversehrtheit der Probe erfordern eine quantitative Analyse. Die Verarbeitungszeit von maximal zwei Stunden kann eingehalten werden. Für die Fraktionierung der Probe zur Evaluation wurden insgesamt eine Stunde und 20 Minuten benötigt. Je nach Siebzeit kann sich diese Zeit jedoch noch ändern. Der Gesamtpreis des Systems beläuft sich auf ca. 420 €, die Anforderung an die Kosten wird demnach erfüllt. Die Publikation erfolgt *Open Access*, die Teile werden über das *Open Science Framework* (OSF) bereitgestellt: <https://osf.io/6t25n/>.

Zukünftig wird in Kooperation mit dem Museum für Naturkunde Berlin, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung und der *Sapienza University of Rome, Department of Environmental Biology* eine quantitative Evaluierung des Systems vorgenommen. Dazu wird eine Malaise Falle mit dem vorgestellten System fraktioniert und die Ergebnisse werden systematisch ausgewertet.

## **Teil II**

# **Teilautomatisierte Bildgebung von Insekten in Ethanol**



# Übersicht Teil II

Von einer Teilautomatisierung der bislang in vielen Fällen ausschließlich manuell durchgeführten Bildgebung von Arthropoden und insbesondere von Insekten in Ethanol kann die Biodiversitätsforschung bereits enorm profitieren. Um die Abgrenzung eines teilautomatisierten Systems von einem manuellen oder automatisierten System eindeutig zu ermöglichen, wird im Folgenden die Definition für ein teilautomatisiertes System gegeben:

*Ein System wird als teilautomatisiertes System zur Bildgebung definiert, wenn die abzubildenden Objekte zwar manuell und einzeln zur Bildgebung vor der Kamera platziert werden müssen, die Bildaufnahme und das Datenmanagement, sowie die Bildverarbeitung anschließend jedoch automatisiert ablaufen.*

Mit einem standardisierten, einfach und günstig zu reproduzierenden teilautomatisierten Aufbau zur Bildgebung können Datensätze einheitlich, vergleichbar und kostengünstig erstellt werden. Der Fokus bei der Entwicklung eines solchen Systems liegt dabei auf der Reproduzierbarkeit und der Bildqualität. Teil II der vorliegenden Dissertation umfasst die Entwicklung solcher teilautomatisierter Systeme. Es werden zwei verschiedene Versionen des 'Entomoscopes' vorgestellt. Die *Standalone* Version, sowie die *Plug-In* Version. Beide eignen sich zur Aufnahme von Arthropoden in Ethanol, erfüllen jedoch leicht unterschiedliche Anforderungen. Das Standalone Entomoscope nutzt einen Raspberry Pi als zentrales Steuerelement, der in das System integriert ist. Somit wird ein alleinstehendes System realisiert, jedoch mit der Einschränkung auf die begrenzte Leistung des Raspberry Pi. Die Plug-In Version muss für den Betrieb an einen externen *Personal Computer* (PC) oder Laptop angeschlossen werden. Es bietet jedoch den Vorteil, dass es günstiger nachgebaut werden kann und die Bildverarbeitung auf dem angeschlossenen Computer stattfindet. Im Rahmen des Forschungsprojekts wurden bislang vier Standalone Entomoscopes und 15 Plug-In Entomoscopes an verschiedene, internationale Forschungseinrichtungen in Europa und Australien verteilt.

Zusätzlich zur Bildgebung aus einer Perspektive, kann die Aufnahme mehrerer Perspektiven große Vorteile für die Biodiversitätsforschung bringen. Der größte Vorteil liegt darin, dass morphologische Merkmale, welche in einer Perspektive verdeckt sein können, in einer anderen sichtbar werden. Aus diesem Grund umfasst Teil II ebenfalls die Entwicklung einer Methode zur multiperspektivischen Bildgebung. Das System, der 'DiversityScanner-360°' rotiert zur Bildgebung um ein Glasröhrchen, in welchem sich die zu fotografierende Probe befindet. Zur Reduktion der Brechung an der runden Oberfläche des Glases wird eine Bildgebungszelle, gefüllt mit Flüssigkeit, implementiert.



## 5 Konzept zur teilautomatisierten Bildgebung: Entomoscope

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wühl, L. Rettenberger, R. Meier, E. Hartop, J. Graf, und C. Pylatiuk, „Entomoscope: An Open-Source Photomicroscope for Biodiversity Discovery,” *IEEE Access*, Vol. 12, S. 11 785–11 794, 2024. doi: 10.1109/ACCESS.2024.3355272.

In diesem Kapitel wird zunächst der aktuelle Stand der Technik zur Bildgebung von Insekten vorgestellt. Dabei werden nicht nur teilautomatisierte Systeme betrachtet, sondern auch die konventionelle Herangehensweise zur Bildgebung von Insekten mit einbezogen. Eine eingehende Literaturrecherche zeigt, dass bisher kein einfach reproduzierbares, teilautomatisiertes System existiert, das alle in Tabelle 5.1 zusammengefassten Anforderungen vollständig erfüllt.

Im Weiteren werden das Konzept und Methoden für das teilautomatisierte Bildgebungssystem erläutert. Grundlegendes Forschungsziel ist die Entwicklung eines kostengünstigen *Open Source* Systems zur standardisierten Bildgebung von Invertebraten in Ethanol mit gleichmäßiger Beleuchtung. Die generierten Bilder sollen zur Klassifizierung der abgebildeten Invertebraten verwendet werden (vgl. Teil IV) und das System damit zu einem smarten Instrument zur Erforschung der Biodiversität unter Insekten machen. Es werden zwei verschiedene Versionen beschrieben. Die erste Version ist ein eigenständiges System, das lediglich ein externes Netzteil für den Betrieb erfordert. Das zweite System hingegen benötigt zusätzlich einen PC oder Laptop für den Betrieb. Detaillierte Anforderungen können Anhang A.2 entnommen werden.

Eine der zentralen Anforderungen an die Systeme ist die Reproduzierbarkeit, damit sie ohne besondere Vorkenntnisse nachgebaut werden können. Dies ist insbesondere wichtig, da die Zielgruppe des Systems Entomolog:innen sind, die häufig wenig oder keine Erfahrung im Aufbau technischer Systeme haben. Zusätzlich sollen alle Komponenten kommerziell verfügbar sein oder mittels 3D-Druck herstellbar. Eine weitere wichtige Anforderung ist die Gesamtgröße des Systems, diese sollte 500 x 300 x 300 mm (h x b x t) nicht überschreiten. Des Weiteren muss das System in der Lage sein, alle in Malaise Fallen gefangenen Insekten abzubilden. Hierbei müssen die in Kapitel 2.2 definierten Größenklassen (< 3 mm, 3 mm - 8 mm, 8 mm - 15 mm und > 15 mm) abgedeckt werden und eine ausreichende Schärfentiefe

**Tabelle 5.1:** Übersicht über die wichtigsten Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur Bildgebung von Insekten in Ethanol. Detaillierte Anforderungen sind Anhang A.2 zu entnehmen.

Parameter	Anforderung
Reproduzierbarkeit	Das System soll ohne besondere (technische) Vorkenntnisse aufgebaut werden können.
Größe und Gewicht	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 300 mm x 300 mm x 600 mm (b x t x h) nicht überschreiten und nicht schwerer als 5 kg sein, um die Transportierbarkeit zu gewährleisten.
Probengröße	Es sollen alle in Kapitel 2.2 definierten Größenklassen (< 3 mm, 3 mm - 8 mm, 8 mm - 15 mm und > 15 mm) fotografiert werden können. Für die letzte Größenkategorie (> 15 mm) wird eine Beschränkung auf maximal 40 mm festgelegt. Größere Insekten sind in Malaise Fallen Proben nur sehr selten vertreten [20].
Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten aller Größenklassen (vgl. Probengröße) vollständig und in allen Bereichen scharf abbilden zu können.
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen, ist demnach möglichst diffus. Zusätzlich dürfen helle Strukturen nicht zu stark beleuchtet und dunkle nicht zu wenig beleuchtet werden.
Auflösung	Die Auflösung des Systems soll möglichst hoch sein, mindestens aber 12 MP (4K) betragen, um feine Strukturen sicher abbilden zu können.
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 1500 € nicht übersteigen.
Anpassbarkeit	Das System soll für verschiedene Anwendungsfälle anpassbar sein. Dies beinhaltet die Anpassbarkeit der Funktionalität, als auch die Anpassbarkeit an äußere Rahmenbedingungen.
Software	Das System muss über eine geeignete Software verfügen, um eine einfache Bedienung zu gewährleisten.
<i>Open Source</i>	Alle Komponenten des Systems sollen <i>Open Source</i> sein, das beinhaltet sowohl die Hardware als auch die Software.

ist erforderlich, um alle charakteristischen Merkmale der Insekten darzustellen. Die Qualität eines Bildes ist stark von der Beleuchtung abhängig, daher muss diese geeignet sein, Insekten in Ethanol abzubilden und keine Reflexionen auf dem Ethanol oder den Insekten zu erzeugen. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Auflösung des Sensors, die nicht unter 12 MP liegen sollte. Die Kosten für den Aufbau des Bildgebungssystems sollen minimal sein und dürfen 1500 € nicht übersteigen, um sicherzustellen, dass es auch in ressourcenschwächeren Institutionen verwendet werden kann und somit weitläufig zur Verfügung steht. Das System muss

anpassbar sein, da möglicherweise nicht immer alle notwendigen Komponenten verfügbar sind. Es sollte so konzipiert werden, dass fehlende Komponenten durch andere ersetzbar sind. Zusätzlich muss das System über eine geeignete Software verfügen, die einfach zu installieren und zu bedienen ist. Sowohl die Software als auch die Hardware sollen *Open Source* sein und unter dem Aspekt von *Open Science* publiziert werden, um eine breite Verfügbarkeit zu gewährleisten.

## 5.1 Stand der Technik zur manuellen und teilautomatisierten Bildgebung von Insekten in Ethanol

Die Bildgebung von Insekten ist selten Bestandteil von Projekten zur Untersuchung der Biodiversität. Dies liegt unter anderem daran, dass es bislang keine standardisierte Lösung zur Bildgebung von Insekten in Ethanol gibt. Zur Bildgebung werden deshalb häufig kommerzielle Mikroskope genutzt, die im Labor zur morphologischen Untersuchung bereits vorhanden sind und mit Kameras ausgestattet werden [92–95]. Carrington-Hoekstra et al. (2023) [95] nutzen bspw. ein Leica M205 C Stereomikroskop mit 5 MP Leica DFC 425 Mikroskopkamera. Auch kommerzielle digitale Mikroskope finden dafür Verwendung und nahezu alle Mikroskophersteller bieten passende Lösungen [96]. Beispielsweise Mikroskope von Keyence (Osaka, Japan) der VHX-Serie werden häufig verwendet [95, 97, 98]. Aufgrund des Preises eignen sich diese Geräte jedoch nicht für die kostengünstige Bildgebung und sind somit Institutionen mit ausreichend finanziellen Mitteln vorbehalten. Das VHX-7000 (Keyence, Osaka, Japan) liegt beispielsweise im oberen fünfstelligen Dollarbereich. Kostengünstiger ist die Verwendung von Digitalkameras mit Makroobjektiven, weswegen diese auch häufig in personalisierten Aufbauten Verwendung finden [68, 69, 96, 99–104]. Diese Aufbauten bestehen meist aus einem Stativ, an dem die Kamera befestigt wird. Insekten werden dann zur Bildgebung unter dem Objektiv platziert. Zur Beleuchtung finden individuelle Konstruktionen oder Kamerablitz Verwendung. Um die notwendige Schärfentiefe zu erreichen, werden die Aufbauten meist um eine motorisierte Linearführung ergänzt, die dazu genutzt wird den Abstand zwischen Kamera und Objekt zu verändern und so Bilder mit unterschiedlicher Fokusebene (FE) für das *Focus Stacking* aufzunehmen [69, 96]. Verschiedene Kameras bieten diese Funktion bereits, weswegen auch sie zur Aufnahme von Insekten genutzt werden [68, 103]. Zusätzlich zu Kameras werden auch Flachbettscanner zur Bildgebung von Insekten verwendet [105–108]. Diese bieten den Vorteil, dass mehrere Insekten gleichzeitig aufgenommen werden, erfordern jedoch ein Ausschneiden der einzelnen Insekten aus dem Gesamtbild. Zudem ist keine Personalisierung des Aufbaus möglich, Belichtung und Bildgebungsparameter sind durch den Scanner vorgegeben.

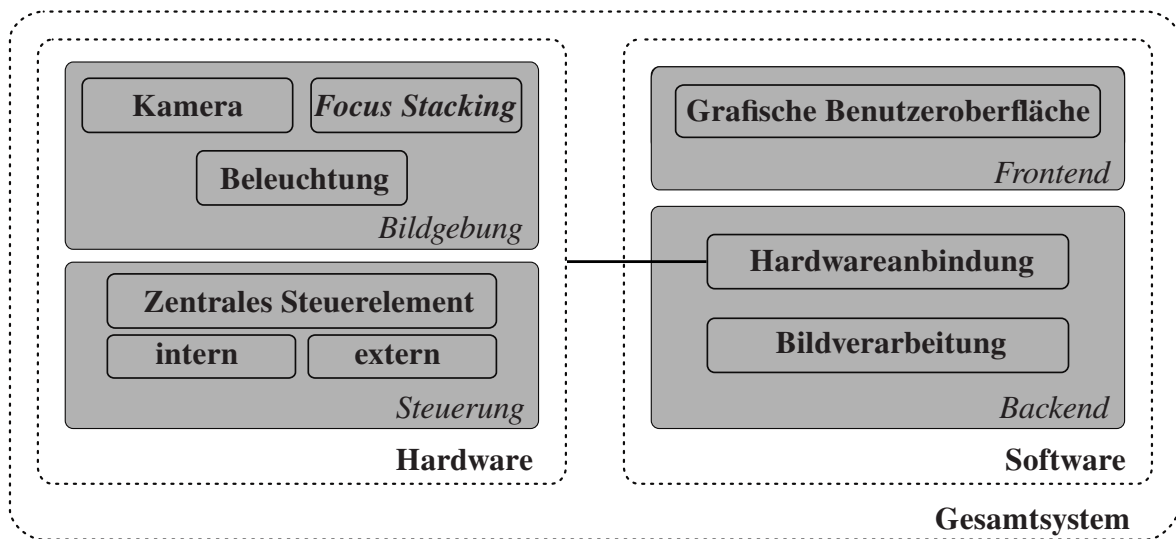
Zusätzlich zur Verwendung von kommerziellen Mikroskopen, Kameras und Flachbettscannern, gibt es auch erste *Open Source* Ansätze [109]. Der Aufbau von Raitoharju et al. (2018) [109] nutzt zwei Kameras, um Insekten in einer Küvette zu fotografieren. Dazu müssen sie manuell in die Küvette gegeben werden, Bilder werden dann automatisch beim Absinken der Insekten in der Küvette angefertigt. Später wurde der Aufbau von Ärje et al. (2020) [110] weiterentwickelt. Der Aufbau von Ärje et al. nutzt dasselbe Grundprinzip, erfordert aber nicht das Leeren der Küvetten, da die Insekten in einen Auffangbehälter unter dem System absinken. Auch in anderen Bereichen wird der *Open Source* und *Do It Yourself* (DIY) Ansatz genutzt, um kostengünstige und verfügbare Mikroskope zu realisieren [52, 111–114]. Häufig werden diese für einen sehr speziellen Anwendungsfall entwickelt. Beispielsweise Mikroskope zur Untersuchung von Bakterienkulturen [113, 114], ein Mikroskop zur Untersuchung von *C. elegans*, ein in der Biologie häufig genutzter Modellorganismus [111] oder ein Fluoreszenzmikroskop zur Bildgebung von Zellkulturen [112]. Bei den meisten DIY Mikroskopen handelt es sich jedoch um Durchlichtmikroskope, während DIY Auflichtmikroskope, welche zur Bildgebung von Insekten benötigt werden, bislang kaum entwickelt wurden [115–117].

## 5.2 Konzept und Methoden

Anhand der definierten Anforderungen soll ein Konzept für ein teilautomatisiertes Bildgebungssystem für Insekten in Ethanol entwickelt werden. Die Entwicklung des Systems orientiert sich an VDI 2206 (2021) [118]. Dazu wird das Gesamtsystem in Teilsysteme untergliedert, siehe Abbildung 5.1.

Grundlegend kann der Gesamtaufbau in Hardware und Software unterteilt werden. Die Hardware umfasst dabei elektronische und mechanische Komponenten. Im Detail wird eine Kamera mit geeigneter Optik benötigt, die über eine Möglichkeit zum *Focus Stacking* verfügen muss. Zur Bildgebung ist eine konsistente Belichtung entscheidend, daher muss das System über eine geeignete Belichtung verfügen. Zur Steuerung der Bildaufnahme wird ein zentrales Steuerelement benötigt. Dieses kann entweder als Bestandteil des Systems, also intern, oder als gesondertes System (extern) realisiert werden. Die Software muss eine Schnittstelle zum/-zur Anwender:in bereitstellen. Dies erfolgt am besten über eine grafische Benutzeroberfläche (*Graphical User Interface* (GUI)), im als *Frontend* bezeichneten Teil der Software. Der als *Backend* bezeichnete Teil der Software umfasst die Bildverarbeitung sowie die Hardwareanbindung.

Zur Fertigung soll auf kostengünstige und einfache Methoden zurückgegriffen werden. Alle Gehäuseteile werden im *Fused Deposition Modeling* (FDM) 3D-Druck Verfahren hergestellt. Alle weiteren Komponenten werden so ausgewählt, dass sie direkt verbaut werden können. Somit sind zum Aufbau des Systems nur grundlegende Kenntnisse im Aufbau von Hardware



**Abbildung 5.1:** Das Gesamtsystem zur teilautomatisierten Bildgebung von Insekten in Ethanol kann in zwei Teilsysteme untergliedert werden. Die Hardware umfasst dabei eine Kamera, ein System zum *Focus Stacking*, eine geeignete Belichtung sowie ein zentrales Steuerelement. Das Steuerelement kann entweder intern oder extern realisiert werden. Die Software bietet eine Schnittstelle zum/zur Nutzer:in sowie die Hardwareanbindung und eine Bildverarbeitung.

notwendig und beschränken sich auf das Verschrauben von Komponenten und Verbinden von Kabeln durch Löten.

Beide in Abbildung 5.1 dargestellten Wege zur Realisierung des zentralen Steuerelements bieten verschiedene Vorteile. Während ein internes Steuerelement ein alleinstehendes System ermöglicht, erfordert es auch weitere Komponenten wie einen Monitor und Speicherkapazität. Als externes Steuerelement kann beispielsweise ein PC oder Laptop genutzt werden. Dies reduziert die für das System notwendigen Komponenten, erfordert aber Zugang zu zusätzlicher Hardware. Für welches System die Vorteile überwiegen, entscheidet das Arbeitsumfeld und kann nicht allgemeingültig festgelegt werden. Aus diesem Grund werden für beide Konzepte Systeme entwickelt. Im Folgenden wird das System mit integriertem Steuerelement 'Standalone Entomoscope' und das System mit externem Steuerelement als 'Plug-In Entomoscope' bezeichnet. Die Bezeichnung setzt sich dabei aus den Begriffen 'Entomologie' und 'Mikroskop' zusammen.

## 5.3 Aufbau der Entomoscope Versionen

Im Folgenden wird zunächst der Aufbau des Standalone Entomosopes und anschließend der des Plug-In Entomosopes beschrieben. Dabei werden die Unterschiede beider Versionen detailliert aufgezeigt.

### 5.3.1 Standalone Entomoscope: Teilautomatisiertes Bildgebungssystem mit integriertem Steuerelement

Das Standalone Entomoscope ist in Abbildung 5.2 links dargestellt. Die Hardware des Systems



**Abbildung 5.2:** Standalone Entomoscope (links), mit (1) Basis, (2) *Universal Serial Bus* (USB)- und Netzwerk-Hub, (3) Beleuchtung, (4) 12-MP-Kamera mit (5) telezentrischem Objektiv, (6) 10-Zoll-HD-Touchscreen, (7) grafischer Benutzeroberfläche und (8) Fokussierad. Weiterhin dargestellt ist die 3D-Ansicht der *Focus Stacking* Einheit (rechts), mit (I) Schrittmotor, (II) Fokussierad, (III) Kupplungsadapter, (IV) Lineartisch, (V) Kameraeinheit mit Raspberry Pi HQ-Kamera und HDMI-Adapter, (VI) Objektiv. Modifiziert nach [91].

setzt sich aus dem mechanischen, sowie dem elektronischen Aufbau zusammen und wird im Folgenden im Detail beschrieben.

**Mechanischer Aufbau:** Das Standalone Entomoscope setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: der Basis, dem oberen Hauptrahmen und der *Focus Stacking* Einheit. Die Basis fungiert als Gehäuse für Elektronik und Beleuchtung, während sie gleichzeitig als Plattform für eine 60 mm Petrischale zur Platzierung von in Ethanol konservierten Insekten dient. Die Abmessungen der Basis betragen 200 mm x 200 mm x 80 mm (l x b x h). Die Objektbeleuchtung besteht aus einem *Light Emitting Diode* (LED)-Streifen mit weißen LEDs, die den Umfang der Petrischale beleuchten. Der obere Hauptrahmen ist mithilfe von zwei 20 mm x 20 mm großen Aluminiumstrebenprofilen (Bosch Rexroth AG, Lohr am Main, Deutschland) mit der Basis verbunden. Diese Profile sind mit 3D-gedruckten Teilen verkleidet, um die Kabelführung zum oberen Hauptrahmen zu ermöglichen. Das Standalone Entomoscope kann nahezu an jedes Objektiv mit C-/CS-Verbindung angepasst werden, indem die Länge der Aluminiumstrebenprofile entsprechend dem Objektabstand des Objektivs und dessen Länge ausgewählt wird. Ein 10-Zoll-Touchscreen (Modell 10BS7 Beetronics, Düsseldorf, Deutschland) ist am oberen Hauptrahmen befestigt und zeigt im Betrieb die GUI. Ebenfalls am oberen Hauptrahmen befestigt ist die *Focus Stacking* Einheit, die die Kamera mit Objektiv trägt. In Abbildung 5.2 rechts ist eine 3D-Darstellung der *Focus Stacking* Einheit des Standalone Entomosopes zu sehen. Um die 12,3-MP-Kamera mit Sony IMX477-Sensor (Raspberry Pi HQ-Kamera, Raspberry Pi Ltd, Cambridge, UK) und dem Objektiv (z. B. Lensagon TC10M0565i von Lensation, Karlsruhe, Deutschland) zu fokussieren und das *Focus Stacking* zu ermöglichen, kann die Kamera in der z-Achse um 45 mm bewegt werden. Dies erfolgt mithilfe eines motorisierten Lineartisches, der aus einem Schrittmotor (NEMA 1702 von Joy-It, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) und einem Präzisions-Lineartisch (VT 45N von Owis GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland) besteht und durch eine flexible Wellenkupplung aus Aluminium miteinander verbunden ist. Zusätzlich ermöglicht ein Fokussierrad am oberen Ende der Antriebswelle eine manuelle Fokussierung. Die Strecke  $d$ , um die sich der Lineartisch bewegt, ist definiert als das Produkt aus der Steigung  $p$  der Spindel und der Anzahl der Umdrehungen  $rev$  (vgl. Gleichung 5.1).

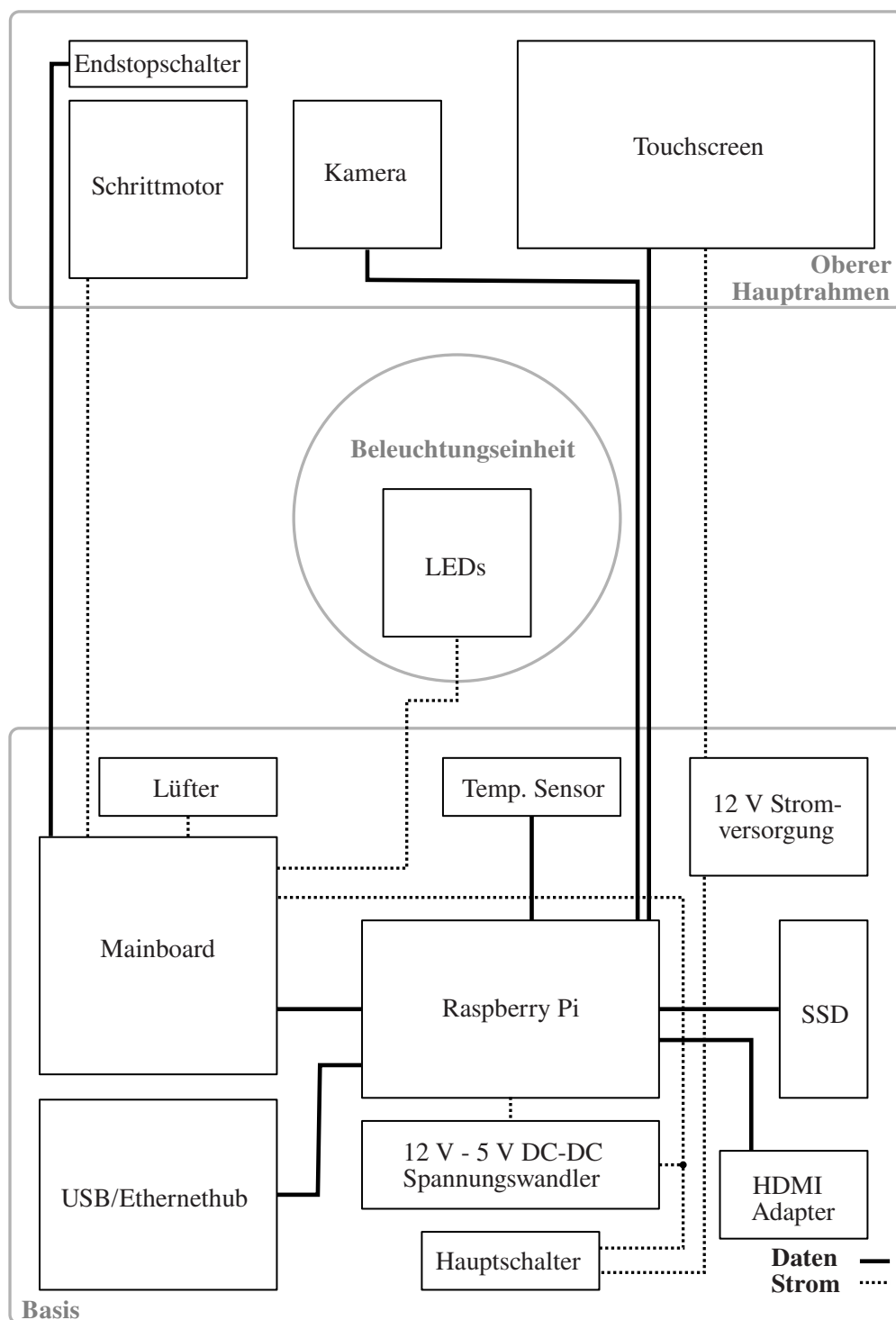
$$d = p * rev \quad (5.1)$$

Die Spindel des für das Entomoscope verwendeten Lineartisches hat eine Steigung  $p_S = 0,5$  mm. Der NEMA 17-2 Schrittmotor hat einen Schrittwinkel von  $\alpha = 1,8^\circ$  und damit 200 Vollschritte pro Umdrehung. Um den Schrittmotor zu bewegen, wird ein Schrittmotortreiber benötigt (vgl. elektronischer Aufbau). Der im Entomoscope verwendete Motortreiber ermöglicht Mikroschritte mit einer Auflösung von bis zu 256 Mikroschritten pro Vollschritt. Im Standalone Entomoscope werden 16 Mikroschritte pro Vollschritt gewählt, da dies einen guten Kompromiss zwischen Geschwindigkeit, Drehmoment und Positioniergenauigkeit darstellt. Bei 16

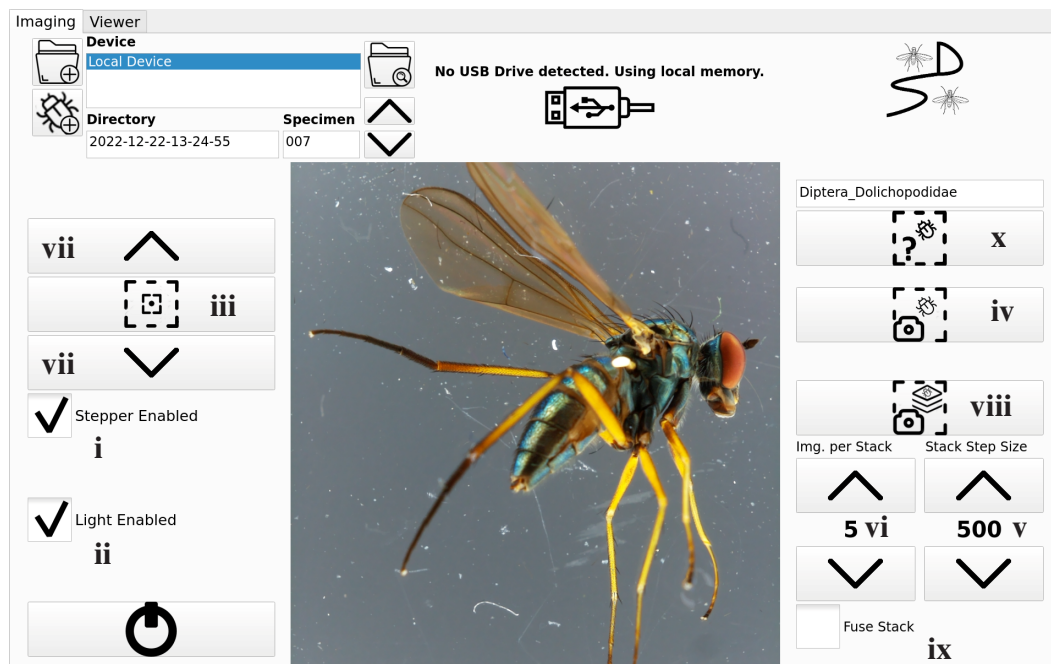
Mikroschritten pro Vollschrift und 200 Vollschriften pro Umdrehung ergibt sich ein minimaler Fahrweg des Lineartisches von  $d_s = 0,16 \mu\text{m}$  pro Mikroschritt. Zur Referenzierung des Systems befindet sich ein Endstopschalter am tiefsten Punkt der Linearführung. Dieser muss nach Systemstart oder nach dem Wechsel vom manuellen Fokussieren zum automatisierten Modus angefahren werden, um die Achse zu referenzieren.

**Elektronischer Aufbau:** Wie beim mechanischen Aufbau wird für den elektronischen Aufbau darauf geachtet, möglichst viele kommerziell verfügbare Komponenten zu nutzen, um den Aufwand zum Aufbau eines Standalone Entomosopes zu minimieren. Der Aufbau aller elektronischen Komponenten des Standalone Entomosope ist schematisch in Abbildung 5.3 dargestellt. Als zentrales Steuerelement findet ein Raspberry Pi 4 Modell B 8 GB (Raspberry Pi Ltd., Cambridge, UK) Verwendung. Neuere Modelle können ebenfalls verwendet werden, dies kann allerdings Anpassungen der Software erfordern. Die Energieversorgung erfolgt über ein externes 12 V DC, 60 W Steckernetzteil (EA10731J1201 von EDAC Power Electronics, New Taipei City, Taiwan), welches beim Standalone Entomosope die einzige zusätzlich notwendige Hardware darstellt. Die 12 V Eingangsspannung, welche für den Schrittmotor als auch für die Beleuchtungseinheit notwendig ist, wird intern zusätzlich mit einem 12 V - 5 V DC-DC Spannungswandler (SD-30G-5 von MeanWell, New Taipei City, Taiwan) auf 5 V zur Versorgung des Raspberry Pis reduziert. Zur Steuerung des Schrittmotors wird ein Schrittmortreiber (SilentStepStick TMC2209 V2 von Watterott Electronic GmbH, Leinefelde-Worbis, Deutschland) verwendet. Um diesen mit dem Raspberry Pi zu verbinden, wird ein einfaches Mainboard aufgebaut. Das Mainboard dient weiterhin dem Schalten der Belichtungseinheit, sowie des Lüfters. Dazu wird jeweils ein *Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor* (MOSFET) (FQP20N06L von Fairchild Semiconductors Inc., San José, USA) verwendet. Der Aufbau des Mainboards ist entweder auf einer Lochrasterplatine möglich oder kann als einlagige Platine geätzt werden. Um Daten vom Entomosope zu übertragen und zum Verbinden mit einem Netzwerk, verfügt es über einen USB- und Ethernet Hub. Die drei USB-Buchsen, sowie der Ethernet Anschluss sind von außen erreichbar. Zum Speichern der Bilder verfügt das Standalone Entomosope zusätzlich zu der SD-Karte des Raspberry Pis über eine *Solid State Drive* (SSD). Ein von außen zugänglicher HDMI-Anschluss ermöglicht die Verbindung eines zweiten Monitors. Dieser wird für den Betrieb jedoch nicht benötigt.

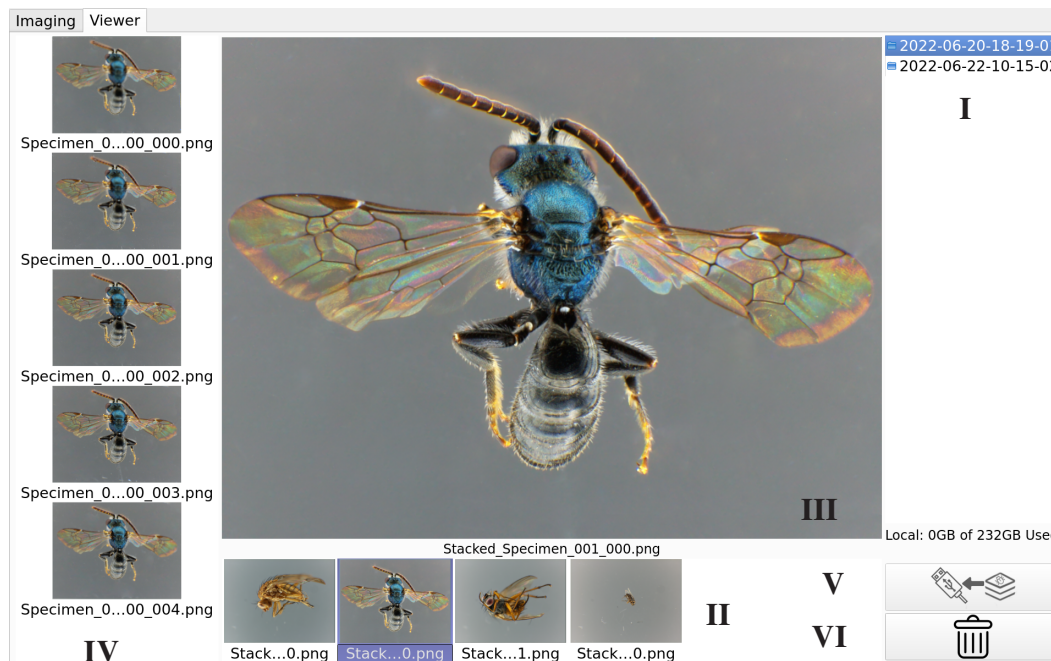
**Steuerungssoftware:** Zur Steuerung des Entomosopes verfügt es über eine GUI. Diese ermöglicht es, Bildgebungsparameter einzustellen und die Daten zu verwalten. Die Software (*Entomoscope Imaging Software* (ENIMAS)) ist in Python 3 geschrieben und nutzt das Python-Paket *Qt* für die GUI. Nach dem Start des Standalone Entomosopes, startet der Raspberry Pi ENIMAS automatisch. Die GUI verfügt über zwei Tabs. Diese sind in Abbildung 5.4 (a) und (b) dargestellt. Das Standalone Entomosope kann entweder im manuellen Modus genutzt werden oder ermöglicht eine automatisierte Fokussierung. Dazu muss der Schrittmotor aktiviert werden ((i) in Abbildung 5.4a). Die Lineareinheit referenziert dann automatisch, indem sie bis zum Auslösen des Endschalters nach unten gefahren wird. Nach



**Abbildung 5.3:** Schematischer Aufbau aller elektronischen Komponenten des Standalone Entomoscopes. Die Hauptkomponenten zur Steuerung des Entomoscopes sind in der Basis des Systems untergebracht. Als zentrales Steuerelement dient ein Raspberry Pi 4B. Der Touchscreen, sowie die *Focus Stacking* Einheit mit Schrittmotor befinden sich im oberen Hauptrahmen. Zur Belichtung der Objekte wird eine Belichtungseinheit mit LEDs verwendet. Datenkabel sind als durchgezogene Linien visualisiert, Kabel zur Energieversorgung sind gepunktet dargestellt. Modifiziert nach [91].



(a) *Imaging Tab* von ENIMAS des Standalone Entomoscopes, modifiziert nach [91]. Mit (i) Schrittmotor aktivieren, (ii) Beleuchtung aktivieren, (iii) Autofokus, (iv) Bild aufnehmen, (v) Abstand zwischen Fokusebenen (FE), (vi) Anzahl an FE, (vii) Fokussieren, (viii) gewählte Anzahl an FE aufnehmen, (ix) Bildverarbeitung aktivieren, (x) klassifizieren. Modifiziert nach [91].



(b) *Viewer Tab* von ENIMAS des Standalone Entomoscopes. Mit (I) Ordnerauswahl, (II) Bildauswahl, (III) Detailansicht, (IV) Vorschau der FE, (V) Bilder auf Wechseldatenträger übertragen, (VI) Bilder löschen.

**Abbildung 5.4:** Screenshots aus *Entomoscope Imaging Software* (ENIMAS) für das Standalone Entomoscope: (a) *Imaging Tab* und (b) *Viewer Tab*.

Aktivieren der Belichtungseinheit (ii), kann durch Betätigen der Schaltfläche (iii) der Autofokus gestartet werden. Anschließend kann ein einzelnes Bild (iv) aufgenommen werden. Ist die Schärfentiefe des Objektivs nicht ausreichend, um alle Bereiche des Insektes scharf

abzubilden, besteht die Möglichkeit mehrere FE automatisiert aufzunehmen. Dazu kann der Abstand zwischen den Bildern (v), sowie deren Anzahl (vi), eingestellt werden. Um die Parameter zu überprüfen, entspricht der Abstand, der durch Betätigen der Schaltflächen (vii) mit der Kamera verfahren wird, der eingestellten Distanz für das *Focus Stacking*. Anschließend kann der automatisierte Bildaufnahmeprozess gestartet werden (viii). Um die aufgenommenen Einzelbilder zu einem, in allen Bereichen scharfen, Bild zusammenzufügen, ist in ENIMAS ein Bildverarbeitungsalgorithmus implementiert. Dieser kann durch Aktivieren der 'Fuse Stack' (ix) Funktion gestartet werden. Zur Klassifizierung der Insekten unter dem Entomoscope, können neuronale Netze in ENIMAS hinterlegt werden (vgl. Kapitel 9). Die Auswertung erfolgt dann durch Starten des Klassifizierungsprozesses (x). Zur Inspektion der Bilder und zur Datenübertragung kann der *Viewer Tab* genutzt werden. Nach Öffnen des Tabs, kann der Ordner gewählt werden, in den die Bilder gespeichert wurden ((I) in Abbildung 5.4b). Anschließend wird eine Vorschau aller im Ordner vorhandenen Bilder angezeigt (II). Wurde das *Stacking* im *Imaging Tab* aktiviert und wurden die Bilder bereits verarbeitet, wird wie dargestellt das verarbeitete Bild als Vorschau angezeigt. Ist dies nicht der Fall oder wurde nur eine FE aufgenommen, zeigt ENIMAS das Bild mit der niedrigsten FE bzw. das Einzelbild. Durch Anklicken eines Bilds unter (II) wird die Detailansicht (III) geladen, welches durch erneutes Anklicken im Vollbild dargestellt wird. In dieser Ansicht kann es auch vergrößert werden, um Details genauer zu betrachten. Unter (IV) sind die einzelnen FE dargestellt, welche wiederum durch Anklicken im Detailfenster (III) angezeigt werden können. Wurden die Bilder auf dem Entomoscope gespeichert und wird ein Wechseldatenträger eingesteckt, können die Bilder durch Klicken auf die Schaltfläche zur Übertragung der Daten (V) auf diesen übertragen werden. Zuletzt können durch Klicken auf die Schaltfläche (VI) die auf dem Gerät gespeicherten Bilder gelöscht werden.

**Bildgebung:** Aufgrund des relativ geringen Hubs der Lineareinheit von 45 mm, muss im Vorfeld festgelegt werden, für welche Größenklasse das Standalone Entomoscope verwendet werden soll. Dementsprechend ist die Länge der Aluminiumprofile zu wählen, um mit der Länge des Objektivs und dem notwendigen Objektabstand kompatibel zu sein. Optimal zum *Focus Stacking* geeignet sind telezentrische Objektive, da sich die Größe des Objekts im Bild nicht mit dem Abstand ändert. Um alle in Kapitel 2.2 definierten Größenklassen abzudecken, bieten sich drei verschiedene Vergrößerungen an: 1x, 0.5x und 0.3x. Zusätzlich zu den drei Varianten mit fester Höhe (vgl. Abbildung 5.5), die für die folgenden Objektive entwickelt sind (alle von Lensation GmbH, Karlsruhe, Deutschland):

- Lensagon TC5M-10-65: 1x Vergrößerung, Objektabstand 65 mm
- Lensagon TC10M-05-65: 0.5x Vergrößerung, Objektabstand 65 mm
- Lensagon TC5M-03-110: 0.3x Vergrößerung, Objektabstand 110 mm

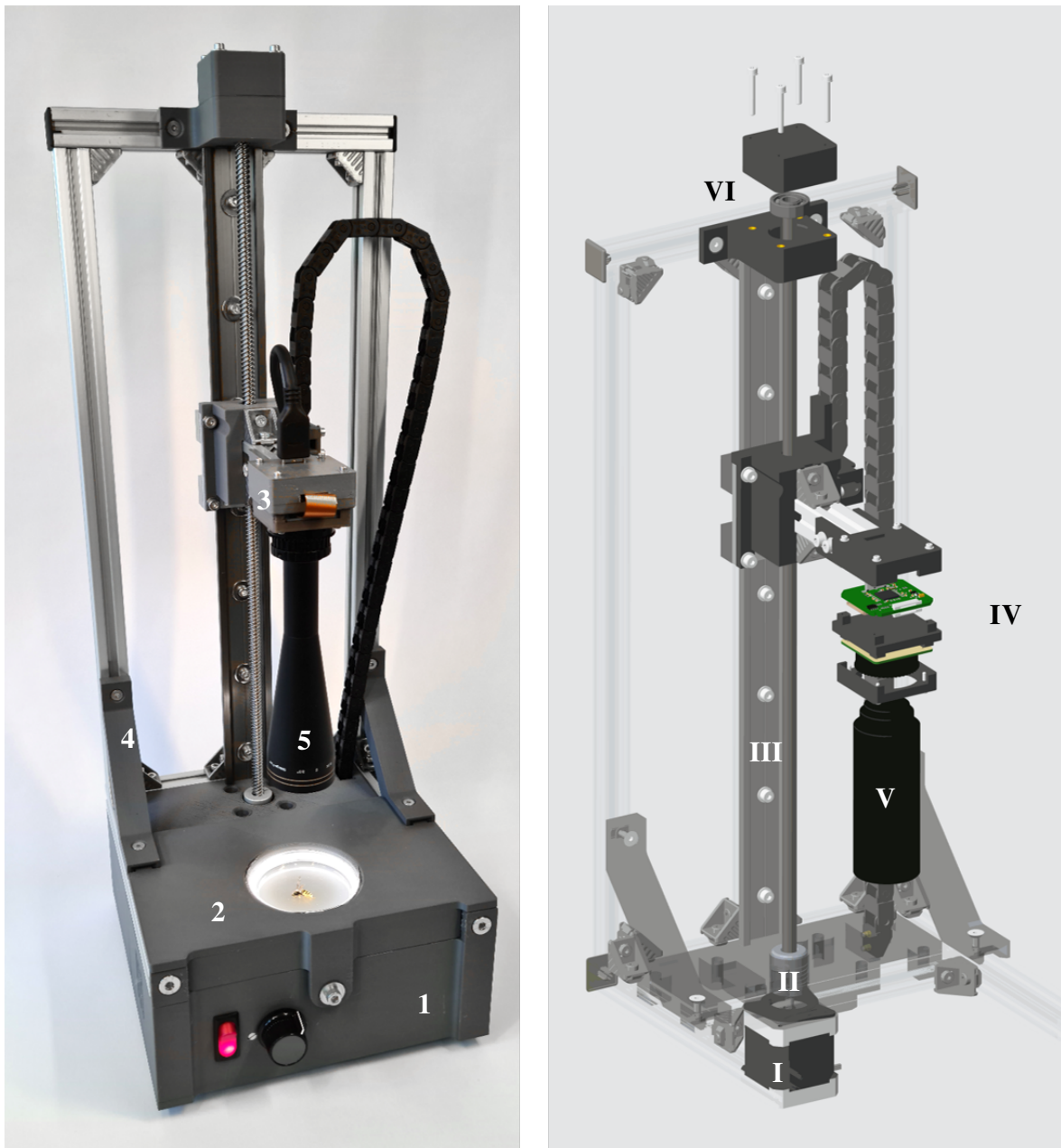
kann auch ein Standalone Entomoscope mit flexibler Höhe aufgebaut werden. Die Aluminiumprofile werden bei dieser Version durch den oberen Hauptrahmen und die Abdeckung geführt. Durch die Verschraubung mit T-Nut Muttern kann der gesamte obere Hauptrahmen nach oben und unten verschoben werden. Dies bietet die Möglichkeit verschiedene Objektive auf einem Gerät zu verwenden, erfordert jedoch eine genaue Ausrichtung des oberen Hauptrahmens für den Wechsel der Objektive.



**Abbildung 5.5:** Drei verschiedene Versionen des Standalone Entomoscopyes für Insekten unterschiedlicher Größenkategorien, < 6 mm (links), 6 mm - 12 mm (rechts) und 12 mm - 25 mm (mitte). Die Versionen unterscheiden sich in der Höhe der verwendeten Aluminiumprofile, um die unterschiedliche Länge der Objektive, sowie unterschiedliche Objektabstände zu kompensieren. Zur Versteifung besitzt das Standalone Entomoscope für große Insekten (mitte) Winkel, die die Aluminiumprofile abstützen.

### 5.3.2 Plug-In Entomoscope: Teilautomatisiertes Bildgebungssystem mit externem Steuerelement

Das Plug-In Entomoscope verzichtet im Vergleich zum Standalone Entomoscope auf ein internes Steuerelement und einen eigenen Monitor. Dies ermöglicht einen vereinfachten und kostengünstigeren Aufbau. Zum Betrieb wird jedoch ein Laptop oder PC benötigt.

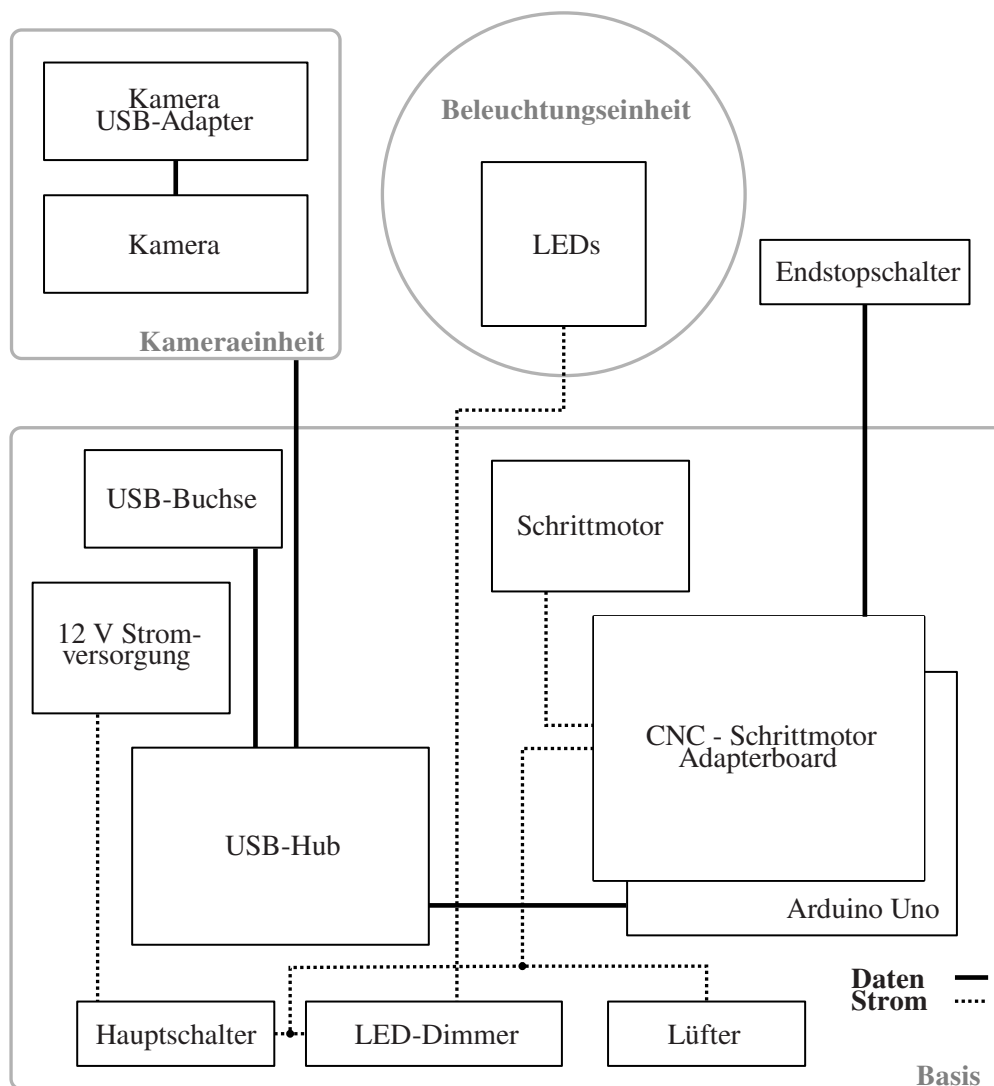


**Abbildung 5.6:** Plug-In Entomoscope (links), mit (1) Basis, (2) Beleuchtung, (3) 12-MP-Kamera mit (4) telezentrischem Objektiv und (5) Lineareinheit, sowie 3D-Ansicht der *Focus Stacking* Einheit (rechts), mit (I) Schrittmotor, (II) Kupplungsadapter, (III) Linearschiene, (IV) Kameraeinheit mit Raspberry Pi HQ-Kamera und USB-Adapterboard, (V) telezentrischem Objektiv und (VI) Lagerung für Gewindetrieb. Modifiziert nach [91].

**Mechanischer Aufbau:** Die Plug-In-Version des Entomoscopes behält im Wesentlichen den gleichen mechanischen Aufbau wie die Standalone-Version bei, jedoch mit einigen Veränderungen. Zum einen entfällt der obere Hauptrahmen vollständig, da kein Monitor benötigt wird. Der Schrittmotor (NEMA 17-01 von Joy-It, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) wird infolgedessen in die Basis integriert. Dadurch wird der Sockel minimal größer und misst 200 mm x 205 mm x 95 mm. Die Beleuchtung ist in beiden Versionen

identisch. Aufgrund der größeren Basis im Vergleich zum Standalone Entomoscope, steht die Beleuchtungseinheit nicht mehr über. Durch Verlagerung des Schrittmotors in die Basis ist eine längere Linearführung notwendig. Diese konstruktive Änderung bietet jedoch den Vorteil, dass das Plug-In Entomoscope mit einer Vielzahl von Objektiven kompatibel ist, da der Abstand zwischen Kamera und Basis automatisch im Bereich von 25 mm bis 365 mm eingestellt werden kann. Die Lineareinheit ist mit drei 20 mm x 20 mm x 410 mm Aluminium-Strebenprofilen (Bosch Rexroth AG, Lohr am Main, Deutschland) an der Basis befestigt. Eine detaillierte dreidimensionale Darstellung der *Focus Stacking* Einheit des Plug-In Entomoscopes ist in Abbildung 5.6 (rechts) zu sehen. Die Lineareinheit ist aus Einzelkomponenten aufgebaut. Zur Führung des Schlittens findet eine hartanodisierte Aluminiumschiene (drylin W Doppelschiene WSQ, Igus GmbH, Köln, Deutschland) Verwendung. Der gleitgelagerte Schlitten (drylin W Komplettschlitten WWQ, Igus GmbH, Köln, Deutschland) trägt die Kameraeinheit. Zur Transformation der rotierenden Bewegung des Schrittmotors in eine lineare Bewegung, wird eine Edelstahl Steilgewindespindel (Ds 8 mm x 10 mm, dryspin, Igus GmbH, Köln, Deutschland) mit passender Flanschgewindemutter (dryspin JFRM, Igus GmbH, Köln, Deutschland) verwendet. Die Steilgewindespindel ist durch eine Aluminiumkupplung mit dem Schrittmotor verbunden und oben mit einem gedichteten Kugellager (608 2RS) gelagert. Das axiale Spiel kann durch Einbringen von Einstellscheiben in den Deckel der Lagerung eingestellt werden und sollte minimal sein. Das Plug-In Entomoscope kann nicht manuell fokussiert werden. Auf diese Funktion wurde aus mehreren Gründen bewusst verzichtet. Aufgrund der hohen Steigung der Gewindespindel ( $p_P = 10 \text{ mm}/U$ ), wäre bei direktem Fokussieren eine sehr geringe Verdrehung notwendig, um kleine linear Wege zu verfahren, dies würde zudem ein großes Drehmoment erfordern. Eine Gewindespindel, mit geringerer Steigung, würde jedoch hohe Drehzahlen des Schrittmotors erfordern, um ein schnelles Referenzieren und Verfahren der Achse zu gewährleisten. Der Schrittmotor besitzt den gleichen Schrittwinkel wie im Standalone Entomoscope, zudem wird der gleiche Schrittmotortreiber mit gleicher Mikroschrittauflösung von 16 Mikroschritten pro Vollschrift gewählt. Der minimale Verfahrweg des Linearschlittens für das Plug-In Entomoscope ergibt sich somit zu  $d_P = 3,13 \text{ }\mu\text{m}$  pro Mikroschritt.

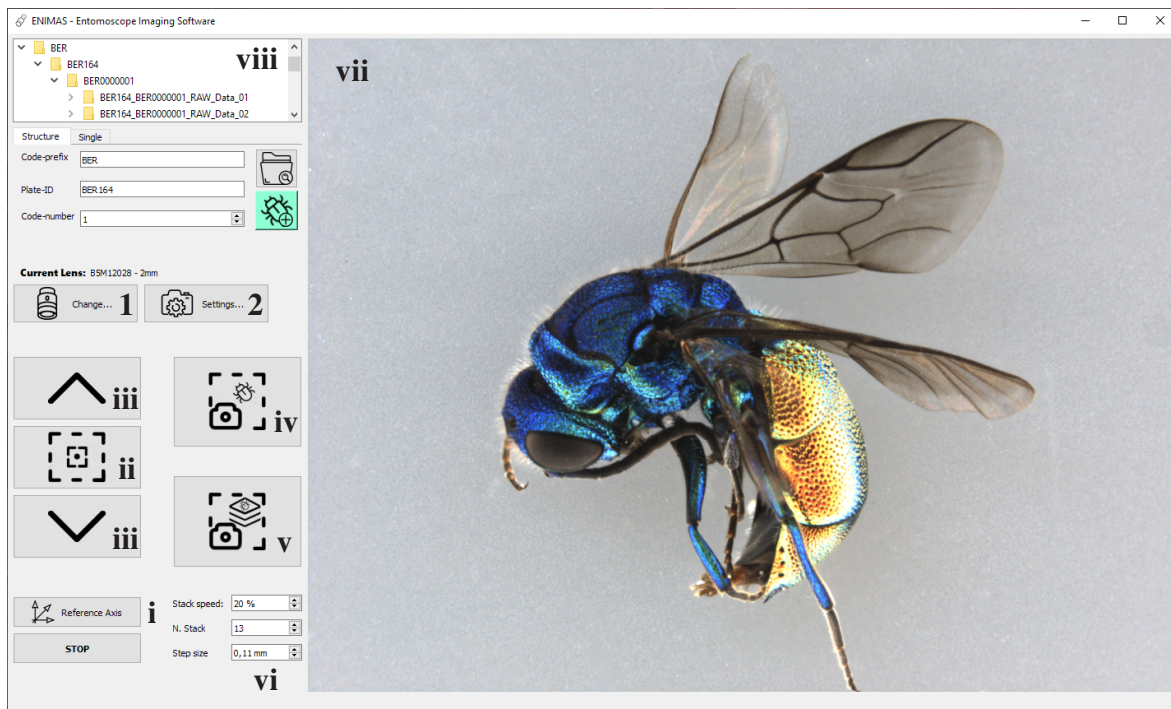
**Elektronischer Aufbau:** Das Plug-In Entomoscope verzichtet auf eine interne Steuereinheit. Der schematische Aufbau der elektronischen Komponenten ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Als Steuerelement dient ein via USB angeschlossener PC oder Laptop. Zur Verwendung der für den Raspberry Pi entwickelten Kamera (Raspberry Pi HQ-Camera) wird eine USB-Adapter Platine benötigt (USB3.0 Camera Shield Plus, Arducam, Nanjing, China). Diese wird mit einem im Plug-In Entomoscope verbauten USB-Hub (USB Hub 3.0 mini 4-Port, StarTech Ltd., Hoofddorp, Niederlande) verbunden. Die Steuerung des Schrittmotors erfolgt über einen ebenfalls am USB-Hub angeschlossenen Arduino Uno mit CNC-Platine (Joy-It, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland). Die eigentlich für drei Achsen entwickelte Platine wird verwendet, da sie direkt auf den Arduino Uno gesteckt werden kann.



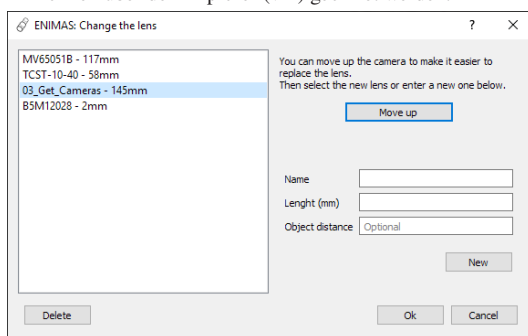
**Abbildung 5.7:** Schematischer Aufbau aller elektronischer Komponenten des Plug-In Entomosopes. Zur Steuerung des Schrittmotors ist in der Basis ein Arduino Uno mit Motortreiber vorgesehen. Der Arduino sowie die Kamera mit USB-Adapter sind mit einem USB-Hub verbunden. Dieser USB-Hub wird mit einem externen PC oder Laptop verbunden. Zur Beleuchtung der Objekte wird eine Beleuchtungseinheit mit LEDs verwendet, deren Helligkeit über einen Dimmer reguliert werden kann. Datenkabel sind als durchgezogene Linien visualisiert, Kabel zur Energieversorgung sind gepunktet dargestellt. Modifiziert nach [91].

So entfällt die Notwendigkeit, ein Mainboard zu löten. Der Schrittmotor (Nema 17-1, SI-MAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) kann einfach mit der CNC-Platine verbunden und der Schrittmotortreiber (SilentStepStick TMC2209 V2, Watterott electronic GmbH, Leinefelde-Worbis, Deutschland) aufgesteckt werden. Die Steckplätze für die übrigen Achsen bleiben offen. Zur Regulierung der Helligkeit der LEDs verfügt das Plug-In Entomoscope über einen analogen Dimmer. Dieser ist optional und kann, wenn er nicht benötigt wird weggelassen werden. Die LEDs leuchten dann durchgehend mit voller Helligkeit. Der Aufbau kann entweder auf einer zweilagig gefrästen Platine oder einer Lochrasterplatine vorgenommen werden.

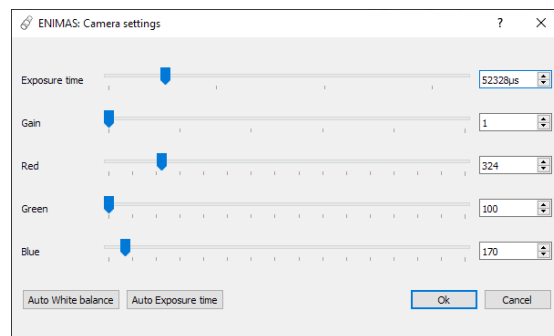
**Software:** Die Software für das Plug-In Entomoscope muss auf dem zum Betrieb angeschlossenen PC oder Laptop installiert werden. Sie ist in Python 3.10 geschrieben und für die Microsoft Betriebssysteme Windows 10 und Windows 11 optimiert. Die Installation erfolgt über ein *Batch*-Skript, welches die Installation von Python, sowie der notwendigen Pakte und den Download des Codes von GitLab automatisiert. Nach erfolgreicher Installation kann ENIMAS (vgl. Abbildung 5.8a) über ein Desktop Icon per Doppelklick gestartet werden.



(a) Hauptfenster der Windows Version der *Entomoscope Imaging Software* (ENIMAS). Durch Klicken der Schaltflächen (1) und (2) können die Fenster zur Einstellung der Objektive (b), respektive Kamera Parameter (c) geöffnet werden. Funktionen weiterer Schaltflächen sind: (i) Referenzieren der Achse für das *Focus Stacking*, (ii) Autofokus, (iii) Fokussieren, (iv) Aufnahme eines Einzelbilds, (v) Aufnahme eines Stacks, (vi) *Focus Stacking* Parameter. Unter (vii) wird durchgehend ein Livebild der Kamera angezeigt, Bilder können über den Explorer (viii) geöffnet werden.



(b) Einstellungen zur Definition der Parameter der verwendeten Objektive. Um eine Kollision mit der Petrischale zu verhindern, muss das verwendete Objektiv mit Länge und Objektabschabst hinterlegt werden.



(c) Einstellungen zur Definition der Bildgebungsparameter. In dem Fenster kann zudem ein automatischer Weißabgleich vorgenommen werden sowie automatisch eine geeignete Belichtungszeit ermittelt werden.

**Abbildung 5.8:** Screenshots aus der *Entomoscope Imaging Software* (ENIMAS) für das Plug-In Entomoscope: (a) Hauptfenster, (b) Objektiveinstellungen und (c) Bildgebungseinstellungen.

Da das Plug-In Entomoscope keine manuelle Fokussierung zulässt, muss der Schrittmotor nach dem Programmstart von ENIMAS nicht explizit aktiviert werden. Trotzdem ist eine Referenzierung der Achse notwendig. Dies findet am höchsten Punkt statt. Das Referenzieren kann nach Programmstart durch Klicken auf die Schaltfläche (i) (Abbildung 5.8a) gestartet werden. Erst danach sind die Schaltflächen für den Autofokus (ii) sowie zum manuelle Verfahren der Achse zum Fokussieren (iii) freigegeben. Nach Fokussierung kann dann ein Einzelbild (iv) oder ein *Stack* (v) aufgenommen werden. Die Parameter zur Aufnahme mehrere FE (vi) können vorher wie beim Standalone Entomoscope eingestellt werden. Zusätzlich kann die Geschwindigkeit, mit der die Kamera zwischen den Aufnahmen verfahren wird, reguliert werden. Dies hat sich als notwendig herausgestellt, da zu schnelle Bewegungen der Kamera zu Bewegungen des abzubildenden Objekts führen können. Für kleine und leichte Insekten ist daher die Geschwindigkeit niedriger zu wählen als für große. Während ENIMAS läuft, wird permanent das Livebild der Kamera bei voller Auflösung angezeigt (vii). Dies erlaubt ein genaues Einstellen der Bildgebungsparameter und ein einfaches Platzieren des Objekts unter dem Objektiv. Auf einen *Viewer* wird in der Windows Version von ENIMAS bewusst verzichtet. Die Betrachtung der Bilder erfolgt über den Standardbildbetrachter, der unter Windows hinterlegt ist. Die Dateien der aufgenommenen Bilder werden in ENIMAS angezeigt (viii) und können direkt geöffnet werden.

Da das Plug-In Entomoscope nicht für ein spezielles Objektiv ausgelegt ist und verschiedene Objektive verschiedener Länge und mit unterschiedlichem Objektabstand verwendet werden können, müssen diese Eigenschaften in der Software hinterlegt werden (vgl. Abbildung 5.8c). Dies verhindert, dass das Objektiv beim Verfahren der Achse unten aufschlägt und verkürzt zudem die für den Autofokus notwendige Zeit, da bei bekanntem Objektabstand der Bereich bekannt ist, in dem das Objekt scharf abgebildet wird. Zur Eingabe dieser Parameter können in ENIMAS über die Schaltfläche (1) neue Objektive gespeichert oder bereits hinterlegte Objektive ausgewählt werden. Die Einstellungen Schaltfläche (2) öffnet ein weiteres Fenster (vgl. Abbildung 5.8), in dem die Bildgebungsparameter (Belichtungszeit, *Gain* und Weißabgleich) eingestellt werden können.

**Bildgebung:** Die Bildgebung unterscheidet sich nicht vom Standalone Entomoscope (vgl. Kapitel 5.3.1). Dieses Entwicklungsziel ist Voraussetzung für die Entwicklung der beiden Versionen. So wird gewährleistet, dass Bilder, welche mit verschiedenen Systemen aufgenommen werden, austauschbar sind. Zur Bildverarbeitung in Python zur Generierung des *gestackten* Bilds findet in der Windows Version von ENIMAS der gleiche Algorithmus Verwendung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, das *Stacking* mit der kommerziell verfügbaren Software *Helicon Focus* (HeliconSoft, Kharkiv, Ukraine, [73]) durchzuführen. Hierfür ist eine Lizenz notwendig.

## 5.4 Evaluierung des Standalone und Plug-In Entomoscopyes

Die Evaluation der Systeme erfolgt anhand der zu Beginn von Kapitel 5 zusammengefassten und in Anhang A.2 detaillierten Anforderungen. Beide Entomoscope Versionen sind leicht reproduzierbar. Alle Gehäuseteile können 3D-gedruckt werden. Nahezu alle weiteren Teile können kommerziell erworben werden. Für das Standalone Entomoscope ist der Aufbau eines Mainboards notwendig, was grundlegende Kenntnisse über das Verlöten von Bauteilen auf Platinen erfordert. Für den Aufbau des Plug-In Entomoscopyes, ist dies nicht notwendig. Soll jedoch der Dimmer integriert werden, wird auch hier der Aufbau einer Platine notwendig. Grundsätzlich verfügt das Plug-In Entomoscope über weniger Teile und ist daher schneller aufzubauen. Beide Systeme erfüllen die Anforderung an die Größe des Systems und unterschreiten diese. Das Plug-In Entomoscope ist insgesamt 205 mm x 200 mm x 550 mm groß. Die Größe des Standalone Entomoscopyes ist abhängig vom verwendeten Objektiv. Die größte Version misst 210 mm x 242 mm x 550 mm.

Durch Verwendung von Objektiven mit unterschiedlichen Vergrößerungen können alle definierten Größenklassen mit beiden Systemen abgebildet werden. Da beide Systeme über eine *Focus Stacking*-Einheit verfügen, kann auch unabhängig vom gewählten Objektiv eine ausreichende Schärfentiefe sichergestellt werden. Die implementierte Ringbeleuchtung sorgt dabei für eine ideale Beleuchtung. Die gewählte Kamera mit IMX477 (Sony Corporation, Tokio, Japan) liefert eine Auflösung von 12,3 MP und erfüllt somit die gesetzte Anforderung. Die Kosten beider Systeme unterschreiten die Anforderung von 1500 €. Das Standalone Entomoscope kann für ca. 1100 € aufgebaut werden, das Plug-In Entomoscope für ca. 750 €. Diese Kosten beinhalten keine Objektive. Die Anpassbarkeit der Systeme ist gewährleistet, da alle 3D-gedruckten Komponenten individuell angepasst werden können. Zudem sind wichtige Komponenten wie die Kamera oder Beleuchtung so montiert, dass sie einfach gegen andere Konzepte ausgetauscht werden können. Für beide Systeme bietet ENIMAS eine geeignete Software, um Bilder intuitiv aufzunehmen. Die Publikation der Systeme erfolgt in einem *Open Science Journal* [91]. Zusätzlich gibt es für beide Systeme ein *Repository*, in welchem alle Daten zum Download bereitstehen. Ein im *Repository* angelegtes Wiki beschreibt den Aufbau der Systeme:

- Standalone Entomoscope: <https://osf.io/h5qmv>
- Plug-in Entomoscope: <https://osf.io/3vmrg/>

Der Entwurf und die Bewertung der Entomoscope Versionen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit mehreren erfahrenen Entomologinnen und Entomologen. Die Rückmeldungen wurden und werden auch in Zukunft in das Design der Entomoscope einfließen. Im Rahmen des Forschungsprojekts wurden bislang insgesamt vier Standalone Entomoscope und

15 Plug-In Entomoscope an verschiedenen internationale Forschungseinrichtungen in Europa und Australien versendet (vgl. Tabelle 5.2). Die Rückmeldungen der Forschenden aus den verschiedenen Institutionen tragen dazu bei, dass die Hardware-Komponenten ständig weiterentwickelt werden. Darüber hinaus wird die Funktionalität von ENIMAS auf der Grundlage von Feedback kontinuierlich weiter verbessert und erweitert.

## 5.5 Diskussion und Ausblick

Die beiden entwickelten Entomoscope Versionen, das Standalone Entomoscope und das Plug-In Entomoscope, eignen sich beide zur Bildgebung von Insekten in Ethanol. Beide verwenden die gleiche Kamera und das gleiche Beleuchtungskonzept und erzeugen somit standardisierte Bilder. Diese können zur automatisierten Auswertung herangezogen werden und bieten Potenzial zur Klassifizierung und Biomassenbestimmung (vgl. Teil IV). Aufgrund der unterschiedlichen Herangehensweise bieten beide Systeme Vor- und Nachteile. Das Standalone Entomoscope ist kompakt und kann ohne zusätzliche Hardware (ausgenommen der Stromversorgung) betrieben werden. Es ist somit für enge Arbeitsplätze oder für die mobile Anwendung ideal oder wenn kein PC oder Laptop zur Verfügung steht. Die Verwendung der integrierten Hardware bringt aber auch Herausforderungen mit sich. Auch wenn die Rechenleistung der Raspberry Pi Modelle in den vergangenen Jahren stark zugenommen hat, ist dies nicht vergleichbar mit modernen PCs oder Laptops. Zudem ist der Arbeitsspeicher beschränkt und kann nicht erweitert werden. Dies führt dazu, dass die Aufnahme und das *Stacking* der Bilder deutlich langsamer abläuft als auf externer Hardware. Das Aufnehmen eines einzelnen Bilds mit dem Standalone Entomoscope dauert circa eine Sekunde. Diese Zeit ist für Anwender:innen akzeptabel, sollen jedoch mehrere FE aufgenommen werden, kann sich die Zeit die zur Bildgebung eines Insekts benötigt wird schnell vervielfachen. Zusätzlich kommt zur reinen Aufnahmezeit auch die Zeit hinzu, die benötigt wird, um die Kamera zu verfahren. Diese fällt im Vergleich zur Aufnahmezeit jedoch wenig ins Gewicht. Erfahrungswerte zeigen, dass fünf FE, insbesondere bei Insekten der kleineren Größenklassen und unter Verwendung der vorgeschlagenen telezentrischen Objektive (vgl. Kapitel 5.3.1), ausreichend sind. Sollen zudem noch mehrere Perspektiven eines Insekts aufgenommen werden, kann die Zeit, die durch die Bildgebung in Anspruch genommen wird, als frustrierend empfunden werden. Durch die Verwendung eines externen Steuerelements in Form eines modernen Laptops oder PCs kann die Zeit, die zur Aufnahme notwendig ist, um den Faktor zehn reduziert werden. Die Aufnahme von fünf FE beim Plug-In Entomoscope erfolgt demnach in unter einer Sekunde. Der Nachteil hierbei ist, dass das System immer ein zusätzliches externes Gerät benötigt. Das Verarbeiten der aufgenommenen FE zu einem in allen Bereichen scharfen Bild kann auf beiden Geräten in ENIMAS durchgeführt werden. Die in Python implementierte Verarbeitung kommt jedoch schnell an ihre Grenzen und erzeugt Artefakte im Bild. Beim Standalone Entomoscope ist zudem die Anzahl an verarbeitbaren Bildern pro Stack aufgrund

**Tabelle 5.2:** Kooperationspartner zur Evaluation der Entomoscope Modelle inklusive Kurzbeschreibung der Projekte für die das Entomoscope eingesetzt wird.

Kooperationspartner	Modell	Kurzbeschreibung Projekt
Museum für Naturkunde Berlin, Deutschland	Standalone, Plug-In	Bildgebung von nass konservierten Insekten aus Malaise Fallen und Schalenfallen-Massenproben zur Biomassenbestimmung und Klassifizierung.
Museum für Naturkunde Stuttgart, Deutschland	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten <i>Hymenopteren</i> zur Klassifizierung.
Zoologische Staatssammlung München, Deutschland	Standalone, Plug-In	Bildgebung von nass konservierten <i>Hymenopteren</i> zur Klassifizierung.
Sapienza University of Rome, Italien	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten <i>Tachinidae</i> Fliegen zur Biomassenbestimmung und Klassifizierung, sowie Bildgebung von (trocken und nass konservierten) Käfern der Gattung <i>Agrilus</i> zur Klassifizierung.
Australian National University, Australien	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten im Boden lebenden wirbellosen Tieren zur Biomassenbestimmung und Klassifizierung.
University of Lisbon, Portugal	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten <i>Hymenopteren</i> zur Klassifizierung.
Uppsala University Ecological Research Station - Station Linné, Schweden	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten Insekten zur Evaluierung von Malaise Fallen Proben.
Swedish University of Agricultural Sciences, Schweden	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten Insekten zur Evaluierung von Malaise Fallen Proben.
The Natural History Museum, Vereinigtes Königreich	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten <i>Hymenopteren</i> zur Klassifizierung und weiteren Insekten zur Evaluierung von Malaise Fallen Proben.
Laboratory of Insect Symbiosis, Tschechien	Plug-In	Bildgebung von nass konservierten Insekten zur Evaluierung von Malaise Fallen Proben.

des geringen Arbeitsspeichers von 8 GB auf fünf Bilder beschränkt. Die Lösung in Python bietet eine gute Lösung für Anwender:innen, die keinen Zugang zu externer Hardware und zusätzliche finanzielle Mittel für kommerzielle Alternativen haben. Die Weiterentwicklung der Algorithmen zum *Stacking* in Python ist aufgrund des *Open Source* Ansatzes jederzeit möglich. Kommerzielle Lösungen bieten aber bereits sehr gute Algorithmen, mit dem Nachteil, dass häufig jährliche Abonnements notwendig sind. Die Verwendung von *Helicon Focus* (HeliconSoft, Kharkiv, Ukraine, [73]) bietet sich zur Verarbeitung im Anschluss an die Bildgebung an. Für das Standalone Entomoscope müssen die Bilder dazu auf einen separaten Computer mit geeigneter Hardware übertragen werden. Die Windows Version von ENIMAS bietet direkt die Möglichkeit *Helicon Focus* als Standard Bildverarbeitungssoftware zum *Stacking* der Bilder zu nutzen.

Beide vorgestellten Systeme erfüllen die Anforderung an die Kosten und unterschreiten diese. Werden jedoch die zum Betrieb notwendigen Objektive mit in die Kalkulation aufgenommen, zeigt sich, dass diese eine große zusätzliche finanzielle Belastung darstellen. Die Auswahl der Objektive von Lensation (Lensation GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde aufgrund der Verfügbarkeit und der sehr guten Bildgebungsparameter getroffen. Deutlich günstigere Objektive:

- LCM-TELECENRIC-1X-WD65-1.5-NI
- LCM-TELECENRIC-0.5X-WD65-1.5-NI
- LCM-TELECENRIC-0.3X-WD65-1.5-NI2

des niederländischen Vertriebs GetCameras (GeT Components Group B.V., Eindhoven, Niederlande) mit vergleichbaren Bildgebungsparametern resultieren jedoch ebenfalls in sehr guten Bildern.

Weiterhin bietet die Verwendung von günstigeren Linearführungen weiteres Potenzial zur Kostenreduktion beider Systemen. Für beide Systeme wurde bei der Auswahl der Linearführungen auf Angebote von Markenherstellern (Standalone: Owis, Plug-In: Igus) zurückgegriffen. Dies gewährleistet eine hohe Qualität und stellt die langfristige Verfügbarkeit sicher. Für Anwender:innen, die ein System einmalig aufbauen wollen, wäre die Verwendung deutlich günstigerer Komponenten von Drittanbietern denkbar. Dies setzt jedoch ausreichendes technisches Verständnis und die Anpassung 3D-gedruckter Komponenten voraus.

Beide Versionen des Entomosopes bieten die Möglichkeit, standardisierte Bilder von in Ethanol konservierten Insekten aufzunehmen, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Das *Open Source* Projekt bietet das Potenzial, an zukünftige Anforderungen angepasst und kontinuierlich durch Feedback oder eigene Implementierungen weiterentwickelt und verbessert zu werden. So ist auch die Übertragung auf andere Anwendungsfälle wie zur Bildgebung trockenen konservierter Insekten oder anderer Invertebraten wie zum Beispiel Plankton denkbar.

Der kosteneffiziente Aufbau, die Zugänglichkeit und das Wegfallen von Lizenzgebühren für Software erlauben innovative und hochmoderne Forschung auch an Institutionen mit eingeschränkten finanziellen Mitteln. Die erzeugten Bilddaten bieten großes Potenzial zur Klassifizierung der Insekten und erlauben einen Austausch zwischen Forschenden, ohne erneut auf die physischen Proben zurückgreifen zu müssen. Zudem ist die Anwendung des Entomoscopes nicht auf Forschungseinrichtungen beschränkt, sondern bietet auch die Möglichkeit, durch die kostengünstige Verfügbarkeit beispielsweise zur Bildung eingesetzt zu werden und das Interesse an der Entomologie zu fördern.

Zur Erforschung der Biodiversität bietet ein teilautomatisiertes System gegenüber einem vollständig automatisierten System den Vorteil, dass durch eine Reduktion der Anforderungen auch eine Reduktion der Kompliziertheit erzielt werden kann. Angesichts des Ziels, alle Systeme so einfach und verständlich wie möglich zu gestalten, auch für technische Laien, hat die Verfügbarkeit eines teilautomatisierten Systems einige Vorteile. Es bietet die Möglichkeit, den Aufbau eines solchen Systems über einem vollautomatisierten zu priorisieren, selbst wenn die manuelle Bedienung mehr Zeit in Anspruch nimmt. Denn dafür kann von einem einfacheren und vor allem kostengünstigeren System profitiert werden. Weiterhin kann es auch die Einstiegshürde zur Verwendung selbst aufgebauter Hardware reduzieren, wenn mit einem einfacheren System, wie dem Entomoscope im Vergleich zu vollautomatisierten Systemen begonnen wird. Insgesamt bietet das Entomoscope eine vielseitige Plattform für die Erforschung der Biodiversität und birgt das Potenzial einen entscheidenden Beitrag zur Beschleunigung dieser Prozesse beizutragen.

## 6 Konzept zur teilautomatisierten, multiperspektivischen Bildgebung: DiversityScanner-360°

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wühl, K. Rotmann, R. Meier, E. Hartop, N. Klug, und C. Pylatiuk, „DiversityScanner-360°: An Automated System for Digitizing Invertebrate Bulk Samples,” in *2023 3rd International Conference on Robotics, Automation and Artificial Intelligence (RAAI)*, S. 226–230, 14.-16. Dez. Singapur, 2023. doi: 10.1109/RAAI59955.2023.10601274.

Die Digitalisierung naturhistorischer Sammlungen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Auch bei entomologischen Sammlungen spielt die Digitalisierung eine immer wichtigere Rolle. Ein wesentlicher Aspekt dabei ist, dass möglichst alle wichtigen morphologischen Strukturen abgebildet werden. Die bereits vorgestellten Systeme zur teilautomatisierten Bildgebung (vgl. Teil II) ermöglichen zwar das Anfertigen von Bildern aus mehreren Perspektiven, durch das manuelle Platzieren kann dies allerdings zeitaufwendig sein. Zudem lassen sich die Insekten in Ethanol nicht immer in allen beliebigen Positionen platzieren. Vor den gleichen Herausforderungen stehen auch die in Kapitel 5.1 vorgestellten Systeme nach dem Stand der Technik zur manuellen Bildgebung. Der DiversityScanner (vgl. Kapitel 7) überwindet zwar den notwendigen Aufwand, die Insekten einzeln zu platzieren, nimmt diese aber in einer zufälligen Position auf. Im Folgenden werden deshalb die Anforderungen an ein System zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol dargelegt. Anschließend wird der aktuelle Stand der Technik betrachtet und ein neues System, der DiversityScanner-360°, vorgestellt.

In Tabelle 6.1 sind die wichtigsten Anforderungen an ein System zur multiperspektivischen Bildgebung zusammengefasst. Die vollständigen Anforderungen können Anhang A.3 entnommen werden.

**Tabelle 6.1:** Übersicht über die wichtigsten Anforderungen an ein automatisiertes System zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol. Detaillierte Anforderungen sind Anhang A.3 zu entnehmen.

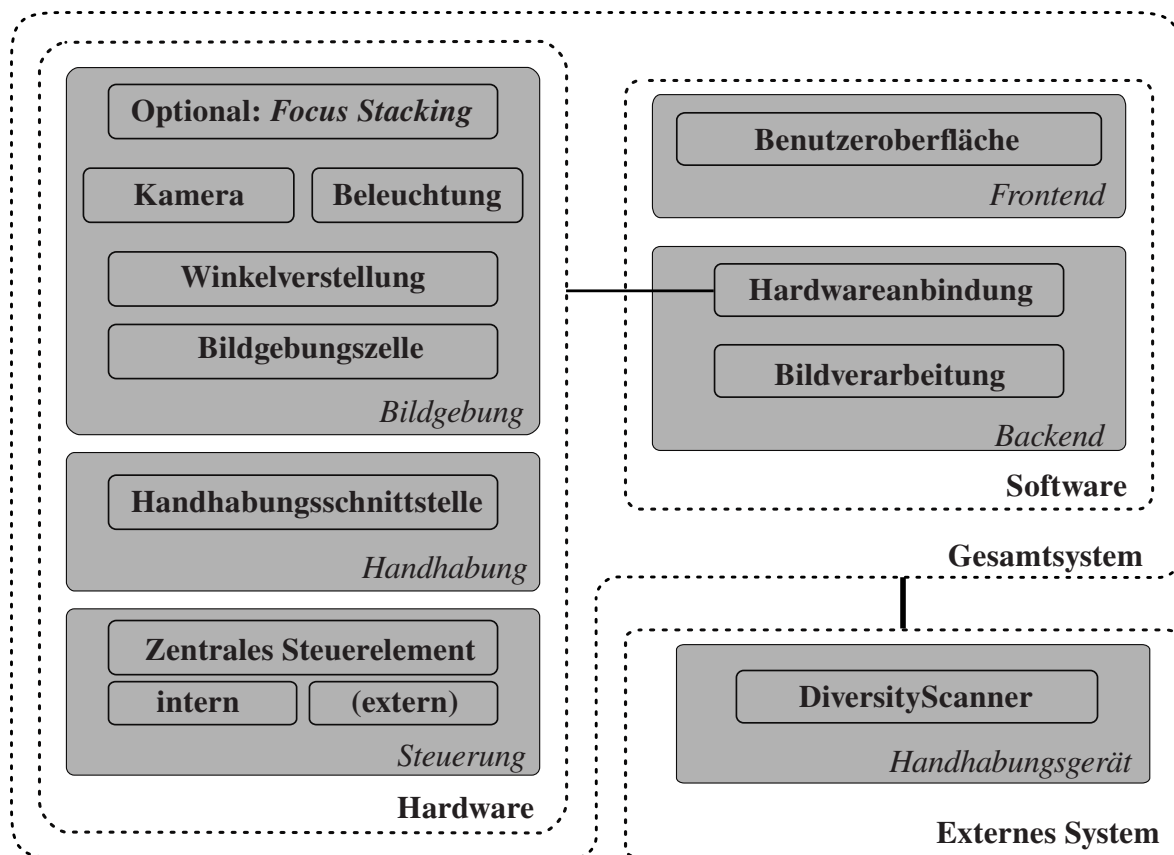
Parameter	Anforderung
Reproduzierbarkeit	Das System soll ohne besondere (technische) Vorkenntnisse aufgebaut werden können.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten, um auf einem Labortisch platziert werden zu können.
Probengröße	Es sollen Insekten der ersten Größenkategorie (< 3 mm, vgl. Kapitel 2.2) gehandhabt und abgebildet werden können.
Unversehrtheit der Proben	Das System muss so gestaltet werden, dass die Proben durch das System und insbesondere die Handhabung nicht beschädigt werden. Zudem muss sichergestellt werden, dass die Probe durchgängig im Ethanol verbleibt, um ein Austrocknen zu verhindern.
Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten < 3 mm vollständig und in allen Bereichen scharf abbilden zu können.
Auflösung	Die Auflösung des Systems soll möglichst hoch sein, mindestens aber 12 MP (4K) betragen, um feine Strukturen sicher abbilden zu können.
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen, ist demnach möglichst diffus. Zusätzlich dürfen helle Strukturen nicht zu stark beleuchtet und dunkle nicht zu wenig beleuchtet werden.
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 2000 € nicht übersteigen.
Perspektiven	Das System soll eine frei wählbare Anzahl an Perspektiven aufnehmen und vollständige 360° um die Probe rotieren können. Dabei ist zu beachten, dass die relative Beziehung der Perspektiven zueinander bekannt ist.
Kompatibilität	Das System soll kompatibel mit dem DiversityScanner sein, d.h. die Zuführung neuer Proben soll mit dem DiversityScanner (vgl. Kapitel 7) erfolgen können.
<i>Open Source</i>	Alle Komponenten des Systems sollen <i>Open Source</i> sein, das beinhaltet sowohl die Hardware als auch die Software.

## 6.1 Stand der Technik zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten

Zur multiperspektivischen Bildgebung trocken konservierter und mit Nadeln fixierter Insekten existieren bereits Systeme, welche genau für diesen Zweck entwickelt wurden. Dazu werden die Insekten einzeln vor einer Kamera auf einem Dreiachs-Gimbal platziert und können so aus beliebigen Perspektiven aufgenommen werden [120–122]. Die verfügbare Literatur zur multiperspektivischen Bildgebung von in Ethanol konservierten Insekten ist sehr beschränkt. Das von Raitoharju et al. (2018) [109] entwickelte und von Ärje et al. (2020) [110] weiterentwickelte System nimmt Bilder aus zwei Perspektiven auf. Dies wird durch die Verwendung von zwei im 90°-Winkel angeordneten Kameras realisiert. Zudem können Aufnahmen aus weiteren Perspektiven hinzukommen, da die Insekten beim Absinken in einer Küvette fotografiert werden und eine Veränderung der Lage nicht unwahrscheinlich ist. Dabei handelt es sich aber um einen zufälligen Prozess. Zudem kann nicht definiert werden, aus welchem Winkel die Bilder aufgenommen werden. Ein anderes System von Sarpola et al. (2008) [123] nutzt Spiegel, um mit einer Kamera mehrere Perspektiven von Steinfliegenlarven aufzunehmen. Die Kamera wird von oben auf einen, im Querschnitt rechteckigen Kanal gerichtet, der zwei Sammelbehälter miteinander verbindet. Über diesem Kanal befinden sich vier Spiegel, sodass auf dem Bild zwei Ansichten, um 90° verdreht voneinander, sichtbar sind. Zusätzlich kann ein in den Kanal integrierter Wasserstrahl dazu genutzt werden, die Steinfliegenlarven auszurichten. Zur Bildgebung wird ein Mikroskop mit Kamera verwendet. Zur Steuerung wird eine GUI verwendet, in der die Bildaufnahme gestartet wird und die Positionsänderung der Steinfliegenlarven manuell erfolgen kann [123]. Der zur multiperspektivischen Bildgebung von Zebrafischlarven entwickelte *VAST BioImager* bietet Ansätze, die gegebenenfalls auf den Anwendungsfall übertragbar sind. Hierbei werden die Zebrafischlarven in einem 3,5 cm langen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von ca. 600 µm - 700 µm in einer Bildgebungskammer positioniert. Die Bildgebungskammer ist mit Wasser gefüllt, um die Brechung an der Oberfläche des Glasröhrchens zu reduzieren. Die Bildaufnahme kann dann entweder mit der im System integrierten Kamera über eine Spiegeloptik von der Seite oder mit einem Mikroskop von oben erfolgen. Um die Zebrafischlarven zu rotieren, werden zwei Schrittmotoren mit Hohlwelle verwendet, durch die das Glasröhrchen geführt wird. Durch ein Drehen der Motoren kann das Röhrchen rotiert werden. Dadurch werden die darin befindlichen Zebrafischlarven ebenfalls rotiert und können aus einer beliebigen und definierten Anzahl an Positionen abgebildet werden, solange sie sich im Glasröhrchen nicht bewegen [124].

## 6.2 Konzept und Methoden

Die in Tabelle 6.1 zusammengefassten und in Anhang A.3 detaillierten Anforderungen dienen als Grundlage zur Entwicklung eines Systems zur multiperspektivischen Bildgebung von wirbellosen Tieren in Ethanol. Das System wird im Folgenden DiversityScanner-360° genannt. Die Entwicklung orientiert sich an der VDI 2206 (2021) [118] zur Entwicklung mechatronischer Systeme. Zunächst findet eine Aufteilung des Gesamtsystems in Teilsysteme statt. Diese sind in Abbildung 6.1 dargestellt und umfassen jeweils ein Teilsystem für Software und für Hardware. Die Hardware umfasst ein zentrales Steuerelement, welches entweder intern



**Abbildung 6.1:** Das Gesamtsystem zur automatisierten multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol kann in zwei Teilsysteme untergliedert werden: Hardware und Software. Die Hardware umfasst dabei drei Teilsysteme. Das System zur Bildgebung, das eine Kamera, ein optionales System zum *Focus Stacking*, eine geeignete Beleuchtung, eine Bildgebungszelle, in der sich das zu fotografierende Objekt befindet, sowie eine Winkelverstellung zwischen Bildgebungszelle und Kamera umfasst. Zudem ein System zur Handhabung mit Handhabungsschnittstelle und ein Hardwaresystem zur Steuerung aller Komponenten mit zentralem Steuerelement, das entweder intern oder extern realisiert werden kann. Die Software bietet eine Schnittstelle zum/zur Nutzer:in sowie die Hardwareanbindung und eine Bildverarbeitung. Zusätzlich soll das System an ein externes Handhabungsgerät, wie den DiversityScanner angeschlossen werden können.

oder extern realisiert werden kann. Zur Handhabung wird eine Handhabungsschnittstelle benötigt. Der DiversityScanner-360° soll über kein eigenes Handhabungssystem für die Proben

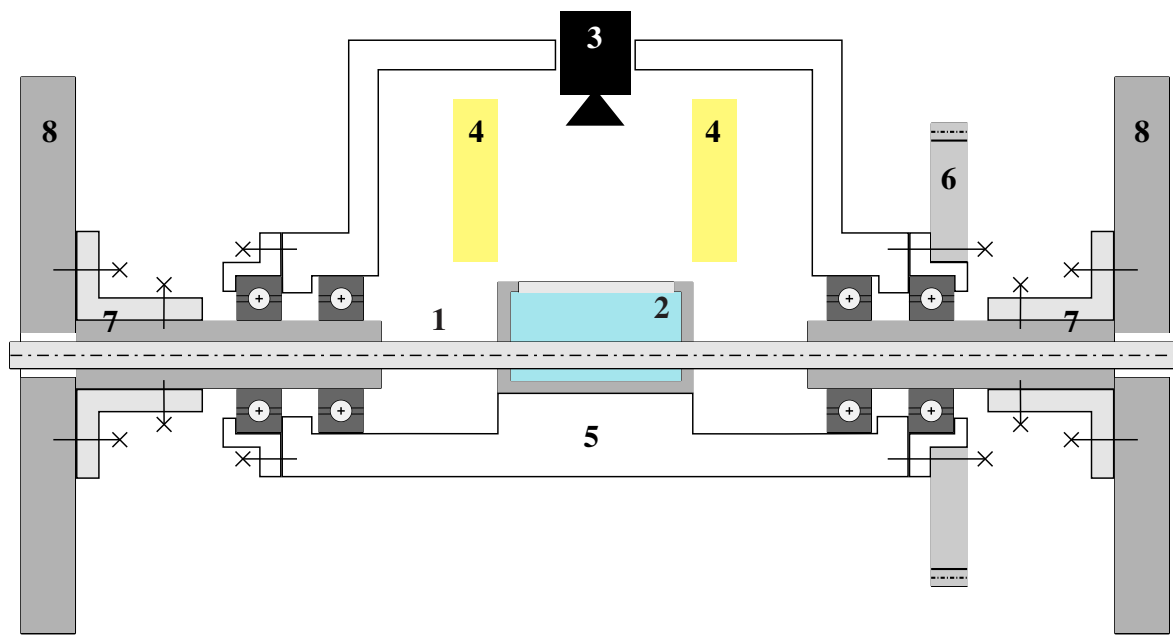
verfügen, sondern an ein externes System wie den DiversityScanner (vgl. Kapitel 7) angebunden werden können, wenn eine vollständige Automatisierung nach Definition (vgl. Übersicht Teil III) gewünscht ist. Alternativ sollen die Proben manuell vereinzelt der Handhabungsschnittstelle zugeführt werden können. Das Teilsystem zur Bildgebung stellt das aufwendigste Teilsystem der Hardware dar. Es umfasst eine Kamera mit Objektiv, die, für den Fall, dass das *Depth of Field* (DoF) nicht ausreicht, um Proben der definierten Größe vollständig abbilden zu können, mit einer *Focus Stacking*-Einheit mehrere FE aufnehmen kann. Weiterhin muss eine Bildgebungszelle realisiert werden, die sich oder zu der die Kamera mittels einer Winkelverstellung relativ bewegt werden kann, um die Aufnahme aus mehreren Perspektiven zu ermöglichen. Die Software umfasst wiederum ein *Backend*, in dem die Bildverarbeitung realisiert wird, sowie eine Anbindung zur Hardware, um Steuerfunktionen zu übernehmen. Für das *Frontend* muss eine Benutzeroberfläche realisiert werden. Diese kann wieder als GUI realisiert werden. Für den Fall, dass das System in den DiversityScanner integriert wird, kann darauf jedoch verzichtet werden.

Das Teilsystem zur Bildgebung nutzt eine ähnliche Herangehensweise wie das *VAST BioImager* [124] System. In Abbildung 6.2 wird das Konzept visualisiert. Ein Glasröhrchen (1) wird durch eine Bildgebungszelle (2) geführt. Bei dieser handelt es sich um ein mit Flüssigkeit gefülltes Behältnis, das zum Glasröhrchen hin abgedichtet und mit einer Abdeckung aus Glas verschlossen ist, um die Brechung auf der Oberfläche des Glasröhrchens zu reduzieren. Die Dichtung zwischen Glasröhrchen und Bildgebungszelle wird so realisiert, dass letztere um das Röhrchen herum rotiert werden kann. Über der Bildgebungszelle ist die Kamera mit Objektiv angebracht (3). Diese muss, wenn die Schärfentiefe des Objektivs in Kombination mit der Kamera nicht ausreicht, über einen *Focus Stacking* Mechanismus verfügen. Die Beleuchtung (4) wird oberhalb der Bildgebungszelle angebracht. Zur Winkelverstellung sind Bildgebungszelle, Kamera und Beleuchtung auf einem um das Glasröhrchen rotierbaren Rahmen (5) montiert. Dieser kann über einen Zahnriemen (6) angetrieben werden und so uneingeschränkt viele Winkel um das Glasröhrchen herum realisieren. Die Rotation erfolgt um zwei Hohlwellen (7) die am Hauptrahmen (8) befestigt sind und durch welche das Glasröhrchen geführt wird.

## 6.3 Aufbau des DiversityScanner-360°

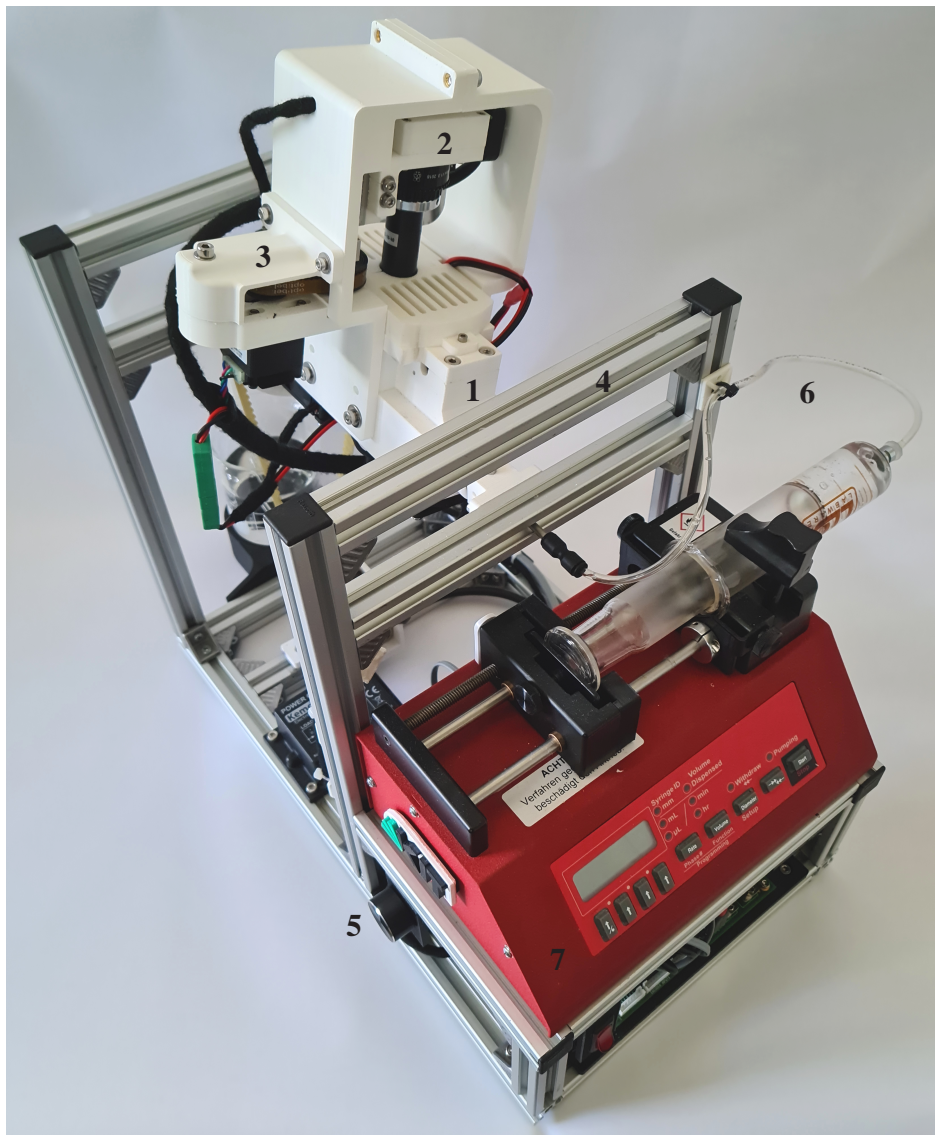
Das Gesamtsystem, der DiversityScanner-360°, ist in Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4 dargestellt.

Das Konzept sieht vor, eine Bildgebungszelle gefüllt mit Flüssigkeit zu verwenden. Diese wird in den rotierenden Rahmen (vgl. Abbildung 6.3 (1)) zusammen mit der Kamera (2) und dem *Focus Stacking* Mechanismus (3) integriert. Durch die Bildgebungszelle wird ein Glasröhrchen geführt, in dem das abzubildende Insekt platziert wird, indem es durch den Saugschlauch (6) mit einer Spritzenpumpe (LA-110, Landgraf Laborsysteme HLL GmbH,



**Abbildung 6.2:** Konzept zur Bildgebung mit dem DiversityScanner-360°. Die zu fotografierenden Insekten werden in ein (1) Glasröhrchen gesaugt, welches durch eine mit (2) Flüssigkeit gefüllte Bildgebungszelle geführt wird. Die (3) Kamera und die (4) Beleuchtung sind darüber platziert. Zur Rotation befinden sich die Bildgebungszelle, die Kamera und Beleuchtung auf einem um das Glasröhrchen (5) rotierbaren Rahmen, dessen Rotation durch einen (6) Riemenantrieb erreicht wird. Die Rotation erfolgt um zwei (7) Hohlwellen die am (8) Hauptrahmen befestigt sind und durch welche das Glasröhrchen geführt wird. Modifiziert nach [119].

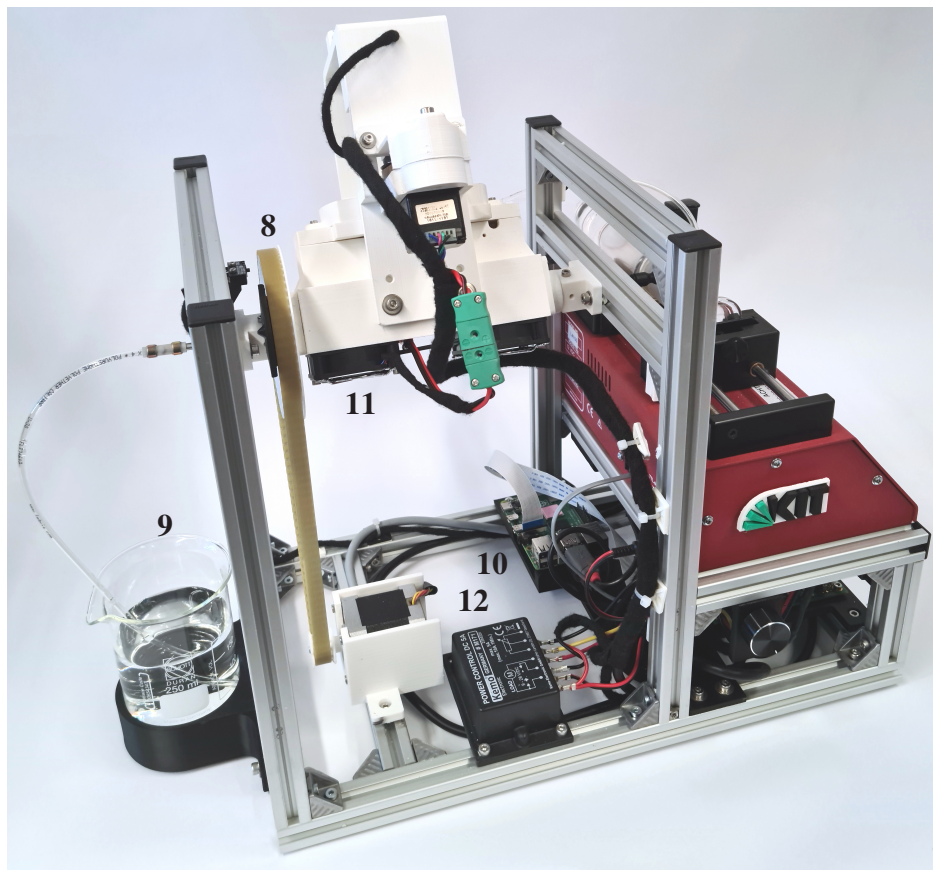
Langenhagen, Deutschland) (7) angesaugt wird. Um eine geeignete Abdichtung zu gewährleisten, kann für die Bildgebungszelle kein 3D-gedrucktes Teil verwendet werden. Stattdessen wird sie aus Aluminium gefertigt und muss daher spanend bearbeitet werden. Die Größe der Bildgebungszelle ergibt sich aus der Anforderung an die Größe der zu fotografierenden Proben, welche eine maximale Größe von 3 mm haben. Daher wird ein Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 3 mm und einer Wandstärke von ca. 0,5 mm gewählt. Die Bildgebungszelle muss demnach groß genug sein, um das Glasröhrchen mit einem Außendurchmesser von 4 mm durchführen und abdichten zu können. Die Abdichtung kann entweder mit O-Ringen oder Wellendichtringen erfolgen. Da die maßgenaue Fertigung von O-Ring-Nuten auf der Innenseite von Bohrungen deutlich anspruchsvoller ist als die Herstellung einer Bohrung mit definiertem Durchmesser für einen Wellendichtring, werden zur Abdichtung Wellendichtringe (WDR EPDM 4 mm × 8 mm × 2 mm, Dichtelemente arcus GmbH, Seevetal, Deutschland) verwendet. Die Materialauswahl der Dichtelemente und der Bildgebungszelle selbst ist abhängig von der Flüssigkeit, die sich in der Zelle befinden soll. Diese hängt wiederum von den optischen Eigenschaften und insbesondere vom Verhältnis der Brechungsindizes zwischen Glasröhrchen, Flüssigkeit und Abdeckung ab. Es wird eine Kombination aus Quarzglas und Ethanol gewählt, da deren Brechungsindizes näher beieinander liegen als die von Quarzglas und Wasser (vgl. Tabelle 6.2). Die Vorauswahl von Quarzglas wird getroffen, da es sich dabei um ein gängiges Material im Laborbedarf handelt, das eine gute Verfügbarkeit hat.



**Abbildung 6.3:** Vorderansicht des DiversityScanner-360° mit rotierendem Rahmen (1), Kamera mit Objektiv (2), *Focus Stacking* Mechanismus (3), Hauptrahmen (4), Regler zur Einstellung der Helligkeit (5), Saugschlauch (6) und Spritzenpumpe (7). Modifiziert nach [119]. ©2024 IEEE

Die Beschränkung auf Ethanol und Wasser erfolgt, da das Gemisch aus 80 % Ethanol und 20 % Wasser zur Konservierung der Insekten verwendet wird. Demnach dient das Gemisch im Inneren des Glasröhrchens auch dem Transport der Insekten.

Da der Brechungsindex von 100 % Ethanol näher an Quarzglas liegt als der von Wasser, werden die Insekten für die 360° Bildgebung in 100 % Ethanol umgelagert. Demnach sollte auch die Bildgebungszelle mit 100 % Ethanol gefüllt werden. Die verwendeten Materialien müssen demnach beständig gegen Ethanol sein. Dies trifft sowohl für Aluminium als auch für Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) zu, was als Material für die Dichtungen gewählt wird [129]. Die Bildgebungszelle mit allen Komponenten ist als Explosionszeichnung in Abbildung 6.5 dargestellt und hat eine Gesamtgröße von 30 mm x 30 mm x 24 mm. Die Abdeckung wird durch eine Glasscheibe mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Stärke



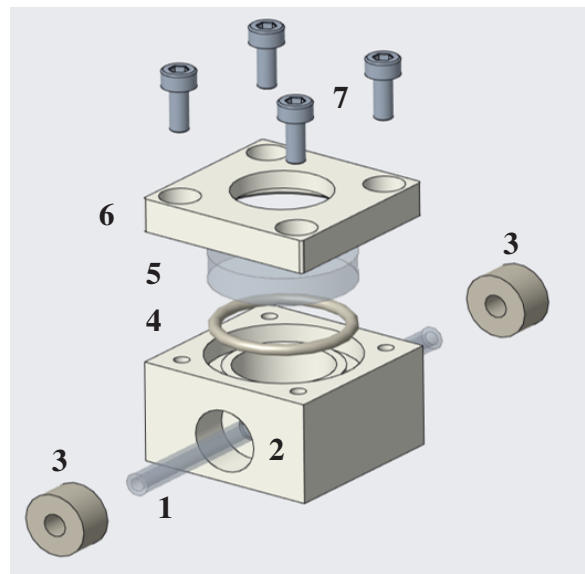
**Abbildung 6.4:** Rückansicht des DiversityScanner-360° mit (8) Zahnriemenantrieb, (9) Probenbehälter, (10) Raspberry Pi 4, (11) Lüftern und (12) Pulsweitenmodulation (PWM)-Dimmer. Modifiziert nach [119]. ©2024 IEEE

**Tabelle 6.2:** Brechungsindizes verschiedener Materialien, sowie deren Quellen.

Material	Brechungsindex*	Referenz
Quarzglas	1,46	[65, 125]
Wasser	1,33	[65, 126]
Ethanol	1,36	[127, 128]

\*Bei allen Werten handelt es sich um Näherungen bei Raumtemperatur  $T = 20\text{ °C}$  und Wellenlängen im sichtbaren Bereich. Je nach genauer Zusammensetzung des Glases, kann der Wert für Quarzglas etwas variieren.

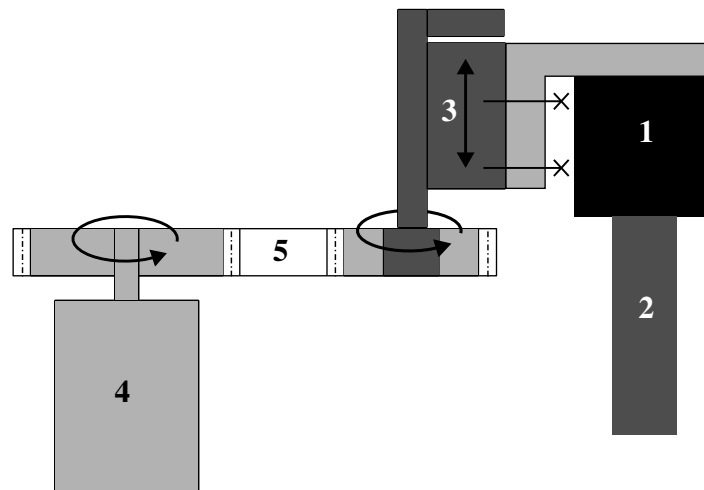
von 5 mm realisiert. Die Abdichtung zur Bildgebungszelle hin erfolgt mit einem O-Ring (21 mm x 2 mm, 60 Shore A, EPDM). Zur Fixierung wird die Glasscheibe von oben durch einen Deckel aus Aluminium und mit vier Zylinderkopfschrauben geklemmt. Um mit den Entomoscopen und dem DiversityScanner-4K (vgl. Kapitel 7) vergleichbare Bilder anfertigen zu können, wird wiederum die Raspberry Pi HQ Kamera mit 12,3 MP verwendet. Als Objektiv wird ein, ebenfalls im DiversityScanner (vgl. Kapitel 7) verbaut und mit dem Plug-In Entomoscope kompatibles, telezentrisches Objektiv mit 40 mm Arbeitsabstand und



**Abbildung 6.5:** Explosionsansicht der Bildgebungszelle des DiversityScanner-360°. Das (1) Glasröhrchen wird durch die (2) Bildgebungszelle geführt und mit (3) Wellendichtringen abgedichtet. Ein (4) O-Ring wird zur Abdichtung der (5) Glasabdeckung verwendet und mit einem (6) Deckel aus Aluminium und vier (7) Schrauben festgeklemmt. Modifiziert nach [119]. ©2024 IEEE

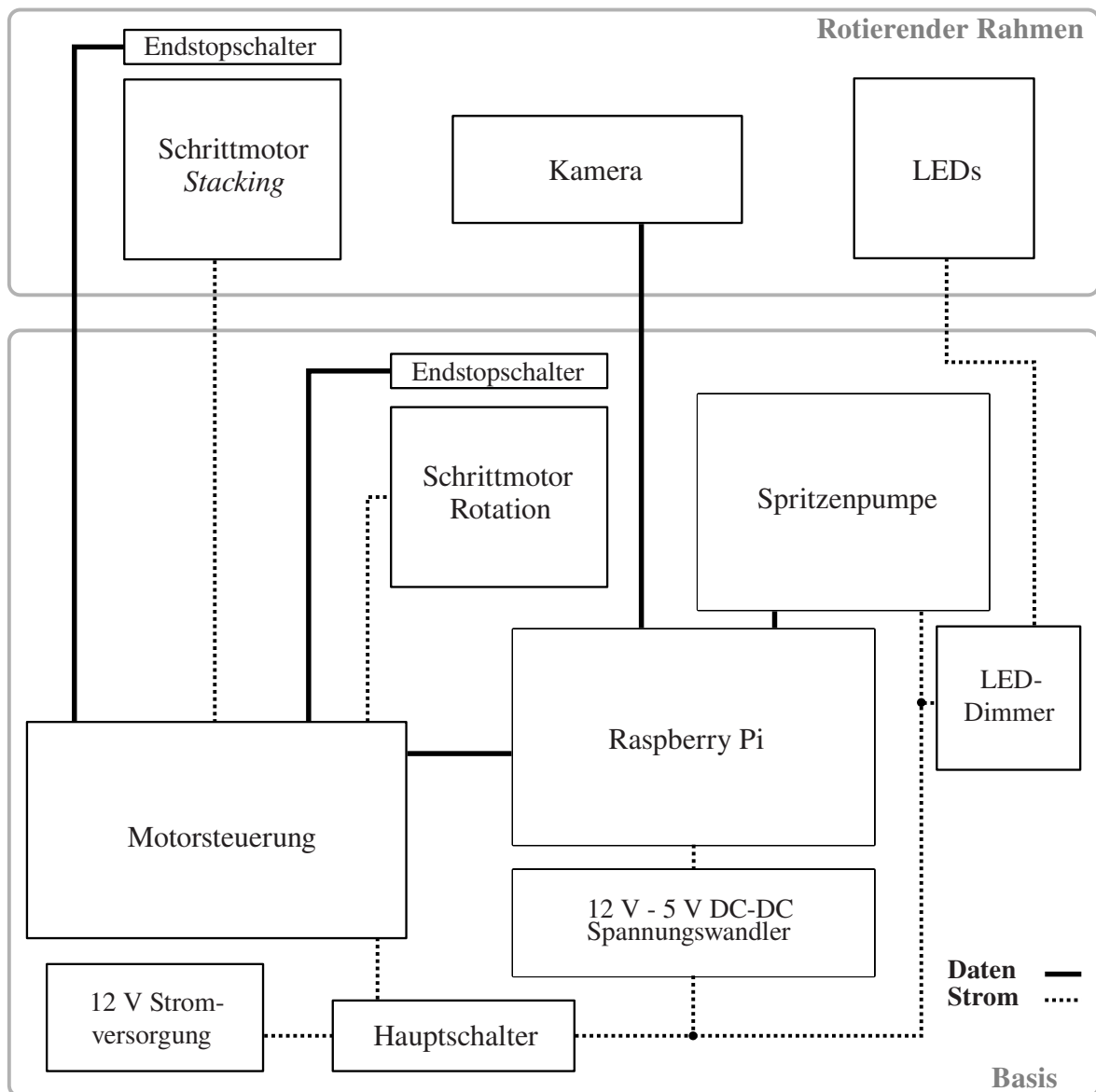
einer Vergrößerung von 1x gewählt (TCST-10-40, Lensation GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die mit dieser Kombination aus Kamera und Objektiv erreichbare Schärfentiefe reicht nicht aus, um den Inhalt des Glasröhrchens mit einer maximalen Höhe von 3 mm (entspricht dem Innendurchmesser des Röhrchens) abzubilden. Die Schärfentiefe des Objektivs ist mit einem 1/2"-Sensor bei einem *Circle of Confusion* (CoC) von  $40\text{ }\mu\text{m}$ , mit  $740\text{ }\mu\text{m}$  angegeben, für den kleineren Sensor (1/2, 3") der Raspberry Pi HQ Kamera ist demnach eine noch geringere Schärfentiefe zu erwarten. Aus diesem Grund wird ein *Focus Stacking* Mechanismus implementiert, um die FE über den gesamten Bereich des Glasröhrchens verschieben zu können. Die Prinzipskizze des *Focus Stacking* Mechanismus ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Die lineare Bewegung wird durch einen Positioniertisch (PT1104, MM Engineering GmbH, Baiern-Berganger, Deutschland) realisiert, der durch einen NEMA11 Schrittmotor (ST2818S1006-A, Nanotec Electronic GmbH & Co. KG, Feldkirchen, Deutschland) angetrieben wird. Die Raspberry Pi HQ Kamera (1) mit dem Objektiv (2), wird über einen 3D-gedruckten Halter mit dem Positioniertisch (3) verbunden. Der Schrittmotor (4) bewegt über einen Riementrieb (5) den Positioniertisch.

Neben Bildgebungszelle, Kamera mit Objektiv und *Focus Stacking* Mechanismus, wird eine geeignete Beleuchtung benötigt. Die Beleuchtung von der Seite, wie im Entomoscope oder DiversityScanner, ist aufgrund der Bildgebungszelle nicht möglich. Der Lichteinfall erfolgt daher idealerweise von oben durch die gläserne Abdeckung der Bildgebungszelle. Zur Beleuchtung der Proben für die Bildgebung werden LEDs verwendet. Um den Platz optimal zu nutzen, werden *Surface Mounted Device* (SMD)-LEDs (WENPW02C1M 0805 SMD LED, Winger Electronics GmbH & Co. KG, Dessau-Roßlau, Deutschland) genutzt. Diese



**Abbildung 6.6:** Prinzipskizze des *Focus Stacking* Mechanismus im DiversityScanner-360°. Die (1) Kamera mit (2) Objektiv wird mit einem 3D-gedruckten Halter am (3) Positioniertisch befestigt. Der Antrieb erfolgt mit einem (4) Schrittmotor der über einen (5) Riementrieb mit dem Positioniertisch verbunden ist. Modifiziert nach [119]. ©2024 IEEE

sind auf gefrästen SMD-Boards montiert. Zur Beleuchtung wird links und rechts der Bildgebungszelle eine Platte mit LEDs angebracht. Zusätzlich wird über der Bildgebungszelle ein Ring mit LEDs um das Objektiv montiert. Insgesamt sind 162 SMD-LEDs installiert. Um diffuses Licht zu erhalten, werden 3 mm starke Diffusorplatten aus Polycarbonat mit einer Lichtdurchlässigkeit von 50 % verwendet. Die Helligkeit der LEDs kann manuell über einen PWM-Leistungsregler (M171, Kemo-Electronic GmbH, Geestland, Deutschland) verändert werden. Zur Kühlung der LEDs sind zwei Lüfter in den Aufbau integriert. Die Rotation der Bildgebungskomponenten um das Glasröhrchen wird ermöglicht, indem sie in ein 3D-gedrucktes Gehäuse montiert werden, welches um zwei Hohlwellen rotiert. Die Lagerung wird mit vier Kugellagern vom Typ 608-2RSH (gedichtetes Kugellager mit einem Innendurchmesser von 8 mm) in fest-los Anordnung realisiert. Zur Rotation wird ein NEMA 23 Schrittmotor (ST5918X1008-A, Nanotec Electronic GmbH & Co. KG, Feldkirchen, Deutschland) in Kombination mit einem Zahnriemenantrieb verwendet. Der Schrittmotor ist am Hauptrahmen, bestehend aus 20 mm x 20 mm Aluminium Strebenprofilen (Bosch Rexroth AG, Lohr am Main, Deutschland), befestigt. Der Zahnriemenantrieb ist in Abbildung 6.4 (8) dargestellt. Abbildung 6.7 zeigt alle elektronischen Komponenten des Systems. Als zentrales Steuerelement findet ein Raspberry Pi 4 Model B 8 GB Verwendung. Auf dem Raspberry Pi läuft die Steuerungssoftware. Er ist mit der Spritzenpumpe und der Motorsteuerung (TMC3110, TRINAMIC Motion Control GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) über USB verbunden. Die Kamera wird ebenfalls an den Raspberry Pi angeschlossen. Die Motorsteuerung, Spritzenpumpe und LEDs werden mit 12 V DC versorgt. Die Stromversorgung des Raspberry Pi erfolgt mit einem 12 V - 5 V DC-DC Spannungswandler. Zur Regulierung der Helligkeit der LEDs wird ein PWM-Leistungsregler verwendet. Dieser erlaubt eine einfache Einstellung über ein Potentiometer. Die Platzierung der Insekten in der Bildgebungskammer erfolgt mithilfe der Spritzenpumpe, welche mit dem Saugschlauch verbunden ist. In Abbildung 6.4 ist



**Abbildung 6.7:** Elektronische Komponenten des DiversityScanner-360°. Als zentrales Steuerelement dient ein Raspberry Pi, der über USB mit der Motorsteuerung verbunden ist. Diese steuert die Schrittmotoren zur Rotation und zur linearen Bewegung der Kamera. Die Stromversorgung erfolgt über ein externes 12 V Netzteil und wird intern für den Raspberry Pi mit einem 12 V - 5 V DC-DC Spannungswandler reduziert. Die Kamera ist mit dem Raspberry Pi verbunden. Die Helligkeit der LEDs zur Objektbeleuchtung während der Bildgebung kann mit einem Dimmer angepasst werden.

der Probenbehälter (9) dargestellt, in dem die Insekten platziert werden können. Anschließend können diese nach Aktivieren der Spritzenpumpe in der Software mit dem Saugschlauch aufgenommen werden. Die Software des DiversityScanner-360° erfüllt mehrere Funktionen. Im Backend wird zunächst die Positionierung des Insekts vor der Kamera geregelt. dazu startet ein Videostream, der kontinuierlich überwacht wird, während die Spritzenpumpe eine Probe ansaugt. Die konstanten Belichtungsbedingungen im DiversityScanner-360° erlauben eine sehr einfache Objekterkennung. Dazu wird nur das Zentrum des Bildes betrachtet, welches

anhand eines globalen Schwellwerts in ein binäres Bild umgewandelt wird. Übersteigt die Anzahl schwarzer Pixel einen Wert von 2 %, befindet sich ein Objekt vor der Kamera und die Spritzenpumpe wird gestoppt. Um zu überprüfen, ob sich die Probe aufgrund ihrer Trägheit über den Bildgebungsbereich hinaus bewegt hat, wird zwei Sekunden gewartet und erneut geprüft, ob sich ein Objekt im Bildausschnitt befindet. Ist das nicht der Fall, wird die Pumprichtung geändert und das Objekt ausgemittelt. Daraufhin wird der Bildaufnahmeprozess gestartet. Dieser nimmt eine definierte Anzahl an Perspektiven und FE auf. Das *Frontend* ist als *Comand-Line Interface* (CLI) realisiert und erlaubt so das einfache Testen des Systems. Zukünftig ist eine Integration der Software in die des DiversityScanners vorgesehen (vgl. Kapitel 7), um die Anforderung an ein automatisiertes System zu erfüllen, da der DiversityScanner wie in Abbildung 6.1 dargestellt die Handhabungsaufgabe übernehmen kann und somit kein manuelles und einzelnes Einsaugen der Proben stattfinden muss. Dazu kann der Schlauch, der in den Probenbehälter geführt wird, als Handhabungsschnittstelle angesehen werden.

## 6.4 Evaluierung des DiversityScanner-360°

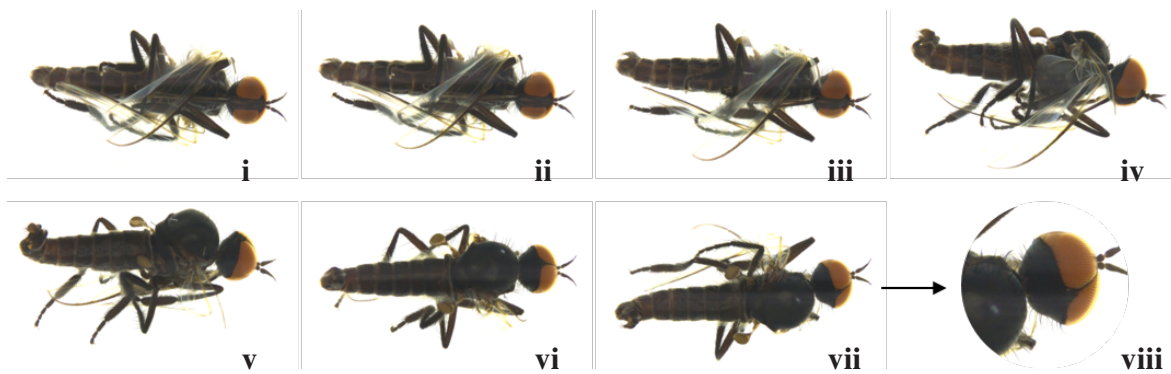
Die in Tabelle 6.1 zusammengefassten und in Anhang A.3 detaillierten Anforderungen dienen als Grundlage zur Evaluierung des Systems. Das System ist vollständig reproduzierbar und größtenteils aus 3D-gedruckten oder kommerziell verfügbaren Komponenten aufgebaut. Aus technischen Gründen sind nicht alle Teile 3D-druckbar bzw. kommerziell erwerbbar und erfordern das spanenende Bearbeiten von Metall. Dies betrifft die Bildgebungszelle sowie die Hohlwellen. Diese Komponenten erfordern Zugriff auf eine Werkstatt mit entsprechender Ausstattung sowie die notwendigen Kenntnisse zur Fertigung. Alternativ können die Komponenten in Auftrag gegeben werden, was jedoch wieder mit Kosten verbunden ist. Das Gesamtsystem hat Abmessungen von 500 mm x 250 mm x 500 mm und erfüllt damit die Anforderung an die Gesamtgröße. Die handhabbare Probengröße entspricht mit maximal 3 mm ebenfalls der Anforderung. Zur Bildgebung muss die Probe nicht aus dem Ethanol genommen werden. Idealerweise wird sie jedoch in 100 % Ethanol umgelagert, um die Brechung am Glasröhrchen zu reduzieren. Nachteile für die Probe sind dadurch nicht zu erwarten, da die Zeit, die sich die Probe in der anderen Konzentration befindet, nur auf den Bildgebungsprozess beschränkt ist und anschließend wieder in 80 % Ethanol umgelagert werden kann. Zusätzlich sind die auf die Probe wirkenden Kräfte durch den Transport in Ethanol minimal. Die Unversehrtheit der Probe kann somit gewährleistet werden. Die notwendige Schärfentiefe kann durch den implementierten *Focus Stacking* Mechanismus erreicht werden. Dieser erlaubt einen Fokusbereich über 11 mm, dies entspricht dem Hub des verbauten Linear-tischs. Dieser muss jedoch nicht ausgereizt werden, da die maximale abzubildende Tiefe dem Innendurchmesser des Glasröhrchens mit 4 mm entspricht. Die verwendete Kamera liefert eine Auflösung von 12,3 MP. Die Beleuchtung wird durch SMD-LEDs realisiert. Durch den

abgeschlossenen Aufbau sind Fremdlichteinflüsse ausgeschlossen und es können Bilder mit einheitlicher Beleuchtung aufgenommen werden. Zusätzlich kann die Beleuchtung in ihrer Helligkeit angepasst werden, um auch sowohl helle als auch dunkle Insekten gut abbilden zu können. Die Kosten zum Aufbau des Systems liegen bei ca. 2250 €. Dieser Wert übersteigt die Anforderung von maximal 2000 €. Größter Kostenfaktor ist dabei die Spritzenpumpe, die mit 1100 € einen Großteil der Kosten ausmacht, zudem kostet die verbaute Motorsteuerung ca. 330 €. Die Anforderung an die Anzahl an Perspektiven wird erfüllt. Durch den Aufbau des Systems sind diese um eine Achse nicht limitiert und können frei gewählt werden. Durch die Implementierung mit feststehendem Glasröhrchen und rotierender Bildgebungszelle mit Kamera bewegt sich das zu fotografierende Insekt während der Bildgebung nicht. Die relative Position der Bilder zueinander ist demnach bekannt. Die Kompatibilität zum DiversityScanner (vgl. Kapitel 7) ist gewährleistet. Es wird die gleiche Spritzenpumpe, sowie der gleiche Saugschlauch verwendet. Eine Integration, welche den DiversityScanner-360° zu einem automatisierten System machen würde, ist demnach denkbar.

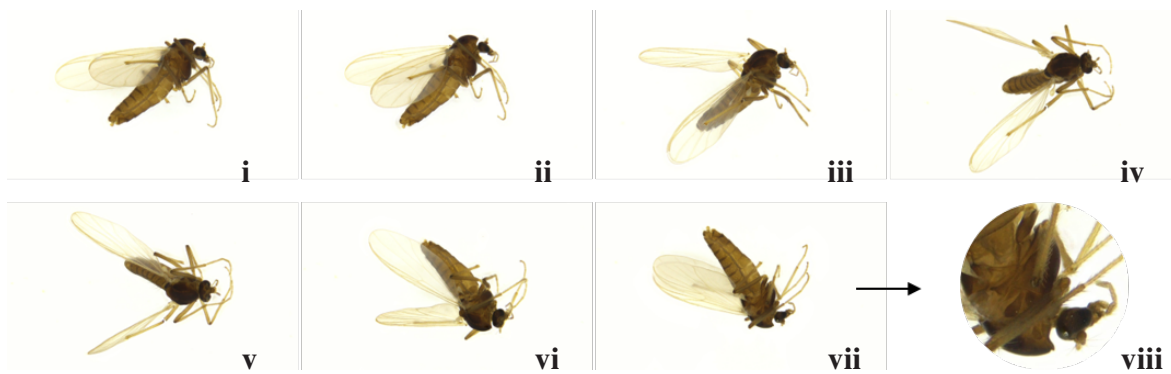
Abbildung 6.8 zeigt beispielhaft zwei mit dem DiversityScanner-360° aufgenommene Insekten in jeweils sieben Perspektiven bestehend aus jeweils fünf FE. Die Verarbeitung zu einem in allen Bereichen scharfen Bild erfolgt mit *Helicon Focus* (HeliconSoft, Kharkiv, Ukraine, [73]). Zusätzlich ist jeweils ein Detail der letzten Perspektive dargestellt.

## 6.5 Diskussion

Der DiversityScanner-360° ist ein multiperspektivisches Bildgebungssystem für in Ethanol konservierte wirbellose Tiere mit einer maximalen Größe von 3 mm. Es ermöglicht die Aufnahme von Bildern verschiedener Perspektiven entlang eines Kreisbogens senkrecht zu einer Achse mit erweiterter Schärfentiefe durch einen implementierten *Focus Stacking* Mechanismus. Die Aufnahme von Insekten aus verschiedenen Perspektiven bietet den Vorteil, dass wichtige Merkmale, die in einer Perspektive verborgen sind, in einer anderen sichtbar werden können. Darüber hinaus können Trainingsdatensätze für maschinelles Lernen schneller generiert werden, selbst wenn nur eine begrenzte Anzahl von Exemplaren einer Klasse<sub>ML</sub> zur Verfügung steht. Schließlich ermöglicht die Bildgebung aus verschiedenen Perspektiven die Erstellung von 3D-Modellen der Proben. Es ist jedoch zu beachten, dass beim DiversityScanner-360° die Kamera nur um eine Achse gedreht wird, was bedeutet, dass bei der Erstellung eines 3D-Modells Informationen an den Stellen fehlen können, an denen diese Achse das Insekt schneidet. Das System kann leicht nachgebaut oder angepasst werden, da die meisten seiner Teile kommerziell erhältlich oder 3D-druckbar sind. Allerdings erfordert der aktuelle Aufbau auch gefräste oder gedrehte Teile aus Aluminium und Edelstahl, was den Aufbau etwas aufwendiger macht. Aus technischen Gründen kann momentan jedoch nicht auf eine spanend bearbeitete Bildgebungszelle verzichtet werden. Versuche, die Zelle im FDM



(a) Beispielbilder, aufgenommen mit dem DiversityScanner-360°, einer Diptera Empididae. Modifiziert nach [91]. ©2024 IEEE



(b) Beispielbilder, aufgenommen mit dem DiversityScanner-360°, einer Diptera Chironomidae. Modifiziert nach [91]. ©2024 IEEE

**Abbildung 6.8:** Zwei beispielhafte Datensets aufgenommen mit dem DiversityScanner-360° mit jeweils sieben Perspektiven (i) - (vii), sowie einer Detailansicht (viii). Für jedes Bild wurden fünf Fokusebenen (FE) aufgenommen und mit *Helicon Focus* zu einem Bild verarbeitet.

3D-Druck herzustellen, scheitern an der für den FDM 3D-Druck typischen unebenen Oberfläche, die durch die Schichtung der einzelnen Lagen entsteht. Dadurch ist eine Abdichtung nicht möglich, und es bilden sich Luftblasen in der Zelle, insbesondere wenn die Glasplatte nach oben zeigt. Zudem kann die Dichtheit der Zelle zwischen den einzelnen Lagen selbst nicht gewährleistet werden. Durch kleinste Fehler beim 3D-Druck kann das Ethanol durch Kapillarkräfte in das Bauteil eindringen. Die gedrehten Hohlwellen hingegen könnten zukünftig durch eine 3D-gedruckte Lösung ersetzt werden. Dies erfordert jedoch größere Durchmesser und folglich auch größere Lager, um die notwendige Stabilität zu gewährleisten. Die Verwendung eines Raspberry Pi als zentrales Steuerelement ermöglicht die Nutzung der zugehörigen Kamera (Raspberry Pi HQ-Kamera) und senkt die Kosten. Allerdings beschränkt die begrenzte Rechenleistung des Raspberry Pi die Funktionalität. Das Verarbeiten der Bilder in Python kann beispielsweise direkt auf dem Raspberry Pi erfolgen, aber bessere und schnellere Ergebnisse werden durch die Verwendung kommerzieller Software wie *Helicon Focus* (HeliconSoft, Kharkiv, Ukraine, [73]) auf einem leistungstärkeren Computer erzielt. Die Bildgebungszeit für ein Insekt hängt von der Anzahl der aufzunehmenden FE und Perspektiven ab. Die Aufnahme eines Bildes mit dem Raspberry Pi und dem HQ-Kameramodul dauert ca. 1 s - 5 s und hängt mit den Bildgebungsparametern zusammen. Auch hier könnten mit einem leistungstärkeren Steuerelement schneller Bilder aufgenommen werden. Eine Plug-In

Version des DiversityScanner-360° wäre für einige Anwendungsfälle demnach eine geeignete Lösung, würde allerdings die Kompatibilität mit dem DiversityScanner (vgl. Kapitel 7), in seiner aktuellen Bauweise, einschränken. Die integrierte Beleuchtung liefert gute Bilderergebnisse (vgl. Abbildung 6.8), erfordert aber die Einstellung der Helligkeit, um sowohl sehr helle, als auch sehr dunkle Insekten abbilden zu können. Zusätzlich wird sehr viel Licht benötigt, um die Proben ausreichend beleuchten zu können. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Licht ausschließlich von oben in die Bildgebungszelle, durch dieselbe Scheibe, durch die auch die Bilder aufgenommen werden, eindringen kann. Eine Alternative könnte eine Bildgebungszelle aus einem transparenten Material, wie bspw. Polycarbonat sein. Somit wäre eine Beleuchtung, ähnlich wie bei den Entomoscoptes, von der Seite möglich. Alternativ, könnten zusätzlich zur Öffnung auf der Oberseite, Öffnungen zur Beleuchtung von der Seite integriert werden, was jedoch zu einer aufwendigeren Form der Bildgebungszelle führen würde. Anstatt einer klaren Glasscheibe, könnten für die seitliche Beleuchtung direkt Diffusorscheiben genutzt werden, um ein möglichst diffuses Licht zu erzeugen. Wie beschrieben, sollte zur Bildgebung eine Umlagerung der Proben in eine möglichst hohe Ethanolkonzentration stattfinden. Wenn eine Umlagerung in eine andere Ethanolkonzentration nicht gewünscht ist, ist eine Bildgebung trotzdem möglich, es kann jedoch zu stärkeren Artefakten im Bild, durch die Verzerrung des Glasröhrchens, kommen. Die Gesamtkosten des DiversityScanner-360° übersteigen die in der Anforderung definierten maximalen Kosten von 2000 €. Wie in der Evaluation beschrieben tragen die Spritzenpumpe, sowie die Motorsteuerung hauptsächlich zu den hohen Kosten bei und verursachen mehr als die Hälfte der Gesamtkosten. Beide Komponenten gewährleisten die Kompatibilität mit dem DiversityScanner (vgl. Kapitel 7). Kostengünstigere Alternativen sind jedoch, insbesondere für die Motorsteuerung, verfügbar. Beispielsweise könnte die im Plug-In Entomoscope verwendete CNC-Platine (Joy-It, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland) für den Arduino Uno in Kombination mit kostengünstigen Schrittmotortreibern (bspw. SilentStepStick TMC2209 V2, Watterott electronic GmbH, Leinefelde-Worbis, Deutschland) genutzt werden, um die anfallenden Kosten zu reduzieren.

Das vorgestellte System zeigt, dass die Methode zur multiperspektivischen Bildaufnahme von wirbellosen Tieren in Ethanol funktioniert. Trotzdem bietet sie noch weitere Optimierungsmöglichkeiten, um die Bildqualität zu verbessern, die Kosten zu senken und das System zu vereinfachen. Diese sollten zukünftig implementiert werden, um die Verfügbarkeit zu erhöhen. Dadurch kann ein wichtiger Beitrag zur automatisierten Biodiversitätsforschung geleistet werden. Da die Proben mit allen Details und mit minimalem Aufwand digitalisiert werden können, insbesondere dann, wenn eine Implementierung des teilautomatisierten DiversityScanner-360° in ein automatisiertes System wie den DiversityScanner erfolgt.



## **Teil III**

# **Automatisierte Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol**



# Übersicht Teil III

Um die Abgrenzung eines automatisierten Systems von einem teilautomatisierten System eindeutig zu ermöglichen, wird im Folgenden die Definition für ein automatisiertes System zur Bildgebung gegeben:

*Ein System wird als automatisiertes System zur Bildgebung definiert, wenn die abzubildenden Objekte nicht manuell und einzeln zur Bildgebung vor der Kamera platziert werden müssen, die Kamera demnach automatisiert verfahren werden kann oder die Proben automatisiert zugeführt und auch wieder entfernt werden. Zudem erfolgt die Bildaufnahme und das Datenmanagement, sowie die Bildverarbeitung anschließend automatisiert.*

Die Erweiterung des teilautomatisierten Systems zu einem vollständig automatisierten System ergänzt dessen Vorteile um die Reduktion der Arbeitskraft und die Möglichkeit der Parallelisierung zur Steigerung des Durchsatzes. Teil III umfasst die Entwicklung eines solchen automatisierten Systems. In Kapitel 7 wird der 'DiversityScanner', ein automatisiertes System zur Bildgebung, Handhabung und Vereinzelung sowie zur Klassifikation und Ermittlung morphometrischer Merkmale (vgl. Teil IV) vorgestellt. Der DiversityScanner erkennt mit einer Übersichtskamera in einer Petrischale ausgebreitete Insekten, klassifiziert diese anhand der Größe und Position in 'sortierbar' oder 'nicht sortierbar' und fertigt anschließend mit einer zweiten Kamera Detailbilder sortierbarer Insekten an. Für die Detailkamera werden zwei Varianten vorgestellt: eine 1,3 Megapixel (MP) Kamera ohne und eine 12,3 MP Kamera mit *Focus Stacking*. Anschließend können die auf den Detailbildern abgebildeten Insekten mit den in Teil IV vorgestellten Methoden klassifiziert oder vermessen werden. Zuletzt werden sie mit einer Pipette aufgenommen und in eine 96er Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Mikrotiterplatte sortiert. Die Evaluation des Handhabungsprozesses zeigt, dass das gewählte Handhabungswerkzeug, eine gekürzte Kunststoff-Pipettenspitze in Kombination mit einer Spritzenpumpe, nicht die erwünschten Ergebnisse von mehr als 90 % korrekt gehandhabter Insekten liefert. Die Handhabung ist nur in 60 % der Fälle erfolgreich. Aus diesem Grund wird in Kapitel 8 ein neues Handhabungswerkzeug, eine Saugspitze aus Glas, mit leistungsfähigerer Spritzenpumpe vorgestellt und evaluiert und gezeigt, dass mit diesem Aufbau 91 % erfolgreich gehandhabt werden können. Zudem wird eine neue Methode zur Handhabung von Insekten > 3 mm, ein pneumatischer Minigreifer entwickelt und evaluiert. Dieser Teil untersucht Methoden zur automatisierten Verarbeitung von in Ethanol konservierten Insekten und liefert so erste Ansätze, um der beschriebenen Vision (vgl. Kapitel 2.1) der vollständig automatisierten Biodiversitätsforschung näherzukommen.



# 7 Konzept zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten: DiversityScanner

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wühl, C. Pylatiuk, M. Giersch, F. Lapp, T. von Rintelen, M. Balke, S. Schmidt, P. Cerretti, und R. Meier, „DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 22, Nr. 4, S. 1626–1638, 2022. doi: 10.1111/1755-0998.13567.

Wie in Kapitel 2 dargelegt, bieten die automatisierte Handhabung und Bildgebung großes Potenzial, um ein vollständig automatisiertes System zu realisieren. Aus diesem Grund wird zu Beginn dieses Kapitels der aktuelle Stand der Technik hinsichtlich der automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol dargelegt. Der Stand der Technik zur manuellen Bildgebung ist Kapitel 5.1 zu entnehmen.

Die Literaturrecherche zeigt, dass kein System existiert, das die in Tabelle 7.1 aufgeführten Anforderungen erfüllt. Aus diesem Grund werden im Anschluss an den Stand der Technik Konzepte und Methoden vorgestellt, um diese Anforderungen zu erfüllen. Anschließend wird die Implementierung eines solchen Systems erläutert, dieses wird evaluiert und diskutiert. Die Anforderungen überschneiden sich teilweise mit denen, die an ein teilautomatisiertes System gestellt werden (vgl. Tabelle 5.1), sind aufgrund der steigenden Komplexität und Kompliziertheit jedoch umfangreicher. Tabelle 7.1 fasst die wichtigsten Anforderungen an ein automatisiertes System zur Bildgebung und Handhabung von Invertebraten in Ethanol zusammen. Die detaillierten Anforderungen sind in Anhang A.4 aufgeführt.

## 7.1 Stand der Technik zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten

Die automatisierte Prozessierung von nass konservierten Insekten-Massenproben stellt ein Forschungsgebiet dar, welches bislang wenig Aufmerksamkeit bekommen hat. Bislang wurde nur wenig unternommen, um der in Kapitel 2.1 beschriebenen Vision näherzukommen. Es

**Tabelle 7.1:** Übersicht über die wichtigsten Anforderungen an ein automatisiertes System zur Bildgebung und Handhabung von wirbellosen Tieren in Ethanol. Detaillierte Anforderungen sind Anhang A.4 zu entnehmen.

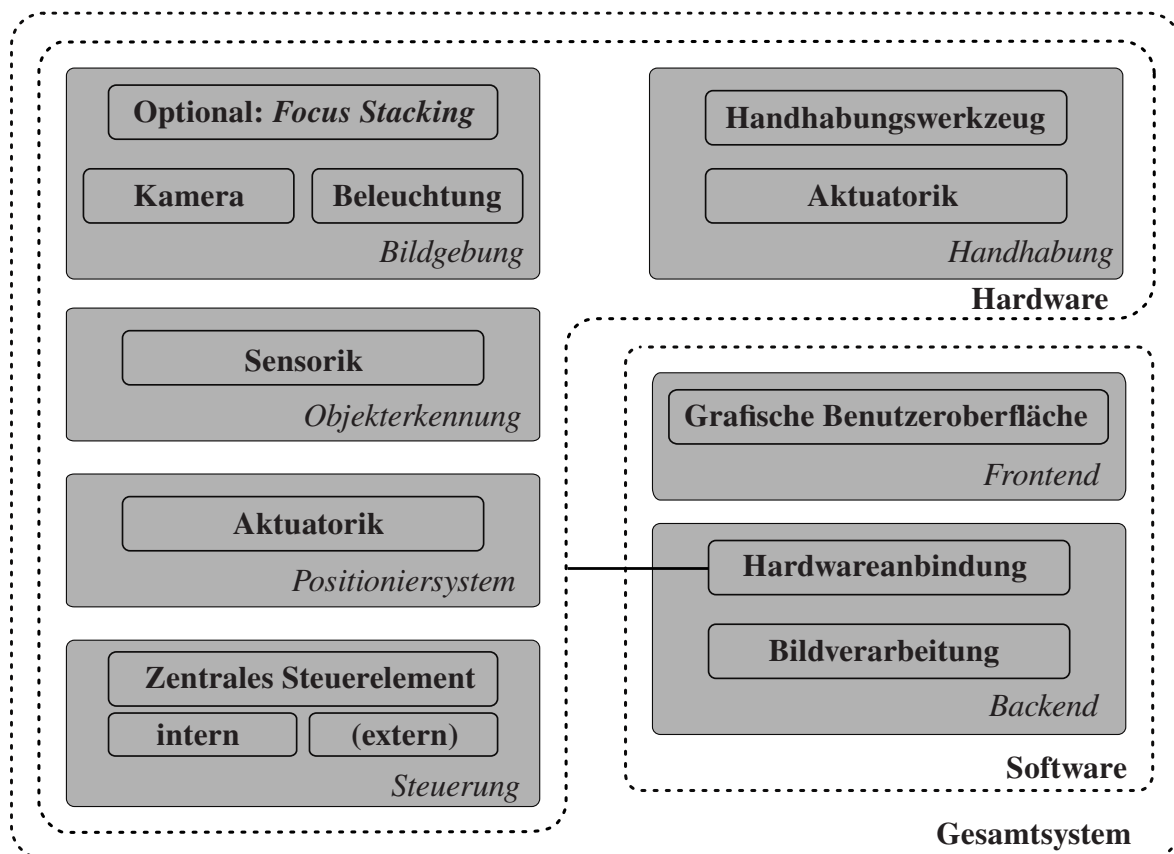
Parameter	Anforderung
Reproduzierbarkeit	Das System soll ohne besondere (technische) Vorkenntnisse aufgebaut werden können.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten, um auf einem Labortisch platziert werden zu können.
Probengröße	Es sollen Insekten der ersten Größenkategorie (< 3 mm, vgl. Kapitel 2.2) gehandhabt und abgebildet werden können.
Zuführung der Proben	Die Insekten sollen auf einer Ebene ausgebreitet werden und von dort aus automatisiert weiterverarbeitet werden.
Unversehrtheit der Proben	Das System muss so gestaltet werden, dass die Proben durch das System nicht beschädigt werden.
Vereinzelung	Nach der Bearbeitung sollen die Insekten vereinzelt vorliegen und eindeutig den Bildern zugeordnet werden können.
Handhabungsprozess	Der Handhabungsprozess soll möglichst häufig erfolgreich sein, mindestens aber in 90 % der Fälle die Probe korrekt entnehmen und im Zielbehältnis ablegen.
Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten < 3 mm in allen Bereichen scharf abzubilden.
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen, ist demnach möglichst diffus.
Auflösung	Die Auflösung des Systems soll möglichst hoch sein, mindestens aber 1 MP für Anwendungen des maschinellen Lernens bzw. 12 MP (4K) für morphologische Untersuchungen betragen.
Verarbeitungszeit	Die Verarbeitungszeit pro Insekt soll 60 s nicht übersteigen.
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 5000 € nicht übersteigen.
Skalierbarkeit	Das System soll skalierbar sein, d. h. die entwickelte Methode soll so gestaltet sein, dass durch Erweiterung des Systems die Zeit verlängert werden kann in der das System selbständig arbeitet.
Software	Das System muss über eine geeignete Software verfügen, um eine einfache Bedienung zu gewährleisten.
Open Source	Alle Komponenten des Systems sollen <i>Open Source</i> sein, das beinhaltet sowohl die Hardware als auch die Software.

existieren bereits verschiedene Systeme zur **Bildgebung** in Ethanol, welche die zuvor definierte Beschreibung an ein automatisiertes System jedoch nicht hinreichend erfüllen. Aus diesem Grund sind sie im Stand der Technik zur teilautomatisierten Bildgebung (vgl. Kapitel 5.1) aufgeführt. Dies betrifft insbesondere das von Raitoharju et al. (2018) [109] entwickelte und von Ärje et al. (2020) [110] weiterentwickelte System. Wie beschrieben, werden dort Insekten beim Herabsinken in einer Küvette fotografiert. Ein wörtliches 'Platzieren' vor der Kamera ist demnach nicht notwendig. Trotzdem müssen die Insekten einzeln zugeführt werden - dies erfolgt manuell. Die Systeme werden nach Definition (siehe oben), daher nicht als automatisiert angesehen. Das bereits 2011 von Chablin et al. [130] vorgestellte System erfüllt jedoch die Definition, ist aufgrund der verwendeten Komponenten aber vergleichsweise teuer. Das System, welches zur Bildgebung von Bodenmesofauna oder im Boden lebender wirbellosen Tieren entwickelt wurde, dient primär der Bildgebung von wirbellosen Tieren in einer Mischung aus Glykol und Glycerin, was zur Konservierung eingesetzt wird. Zur Bildgebung wird ein Leica Mikroskop mit angeschlossener Digitalkamera bei einer Vergrößerung von 3.2x verwendet. Die zu untersuchenden Proben werden in eine 60 mm Petrischale gegeben. Es werden zwei Belichtungsarten genutzt. Zum einen wird eine Hintergrundbeleuchtung durch einen LCD-Bildschirm realisiert. Die Aufnahmen mit Licht von unten liefern einen hohen Kontrast und werden zur Segmentierung genutzt. Zum anderen befinden sich um die Petrischale herum *Light Emitting Diodes* (LEDs), vor denen Diffusorscheiben angeordnet sind und ein Lichtring, der von oben auf die Proben strahlt. Die seitliche Beleuchtung in Kombination mit der Beleuchtung von oben wird zur Aufnahme der Proben genutzt, um diese anhand morphologischer Merkmale zu klassifizieren. Die Bildaufnahme erfolgt, indem die Petrischale mit zwei Achsen in x- und y-Richtung unter dem Mikroskop bewegt wird. Die anschließende **Handhabung** der maximal 1 mm großen Tiere erfolgt mit einem Sechssachsroboter, der als Endeffektor eine Pipette besitzt. Die Pipette wird über eine Vakuumpumpe mit Magnetventil automatisiert [130]. Bei der manuellen Handhabung von Insekten in Alkohol werden je nach Größe verschiedene Werkzeuge genutzt. Kleine und kompakte Insekten werden häufig pipettiert. Diese Methode bietet sich an, da eine Beschädigung der Probe sehr unwahrscheinlich ist. Es wirken keine direkten mechanischen Kräfte auf das zu handhabende Objekt. Diese Methode ist jedoch limitiert. Durch die geringe Oberflächenspannung von Ethanol, tendiert die Flüssigkeit bei zu großen Öffnungen der Pipettenspitze dazu, aus der Pipette zu laufen. Daher werden für größere Insekten häufig Pinzetten aus Federstahl verwendet, um diese zu handhaben. Diese Pinzetten haben jedoch den Nachteil, dass die Insekten bei unsachgemäßer Handhabung beschädigt werden können. Ansätze zur Automatisierung der Handhabung von Insekten in Ethanol sind in der Literatur selten vertreten. Zusätzlich zur von Chamblin (2011) [130] vorgestellten automatisierten Pipette, existieren weitere Publikationen, in denen eine automatisierte Pipette zur Handhabung biologischer Proben genutzt werden. Insbesondere bei der Untersuchung von Zebrafischeiern und Embryonen, wird diese Methode herangezogen [131–133]. Pfriem et al. [131, 132] nutzen zur Automatisierung eine

selbst entwickelte Linearpumpe, während Pardo-Martin et al. [133] auf eine Spritzenpumpe zurückgreifen. Zusätzlich zu Anwendungsfällen, bei denen automatisierte Pipetten zur Handhabung von biologischen Proben genutzt werden, sind für die reine Handhabung von Flüssigkeiten viele kommerzielle Pipettiersysteme verfügbar aber auch *Do It Yourself* (DIY) Ansätze wurden publiziert [134–136].

## 7.2 Konzept und Methoden

Auf Basis der definierten Anforderungen (vgl. Tabelle 7.1 und Anhang A.4), wird ein System entwickelt, das zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol verwendet werden kann. Die Entwicklung des Systems orientiert sich an VDI 2206 (2021) [118]. Dazu wird das Gesamtsystem in Teilsysteme untergliedert, siehe Abbildung 7.1. Die notwen-



**Abbildung 7.1:** Das Gesamtsystem zur automatisierten Bildgebung von Insekten in Ethanol, der DiversityScanner, kann in zwei Teilsysteme untergliedert werden: Hardware und Software. Die Hardware umfasst dabei wiederum mehrere Teilsysteme. Das System zur Bildgebung, das eine Kamera, wenn notwendig ein System zum *Focus Stacking* und eine geeignete Beleuchtung umfasst, ein System zur Handhabung mit Handhabungswerkzeug und geeigneter Aktuatorik, ein System zur Objekterkennung mit geeigneter Sensorik, sowie ein Positioniersystem, welches wiederum eine Aktuatorik umfasst. Zudem beinhaltet die Hardware ein zentrales Steuerelement. Das Steuerelement kann entweder intern oder extern realisiert werden. Die Software bietet eine Schnittstelle zum/zur Nutzer:in sowie die Hardwareanbindung und die notwendige Bildverarbeitung.

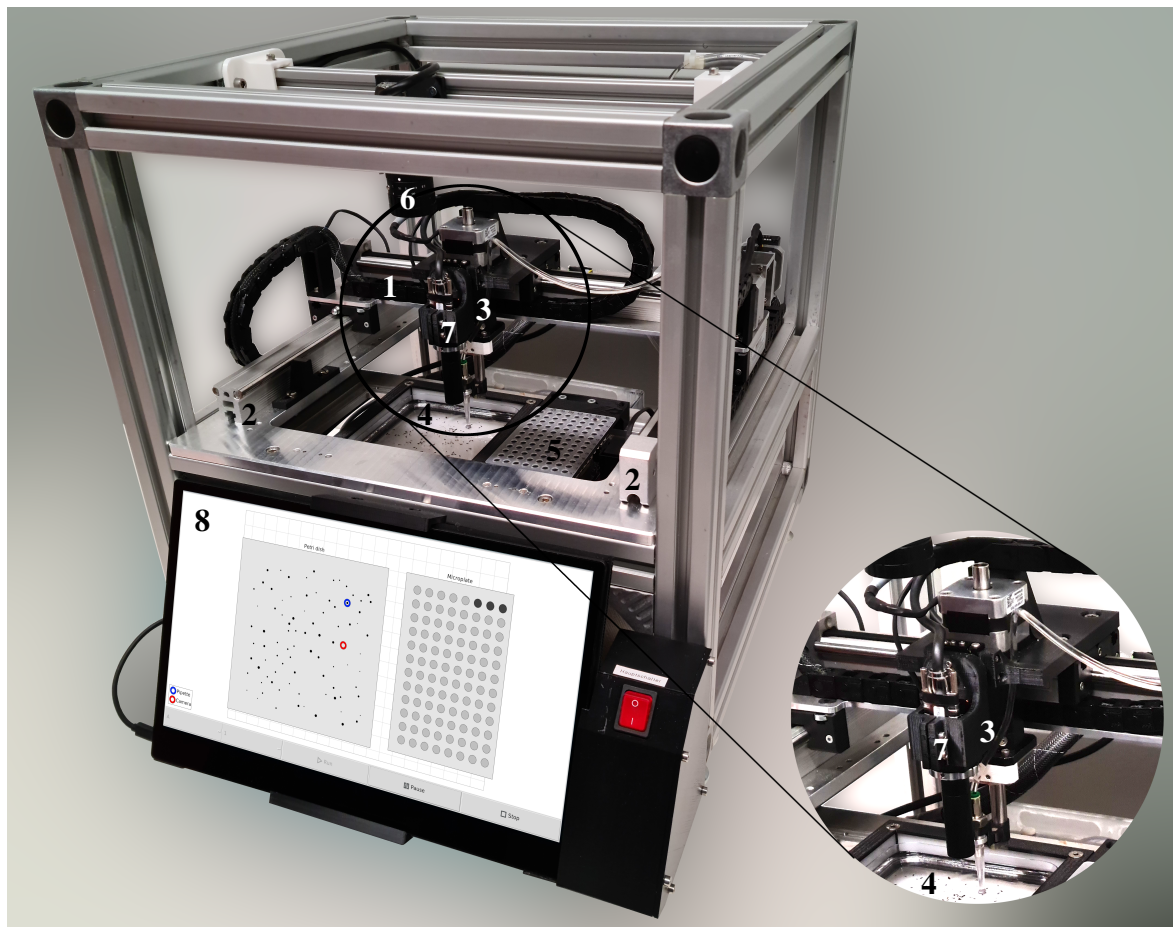
digen Teilsysteme sind in Software und Hardware unterteilt und ergänzen die Teilsysteme für ein System zur teilautomatisierten Bildgebung, um ein Handhabungssystem bestehend aus Handhabungswerkzeug und Aktor, sowie einem Positioniersystem für die Kamera und das Handhabungswerkzeug. Weiterhin wird eine Objekterkennung benötigt, die über eine geeignete Sensorik verfügen muss, um die Proben, welche laut Anforderungen auf einer Ebene ausgebreitet werden, erkennen zu können. Bezüglich der Bildgebung wird das *Focus Stacking* optional. Da nur eine Größenklasse ( $< 3 \text{ mm}$ ) abgebildet werden soll, kann auf *Focus Stacking* verzichtet werden, wenn die Optik so ausgelegt ist, dass die Schärfentiefe ausreicht, um alle Objekte in allen Bereichen scharf abbilden zu können. Auch im automatisierten System, kann das zentrale Steuerelement wieder entweder extern oder intern ausgelegt werden. Aufgrund der Gesamtgröße des Systems, bietet es sich an, ein internes Steuerelement zu wählen, um den notwendigen Platzbedarf am Aufstellungsort zu reduzieren und ein von weiterer Hardware unabhängiges System zu realisieren.

Aufgrund des komplizierteren Systems gestaltet sich die Entwicklung für den einfachen Nachbau herausfordernder im Vergleich zu den teilautomatisierten Systemen. Weiterhin wird ein Augenmerk darauf gelegt, aufwendige und dabei teure Fertigungsmethoden wie Fräsen und Drehen zu vermeiden. Die Verwendung von Standardkomponenten oder *Fused Deposition Modeling* (FDM) 3D-gedruckten Bauteilen ist immer anzustreben. Das System zur automatisierten Bildgebung und Handhabung von Insekten wird 'DiversityScanner' genannt. Die Bezeichnung unterstreicht dabei das Potenzial, das ein solches System zur Untersuchung der Biodiversität unter Insekten bietet.

## 7.3 Aufbau des DiversityScanners

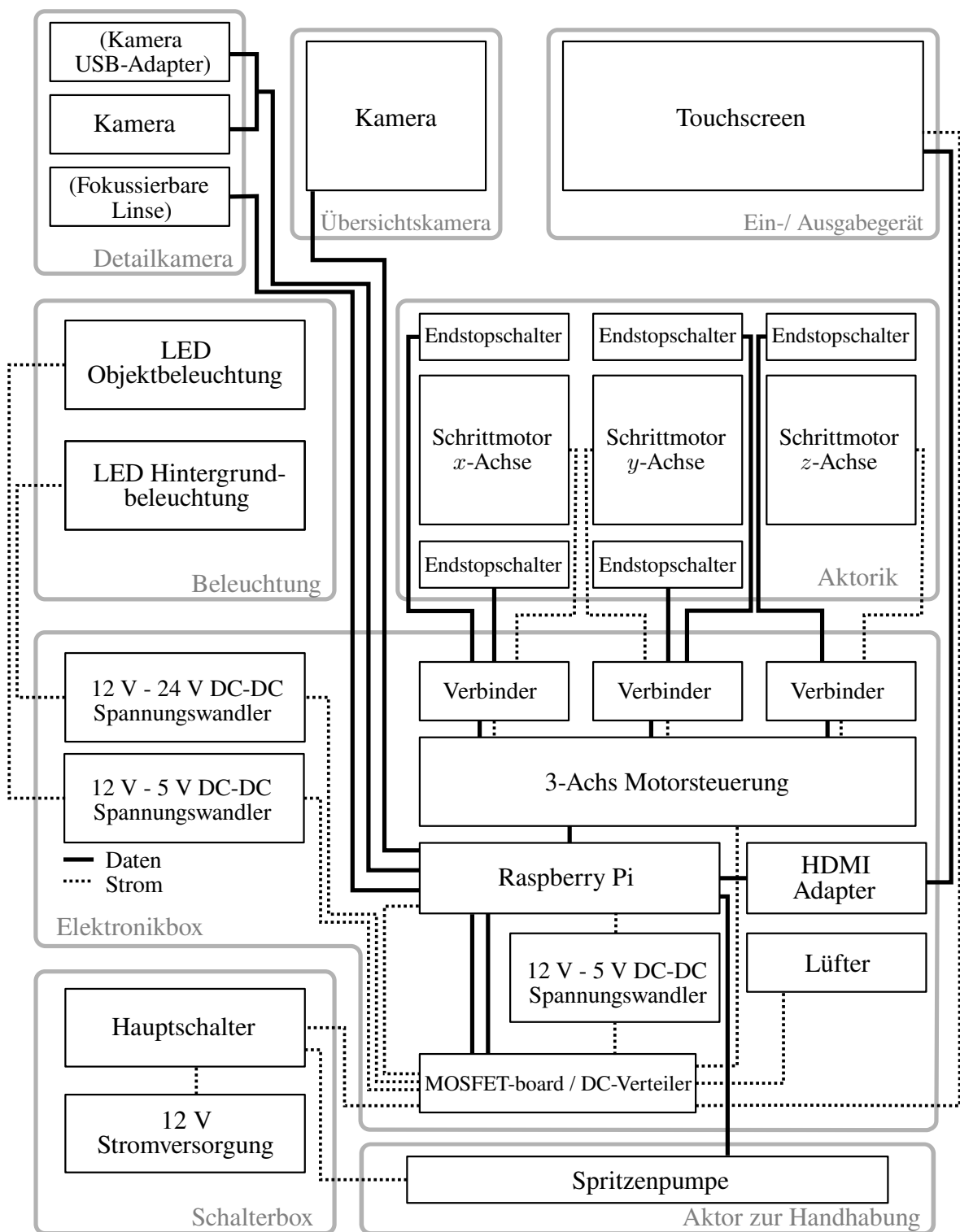
Das System soll die in Tabelle 7.1 zusammengefassten und im Anhang A.4 detailliert dargelegten Anforderungen erfüllen. In Abbildung 7.2 ist der DiversityScanner dargestellt. Im Folgenden wird die Implementierung der Teilsysteme erläutert.

Wie in Kapitel 7.2 beschrieben, wird für das Steuerelement eine interne Lösung gewählt. Dabei fällt die Wahl auf einen Raspberry Pi 4 B mit 4 GB Arbeitsspeicher. Dieser wird gewählt, da die weltweite Verfügbarkeit sowie eine große Community die Softwareentwicklung und Anbindung der Hardware erleichtern und für mögliche Endanwender:innen so die Möglichkeit besteht einfach und unkompliziert Unterstützung zu erhalten. Weiterhin bietet er mit vier USB-Buchsen, integriertem WLAN und einer LAN-Buchse sowie zwei HDMI-Buchsen ausreichend Schnittstellen, um alle notwendigen Komponenten damit zu verbinden. Zusätzlich bieten 40 *General Purpose In- and Outputs* (GPIOs) die Möglichkeit weitere Hardware, beispielsweise über *Serial Peripheral Interface* (SPI) oder *Inter-Integrated Circuit* (i<sup>2</sup>c) zu verbinden oder einfache Steuerfunktionen, wie das Schalten von LEDs zu realisieren. Abbildung 7.3 zeigt alle elektronischen Komponenten des Systems.



**Abbildung 7.2:** DiversityScanner mit  $x$ -Achse (1),  $y$ -Achse (2),  $z$ -Achse (3), Petrischale (4), 96er PCR-Mikrotiterplatte (5), Übersichtsamera (6), Detailkamera (7) und Touchscreen (8). Modifiziert nach [49].

Der DiversityScanner verwendet den von Pfriem (2016) [132] am Institut für Automation und angewandte Informatik (IAI) entwickelten Grundroboter. Dieser wurde konzipiert, um verschiedene Funktionsroboter im Rahmen der Hochdurchsatzuntersuchung von Zebrafischeiern und -embryonen zu realisieren. Für den DiversityScanner werden die mechanischen Komponenten übernommen, während sämtliche elektronische Komponenten durch zeitgemäße Varianten ersetzt werden. Das Design umfasst einen Hauptrahmen mit äußeren Abmessungen von 500 mm x 500 mm x 500 mm, in den alle Teilsysteme integriert werden. Zusätzlich wird der Grundroboter noch um Standfüße ergänzt, um eine waagrechte Ausrichtung des Systems zu erleichtern. Der Hauptrahmen besteht aus 40 mm x 40 mm Aluminium Strebenprofilen (Bosch Rexroth AG, Lohr am Main, Deutschland), die an den Ecken mit Würfelverbindern verbunden sind. Die Kinematik entspricht einem Portalroboter. Für die  $y$ -Achse werden zwei parallele, kugelumlaufgeführte Achsen vom Typ LEZ1 (Isel AG, Eichenzell, Deutschland) verwendet. Dabei findet eine passive sowie eine aktive Achse Verwendung. Der Antrieb der aktiven Achse erfolgt über einen NEMA 17 Schrittmotor (Joy-It, SIMAC Electronics GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland). Zur Verbindung beider Linearführungen wird ein aus Aluminium gefertigter Steg auf beide Schlitten der Führungen der  $y$ -Achse

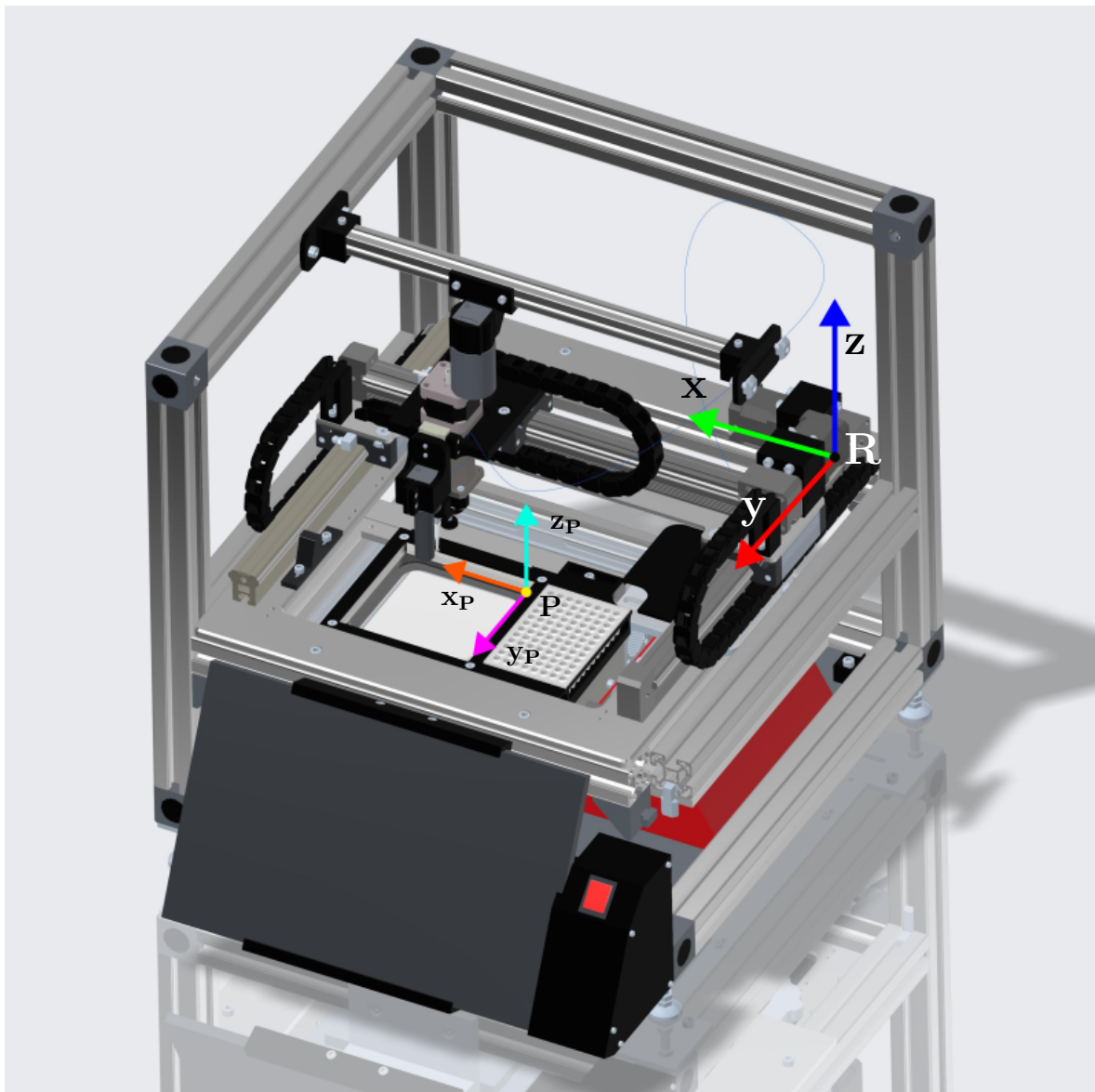


**Abbildung 7.3:** Schematischer Aufbau aller elektronischen Komponenten des DiversityScanners. Er umfasst acht Funktionseinheiten, die Elektronikbox mit zentralem Steuerelement, steht in Verbindung mit den weiteren Funktionseinheiten, namentlich: Aktorik, Aktor zur Handhabung, Schalterbox, Ein-/ Ausgabegerät, Detailkamera, Übersichtskamera sowie Beleuchtung.

geschraubt. Darin befinden sich Bohrungen zur Montage der  $x$ -Achse (Typ LEZ1, aktiv, mit NEMA 17 Schrittmotor), welche auf diesen Steg montiert wird. Das Portal wird auf

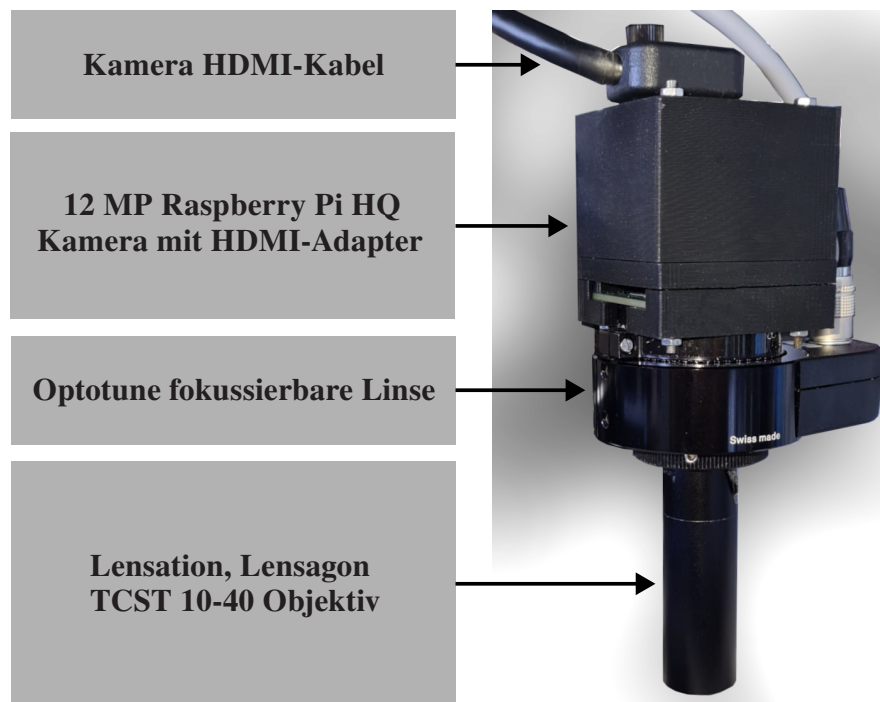
einer Aluminium-Grundplatte verschraubt, die im unteren Drittel des Hauptrahmens an quer verlaufenden Aluminium Strebenprofilen befestigt ist. Der so realisierte Portalroboter dient der Positionierung einer Kamera (zur Bildgebung der Proben) und dem Handhabungssystem mit  $z$ -Achse in der  $x$ - $y$ -Ebene. Das Roboter-Koordinatensystem wird durch den Ursprung  $R$  und die drei Richtungsvektoren  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$ ,  $\vec{z}$  beschrieben, wobei  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$ ,  $\vec{z}$  die Basisvektoren des rechtshändigen kartesischen Koordinatensystems bilden. Das Roboter-Koordinatensystem ist in Abbildung 7.4 dargestellt. Zur Steuerung der Schrittmotoren wird ein Schrittmotortreiber für drei Achsen vom Typ TMCM-3110 (TRINAMIC Motion Control GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) verwendet. Dieser ist mit den Motoren und den zugehörigen Endstoppschaltern zur Referenzierung verbunden und über *Universal Serial Bus* (USB) am Raspberry Pi angeschlossen.

Das Teilsystem zur Bildgebung umfasst zunächst eine geeignete Beleuchtung der Proben. Im DiversityScanner wird das gleiche Prinzip wie bei den Entomoscoptes angewendet. Außerhalb der Petrischale wird eine rechteckige Beleuchtung angebracht, welche über die Seiten die Proben beleuchtet. Um eine diffuse Beleuchtung sicherzustellen, befinden sich vor den LED-Streifen Diffusorplatten aus 3 mm starkem Polycarbonat mit einer Lichtdurchlässigkeit von 50 %. Die notwendige Lichtintensität zur Beleuchtung der größeren, rechteckigen Petrischale mit einer Kantenlänge von 120 mm übersteigt die, die für die runden 60 mm Petrischalen im Entomoscope notwendig ist. Aus diesem Grund werden 24 V LED-Streifen mit einer höheren Lichtintensität verwendet. Da der DiversityScanner für eine bestimmte Probengröße ( $< 3$  mm) entwickelt wird, kann auf ein *Focus Stacking* verzichtet werden, wenn die Schärfentiefe des Kamerasystems ausreichend ist. Im Folgenden wird die Kamera, welche zur Aufnahme der Bilder der Insekten genutzt wird, 'Detailkamera' genannt. Vorteile eines Systems ohne *Focus Stacking* sind: der Verzicht auf notwendige mechanische bzw. optische Komponenten zur Verschiebung der Fokusebene (FE), sowie die entfallende Verarbeitung der Bilder. Zusätzlich reduziert sich die Zeit zur Aufnahme der Bilder und der notwendige Speicherplatz, kann durch die reduzierte Anzahl an Aufnahmen verringert werden. Nichtsdestotrotz, bietet auch ein System mit *Focus Stacking* Vorteile. Dabei ist zu nennen, dass kleinere Sensoren genutzt werden können, die eine höhere Ortsauflösung bieten, weiterhin ist das System besser anpassbar, da der Bereich der Schärfentiefe größer gewählt werden kann. Aus diesem Grund werden zwei Versionen entwickelt, der DiversityScanner 4K mit 12,3 MP Detailkamera (Raspberry Pi HQ-Kamera, Raspberry Pi Ltd., Cambridge, UK) und *Focus Stacking* (vgl. Abbildung 7.5) [137], sowie der DiversityScanner mit 1,3 MP Detailkamera (Ximea MQ013CG-E2, Ximea GmbH, Münster, Deutschland) [49] und ohne *Focus Stacking* (vgl. Abbildung 7.6). Beide nutzen das gleiche Objektiv, welches auch schon im DiversityScanner-360° Verwendung findet, ein telezentrisches Objektiv mit Objektstand von 40 mm und einer Vergrößerung von eins (TCST 10-40, Lensation GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Montage der Kamera erfolgt auf dem bewegten Schlitten der  $x$ -Achse. Die Detailkamera kann somit in der  $x$ - $y$ -Ebene verfahren werden. Zur Feinjustierung in  $z$ -Richtung wird sie



**Abbildung 7.4:** Koordinatensysteme des DiversityScanners mit dem Roboter-Koordinatensystem mit Ursprung  $R$  und Basisvektoren  $\vec{x}$ ,  $\vec{y}$ ,  $\vec{z}$  sowie das Petrischalen-Koordinatensystem mit Ursprung  $P$  und Basisvektoren  $\vec{x}_P$ ,  $\vec{y}_P$ ,  $\vec{z}_P$ .

auf einen manuellen Verschiebetisch (7T128, Standa, Vilnius, Litauen) montiert, womit der Fokus justiert werden kann (vgl. Abbildung 7.6 (c)). Die für den DiversityScanner ohne *Focus Stacking* relativ gering gewählte Auflösung der Detailkamera (Ximea MQ013CG-E2, Ximea GmbH, Münster, Deutschland) von 1,3 MP ist auf zwei wesentliche Faktoren zurückzuführen. Der als internes, zentrales Steuerelement gewählte Raspberry Pi 4 B ist in seiner Leistung beschränkt. Bilder mit geringerer Auflösung können schneller verarbeitet werden. Zudem ist die Auflösung für die Klassifikation mittels künstlicher Intelligenz völlig ausreichend. Die Auflösung muss zur Klassifizierung mit *Convolutional Neural Networks* (CNNs) noch weiter reduziert werden (vgl. Kapitel 9). Morphologische Untersuchungen anhand dieser Bilder können aufgrund der geringen Auflösung jedoch erschwert werden. Aus diesem



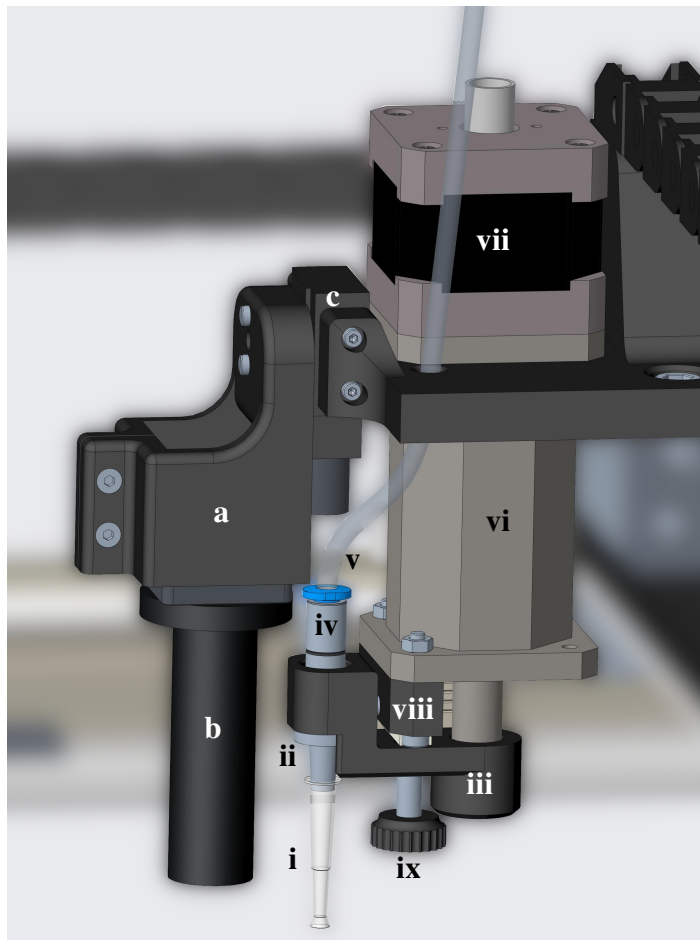
**Abbildung 7.5:** Kameraaufbau des DiversityScanner-4K. Die Raspberry Pi HQ Kamera wird zusammen mit einem HDMI-Adapter in einem 3D-gedruckten Gehäuse montiert. Die fokussierbare Linse wird direkt auf den C-Mount der Kamera geschraubt. Das Objektiv wird dann auf die fokussierbare Linse geschraubt. Dieser Aufbau erlaubt die Aufnahme von mehreren FE ohne das mechanische Verfahren der Kamera. Modifiziert nach [137].

Grund wird im DiversityScanner 4K dieselbe Kamera verbaut, wie in den Entomoscopes und dem DiversityScanner-360°. Die Raspberry Pi HQ Kamera macht aufgrund der geringen Sensorgröße jedoch einen *Focus Stacking* Mechanismus notwendig. Hierfür wird im DiversityScanner 4K ein anderer Ansatz gewählt als bei den teilautomatisierten Systemen. Anstatt die FE durch Verschieben der Kamera anzupassen, wird eine elektrisch fokussierbare Linse (EFL) (C-mount - EL-16-40-TC-VIS-5D-C, Optotune Switzerland AG, Dietikon, Schweiz) verwendet. Die Verwendung der EFL im DiversityScanner 4K bietet gegenüber einer mechanischen Verstellung einige Vorteile. Zunächst ist hierbei die Implementierung in das Gesamtsystem zu nennen. Die Verwendung einer EFL erlaubt es die Schnittstelle zwischen Kamera und Gesamtsystem so zu gestalten, dass beide verwendbaren Kameras einfach montiert werden können, dies ist auch auf die Kompaktheit der EFL zurückzuführen. Der Verzicht auf eine Linearführung und einen Schrittmotor, reduziert zudem die bewegte Masse und macht eine zusätzliche Motoransteuerung überflüssig. Weiterhin kann mit einer EFL die FE sehr schnell (ca. 5 ms) angepasst werden.

Weiterhin muss ein geeignetes Handhabungssystem gefunden werden. Die Limitierung der Größe der Insekten auf maximal 3 mm erleichtert diese Aufgabe. Die für gewöhnlich bei der manuellen Handhabung genutzte Pipettierung der Proben bietet sich ebenfalls für die Automatisierung an. Dabei ist sichergestellt, dass die Insekten durchgehend im Ethanol

verbleiben und ein Austrocknen verhindert wird. Die Handhabung kann, wie bei der Untergliederung in Teilsysteme (vgl. Abbildung 7.1) dargestellt, in das Handhabungswerkzeug, bei diesem Anwendungsfall die Saugspitze, sowie einer Aktuatorik unterteilt werden. Als Saugspitze verwendet der DiversityScanner eine gekürzte Pipettenspitze (vgl. Abbildung 7.6 (i)), welche auf eine aus Aluminium gedrehte Aufnahme (ii) gesteckt wird. Diese wird in einen 3D-gedruckten Halter (iii) geschraubt und mit einem Schlauchanschluss (iv) versehen, in den der Saugschlauch (v) gesteckt wird. Die Aktuatorik des Handhabungssystems setzt sich aus einem Aktor zur vertikalen Bewegung ( $z$ -Richtung) des Handhabungswerkzeugs, einem Aktor zum Ansaugen und Abgeben der Flüssigkeit, sowie dem bereits beschriebenen Positioniersystem in  $x$ - und  $y$ -Richtung zusammen. Zur vertikalen Bewegung ( $z$ -Richtung) wird ein spindelgetriebener Linearaktor ((vi), L4118S1404-T5x5-A50, Nanotec Electronic GmbH & Co. KG, Feldkirchen, Deutschland) mit einem Hub von 50 mm und einer Auflösung von  $25\text{ }\mu\text{m}$  pro Vollschrift des bei diesem Linearaktor verwendeten NEMA 17 Schrittmotors (vii) verwendet. Dieser bildet die  $z$ -Achse des DiversityScanners und wird mithilfe eines Endstopschalters (viii) am höchsten Punkt referenziert. Der Referenzpunkt kann durch Einschrauben der Anschlagsschraube (ix) verschoben werden. Zum Ansaugen und Abgeben der Flüssigkeit und somit zum Aufnehmen und Abgeben der Insekten wird eine Spritzenpumpe (LA100, Landgraf Laborsysteme HLL GmbH, Langenhagen, Deutschland) verwendet. Darin werden 50 ml Luer-Spritzen (BD Plastipak Luer-Spritze, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Der bei Spritzen geläufige *Luer-Lock* ermöglicht ein einfaches Anschließen des Saugschlauchs, welcher über einen Festo-Adapter, mit der Aluminiumaufnahme zur Befestigung der Pipettenspitze verbunden ist und so die Spritze mit der Saugspitze verbindet.

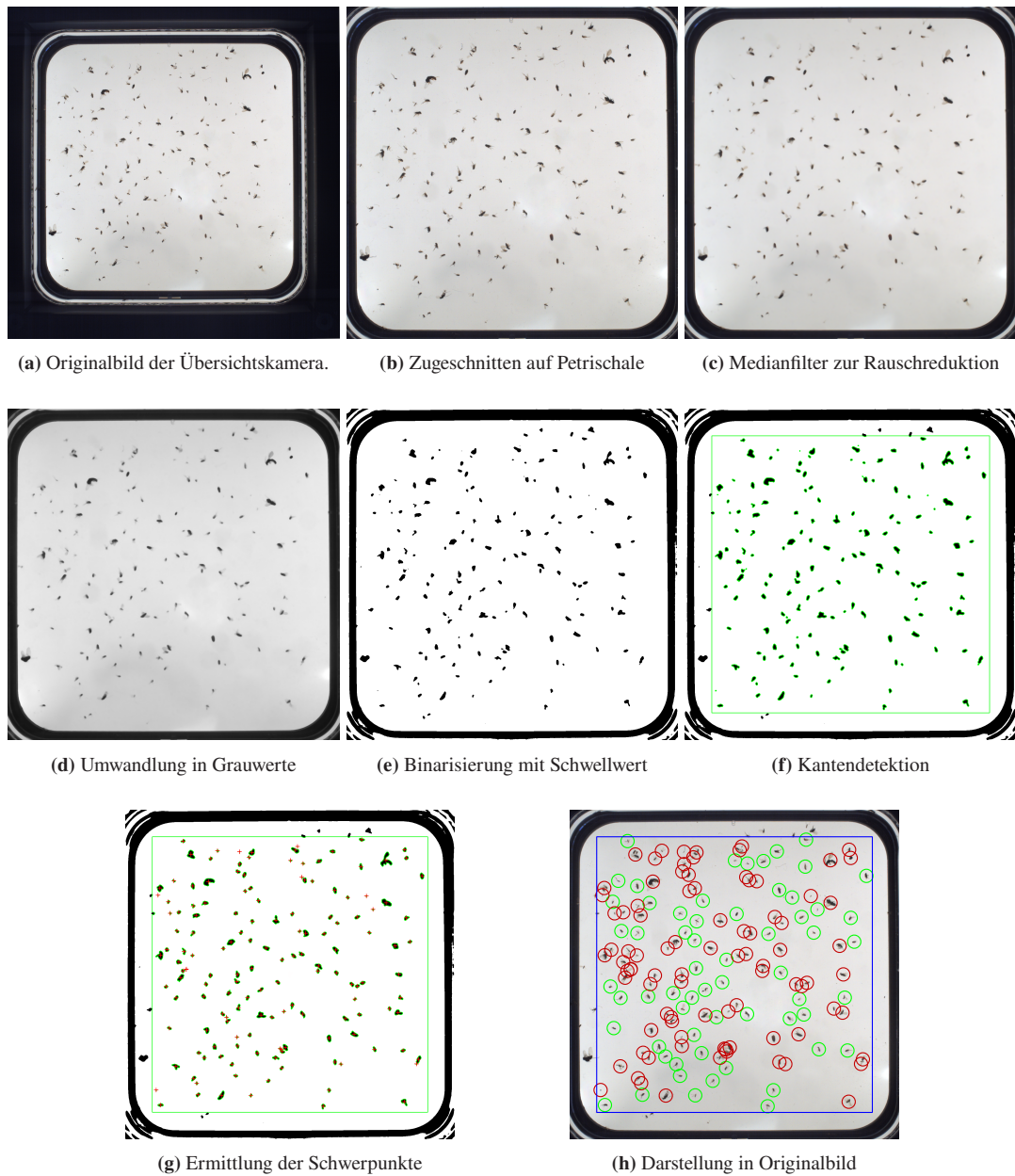
Zuletzt muss die notwendige Hardware zur Objekterkennung implementiert werden. Wie in den Anforderungen beschrieben, sollen die Proben zur Untersuchung auf einer Ebene ausgebreitet werden. Hierzu wird eine 120 mm x 120 mm große, quadratische Petrischale gewählt, in welche die Insekten gegeben werden und von Ethanol bedeckt sind. Ziel der Objekterkennung ist die Bestimmung der Position der Objekte in der Petrischale und die Kategorisierung in *sortierbar* oder *nicht sortierbar*. Die Beschreibung der Position der Insekten in der Petrischale erfolgt im rechtshändigen kartesischen Petrischalen-Koordinatensystem mit dem Ursprung  $P$ , wiederum in der hinteren rechten Ecke der Petrischale (von vorne auf den DiversityScanner blickend) und den Basisvektoren  $\vec{x}_P, \vec{y}_P, \vec{z}_P$  (vgl. Abbildung 7.4). Das Petrischalen-Koordinatensystem befindet sich relativ zum Roboterkoordinatensystem immer an derselben Stelle und kann durch eine konstante lineare Verschiebung entlang von  $\vec{x}, \vec{y}, \vec{z}$  im Roboter-Koordinatensystem beschrieben werden. Zu Objekterkennung muss eine geeignete Sensorik gefunden werden. Auch für diesen Anwendungsfall bietet sich die Verwendung von Kameras an. Im Bild, kann die Position der Proben anhand von digitaler Bildverarbeitung ermittelt werden. Aus diesem Grund wird eine Kamera (MQ042CG-CM, Ximea GmbH, Münster, Deutschland) mit Objektiv (CK12M1628S11 Lensation GmbH,



**Abbildung 7.6:** Detailkamera und Handhabungssystem des DiversityScanners. Mit Detailkamera (a), Objektiv (b) und Lineartisch (c), sowie gekürzter Pipettenspitze (i), Aluminiumaufnahme (ii), 3D-gedruckter Aufnahme (iii), Schlauchanschluss (iv), Saugschlauch (v), Spindeltrieb (vi) mit Schrittmotor (v), Endstoppschalter (vii) und Referenzverstellung (ix).

Karlsruhe, Deutschland) welches eine Brennweite von 16 mm hat, direkt über der Petrischale platziert. Die im Folgenden 'Übersichtskamera' genannte Kamera, liefert die Bilder zur Objekterkennung in der Petrischale. Zur Maximierung des Kontrasts, wird zusätzlich eine Hintergrundbeleuchtung mit einem LED-Panel (27640-HE LED Panel, LDBS Lichtdienst GmbH, Falkensee, Deutschland) realisiert, welches während der Aufnahme von Bildern mit der Übersichtskamera eingeschaltet wird. Ein exemplarisches, unverarbeitetes Übersichtsbild, kann Abbildung 7.7a entnommen werden.

Die Erkennung der Objekte im Bild und somit die Position in der Petrischale erfolgt anschließend softwareseitig anhand der Bilder. Dazu wird der in Abbildung 7.7 visualisierte Prozess genutzt. Vorausgesetzt ist, dass das Verhältnis zwischen Pixel und Distanz im Bild bekannt ist. Dieser Wert kann jedoch einfach ermittelt werden, da die inneren Abmessungen der Petrischale mit 119 mm x 119 mm bekannt sind. Die Objekterkennung basiert auf Verfahren der klassischen Bildverarbeitung. Zunächst wird das Originalbild (vgl. Abbildung 7.7a) auf die Petrischale zugeschnitten (b). Anschließend reduziert ein Medianfilter das Rauschen im



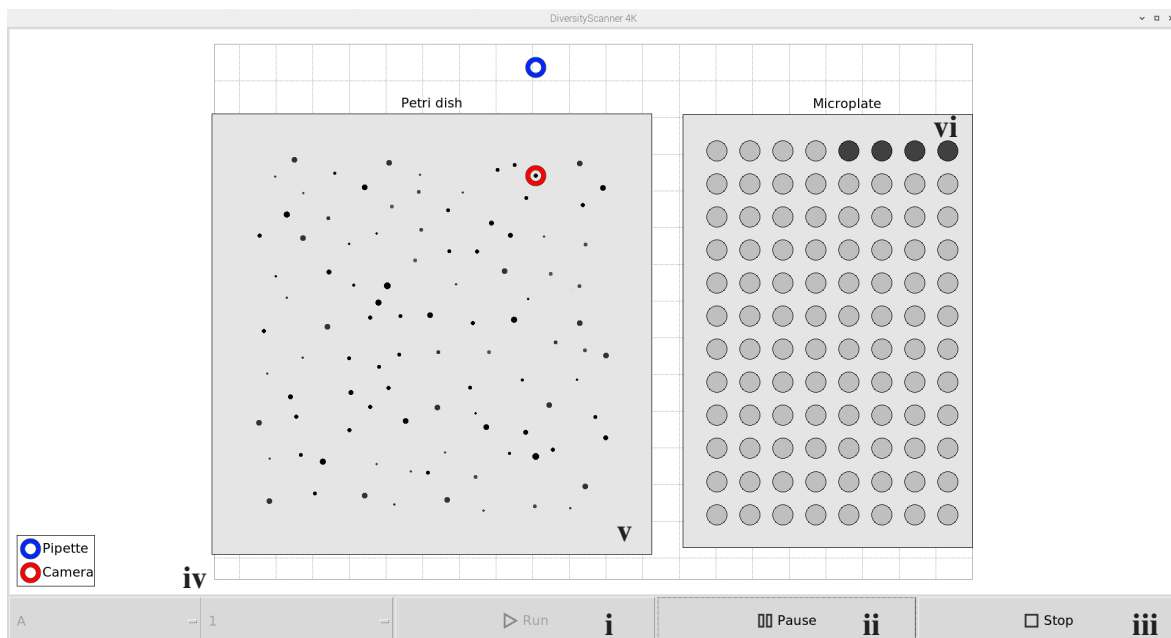
**Abbildung 7.7:** Zur Objekterkennung genutzte Schritte, um Insekten in der Petrischale zu lokalisieren. In (a)-(g) sind die Verarbeitungsschritte dargestellt. Unter (h) ist das dem/der Nutzer:in ausgegebene und gespeicherte Bild dargestellt. Sortierbare Objekte sind grün umrandet, nicht sortierbare rot.

Bild, während die Kanten erhalten bleiben (c). Daraufhin wird das Farbbild in Grauwerte umgewandelt (d) und anschließend anhand eines adaptiven Schwellwerts binarisiert (e). Die Verwendung eines adaptiven Schwellwerts, welche auf den Pixeln der umgebenden Region beruht, erlaubt die Erkennung sowohl hellerer als auch dunklerer Objekte im Bild. Zuletzt werden die Konturen der Objekte bestimmt (f) und somit die Größe der Objekte sowie deren Schwerpunkt im Bild (g). Dieser Schwerpunkt wird als Referenz für die Position genutzt. Anschließend müssen die erkannten Objekte drei Kriterien erfüllen, um als sortierbar kategorisiert zu werden:

1. Die Objekte dürfen die definierte maximale Größe nicht überschreiten. Die maximale sortierbare Länge der Insekten liegt bei 3 mm.
2. Die Objekte müssen innerhalb der *Region of Interest* (ROI) liegen. Für den DiversityScanner wird die ROI als der Bereich in der Petrischale definiert, der mindestens 10 mm vom Rand entfernt ist.
3. Die Objekte müssen einen Mindestabstand voneinander aufweisen, der von dem/der Anwender:in definiert werden kann.

Zuletzt werden sortierbare Insekten im Bild grün markiert, nicht sortierbare rot (i).

Zur Bedienung des DiversityScanners wird eine einfache *Graphical User Interface* (GUI) (vgl. Abbildung 7.8) mithilfe des Python-Pakets *tkinter* implementiert. Diese ermöglicht das

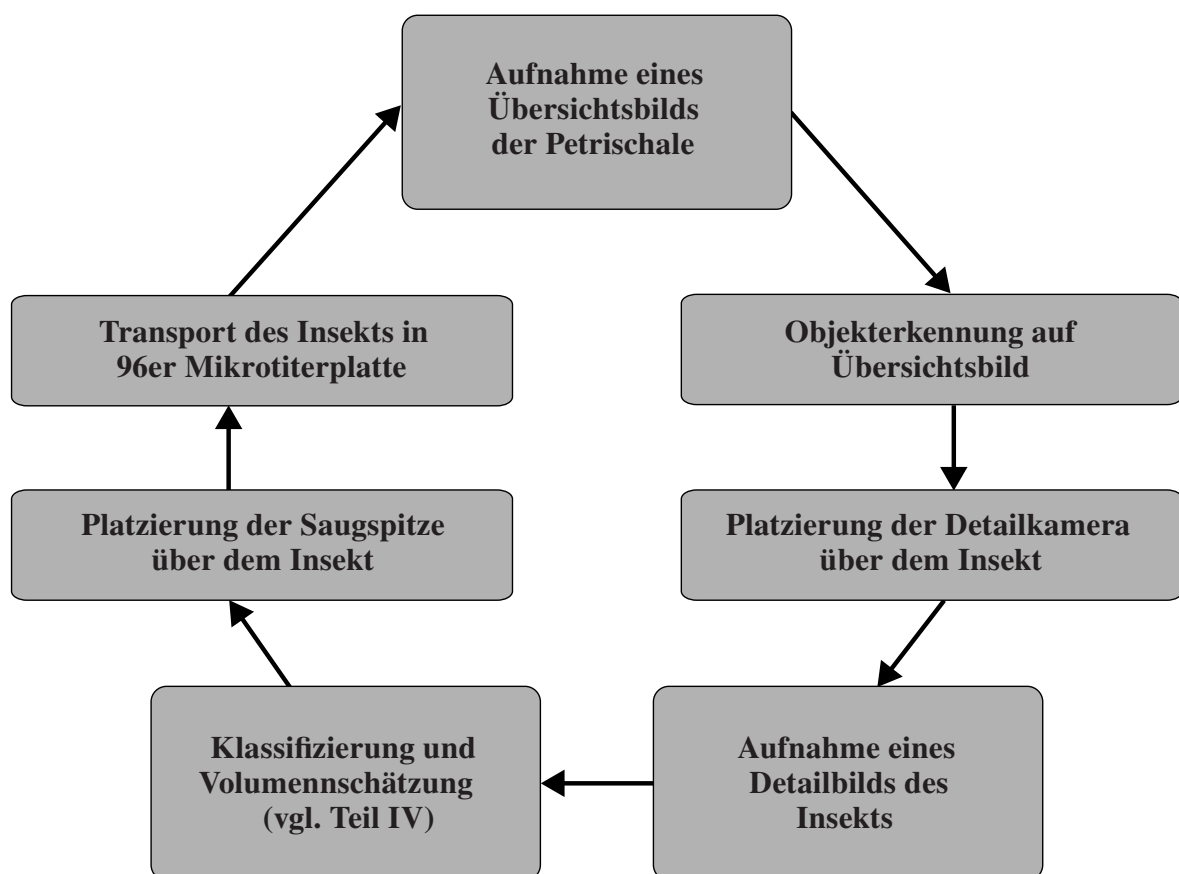


**Abbildung 7.8:** GUI zur Bedienung des DiversityScanners. Mit Start (i), Pause (ii), Stop (iii), Auswahl Well (iv), virtuelle Petrischale mit Objekten (v), virtuelle 96er PCR-Mikrotiterplatte (gefüllte Wells sind schwarz eingefärbt) (vi).

Starten (i), Pausieren (ii) und Stoppen (iii) des Programms. Zudem kann gewählt werden,

ab welchem *Well* die Mikrotiterplatte gefüllt werden soll (iv). Standardmäßig startet die Sortierung in *Well* A1. In der GUI werden permanent die Position der Kamera und der Pipette als roter, respektive blauer Kreis dargestellt. Nach Aufnahme eines Übersichtsbilds und abgeschlossener Objekterkennung, werden die Objekte in der GUI als Punkte in der Petrischale (v) dargestellt. Sobald die Probe aus der Petrischale entfernt und in ein *Well* der 96er PCR-Mikrotiterplatte gelegt wird, verschwindet der Punkt in der Petrischale und das gefüllte *Well* wird schwarz hinterlegt (vi). So kann der Prozessfortschritt kontinuierlich anhand der Anzahl gefüllter *Wells* überwacht werden. Die Angabe aller durch den/die Nutzer:in veränderbaren Werte erfolgt mithilfe einer Konfigurationsdatei. Dort kann bspw. gewählt werden, welches Kamerasystem, 1,3 MP ohne *Focus Stacking* oder 12,3 MP mit *Focus Stacking*, verbaut ist, wie viele FE bei letzterem aufgenommen werden sollen und wie groß der Abstand zwischen den FE sein soll. Zudem lässt sich das System dort kalibrieren, indem *Offsets* definiert werden können.

Durch Starten des Programms, indem auf *Run* geklickt wird, wird zuerst die *z*-Achse mit einem und anschließend die *x*- und *y*-Achsen jeweils mit zwei Endstopschaltern an jedem Ende referenziert. Anschließend wird mit dem Programmablauf (vgl. Abbildung 7.9) begonnen.



**Abbildung 7.9:** Programmablauf des DiversityScanners zur automatisierten Untersuchung von Insekten-Massenproben. Alle erfassten Daten werden auf dem Raspberry Pi gespeichert. Modifiziert nach [49].

Dieser wird so lange fortgesetzt, bis entweder keine sortierbaren Objekte in der Petrischale mehr vorliegen oder die 96er PCR-Mikrotiterplatte gefüllt ist. Zur automatisierten Bildgebung und Sortierung wird zunächst ein Übersichtsbild aufgenommen, anhand dessen die Positionen der sortierbaren Proben in der Petrischale bestimmt werden. Aus dieser Liste wird ein zufälliges Objekt gewählt. Die Detailkamera wird anschließend über diesem Objekt platziert und je nach Kamerasystem wird entweder ein Detailbild oder eine Serie an Bildern mit verschiedenen FE aufgenommen. Diese Detailbilder können anschließend verarbeitet werden, um die Insekten mittels maschinellem Lernen zu klassifizieren (vgl. Kapitel 9) oder/und bspw. das Volumen des Objekts zu schätzen (vgl. Kapitel 10). Anschließend wird die Saugspitze über die fotografierte und ggf. klassifizierte und vermessene Probe bewegt und diese mithilfe der Spritzenpumpe eingesaugt. Zuletzt wird die Saugspitze über das nächste freie *Well* der 96er PCR-Mikrotiterplatte bewegt und das Objekt, durch Abgabe von Ethanol mithilfe der Spritzenpumpe darin abgelegt. Anschließend startet der Programmablauf erneut mit Aufnahme eines Übersichtsbilds.

## 7.4 Evaluierung des DiversityScanners

Zur Evaluierung des DiversityScanners, werden die definierten Anforderungen (vgl. Tabelle 7.1 und Anhang A.4) genutzt. Zur Evaluierung des Handhabungsprozesses, werden Versuche durchgeführt, deren Methodik im Folgenden erläutert wird. Daraufhin werden die Ergebnisse dargelegt.

### 7.4.1 Methodik zur Evaluierung des Handhabungsprozesses

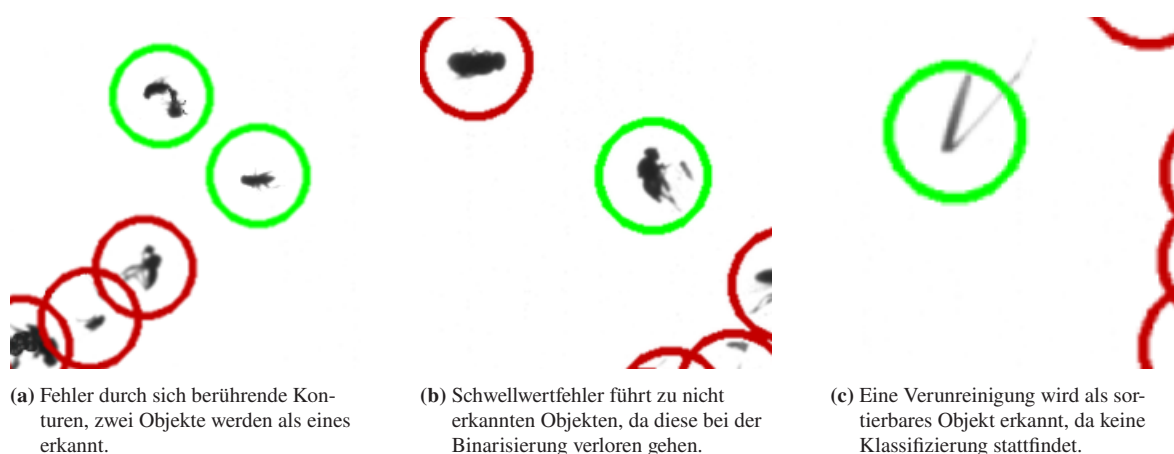
Zur Evaluierung des Handhabungsprozesses werden Versuche durchgeführt, um die Zuverlässigkeit des implementierten Handhabungssystems zu prüfen. Dazu werden zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten mit dem DiversityScanner gefüllt und die Anzahl erfolgreicher Handhabungen gezählt. Für die Versuche wird der DiversityScanner für den Betrieb vorbereitet. Dazu wird zunächst die Spritze mit ca. 25 ml und die Petrischale mit ca. 80 ml Ethanol (80 %) gefüllt. Anschließend werden ca. 120 Insekten  $\leq 3,5$  mm in die Petrischale gegeben und der Sortierprozess gestartet. Für die Auswertung wird die 96er PCR-Mikrotiterplatte ausgewertet, wobei drei mögliche Zustände zu erwarten sind:

1. Der Handhabungsprozess war erfolgreich, das *Well* ist mit genau einem Insekt gefüllt.
2. Der Handhabungsprozess war nicht erfolgreich, das *Well* ist leer (F1).
3. Der Handhabungsprozess war nicht erfolgreich, das *Well* ist mit mehr als einem Insekt gefüllt (F2).

## 7.4.2 Ergebnisse der Evaluierung

Anhand der definierten Anforderungen und der Versuchsergebnisse wird im Folgenden der DiversityScanner evaluiert. Beginnend mit der Reproduzierbarkeit zeigt sich, dass aufgrund der steigenden Kompliziertheit des Systems, im Vergleich zu den teilautomatisierten Systemen, ein größeres technisches Verständnis beim Aufbau vorausgesetzt werden muss. Zudem nutzt der von Pfriem (2016) [132] entwickelte Grundroboter gefräste Aluminiumteile zur Implementierung der Portalkinematik, einerseits zur Verbindung der aktiven und passiven  $y$ -Achsen mit dem Hauptrahmen als auch zur Verbindung dieser Achsen untereinander und zur Montage der  $x$ -Achse. Weiterhin wird für die Montage der Pipettenspitze am Handhabungswerkzeug ein Drehteil, ebenfalls aus Aluminium, verwendet. Die Verwendung dieser spanend gefertigten Teile erschwert die Reproduktion. Die Zielvorgabe der Größe erfüllt das System nahezu. Der Grundroboter mit 500 mm x 500 mm x 500 mm liegt innerhalb der definierten Größe. Durch Anbringen der Verkleidung und die verwendeten Ausgleichsfüße, wird das System minimal größer und misst ca. 510 mm x 510 mm x 580 mm (t x b x h), wobei die Höhe durch Einschrauben oder Herausdrehen der Ausgleichsfüße in einem Rahmen von ca. 50 mm variabel ist. Die definierte maximale Probengröße von 3 mm für die Proben wird eingehalten. Insekten dieser Größe können durch die Detailkamera sowohl in der Standardversion als auch in der 4K Version des DiversityScanners fotografiert werden. Zudem erlaubt das Handhabungswerkzeug ein Sortieren von Insekten dieser Größenklasse. Die Objekterkennung anhand der Übersichtsbilder stellt zudem sicher, dass keine größeren Insekten zur Aufnahme und Sortierung angefahren werden. Dazu werden sie in einer Petrischale, entsprechend der Anforderung, eben ausgebreitet und von dort aus weiter verarbeitet. Die Unversehrtheit der Proben kann weitestgehend sichergestellt werden. Die Pipettierung ist eine in der Entomologie weit verbreitete Methode zur Handhabung kleiner Insekten. Durch die Automatisierung dieses Prozesses sind demnach keine Kräfte zu erwarten, die zu einer Beschädigung der Probe führen könnten. Weiterhin ist durch diese Handhabungsmethodik sichergestellt, dass die Proben nicht aus dem Ethanol entnommen werden müssen. Die Vereinzelung der Proben erfolgt durch die separate Handhabung einzelner Insekten im Anschluss an die Bildgebung. Das Positioniersystem in Kombination mit dem Handhabungssystem ermöglicht eine Überführung der Proben von der Petrischale in die 96er PCR-Mikrotiterplatte. Die Anforderung an die Vereinzelung hängt demnach direkt mit der Anforderung an den Handhabungsprozess zusammen und damit auch mit der Qualität der Objekterkennung. Die im DiversityScanner mit klassischer Bildverarbeitung realisierte Objekterkennung genügt, um den DiversityScanner zu betreiben. Der Algorithmus ist jedoch nur eingeschränkt übertragbar und kann leicht zu fehlerhaft erkannten Objekten führen, dabei sind drei Fehler besonders hervorzuheben, diese sind in Abbildung 7.10 dargestellt.

In Abbildung 7.10a erkennt der Algorithmus zur Objekterkennung zwei Objekte als eines. Dies passiert, wenn sich zwei Objekte bei der Bildaufnahme berühren und eine geschlossene



**Abbildung 7.10:** Drei beispielhaft auftretende Fehler bei der Objekterkennung mit klassischer Bildverarbeitung im DiversityScanner.

Kontur bilden. Dieser Fehler kann reduziert werden, indem beim Ausbreiten der Insekten in der Petrischale darauf geachtet wird, dass sich keine Objekte berühren. Dieser manuelle Mehraufwand widerspricht jedoch dem Ziel eines automatisierten Systems. Abbildung 7.10b zeigt einen weiteren Fehler, der infolge des verwendeten Algorithmus auftreten kann. Durch die Binarisierung anhand eines dynamischen Schwellwerts kann es vorkommen, dass sehr helle Objekte neben einem sehr dunklen Objekt unter den Schwellwert fallen und somit in den folgenden Prozessschritten nicht mehr beachtet werden. In dem dargestellten Fall wird das große Objekt als sortierbar markiert, obwohl sich ein zweites eigentlich zu nahe daran befindet. Zuletzt ist in Abbildung 7.10c dargestellt, dass ein Objekt, bei dem es sich eindeutig nicht um ein Insekt handelt, als sortierbar erkannt wird. Dies tritt auf, da keine Klassifizierung stattfindet. Körperteile von Insekten, wie in der Abbildung dargestellt, oder Verunreinigungen der Probe können zu Sortierfehlern führen. Dies kann direkten Einfluss auf den Handhabungsprozess haben.

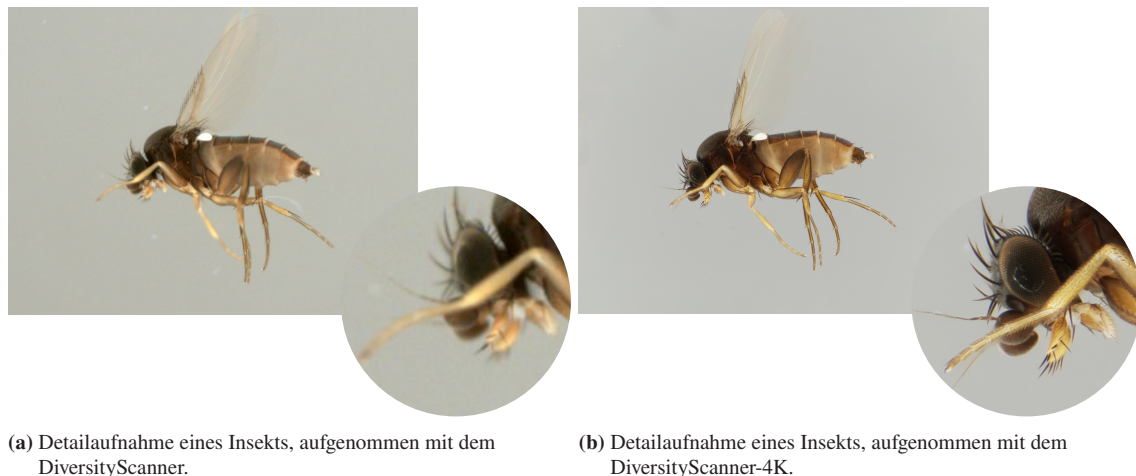
Die Evaluierung des Handhabungsprozesses erfolgt entsprechend der vorgestellten Testmethodik. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 dargestellt. Die Auswertung zeigt, dass die An-

**Tabelle 7.2:** Ergebnisse der Testreihe zum Füllen von zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten zur Evaluation des Handhabungsprozesses im DiversityScanner bei Verwendung einer Pipettenspitze als Saugspitze und LA100 Spritzenpumpe. Prozentsätze auf ganze Prozente gerundet.

	<b>Erfolgreich</b>	<b>Nicht erfolgreich (F1)</b>	<b>Nicht erfolgreich (F2)</b>
Mikrotiterplatte 01	63 (66 %)	23 (22 %)	10 (10 %)
Mikrotiterplatte 02	56 (58 %)	29 (30 %)	11 (12 %)
Mittelwert	59,5 (62 %)	26 (27 %)	10,5 (11 %)

forderung an den Handhabungsprozess mit der verwendeten Spritzenpumpe (LA100) und Saugspitze (gekürzte Pipettenspitze) nicht erfüllt werden kann. Statt der geforderten 90 %

korrekt gehandhabter Objekte, werden lediglich rund 62 % der Insekten korrekt in die 96er PCR-Mikrotiterplatte abgelegt. Insgesamt 27 % der *Wells* bleiben leer. In 11 % der Fälle werden zwei oder mehr Insekten in das *Well* abgelegt. Die Anforderung an die Schärfentiefe der Detailbilder muss für den DiversityScanner und den DiversityScanner 4K separat betrachtet werden. Eine Detailaufnahme eines Insekts mit vergrößertem Bereich ist in Abbildung 7.11 für den DiversityScanner (a) und den DiversityScanner-4K (b) dargestellt. Wie in

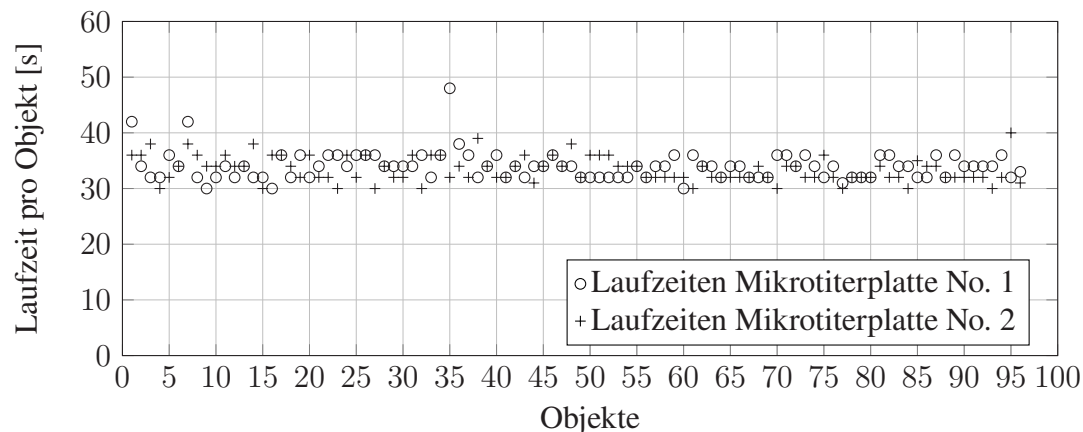


**Abbildung 7.11:** Detailaufnahme aufgenommen mit dem DiversityScanner (a) und dem DiversityScanner-4K (b) mit jeweils vergrößertem Ausschnitt aus dem Bild. Modifiziert nach [137].

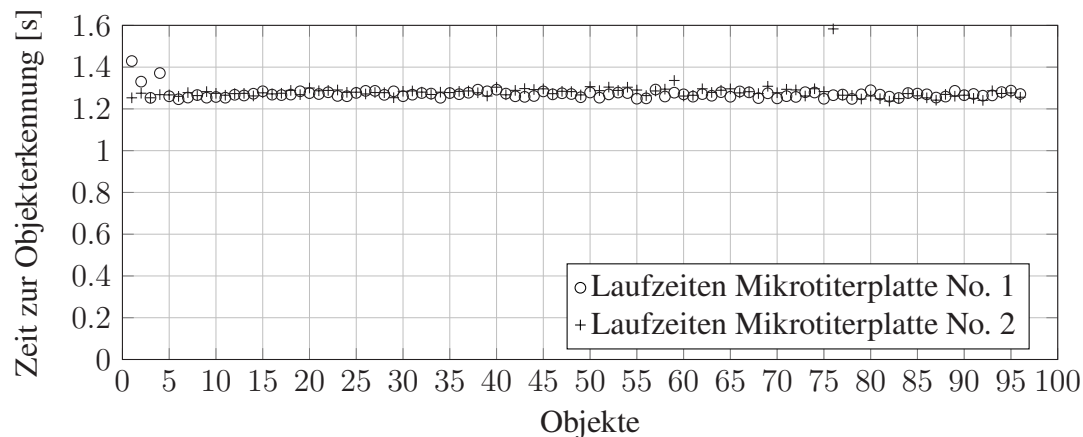
Abbildung 7.11a ersichtlich, wird ein Großteil des Insekts ausreichend scharf abgebildet. Die theoretische Schärfentiefe des optischen Systems liegt ca. bei dem vom Objektivhersteller angegebenen Wert von  $740\ \mu\text{m}$  bei einem *Circle of Confusion* (CoC) von  $40\ \mu\text{m}$ . Das ist für Insekten mit einer maximalen Größe von 3 mm im Normalfall ausreichend. Bei abstehenden Beinen oder Flügeln, kann es aber vorkommen, dass diese nicht ausreichend scharf abgebildet werden. Zudem zeigt sich, dass aufgrund der Auflösung von 1,3 MP, beim Vergrößern des Bildes schnell nicht mehr ausreicht, um morphologische Merkmale sicher zu erkennen. Die Anforderung an die Schärfentiefe ist demnach nur teilweise erfüllt. Der DiversityScanner-4K hingegen nutzt eine fokussierbare Linse zur Realisierung eines *Focus Stacking* Mechanismus. Die damit erreichbare Schärfentiefe übersteigt die des DiversityScanners um ein Vielfaches und kann Insekten ( $< 3\ \text{mm}$ ) immer in allen Bereichen scharf abbilden. Die höhere Auflösung erlaubt zusätzlich ein Vergrößern des Bildes. Die implementierten Beleuchtungen im DiversityScanner erfüllen die Anforderung. Die Verwendung der seitlichen Beleuchtung zeigt gute Ergebnisse bei der Aufnahme der Detailbilder (vgl. Abbildung 7.11), während die Hintergrundbeleuchtung einen starken Kontrast (vgl. Abbildung 7.7) erzeugt, um die Objekterkennung zu vereinfachen.

Die Verarbeitungszeit der Proben ist abhängig von den aktivierten Funktionen. Hier wird ausschließlich die Zeit zum Sortieren, sowie die notwendige Zeit zur Objekterkennung und Aufnahme der Detailbilder berücksichtigt. Weitere Funktionen, wie das Klassifizieren mit

CNNs oder die Bestimmung morphometrischer Merkmale (vgl. Teil IV) sind nicht enthalten. Abbildung 7.12a zeigt die Zeiten für das Fotografieren und Sortieren von zwei vollständigen 96er PCR-Mikrotiterplatten. Der Mittelwert liegt dabei für die erste Mikrotiterplatte bei 34 s, sowie bei 33 s für die zweite. Darin enthalten sind auch die Zeiten zur Objekterkennung mithilfe des in Kapitel 7.3 vorgestellten Algorithmus. Diese Zeiten sind zusätzlich in Abbildung 7.12b dargestellt. Die Mittelwerte liegen bei 1,3 s für beide Platten. Die Anforderung an die Verarbeitungszeit wird demnach erfüllt.



(a) Laufzeiten [s] pro Objekt zur Prozessierung von zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten, gerundet auf ganze Sekunden. Die Laufzeiten beinhalten die Zeiten zur Aktivierung der Benutzeroberfläche, den Schreibvorgängen auf der SD-Karte, der Bewegungszeit der Achsen, der Laufzeit des Algorithmus zur Objekterkennung sowie den Zeiten für die Laufzeit der Spritzenpumpe.



(b) Laufzeiten [s] des Algorithmus zur Objekterkennung für 192 Übersichtsbilder (zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten).

**Abbildung 7.12:** Evaluierung der Verarbeitungszeit pro Probe mit dem DiversityScanner. (a) Zeit pro Objekt, (b) Zeit zur Verarbeitung eines Übersichtsbilds mit dem Algorithmus zur Objekterkennung. Modifiziert nach [49].

Die Kosten für den Aufbau eines DiversityScanners liegen aktuell bei 5980 € und übersteigen somit die Anforderung an die Kosten um knapp 1000 €. Zum Zeitpunkt der Entwicklung (2021) jedoch waren einige Komponenten günstiger und der Aufbau war somit für unter 5000 € möglich. Der Aufbau des DiversityScanner-4K übersteigt diese Kosten noch um

weitere 500 €. Die verwendete fokussierbare Linse (ca. 800 €) erhöht die Kosten für das Gesamtsystem trotz der deutlich günstigeren Raspberry Pi HQ Kamera (ca. 50 €) im Vergleich zur Ximea Kamera (ca. 350 €) im DiversityScanner. Die Skalierbarkeit des DiversityScanners ist in der Theorie gegeben. Durch Vergrößerung des Hauptrahmens und der entsprechenden Linearachsen in  $x$ - und  $y$ -Richtung, kann der horizontale Arbeitsraum des Systems vergrößert werden. Dies ermöglicht die Platzierung von mehreren Petrischalen und Beleuchtungen sowie mehreren 96er PCR-Mikrotiterplatten, würde aber auch die Implementierung weiterer Übersichtskameras erfordern. Eine reine Vergrößerung der Petrischale ist nicht möglich. Die Beleuchtung vom Rand der Petrischale aus, führt zu einer zu schwachen Beleuchtung bei in der Mitte der Schale liegenden Insekten. Die Anpassbarkeit ist ebenfalls gegeben und durch Implementierung von zwei verschiedenen Kamerasystemen für die Detailkameras bereits gezeigt. Durch die Veröffentlichung in einem frei zugänglichen Journal [49] und die Bereitstellung von Teilelisten und notwendigen Dateien zum 3D-Druck (<https://osf.io/en594/>) ist dies auch für externe Nutzer:innen möglich. Die Software des DiversityScanners erfüllt die notwendigen Grundfunktionen zum Betrieb und ermöglicht über eine GUI das Starten, Pausieren und Stoppen des Programms. Zudem kann der Fortschritt darauf überwacht werden. Alle Parameter für den Betrieb können über eine Konfigurationsdatei eingestellt werden.

Ein weiterer Teil der Evaluierung des Systems ist die Anwendung in realen Laborbedingungen. Die Integration von Feedback führt zu einer ständigen Weiterentwicklung des Systems und unterstreicht den *Open Science* Charakter. Der DiversityScanner und anschließend der DiversityScanner-4K werden seit Herbst 2021 im Museum für Naturkunde Berlin, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung zur Bildgebung und Handhabung eingesetzt.

## 7.5 Diskussion und Ausblick

Der DiversityScanner ist ein automatisiertes System zur Bildgebung und Handhabung von Insekten (oder allgemeiner, wirbellosen Tieren) aus Massenproben, wie beispielsweise Malaise Fallen Proben. Der auf dem von Pfriem (2016) [132] basierende, modernisierte Grundroboter eignet sich gut zur Realisierung der Aufgabe. Die Verwendung von speziell gefertigten Teilen aus Aluminium gewährleistet eine hohe Steifigkeit, erfordert jedoch auch aufwendige spanende Fertigungsverfahren. Eine weitere Modifizierung des Grundroboters, um auf die Aluminiumteile zu verzichten, könnte die Reproduzierbarkeit des Systems deutlich erhöhen und gleichzeitig die Kosten reduzieren. Dabei muss darauf geachtet werden, dass bei Verwendung von 3D-gedruckten Teilen die Steifigkeit des Portals weiterhin sichergestellt wird. Die verwendeten kugelumlaufgeführten Linearführungen ermöglichen eine hohe Genauigkeit und Langlebigkeit bei minimalem Verschleiß. Moderne 3D-Drucker zeigen jedoch, dass auch

mit einfachen, gleitgelagerten und deutlich günstigeren Linearführungen hohe Genauigkeiten erreichbar sind. Zur Kostenreduktion würde es sich anbieten, eine erneute Marktanalyse durchzuführen, um eventuell kostengünstigere Linearführungen zu identifizieren. Weiterhin nutzt der Grundroboter 40 mm x 40 mm starke Aluminiumstrebenprofile für den würfelförmigen Hauptrahmen und zusätzlich als Auflager für das Portal des Roboters. Diese sehr massive Bauweise garantiert höchste Steifigkeit, könnte aber in zukünftigen Versionen durch schmalere Profile ersetzt werden. Dies würde den Bauraum erhöhen, die Kosten reduzieren und die Zugänglichkeit verbessern. Die verwendete kartesische Kinematik ermöglicht ein einfaches Verständnis der Bewegungen des Roboters. Alle Positionen sind eindeutig durch drei Koordinaten beschreibbar und erlauben somit eine einfache Fehlersuche, auch für technische Laien. Wie in der Evaluation dargestellt, liefert die implementierte Objekterkennung gute Ergebnisse mit einigen Schwächen. Fehlerhaft erkannte Objekte haben einen direkten Einfluss auf die Qualität des Handhabungsprozesses und könnten unter anderem eine Ursache für die relativ geringe Erfolgsquote von rund 62 % bei der Handhabung sein. Zwei oder mehr Objekte, welche als eines erkannt werden, führen leicht zu mehreren Objekten in einem *Well* der 96er PCR-Mikrotiterplatte. Dies ist bei der Versuchsreihe in 11 % der Fälle aufgetreten und hat somit zu einer nicht erfolgreichen Handhabung geführt. Eine Auswertung der zu den fehlerhaft gefüllten *Wells* gehörenden Detailbilder zeigt, dass in allen Fällen, in denen zwei oder mehr Insekten in einem *Well* vorzufinden sind, auch zwei oder mehr Insekten auf dem Detailbild zu sehen sind. Eine Verbesserung des Sortierprozesses erfordert demnach auch eine Verbesserung des Algorithmus zur Objekterkennung und kann den Ergebnissen zufolge zu einer Steigerung der Erfolgsquote von bis zu 10 % führen. Die Implementierung des Algorithmus zur Objekterkennung mit klassischer Bildverarbeitung erfolgt, da zum Zeitpunkt der Entwicklung keine Trainingsdaten für Lösungen mit maschinellem Lernen vorliegen. Zukünftig sollte der momentan verwendete Ansatz zur Objekterkennung durch moderne, auf maschinellem Lernen basierenden Objekterkennungsalgorithmen wie YOLOv8 [138] ersetzt werden. Es ist zu erwarten, dass diese Anpassung eine Reduktion der falsch erkannten Objekte bewirkt. Dabei ist zu beachten, dass nicht nur eine Instanzsegmentierung stattfindet, sondern dass weiterhin eine semantische Segmentierung vorgenommen wird. Dies ist notwendig, um die Größe der Objekte auch zukünftig einfach bestimmen und dieses Kriterium zur Zuordnung in 'sortierbar' oder 'nicht sortierbar' beibehalten zu können. Die zur semantischen Segmentierung notwendigen Trainingsdaten erfordern pixelgenaue Labels, deren Erstellung zunächst zeitaufwendig ist. Ein weiterer Vorteil, die Objekterkennung mittels maschinellem Lernen zu lösen, ist, dass gleichzeitig eine Klassifizierung möglich wäre. Objekte, bei denen es sich nicht um Insekten handelt, wie einzelne Körperteile, Staub oder Dreck, können direkt als nicht sortierbar ausgeschlossen werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Auflösung der Übersichtsbilder ausreicht, um dies zu erkennen. Eine höher auflösende Übersichtskamera wäre demnach zukünftig zu implementieren. Dies könnte auch die Möglichkeit bieten, schon anhand der Übersichtsbilder eine Klassifizierung der Insekten auf einer niedrigen taxonomischen Ebene vorzunehmen, um für den oder die Nutzer:in

relevante Tiere auszusortieren, ohne diese mit der Detailkamera anfahren zu müssen. Leere *Wells* nach dem Sortierprozess können auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass trotz korrekter Objekterkennung das Objekt nicht aufgesaugt wird, andererseits kann es passieren, dass ein korrekt aufgenommenes Insekt nicht abgelegt wird und trotz Abgabe der Flüssigkeit in der Saugspitze verbleibt. Diese Fehler könnten auf den Volumenstrom der Spritzenpumpe oder die Form der Saugspitze zurückgeführt werden. Eine Erhöhung des Volumenstroms ist mit der verwendeten Spritzenpumpe LA100 nicht möglich. Die von den äußeren Abmessungen gleiche, aber leistungsstärkere LA110 (Landgraf Laborsysteme HLL GmbH, Langenhagen, Deutschland) kann ohne weitere Anpassungen mit dem DiversityScanner getestet werden, um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Volumenstroms zu einer Verbesserung des Sortierprozesses führt. Zudem zeigen Erfahrungswerte von Projektpartnern (Museum für Naturkunde Berlin, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung), dass das Ablegen der Insekten in den *Wells* aufgrund der konisch zulaufenden Pipettenspitze fehleranfällig ist. Eine Modifizierung des Handhabungswerkzeugs zu einer Saugspitze mit zylindrischer Form könnte demnach zu einer Verbesserung des Handhabungsprozesses führen (vgl. hierzu Kapitel 8). Die implementierte Software des DiversityScanners erfüllt die notwendigen Grundfunktionen, um mit dem System arbeiten zu können. Die Einstellung der Parameter über eine separate Datei bietet jedoch keinen hohen Komfort bei der Nutzung. Zudem wird nach Änderung von Parametern ein Neustart der Software notwendig. Die Entwicklung nach dieser Art ist unter der Annahme erfolgt, dass das System möglichst leicht zu bedienen sein soll und gleichzeitig immer mit den gleichen Parametern arbeitet. Die Verwendung des Systems bei Projektpartnern im Museum für Naturkunde Berlin, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung zeigt jedoch, dass die Einstellung der Betriebsparameter, bspw. die Größe der zu sortierenden Insekten, genutzt werden kann, um den DiversityScanner für spezialisiertere Aufgaben zu nutzen. Die Einstellung der Parameter direkt in der GUI ist demnach wünschenswert und sollte für zukünftige Versionen, vergleichbar wie bei der *Entomoscope Imaging Software* (ENIMAS), direkt integriert werden. Die Anforderung an die Beleuchtung ist erfüllt. Die verwendeten von um die Petrischale herum verlaufenden LEDs mit Diffusorscheiben liefern eine geeignete Beleuchtung zur Aufnahme der Detailbilder. Jedoch schränken sie den Bedienungskomfort ein. Die Petrischale kann nur von oben eingesetzt und nach oben wieder herausgenommen werden. Dies ist bei einer leeren Schale kein Problem, kann bei einer gefüllten Schale, insbesondere beim Herausnehmen schnell dazu führen, dass Ethanol verschüttet wird und erfordert, dass in die mit Ethanol gefüllte Petrischale gefasst wird. Eine klappbare Beleuchtung würde den Komfort daher deutlich steigern, da die Schale dann von außen gegriffen und von vorne eingesetzt werden könnte. Die Evaluation der Verarbeitungszeit pro Probe zeigt, dass die Anforderung erfüllt wird. Die zukünftige Implementierung von auf maschinellem Lernen basierenden Methoden zur Objekterkennung oder die Bildverarbeitung der mit dem DiversityScanner 4K aufgenommenen Bilder, führen bei der Verwendung des Raspberry Pi

als zentrales Steuerelement allerdings dazu, dass die Verarbeitungszeit pro Probe deutlich steigen kann. Mit den steigenden Anforderungen an die Bildverarbeitung bietet es sich demnach an, auch für den DiversityScanner eine Plug-In Version in Betracht zu ziehen. Wie für das Plug-In Entomoscope, können so arbeitsintensive Prozessschritte auf einem leistungsstarken *Personal Computer* (PC) oder Laptop ausgeführt werden.

Als automatisiertes System bietet sich der DiversityScanner an, um durch Parallelisierung den Durchsatz zur Bildgebung und Vereinzelung im Vergleich zu teilautomatisierten Systemen stark zu erhöhen. Während pro Entomoscope eine Person notwendig ist, können mehrere DiversityScanner durch eine einzelne Person betreut werden. Diese kann, während die Systeme arbeiten, die Proben vorbereiten (vgl. Teil I) und dafür sorgen, dass die DiversityScanner ununterbrochen arbeiten, indem Proben in die Petrischalen nachgelegt und die Mikrotiterplatten getauscht werden. Eventuell auftretende Fehler können durch diese Person festgestellt und direkt behoben werden. Durch parallel arbeitende DiversityScanner können so schnell und mit minimalem personellen Aufwand viele Insekten fotografiert und in 96er PCR-Mikrotiterplatten vereinzelt werden. Zudem stellt der DiversityScanner sicher, dass alle Insekten nach der gleichen Methode fotografiert werden. Der menschliche Einfluss bei der Bildgebung entfällt, wodurch Unterschiede, die durch unterschiedliche Bedienung der Entomoscope oder unterschiedlichen Umgang mit den Proben vor der Bildgebung eliminiert werden. Dies stellt sicher, dass kein Bias auf zukünftige Algorithmen zur Klassifizierung der Insekten anhand von Bildern auftreten kann. Mit dem DiversityScanner wurde ein CNN zur Klassifizierung von Insekten aus Malaise Fallen Massenproben publiziert (vgl. Teil IV), um so die Funktionen des DiversityScanners durch automatische Klassifizierung zu erweitern. Wie im Programmablauf (vgl. Abbildung 7.9) dargestellt, kann nach der Anfertigung eines Detailbilds eine Klassifizierung vorgenommen werden. Basierend auf dieser Klassifizierung sollen zukünftig die Funktionen des DiversityScanners erweitert werden. So könnte der DiversityScanner beispielsweise angewiesen werden, nur Insekten in die 96er PCR-Mikrotiterplatte zu überführen, die bei der Klassifizierung nicht einer der bekannten 14 Klassen<sub>ML</sub> zugeordnet werden können. Durch Erweiterung der neuronalen Netze auf mehr Klassen<sub>ML</sub> höherer taxonomischer Ebene, können somit die Anzahl der Insekten, die mittels *Deoxyribonucleic acid* (DNA)-Barcode bestimmt werden müssen und somit die Kosten reduziert werden. Zudem liegen direkt Informationen über die Abundanz bekannter Klassen<sub>ML</sub> vor. Es hat sich gezeigt, dass großes Interesse an einem System wie dem DiversityScanner besteht, die Bereitschaft ein so kompliziertes System vollständig selbst aufzubauen, jedoch relativ gering ist. Für eine Weiterentwicklung des DiversityScanners und des DiversityScanner-4K, sollte demnach die Vereinfachung des Systems mit als sehr wichtige Anforderung aufgenommen werden. Was mit dem Entomoscope bereits gelungen ist, viele Institutionen mit einem System zu versorgen und so die Weiterentwicklung voranzutreiben, sollte dann auch mit dem DiversityScanner möglich sein. Da die Klassifizierung von Insekten auf höheren taxonomischen Ebenen bereits mit hoher Genauigkeit, beispielsweise für parasitäre Wespen gelingt [139], sollte der

DiversityScanner zukünftig auch über Zielbehältnisse für mehrere Insekten der gleichen Gattung oder sogar Art verfügen, die sicher mittels CNNs klassifiziert werden können und nicht mehr für das DNA-Barcoding vereinzelt in PCR-Mikrotiterplatten sortiert werden müssen.



## 8 Neue Methoden zur Handhabung mit dem DiversityScanner

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wührl, L. Keller, N. Klug, H. Shirali, R. Meier, und C. Pylatiuk, „Automated handling of biological objects with a flexible gripper for biodiversity research,” *at - Automatisierungstechnik*, Vol. 72, Nr. 7, S. 672–678, 2024. doi: 10.1515/auto-2023-0238.

Das in Kapitel 7 beschriebene und im DiversityScanner implementierte Handhabungssystem (vgl. Abbildung 7.6) mit einer gekürzten Pipettenspitze als Handhabungswerkzeug erfüllt nicht die definierte Anforderung, mehr als 90 % aller Insekten erfolgreich zu handhaben. Die Ursachen hierzu werden in Kapitel 7.5 diskutiert und es werden zwei wesentliche Ursachen identifiziert: der Algorithmus zur Objekterkennung und das Handhabungswerkzeug. In diesem Kapitel wird ein neues, verbessertes Handhabungswerkzeug für den DiversityScanner entwickelt. Zudem werden neue Methoden untersucht, um zukünftig auch Insekten > 3 mm handhaben zu können.

### 8.1 Stand der Technik zur Handhabung von Insekten > 3 mm

Der Stand der Technik zur Handhabung von Insekten mit einer Länge von weniger als drei Millimetern ist Kapitel 7.1 zu entnehmen. Zur automatisierten Handhabung größerer Insekten werden andere Methoden benötigt. Ein hydraulischer Greifer [140] aus PDMS scheint potenziell geeignet. Der zur Handhabung biologischer Proben entwickelte Greifer, nutzt drei auf einer Membran angeordnete, flexible 'Finger' mit einem Abstand von je 0,6 mm zueinander. Wird die Membran unter Druck gesetzt, resultiert dies in eine konvexe Form. Die im drucklosen Zustand senkrecht auf der Membran angeordneten Finger neigen sich nach außen. Dies kann als Öffnen des Greifers verstanden werden. Die Reduktion des Drucks auf der Innenseite der Membran führt gegenteilig zu einer konkaven Verformung und somit zu einem Schließen des Greifers. Kordmahale et al. demonstrieren das Greifen und Halten einer lebenden Ameise, die den Prozess unbeschadet übersteht [140].

## 8.2 Konzept und Methoden

Es sollen verschiedene Handhabungswerkzeuge entwickelt werden. Dazu werden die definierten Größenkategorien (vgl. Kapitel 2) herangezogen. Die Verwendung einer gekürzten Pipettenspitze in Kombination mit einer LA100 Spritzenpumpe zeigt, dass die Methode Potenzial zur Handhabung besitzt, liefert mit 62 % erfolgreich gehandhabter Insekten jedoch noch keine zufriedenstellende Lösung. Die zu geringe Saugleistung der Spritzenpumpe in Kombination mit einer 50 ml Spritze und die konisch zulaufende Form der Pipettenspitze werden als Hauptfehlerursache identifiziert (vgl. Kapitel 7.5). Für Insekten mit einer maximalen Länge von 3 mm wird ein neues Konzept vorgestellt. Die LA100 Spritzenpumpe wird durch die leistungsstärkere LA110 Spritzenpumpe ersetzt. Der maximale Volumenstrom wird dadurch nahezu verdreifacht (LA100: 35 ml/min; LA110: 102 ml/min). Zusätzlich wird die Pipettenspitze durch ein Glasröhrchen ersetzt. Die Verwendung eines Glasröhrchens als Saugspitze anstatt der Pipettenspitze erfordert lediglich die Modifikation der Aluminiumaufnahme. Durch diese beiden Modifikationen sind konzeptionell die beiden Hauptfehlerursachen beseitigt. Die Methode zum Testen des Handhabungsprozesses mit der modifizierten Saugspitze und der neuen Spritzenpumpe entspricht der bereits beschriebenen (vgl. Kapitel 7.4.1). Dazu werden die neuen Komponenten in den DiversityScanner integriert. Zudem wird bei den Versuchen darauf geachtet, dass sich berührende Insekten in der Petrischale vermieden werden. So soll der Einfluss der Objekterkennung auf das Ergebnis der Versuche reduziert werden, um die Evaluierung zu vereinfachen.

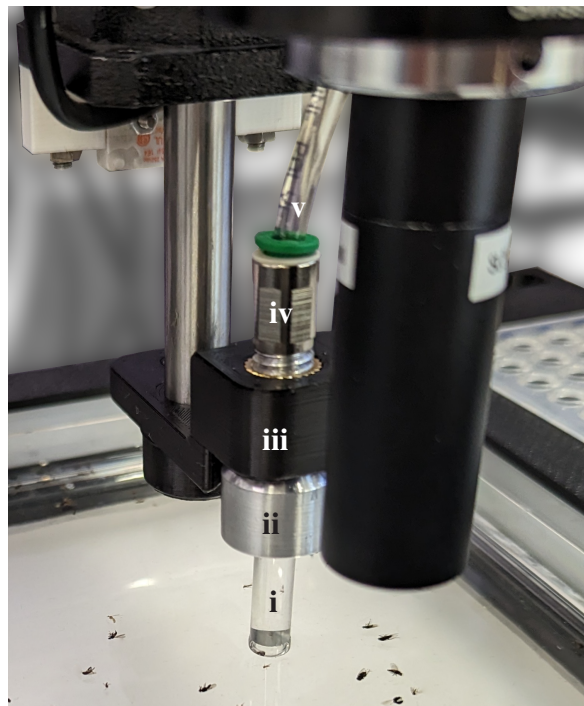
Zusätzlich zur Modifikation der Saugspitze wird ein Minigreifer basierend auf der Funktionsweise des von Kordmahale et al. (2022) [140] vorgestellten Greifers zur Handhabung größerer Insekten implementiert und getestet. Da eine Integration in den DiversityScanner zwar möglich, aber nicht zielführend wäre (der DiversityScanner verfügt derzeit ausschließlich über ein Bildgebungssystem für Insekten mit einer maximalen Länge von 3 mm), soll für die Tests des Greifers ein Teststand implementiert werden. Dieser soll das Aufnehmen, Transportieren und Ablegen der Insekten ermöglichen, um so die Zuverlässigkeit des Handhabungswerkzeugs testen zu können. Die Testmethodik wird im Folgenden beschrieben.

Drei Insekten mit unterschiedlichen Körperlängen von etwa 4 mm, 8 mm und 15 mm werden für Tests mit dem Greifer ausgewählt. Jedes Exemplar wird zunächst insgesamt 50 Transportwiederholungen unterzogen. Eine einzelne Wiederholung beinhaltet das Aufheben des Insekts aus einer Petrischale, das Bewegen entlang einer Achse und das anschließende Ablegen auf eine Ziel-Petrischale. Die Insekten werden zu Beginn und zwischen jeder Wiederholung manuell neu positioniert. Eine Zwischenbewertung wird nach 50 Wiederholungen durchgeführt. Wenn die Erfolgsquote über 50 % liegt, wird der Test fortgesetzt. Diese relativ niedrige Schwelle wird mit der Annahme gesetzt, dass zukünftige Optimierungen die Ergebnisse verbessern könnten. Wenn die Entscheidung getroffen wird, den Test fortzusetzen, werden zusätzliche 50 Wiederholungen durchgeführt, was insgesamt 100 Wiederholungen für jede der drei Größen

ergibt. Die Gesamterfolgsquote wird dann berechnet. Nach jeder Wiederholung wird ein Foto von der Ziel-Petrischale gemacht, einschließlich des abgelegten Insekts. Dies geschieht, um den Ablageort der Proben zu vergleichen. Eine Zusammenstellung aller aufgenommenen Fotos liefert einen Überblick über die Varianz in der Ablagegenauigkeit. Um die untere Grenze für die Probengröße bei der Handhabung mit dem Greifer zu ermitteln, werden Proben mit abnehmender Größe getestet. Dazu wird die Größenkategorie der vorherigen Tests gewählt, die noch mit hoher Erfolgsrate ( $> 90\%$ ) gehandhabt werden kann, und die Größe in 1 mm Schritten reduziert, bis eine Handhabung nicht mehr möglich ist. Jedes Insekt wird 20 Mal angehoben und transportiert. Zusätzliche Tests werden durchgeführt, um die Auswirkungen der Ausrichtung des Insekts zu ermitteln. Ein statischer Test wird durchgeführt, bei dem Proben aufgehoben und gehalten, aber nicht transportiert werden. Insgesamt werden 40 Wiederholungen durchgeführt. Alle zehn Wiederholungen werden die Proben in  $45^\circ$ -Schritten gedreht. Dies deckt einen Bereich ab, der die vollen  $360^\circ$  repräsentiert.

### 8.3 Implementierung der Handhabungswerkzeuge

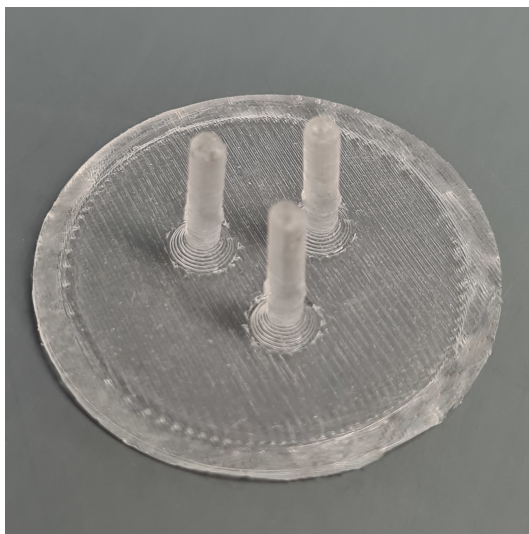
Die Implementierung der Saugspitze aus Glas erfolgt wie im Konzept beschrieben. In Abbildung 8.1, ist die in den DiversityScanner verbaute Saugspitze dargestellt. Die Abdichtung



**Abbildung 8.1:** Handhabungssystem des DiversityScanners mit neuer Saugspitze aus Glas. Mit Saugspitze aus Glas (i), Aluminiumaufnahme (ii), 3D-gedruckter Aufnahme (iii), Schlauchanschluss (iv), Saugschlauch (v).

zwischen der Aufnahme aus Aluminium und der Saugspitze aus Glas wird durch einen Wellendichtring aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) realisiert. Das Glasröhrchen hat einen Außendurchmesser von 4 mm bei einer Wandstärke von 0,1 mm - 0,15 mm. Der Innendurchmesser liegt demnach bei einem minimalen Wert von 3,7 mm. Der 3D-gedruckte Halter ist der neuen Form der Aluminiumaufnahme angepasst. Die Verbindung mit dem Saugschlauch wird wie bei der vorherigen Version realisiert.

Der Minigreifer besteht aus einem 3D-gedruckten Gehäuse und einer Membran mit 'Fingern' zum Aufnehmen der Insekten. Die Membran des Greifers (vgl. Abbildung 8.2a) ist 1 mm dick. Diese Stärke ermöglicht eine ausreichende Flexibilität ohne die Gefahr des Reißens. Sie



(a) Gegossene Polydimethylsiloxan (PDMS) Membran des Greifers.



(b) Geöffneter Greifer durch Druck auf der Innenseite der Membran.



(c) Geschlossener Greifer durch Unterdruck auf der Innenseite der Membran.

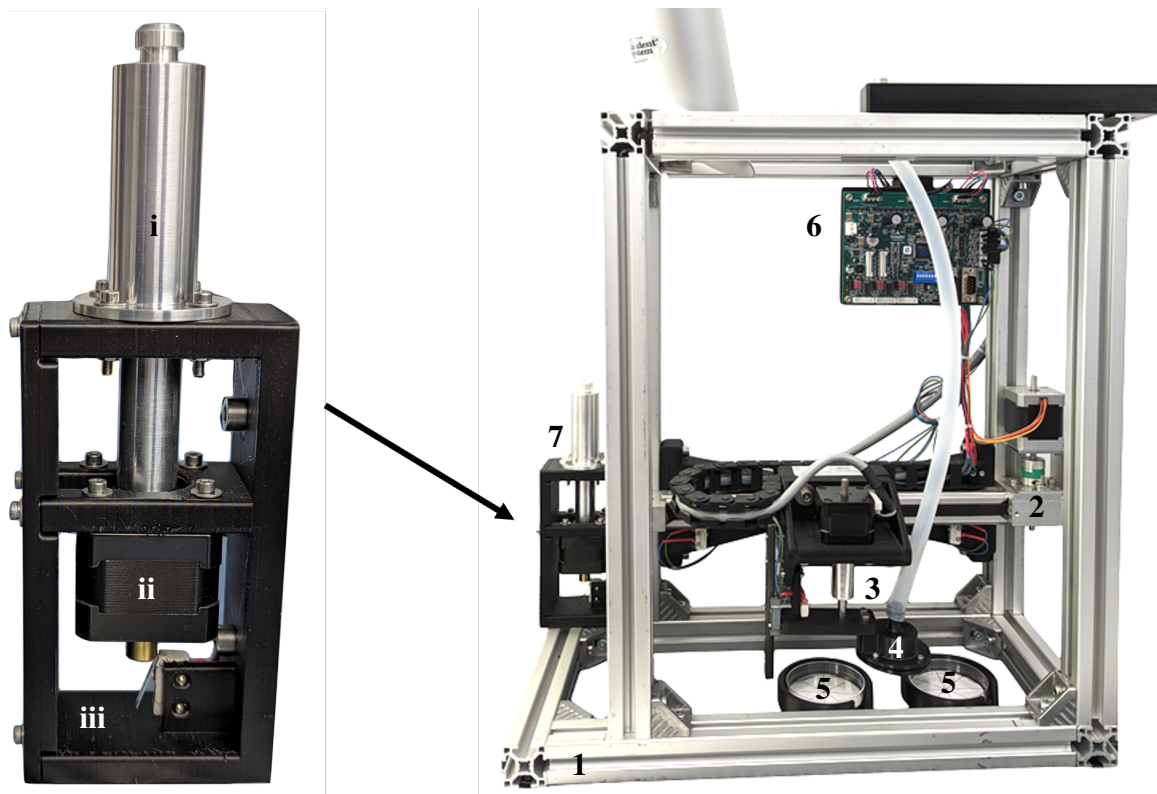


(d) Greifer beim Halten eines Insekts. Die Flexibilität der Finger verhindert eine Beschädigung der Probe.

**Abbildung 8.2:** Minigreifer zur Handhabung von Insekten in Ethanol. Durch Unterdruck kann der Greifer geschlossen werden, Überdruck resultiert in ein Öffnen des Greifers. Modifiziert nach [55].

hat einen Durchmesser von 45 mm. Die Finger sind dreieckig angeordnet, jeweils 15 mm lang, etwa 3 mm im Durchmesser und haben einen Abstand von 12 mm. Diese Wahl der Parameter bietet einen Kompromiss zwischen Reichweite und Stabilität. Längere Finger erhöhen zwar die Reichweite, verringern aber auch die Stabilität am Endbereich und erschweren die Herstellung. Die Greifermembran wird mithilfe einer 3D-gedruckten, dreiteiligen Form gegossen, die auf einem FDM 3D-Drucker gedruckt werden kann. Die Form wird vor dem Gießen mit Seifenwasser benetzt, um den Entformungsprozess zu erleichtern. Eine Einwegspritze wird verwendet, um das vorgemischte PDMS, welches für die Membran verwendet wird in die Form zu drücken. Als Gussmaterial wird SYLGARD 184 (Dow Chemical Company, Midland, USA) gewählt. Mit einer Härte von 43 Shore A ist es etwas härter als das Material, das für den deutlich kleineren Greifer verwendet wird (35 Shore A [140]). Diese erhöhte Härte wird gewählt, um dem vergrößerten Greifer eine höhere Stabilität zu verleihen. Ein 3D-gedrucktes Gehäuse findet Verwendung, um die Membran mit dem Schlauch zu verbinden, der wiederum mit der Steuerpumpe verbunden ist. Der geöffnete Greifer, der geschlossene Greifer, sowie der Greifer beim Halten eines Insekts sind in den Abbildungen 8.2b - 8.2d dargestellt.

Der Greifer wird mit einer Linearpumpe betrieben, ähnlich der Spritzenpumpe im Diversity-Scanner. Die begrenzte Geschwindigkeit der Spritzenpumpe von etwa 3 mm/s würde jedoch in ein langsames Öffnen und Schließen des Greifers resultieren, was wiederum die maximale Geschwindigkeit eines automatisierten Systems begrenzen würde. Um dies zu überwinden, wird eine einfache lineare Pumpe entwickelt (vgl. Abbildung 8.3, links). Die lineare Bewegung eines O-Ring-gedichteten Kolbens in einem Aluminiumrohr (i) wird durch einen spindelgetriebenen Linearaktor (ii, LGA421S14-B-TJCA-038, Nanotec Electronic GmbH & Co. KG, Feldkirchen, Deutschland) realisiert. Alle Komponenten sind auf einem 3D-gedruckten Rahmen (iii) montiert. Für Testzwecke wird ein Versuchsaufbau eingerichtet (vgl. Abbildung 8.3, rechts). Ziel ist es, den Greifer unter wiederholbaren Bedingungen und einer kontrollierten Umgebung zu validieren. Der Rahmen, gebaut aus Bosch-Aluminiumprofilen (1), misst 430 mm in der Breite, 460 mm in der Höhe und 205 mm in der Tiefe. Er verfügt über eine 300 mm lange Linearführung (LEZ1, Isel AG, Eichenzell, Deutschland), die von einem Schrittmotor angetrieben wird und über Endschalter zur Referenzierung verfügt (2). Ein spindelgetriebener Linearaktor (3), montiert auf der Linearachse zur horizontalen Bewegung, ermöglicht die vertikale Bewegung und nutzt eine 105 mm lange Linearführung zur Stabilisierung. Daran befestigt ist der Minigreifer (4). An der Basis des Versuchsaufbaus hält eine 3D-gedruckte Halterung zwei runde Petrischalen (5) im Abstand von 100 mm. Alle Motoren und Schalter sind mit einem Schrittmotortreiber (TMCM-3110 TRINAMIC Motion Control GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) verbunden, welcher oben am Rahmen befestigt ist (6). Die Pumpe (7) ist an der linken Seite des Rahmens befestigt. Ein 12 mm PE-Rohr verbindet das Pumpensystem mit dem Greifer.



**Abbildung 8.3:** Versuchsaufbau zum Testen des Minigreifers (rechts) mit Aluminiumrahmen (1), linearer Achse zum horizontalen Bewegen des Minigreifers (2), z-Achse zum vertikalen Bewegen des Minigreifers (3), Minigreifer (4), Petrischalen zum Aufnehmen und Platzieren der Probe (5), 3-Achs Motorsteuerung (6) und Linearpumpe (7). Die Pumpe (links) besteht aus einem Kolben mit O-Ring-Dichtung in einem Aluminiumzylinder mit Schlauchanschluss (i), der mit einem spindelgetriebenen Linearantrieb (ii) bewegt wird. Alle Komponenten sind auf einem 3D-gedruckten Rahmen (iii) montiert. Modifiziert nach [55].

## 8.4 Evaluierung und Ergebnisse

Ziel der Modifikation der Saugspitze ist es, die in Kapitel 7.5 gefundenen Hauptfehlerursachen zu beseitigen und somit das Ziel von 90 % erfolgreich gehandhabter Insekten zu erreichen. Die Versuche werden wie in der Methodik (vgl. Kapitel 7.4.1) beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 8.1 dargestellt. Für zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten wird eine

**Tabelle 8.1:** Ergebnisse der Testreihe zum Füllen von zwei 96er PCR-Mikrotiterplatten zur Evaluation des Handhabungsprozesses im DiversityScanner bei Verwendung eines Glasröhrchens als Saugspitze und LA110 Spritzenpumpe. Prozentsätze auf ganze Prozente gerundet.

	Erfolgreich	Nicht erfolgreich (F1)	Nicht erfolgreich (F2)
Mikrotiterplatte 01	85 (89 %)	7 (7 %)	4 (4 %)
Mikrotiterplatte 02	89 (93 %)	2 (2 %)	5 (5 %)
Mittelwert	87 (91 %)	4,5 (5 %)	4,5 (5 %)

Erfolgsquote von im Mittel 91 % erreicht. Die nicht erfolgreichen Handhabungen verteilen sich gleichmäßig (jeweils 5 %) auf Fehler der Kategorien F1 und F2. Das Ziel kann mit der neuen Saugspitze in Kombination mit einer leistungsstärkeren Spritzenpumpe demnach erreicht werden.

Die Evaluierung des Minigreifers erfolgt entsprechend der in Kapitel 8.2 vorgestellten Methodik. Die Ergebnisse der Handhabungsversuche mit Insekten der Größen 15 mm, 8 mm und 4 mm sind in Tabelle 8.2 dargestellt. Das 15 mm Insekt kann in 100 % der Fälle erfolgreich aufgenommen, transportiert und abgelegt werden. Das 8 mm Insekt kann in 95 % der Fälle erfolgreich gehandhabt werden, während die Versuchsreihe für das 4 mm Insekt nach 50 gescheiterten Versuchen das Insekt aufzunehmen abgebrochen wird.

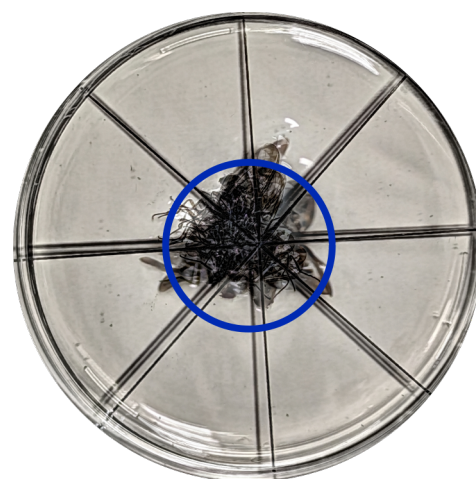
**Tabelle 8.2:** Ergebnisse der Tests des Greifers mit Proben von 15 mm, 8 mm bzw. 4 mm. Bei der 15-mm Probe wird eine Erfolgsquote von 100 % erreicht, die 8-mm-Probe wird in 95 % der Fälle korrekt gehandhabt, während bei der 4 mm Probe alle Versuche fehlschlagen.

Testreihe	Wiederholungen	Erfolgreich	Nicht erfolgreich	Ergebnis
15 mm	100	100	NaN	100 %
8 mm	100	95	Nicht aufgenommen: 5	95 %
4 mm	50	0	Nicht aufgenommen: 50	0 %

Zur Untersuchung der Genauigkeit beim Ablegen der Insekten werden die Bilder der Ablagepetrischale für das 15 mm Insekt und das 8 mm Insekt übereinander gelegt und der Ablegeradius bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass nur die Körper beachtet werden, nicht jedoch die Flügel. Die übereinandergelegten Bilder sind in Abbildung 8.4a für die Versuchsreihe der 15 mm Probe und in Abbildung 8.4b für die 8 mm Probe dargestellt. Die Untersuchung



(a) Ablagekreis der 15 mm Probe mit einem Durchmesser von 25 mm.



(b) Ablagekreis der 8 mm Probe mit einem Durchmesser von 23 mm.

**Abbildung 8.4:** Ablagegenauigkeit mit dem implementierten Greifer für eine 15 mm Probe (a) und eine 8 mm Probe (b). Modifiziert nach [55].

der Richtungsabhängigkeit wird demnach nur noch für das 15 mm und 8 mm Insekt durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind in Tabelle 8.3 aufgeführt. Für das 15 mm Insekt ist wiederum in 100 % der Fälle eine Handhabung erfolgreich. Es kann keine Richtungsabhängigkeit festgestellt werden. Für das 8 mm Insekt schwankt die Erfolgsquote für die verschiedenen Winkel zwischen 100 % für 45° und 70 % bei 90° relativer Verdrehung. Eine Richtungsabhängigkeit ist demnach zu vermuten. Zuletzt erfolgt die Versuchsreihe zur

**Tabelle 8.3:** Ergebnisse der Prüfung der Abhängigkeit des Greifers von Insekten in verschiedenen Ausrichtungen. Bei der 15 mm-Probe sind alle Wiederholungen in allen Ausrichtungen erfolgreich. Bei dem 8 mm Exemplar ist die niedrigste Erfolgsquote von 70 % bei einer Ausrichtung von 90° zu verzeichnen.

Insektengröße	Wiederholungen	Erfolgreich	Ausrichtung	Ergebnis
15 mm	10	10	0°	100 %
	10	10	45°	100 %
	10	10	90°	100 %
	10	10	125°	100 %
8 mm	10	8	0°	80 %
	10	10	45°	100 %
	10	7	90°	70 %
	10	9	125°	90 %

Ermittlung der minimalen Größe. Für das 8 mm Insekt kann in der ersten Versuchsreihe eine Erfolgsquote von 95 % ermittelt werden. Die Versuchsreihe zur Identifizierung der minimalen handhabbaren Größe beginnt demnach mit einem Insekt mit einer Länge von 7,5 mm und wird für drei weitere Proben (6,5 mm, 5,5 mm und 4,5 mm) wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.4 aufgeführt. Das 7,5 mm Insekt wird in 90 % der Fälle erfolgreich gehandhabt, das 6,5 mm Insekt in 70 % und das 5,5 mm in 5 % der Fälle. Die 4,5 mm Probe kann mit dem Greifer nicht gehandhabt werden.

**Tabelle 8.4:** Prüfung des Minigreifers mit Insekten abnehmender Größe. Die Erfolgsquote sinkt mit abnehmender Größe des Insekts.

Insektengröße	Wiederholungen	Erfolgreich	Nicht erfolgreich	Ergebnis
7,5 mm	20	18	Nicht aufgenommen: 2	90 %
6,5 mm	20	14	Nicht aufgenommen: 6	70 %
5,5 mm	20	1	Nicht aufgenommen: 19	5 %
4,5 mm	20	0	Nicht aufgenommen: 20	0 %

## 8.5 Diskussion und Ausblick

Die Verwendung eines Glasröhrchens mit einer neu entwickelten Aluminiumaufnahme als Handhabungswerkzeug sowie die Integration einer stärkeren Spritzenpumpe in den Diversity-Scanner verbessern die Erfolgsrate des Sortierprozesses von 62 % bei Verwendung der gekürzten Pipettenspitze auf 91 % mit den neuen Komponenten. Zudem fällt auf, dass sich die Anzahl der mit zwei oder mehr Proben gefüllten *Wells* im Vergleich zur vorherigen Versuchsreihe mit einer gekürzten Pipettenspitze um die Hälfte reduziert hat. Dies könnte auf den höheren Volumenstrom zurückzuführen sein. Das angesaugte Volumen ist bei beiden Systemen gleich, durch die Erhöhung des Volumenstroms reduziert sich die Zeit, die eingesaugt werden muss. Daher könnte die Trägheit der Objekte dafür sorgen, dass sich Objekte, die sich nicht direkt unter der Saugspitze befinden, nicht angesaugt werden. Jedoch ist weiterhin eine Zuordnung des in ein *Well* sortierten Insekts zu einem Insekt im Bild nicht möglich, wenn im Detailbild mehrere Insekten zu sehen sind. Eine Verbesserung der Objekterkennung, wie in Kapitel 7.5 beschrieben, ist daher trotz der reduzierten Anzahl der mit zwei oder mehr Objekten gefüllten *Wells* erforderlich.

Die Evaluierung des Minigreifers zeigt, dass ein pneumatisch betriebener Greifer mit dem vorgestellten Aufbau grundsätzlich zur Handhabung von Insekten in Ethanol geeignet ist. Die Testergebnisse bestätigen, dass eine Handhabung von Insekten der Größenkategorie drei (8 mm - 15 mm, vgl. Kapitel 2.2) möglich ist. Die Ergebnisse zeigen, dass größere Objekte (15 mm) sicherer gehandhabt werden können als welche an der unteren Grenze der Kategorie (8 mm). Dort ist insbesondere eine Lageabhängigkeit zu erkennen. Während bei einer relativen Drehung von 45° und 125° sehr gute Ergebnisse erzielt werden (100 % und 90 %) sinken für 0° und 90° die Ergebnisse auf 80 % bzw. 70 %. Dies ist ggf. auf die Dimensionen des Greifers zurückzuführen. Bei geschlossenem Greifer bleibt eine Lücke von ca. 6 mm zwischen den Fingern (vgl. Abbildung 8.2c). Ist das Insekt kleiner als 6 mm oder sind die Strukturen, an denen ein größeres Insekt gegriffen wird, kleiner als 6 mm, kann keine erfolgreiche Handhabung stattfinden. Diese Theorie bestätigt die Versuchsreihe mit Insekten abnehmender Größe. Insekten mit einer Größe über 6 mm können in über 70 % der Fälle gehandhabt werden, sinkt die Gesamtgröße jedoch unter 6 mm, ist eine Handhabung nur noch in 5 % der Fälle möglich. Eine Lösung dieser Problematik könnte die Anpassung der Größenparameter der Membran sein. Dazu eignet sich entweder eine Verlängerung der 'Finger', was jedoch die Herstellung erschweren würde, eine Reduktion des Durchmessers der Membran oder die Anordnung der Finger näher beieinander, dies könnte jedoch wiederum die Fähigkeit beeinflussen größere Insekten zu greifen. Weiterhin könnte eine Vergrößerung des Hubvolumens der Pumpe eine Vergrößerung des Unterdrucks bewirken. Demzufolge die Membran weiter nach innen geneigt werden würde, wodurch die Finger vollständig schließen könnten. Zuletzt könnte eine Reduktion des Durchmessers des Saugschlauchs in ein besseres Schließen des Greifers resultieren. Die Reduktion des Gesamtvolumens würde ebenfalls zu

einem stärkeren Unterdruck und somit zu einem besseren Schließen des Greifers führen. Für Insekten der Größenkategorie zwei (3 mm - 8 mm) ist der Greifer mit den aktuellen Abmessungen nicht geeignet. Eine Anpassung der zuvor genannten Parameter könnte aber den handhabbaren Bereich erweitern. Sollte eine Handhabung nicht bis 3 mm möglich sein, wäre ein handhabbarer Bereich von 5 mm - 15 mm schon ein großer Erfolg. Insekten bis 5 mm könnten, ersten Vorversuchen zufolge, mit einer Saugspitze aus Glas mit vergrößertem Durchmesser noch gehandhabt werden.

## **Teil IV**

# **Potenzial der Bildanalyse zur Klassifizierung und Untersuchung von Insekten**



# Übersicht Teil IV

Die in den vorangegangenen Teilen der vorliegenden Dissertation (Teil II und Teil III) entwickelten teilautomatisierten und automatisierten Systeme liefern Bilder, die zur automatisierten Klassifizierung der abgebildeten Invertebraten herangezogen werden sollen. Damit soll der dritte in Kapitel 2 identifizierte potenzielle Bereich, der von der Automatisierung profitieren kann, untersucht werden.

Im folgenden Teil wird das Potenzial der generierten Bilder zur Klassifizierung von Insekten aus Malaise Fallen Proben untersucht. Voraussetzung für das Training von *Convolutional Neural Networks* (CNNs) ist die Verfügbarkeit großer Datensätze, für deren Generierung sich die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellten Methoden eignen. Exemplarisch wird der DiversityScanner genutzt, um mit der Detailkamera fotografierte Insekten zu klassifizieren. Dazu wird ein Datensatz bestehend aus 5083 Bildern aufgenommen, anschließend werden die abgebildeten Insekten durch Entomologen klassifiziert und in 15 Klassen<sub>ML</sub> unterteilt. Dabei handelt es sich um 14 Klassen<sub>ML</sub> verschiedener Taxa, meist auf Familienebene und eine Restklasse, welche Bilder anderer Taxa als auch einzelner Körperteile oder von Staub beinhaltet und dazu genutzt wird, bekannte von unbekannten Klassen<sub>ML</sub> zu unterscheiden. Mit diesem Datensatz werden verschiedene CNNs trainiert und verglichen. Zwei verschiedene Methoden werden getestet: *Methode 1* nutzt die VGG19-Architektur und unterscheidet alle Klassen mit einem Netzwerk, während für *Methode 2* ein kaskadierter Ansatz mit zwei Resnet-50-Encodern gewählt wird. Beide Methoden liefern hohe Genauigkeiten (> 90 %) und zeigen, dass die Bilder dazu genutzt werden können, die Insekten zu klassifizieren. Weiterhin wird im folgenden Teil gezeigt, dass die Bilder das Potenzial bieten, um morphometrische Merkmale der Insekten, wie bspw. deren Länge zu ermitteln oder das Volumen zu schätzen, um Rückschlüsse auf die Biomasse einzelner Insekten ziehen zu können. Diese Merkmale können herangezogen werden, um Veränderungen der Tiere festzustellen oder eine Art anhand dieser Merkmale zu beschreiben. Die vorgestellte Methode bietet eine Grundlage zur Bestimmung der Gesamtlänge, sowie der Länge einzelner Körpersegmente, wie Kopf, Thorax und Abdomen, sowie zur Schätzung des Volumens.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die mittels teilautomatisierter und automatisierter Bildgebungssysteme generierten Bilder nicht nur effektiv zur automatisierten Klassifizierung von Insekten verwendet werden können, sondern auch das Potenzial bieten, morphometrische Merkmale zu ermitteln und damit die Erforschung der Biodiversität unter Invertebraten wesentlich zu beschleunigen.



## 9 Klassifizierung mittels neuronaler Netze

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wühl, C. Pylatiuk, M. Giersch, F. Lapp, T. von Rintelen, M. Balke, S. Schmidt, P. Cerretti, und R. Meier, „DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 22, Nr. 4, S. 1626–1638, 2022. doi: 10.1111/1755-0998.13567.
- L. Wühl, L. Rettenberger, R. Meier, E. Hartop, J. Graf, und C. Pylatiuk, „Entomoscope: An Open-Source Photomicroscope for Biodiversity Discovery,” *IEEE Access*, Vol. 12, S. 11 785–11 794, 2024. doi: 10.1109/ACCESS.2024.3355272.

Die in den Teilen II und III vorgestellten Systeme dienen sämtlich der Generierung von Bildern von beispielsweise mit Malaise Fallen gefangenen Insekten in Ethanol. Die in Kapitel 2 vorgeschlagene Prozesskette sieht die Klassifizierung der Insekten anhand der Bilder vor. Dazu können neuronale Netze genutzt werden.

### 9.1 Stand der Technik zur Klassifizierung von Insekten mit neuronalen Netzen

Insekten anhand von Bildern zu klassifizieren ist kein neuer Gedanke und wird schon seit längerem versucht. Frühere Versuche basieren unter anderem auf der Extraktion lokaler Merkmale und der Klassifizierung mit Support Vector Machines (SVMs), bspw. zur Klassifizierung von Schmetterlingen und Motten [141, 142].

Nach aktuellem Stand der Technik werden häufig CNNs genutzt, um Insekten zu klassifizieren [110, 143–147]. Dabei kommen verschiedene Architekturen zum Einsatz, die auf die Anwendungsfälle angepasst werden. Meistens werden vortrainierte Netze verwendet, um vom sogenannten *transfer learning* zu profitieren. Ein häufig verwendeter Datensatz zum Vortrainieren von CNNs ist der *ImageNet*-Datensatz, der selbst schon einige Insektenklassen<sub>ML</sub> enthält. Dabei handelt es sich jedoch um sehr generelle Klassen<sub>ML</sub>, die auf einer niedrigen taxonomischen Ebene liegen und bspw. 'Fliegen', 'Bienen' oder 'Ameisen' umfassen [148, 149].

Entscheidend für das Training von Klassifikatoren sind die verwendeten Datensätze. Sie haben großen Einfluss auf die Ergebnisse und die Generalisierbarkeit. Bilder aus Datenbanken beispielsweise haben gezeigt, dass sie bei der Klassifikation zu Problemen führen können, da sie häufig unter anderem Skalen als Größenreferenz oder Beschriftungen im Bild aufweisen, die, wenn sie nicht vorher entfernt werden, als Merkmale fehlinterpretiert werden können [143]. Hinzu kommt, dass die Insekten häufig in einer einheitlichen Position aufgenommen werden, bspw. dorsal [144, 146, 150, 151]. Dies kann dazu führen, dass eine Generalisierung des CNNs erschwert wird. Weiterhin muss unterschieden werden, ob die Bilder für das Training von Tieren aus Sammlungen im entweder nass- [98, 109, 146] oder trockenkonservierten [144, 146, 150, 151] Zustand oder lebend vor einem Hintergrund [152] bzw. in natürlicher Umgebung [147, 153] aufgenommen werden. Die Modelle sind meist schlecht übertragbar [150]. Generell eignen sich unter Laborbedingungen aufgenommene Bilder besser für die Klassifikation als solche, die in der natürlichen Umgebung aufgenommen werden. Dies kann ggf. einerseits auf die Anpassbarkeit des Hintergrunds und somit die Reduktion des Hintergrundrauschens, als auch auf die Möglichkeit, die Insekten aus mehreren Positionen aufzunehmen zu können zurückzuführen. Daher eignen sich Bilder, die unter Laborbedingungen mit einheitlichem Hintergrund und Beleuchtung aufgenommen werden, besser, wenn nah verwandte Insekten unterschieden werden sollen [154].

Während einige Publikationen Ergebnisse für spezielle biologische Fragestellungen liefern, wie beispielsweise die Erkennung von Vektor Moskitos [155], finden sich auch Publikationen, welche zwar Insekten klassifizieren, deren Mehrwert für entomologische Fragestellungen jedoch hinterfragt werden sollte. Insbesondere ist dabei die Auswahl der Klassen<sub>ML</sub> zu untersuchen. Werden leicht zu unterscheidende Ordnungen als Klassen<sub>ML</sub> gewählt [156–158], ist ein gutes Ergebnis zu erwarten, ob dadurch entomologische Fragestellungen beantwortet oder die Arbeit von Entomolog:innen unterstützt werden kann, ist jedoch fraglich.

## 9.2 Material und Methoden

Voraussetzung für das Training von CNNs zur Klassifikation von Insekten ist ein Datensatz. Zur Erstellung des Datensatzes zur Klassifizierung werden Bilder mit der Detailkamera des DiversityScanners aufgenommen. Dazu werden fünf Insekten-Massenproben aus Malaise Fallen genutzt: drei aus Deutschland (bei Rastatt, Kitzing und Framersbach) und zwei aus Italien (Provinz L'Aquila: Valle di Teve und Foresta Demaniale Chiarano-Sparvera). Die Häufigkeit der verschiedenen Taxa (in der Regel auf Familienebene) wird genutzt, um zu entscheiden, wie viele Klassen<sub>ML</sub> abgedeckt werden können, da sie über eine ausreichend große Anzahl von Trainings-, Validierungs- und Testbildern verfügen. Daraus resultieren 14 Klassen<sub>ML</sub> für verschiedene Taxa und eine 15. Klasse<sub>ML</sub>, die die restlichen Exemplare (N = 758) als auch Bilder von Körperteilen (hauptsächlich Beine und Flügel) enthält. Diese

Klasse<sub>ML</sub> wird dazu genutzt, bekannte Klassen<sub>ML</sub> von unbekannten zu unterscheiden. Der Datensatz setzt sich aus insgesamt 5083 Bildern zusammen, der in 3182 (ca. 62,5 %) für das Training, 777 (ca. 15 %) für die Validierung und 1124 (ca. 22,5 %) für das Testen unterteilt wird. Eine genaue Aufteilung der Bilder in die 15 Klassen<sub>ML</sub> kann Tabelle 9.1 entnommen werden. In Abbildung 9.1 ist exemplarisch für jede Klasse<sub>ML</sub> ein Bild dargestellt.

**Tabelle 9.1:** Datensatz zur Klassifizierung in 15 Klassen<sub>ML</sub>, die meisten auf Familienebene im Linnschen System (N=10), zwei enthalten zwei Familien und zwei sind auf einer höheren Stufe (Diptera Calyptratae und die paraphyletischen acalyptrate Diptera). Modifiziert nach [49].

Klasse <sub>ML</sub>	Training	Validierung	Test	Summe
Acalyptrate Diptera	377	69	148	594
Diptera Calyptratae	57	10	12	79
Diptera Cecidomyiidae	280	70	117	467
Diptera Chironomidae	140	20	32	192
Diptera Dolichopodidae	112	14	14	140
Diptera Empididae & Hybotidae	254	80	112	446
Diptera Mycetophilidae & Keroplatidae	251	79	110	440
Diptera Phoridae	461	167	209	837
Diptera Psychodidae	91	19	19	129
Diptera Sciaridae	219	54	90	363
Hemiptera Cicadellidae	102	14	21	137
Hymenoptera Braconidae	74	17	22	113
Hymenoptera Diapriidae	166	38	51	255
Hymenoptera Ichneumonidae	100	13	20	133
Rest	498	113	147	758
<b>Summe</b>	<b>3182</b>	<b>777</b>	<b>1124</b>	<b>5083</b>

Auf Basis dieses Datensatzes werden zwei verschiedene Methoden implementiert.

In *Methode 1* [49] erfolgt die Klassifizierung basierend auf der VGG19-Architektur [159]. Alle Klassen<sub>ML</sub>, einschließlich der Restklasse, werden hierbei durch einen Klassifikator unterschieden. Für das Training werden die Daten augmentiert, um die Anzahl der Bilder und die Varianz innerhalb einer Klasse zu erhöhen. Unter anderem werden folgende Augmentierungsmethoden nach dem Zufallsprinzip angewandt: Drehung, Scherung, Zoom und Spiegeln. Das Modell wird mit vortrainierten ImageNet-Gewichten initialisiert, und die letzte Schicht wird entfernt. Für die neue Klassifizierungsschicht wird eine *global average pooling*-Schicht, ein *dense layer* mit 1024 Einheiten und ReLU-Aktivierung, sowie eine lineare Schicht mit einer Dropout-Rate von 0,4 während des Trainings hinzugefügt. Die endgültige Klassifizierung erfolgt mithilfe einer Softmax-Funktion und einer L2-Regularisierung. Jedes Bild

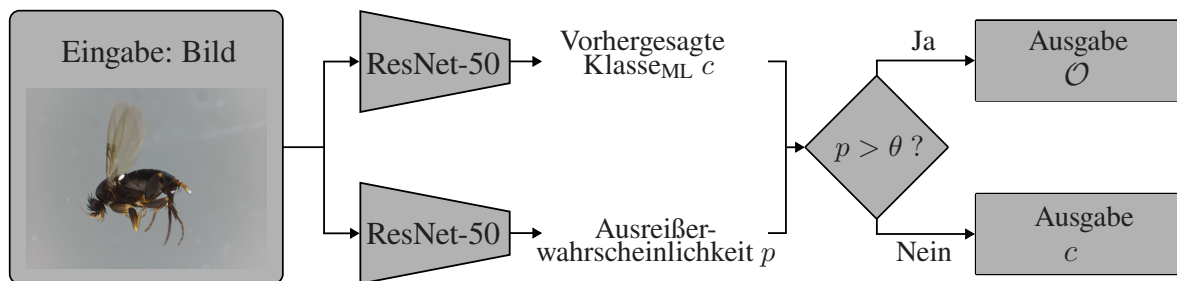


**Abbildung 9.1:** Beispielbilder der 14 Klassen<sub>ML</sub> (a) - (n) und der Restklasse (o) und (p) des Datensatzes zur Klassifizierung von Insekten mit den Entomoscoptes und dem DiversityScanner. Modifiziert nach [49].

hat eine Eingabegröße von  $224 \times 224$  Pixel, und das Modell verfügt insgesamt über etwa 20,5 Millionen Parameter. Während des Trainings werden die Parameter des ursprünglichen Modells eingefroren, und nur die Klassifizierungsschicht wird trainiert. Anschließend wird das gesamte Modell optimiert, wobei das Training auf alle Schichten angewendet wird. Das Modell wird in Keras (Version 2.4.3) auf der Grundlage von TensorFlow (Version 2.2.1) implementiert, und alle Experimente werden in der Programmiersprache Python (Version 3.8.6) durchgeführt.

Für *Methode 2* [91] wird zur Klassifikation ein anderer Ansatz gewählt. Um die Robustheit und Generalisierung des Modells zu verbessern, werden wieder verschiedene Augmentationsstechniken angewendet. Insbesondere werden die Bilder mit einer Wahrscheinlichkeit von

50 % horizontal gespiegelt, Helligkeit und Kontrast zufällig angepasst (bis zu 10 % der Ausgangswerte), um maximal 25 % gedreht und mit einem Gaußschen Weichzeichner mit Sigma-Werten zwischen 0,0 und 1,0 versehen. Für die Klassifizierung bekannter Objektklassen<sub>ML</sub> und die Erkennung unbekannter Exemplare oder anderer Objekte wird jedoch eine kaskadierte CNN-Architektur mit zwei Resnet-50-Encodern [160] verwendet (vgl. Abbildung 9.2). Ein Klassifikator sagt den jeweiligen Klassenindex  $c \in \{1, \dots, n\}$  für  $n$  bekannte Klassen voraus. Der zweite Klassifikator gibt eine Ausreißerwahrscheinlichkeit von  $0.0 \leq p \leq 1.0$ ,  $p \in \mathbb{R}$  an. Wenn  $p$  größer als der Schwellenwert  $\theta$  ist, wird die Ausreißerklasse  $\mathcal{O} = n + 1$  ausgegeben. Andernfalls wird die bekannte Klasse  $c$  vorhergesagt.  $\theta$  wird zu 0.2 gewählt. Um die Klassifizierungsaufgabe mit dieser Architektur zu trainieren, werden die  $c$ -Klassen als die 14 bekannten Klassen festgelegt, und die Ausreißererkennung wird mit der Restklasse durchgeführt. Dazu werden die beiden CNNs einzeln auf dem vorgestellten Datensatz trai-



**Abbildung 9.2:** Kaskadierte Architektur zur Klassifizierung nach *Methode 2*. Es werden zwei ResNet-50-Encoder verwendet, um die Klasse  $c$  und die Ausreißerwahrscheinlichkeit  $p$  zu ermitteln. Wenn  $p$  größer als der Schwellenwert  $\theta$  ist, wird die Ausreißerklasse  $\mathcal{O}$  vorhergesagt, sonst die ermittelte Klasse  $c$ . Modifiziert nach [91].

niert. Der Klassifikator zur Vorhersage des Klassenindex  $c$  nutzt dazu nur die 14 Klassen<sub>ML</sub>, die einem Taxon zugeordnet werden können und berücksichtigt die Restklasse nicht. Für den Klassifikator zur Ermittlung der Ausreißerwahrscheinlichkeit  $p$  werden diese 14 Klassen<sub>ML</sub> zu einer zusammengefasst. Somit liegen nur noch zwei Klassen<sub>ML</sub> vor.

## 9.3 Ergebnisse der Klassifizierung

Die *Confusion Matrix* der nach *Methode 1* durchgeführten Klassifizierung ist in Tabelle 9.2 dargestellt. Die besten Ergebnisse werden für die Klassen<sub>ML</sub> *Hemiptera Cicadellidae* (100,0 %), *Hymenoptera Diapriidae* (100,0 %) und *Diptera Mycetophilidae & Keroplatid* (99,1 %) erreicht, während die schlechtesten Ergebnisse für die Klassen<sub>ML</sub> *Hymenoptera Ichneumonidae* (75,0 %), die Restklasse (81,0 %) und *Hymenoptera Braconidae* (81,8 %) erreicht werden. Die Gesamtgenauigkeit über alle Klassen errechnet sich zu 91,4 %.

Tabelle 9.3 zeigt das Ergebnis der Klassifikation nach *Methode 2*. Die *Confusion Matrix* beinhaltet nur die 14 Zielklassen. Die Restklasse wird durch einen separaten Klassifikator

**Tabelle 9.2:** *Confusion Matrix* der Klassifikation nach *Methode 1*. Umfasst 15 Klassen<sub>ML</sub>, davon 14 Zielklassen und die Restklasse. Auf der Diagonalen (grün hinterlegt) können die Genauigkeiten für die einzelnen Klassen abgelesen werden.

Wahre Klasse <sub>ML</sub>		Vorhergesagte Klasse <sub>ML</sub>														
	acalyptrate Diptera	0,912	0,020	0,000	0,000	0,014	0,014	0,000	0,007	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,027
	Diptera Calyptratae	0,083	0,833	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Cecidomyiidae	0,000	0,000	0,915	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
	Diptera Chironomidae	0,000	0,000	0,031	0,939	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Dolichopodidae	0,143	0,000	0,000	0,000	0,857	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Empididae & Hybotidae	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,866	0,009	0,009	0,000	0,018	0,009	0,018	0,000	0,000	0,045
	Diptera Mycetophilidae & Keroplatidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,991	0,009	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Phoridae	0,014	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,005	0,967	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Psychodidae	0,053	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,895	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Diptera Sciaridae	0,000	0,000	0,056	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,922	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Hemiptera Cicadellidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Hymenoptera Braconidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,818	0,000	0,091	0,091
	Hymenoptera Diapriidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	Hymenoptera Ichneumonidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,750	0,100
	Rest	0,034	0,000	0,000	0,027	0,000	0,034	0,000	0,007	0,020	0,014	0,020	0,020	0,014	0,000	0,810

**Tabelle 9.3:** *Confusion Matrix* der Klassifikation nach *Methode 2*. Umfasst 14 Klassen<sub>ML</sub>, die Restklasse wird aufgrund des kaskadierten Modells zur Klassifizierung nicht dargestellt. Auf der Diagonalen (grün hinterlegt), können die Genauigkeiten für die einzelnen Klassen abgelesen werden.

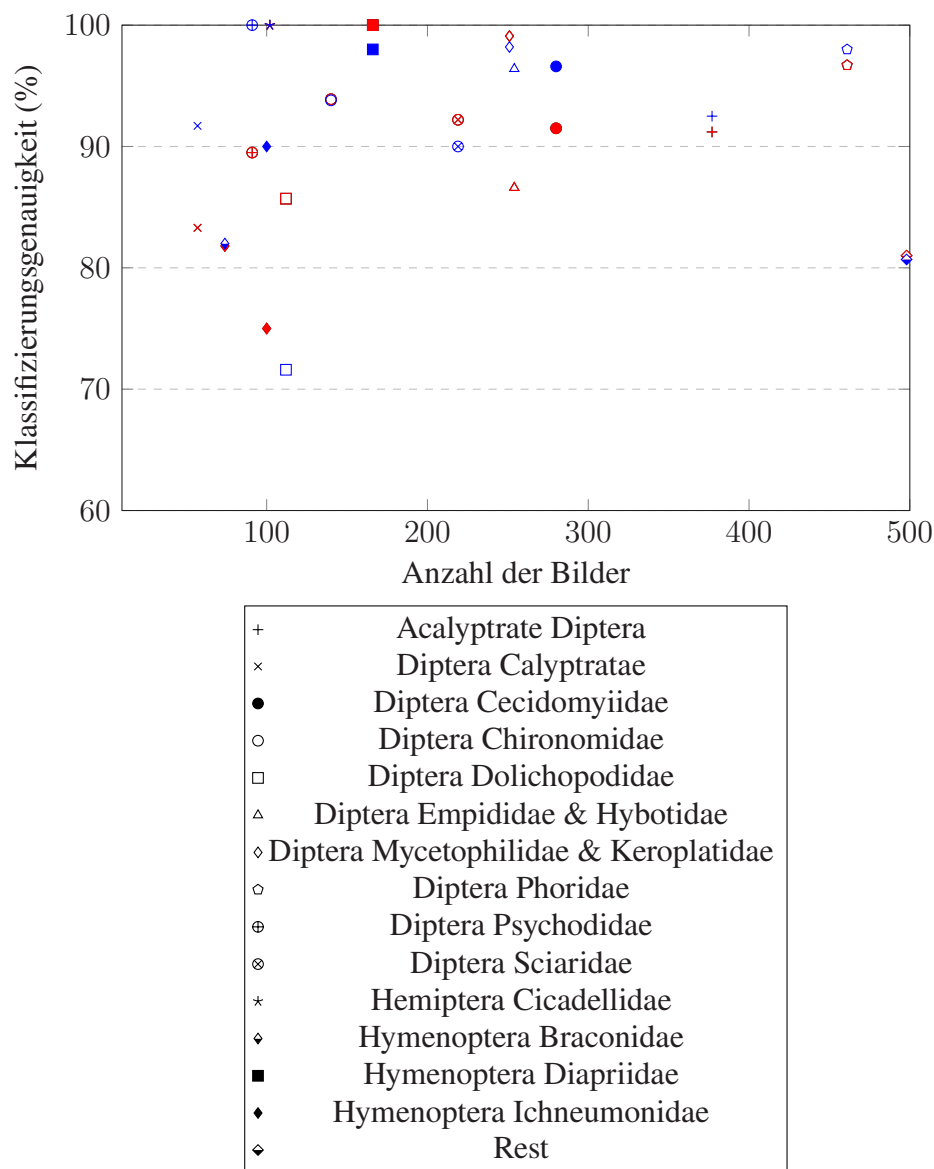
	Vorhergesagte Klassen <sub>ML</sub>													
	acalyprate Diptera	Diptera Calyptratae	Diptera Cecidomyiidae	Diptera Chironomidae	Diptera Dolichopodidae	Diptera Empididae & Hybotidae	Diptera Mycetophilidae & Keroplatidae	Diptera Phoridae	Diptera Psychodidae	Diptera Sciaridae	Hemiptera Cicadellidae	Hymenoptera Braconidae	Hymenoptera Diapriidae	Hymenoptera Ichneumonidae
acalyprate Diptera	0,925	0,034	0,000	0,000	0,007	0,007	0,000	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Calyptratae	0,000	0,917	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Cecidomyiidae	0,000	0,000	0,966	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Chironomidae	0,000	0,000	0,062	0,938	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Dolichopodidae	0,071	0,071	0,000	0,000	0,716	0,071	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Empididae & Hybotidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,964	0,018	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,009	0,000
Diptera Mycetophilidae & Keroplatidae	0,009	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,982	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Phoridae	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,980	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000
Diptera Psychodidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Diptera Sciaridae	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,011	0,022	0,000	0,000	0,900	0,000	0,000	0,000	0,000
Hemiptera Cicadellidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
Hymenoptera Braconidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,820	0,000	0,180
Hymenoptera Diapriidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,980	0,020
Hymenoptera Ichneumonidae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,900

Wahre Klassen<sub>ML</sub>

bestimmt und ist daher nicht enthalten. Die schlechtesten Ergebnisse werden für die Klassen<sub>ML</sub> *Diptera Dolichopodidae* (71,6 %) und *Hymenoptera Braconidae* (82,0 %) erreicht. Die höchste Genauigkeit erreichen die Klassen *Diptera Psychodidae* und *Hemiptera Cicadellidae* mit jeweils 100 %. Die Gesamtgenauigkeit über alle Klassen<sub>ML</sub> 14 errechnet sich zu 95,1 %. Der binäre Klassifikator zur Ausreißererkennung erzielt eine Genauigkeit von 80,69 %. Er erkennt dabei lediglich 63,95 % der Ausreißer korrekt, klassifiziert jedoch 97,44 % der Bilder, die Objekte der Zielklassen enthalten, korrekt als Nicht-Ausreißer.

## 9.4 Diskussion

Beide vorgestellten Methoden liefern hohe Genauigkeiten für die Klassifikation der Insekten der 14 Zielklassen. *Methode 1* berücksichtigt dabei alle Klassen<sub>ML</sub> inklusive der Restklasse in einem Modell. Dieses Vorgehen hat zur Folge, dass auch Objekte, welche eigentlich einer der Zielklassen zugeordnet gehören fälschlicherweise der Restklasse zugeordnet werden und umgekehrt. Im Hinblick auf die Klassifizierungsgenauigkeit des CNN nach *Methode 1* zeigt sich nur eine sehr schwache Korrelation zwischen der Anzahl der Trainingsbilder, der morphologischen Heterogenität und der Klassifizierungsgenauigkeit (vgl. Abbildung 9.3). Es gibt Klassen mit einer großen Anzahl von Trainingsbildern, die besser abschneiden als Klassen mit einer geringeren Anzahl (z. B. *Diptera Calyptratae*, 57 Trainingsbilder, 83 %; *Diptera Phoridae*, 461 Trainingsbilder, 97 %). Die höhere Genauigkeit für die Klasse<sub>ML</sub> *Diptera Phoridae* könnte auch auf eine höhere morphologische Einheitlichkeit zurückzuführen sein. Dies steht jedoch nicht im Einklang mit der Beobachtung einer vergleichsweise hohen Klassifizierungsgenauigkeit, die für die Restklasse erzielt wird, die die größte morphologische Heterogenität aufweist. Tatsächlich schneidet diese Klasse besser ab (81 %) als *Hymenoptera Ichneumonidae* (75 %). Ähnliche Ergebnisse sind bei den mit *Methode 2* resultierenden Ergebnissen zu beobachten. Hierbei wird für die Zielklassen eine höhere Gesamtgenauigkeit erreicht, was aufgrund der Reduktion der Anzahl an Klassen<sub>ML</sub> zu erwarten ist. Der binäre Klassifikator zur Erkennung von Ausreißern schneidet vergleichsweise schlechter ab und erkennt Ausreißer schlecht als solche. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass für das Training der gleiche Datensatz verwendet wird. Dies hat zur Folge, dass die beiden Klassen<sub>ML</sub> stark unterschiedlich viele Bilder beinhalten. Werden die Ergebnisse für die einzelnen Klassen beider Klassifikatoren betrachtet, fällt auf, dass für einige Klassen<sub>ML</sub> sehr ähnliche Ergebnisse erreicht werden (bspw. *Hemiptera Cicadellidae*: *Methode 1*, 100,0 %; *Methode 2*, 100,0 % oder *Diptera Phoridae*: *Methode 1*, 96,7 %; *Methode 2*, 98,0 %) während für andere Klassen<sub>ML</sub> starke Unterschiede erkennbar sind (bspw. *Diptera Dolichopodidae*: *Methode 1*, 85,7 %; *Methode 2*, 71,6 % oder *Hymenoptera Ichneumonidae*: *Methode 1*, 75,0 %; *Methode 2*, 90,0 %), für den Fall der Klasse *Hymenoptera Ichneumonidae* kann das eventuell auf das Wegfallen der Restklasse bei *Methode 2* zurückgeführt werden. Beim



**Abbildung 9.3:** Klassifizierungsgenauigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der Bilder für verschiedene Klassen und Klassifikatoren. Rot: Ergebnisse mit Klassifikator nach *Methode 1*, blau: Ergebnisse mit Klassifikator nach *Methode 2*. Modifiziert nach [49].

Vorgehen nach *Methode 1* werden 10 % fälschlicherweise der Restklasse zugeordnet, während ansonsten bei beiden Methoden ausschließlich der Klasse<sub>ML</sub> *Hymenoptera Braconidae* falsch zugeordnet wird. Für die Klasse<sub>ML</sub> *Diptera Dolichopodidae* ist dies nicht feststellbar. In diesem Fall findet bei Verwendung des Klassifikators nach *Methode 1* nur eine Verwechslung mit der Klasse<sub>ML</sub> *acalyptrate Diptera* statt, während der Klassifikator nach *Methode 2* häufig fälschlicherweise verschiedene andere Klassen<sub>ML</sub>, die Familien der Ordnung *Diptera* beinhalten, ausgibt. Hierfür ist anhand der Ergebnisse keine Erklärung findbar, kann aber ggf. darauf zurückgeführt werden, dass unterschiedliche Merkmale trainiert wurden.

Eine der noch offenen Fragen ist, ob CNNs ausreichend leistungsfähig sind, um Identifizierungen auf Artniveau für eng verwandte Arten zu ermöglichen und diese gleichzeitig von unbekannten Arten zu unterscheiden. Die größte Einschränkung wird wahrscheinlich die Anzahl, Qualität und Ausrichtung der Trainingsbilder sein. Abbildung 9.1 veranschaulicht das letztgenannte Problem. Insekten werden aus vielen verschiedenen Blickwinkeln aufgenommen, und für jedes dieser Bilder sind genügend Trainingsbilder erforderlich, bevor die CNNs eine realistische Chance haben, eine hohe taxonomische Auflösung zu erreichen. Eine Lösung für dieses Problem kann die Aufnahme der Insekten in vielen verschiedenen Positionen sein und kann bspw. mit dem DiversityScanner-360° (vgl. Kapitel 6) erreicht werden. Dies erfordert jedoch, dass zunächst viele tausende Massenproben ausgewertet, die Insekten darin fotografiert und anhand des *Deoxyribonucleic acid* (DNA)-Barcodes identifiziert werden. Die Vergrößerung der Datensätze ermöglicht dann die Implementierung neuer Methoden zur Klassifizierung und insbesondere auch die Verbesserung der Ausreißererkennung, welche zusätzlich zur reinen Klassifikation ein weiteres Forschungsfeld öffnet. Zudem müssen Lösungen gefunden werden, wie die Anzahl an Klassen<sub>ML</sub> erhöht werden kann, ohne die Größe der Modelle zu stark zu vergrößern.

# 10 Ermittlung morphometrischer Merkmale anhand von Bildern

Teile dieses Kapitels basieren auf:

- L. Wühl, C. Pylatiuk, M. Giersch, F. Lapp, T. von Rintelen, M. Balke, S. Schmidt, P. Cerretti, und R. Meier, „DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 22, Nr. 4, S. 1626–1638, 2022. doi: 10.1111/1755-0998.13567.

Zusätzlich zur Klassifizierung, der auf den Detailbildern abgebildeten Insekten, können die Bilder dafür verwendet werden, morphometrische Merkmale der Insekten zu bestimmen. Parameter wie bspw. die Länge der Insekten können dazu genutzt werden, um morphologische Veränderung der Tiere aufgrund äußerer Einflüsse festzustellen. Dazu ist es notwendig das Pixel-Längen-Verhältnis zu kennen, welches von der Kamera und der verwendeten Optik abhängt. Bei der Implementierung von Algorithmen ist daher darauf zu achten, dass die Umrechnung der Einheiten mit dem korrekten Faktor, abhängig vom Bildgebungssystem erfolgt. Zusätzlich zur Bestimmung der Länge ist die Biomasse der Insekten eine für entomologische Fragestellungen interessante Messgröße [19, 161]. Bei der Aufnahme von Bildern kann es sich dabei jedoch immer nur um eine Schätzung handeln, da die Dichte der Insekten nur angenommen werden kann. Besser geeignet könnte das Volumen der Insekten sein, welches ebenfalls zum Vergleich herangezogen werden kann. Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass bei 2D-Bildern die Tiefeninformationen im besten Fall nur approximiert werden können.

## 10.1 Stand der Technik zur Bestimmung der Biomasse und morphometrischer Merkmale

Die Bestimmung der Biomasse von Insekten erfolgt klassisch nicht insektenspezifisch, sondern für vollständige Massenproben. Hallmann et al. (2017) [19] beschreiben eine Methode, um vergleichbare Ergebnisse zur Bestimmung der Biomasse einer vollständigen Massenprobe zu erzielen. Die Insekten werden für drei Tage in Ethanol (80 %) gelagert und die Ethanolkonzentration stabilisiert. Anschließend wird die Probe mit einem Edelstahlsieb (10 cm Durchmesser, 0,8 mm Maschenweite) vom Ethanol getrennt und dann mit einer Laborwaage,

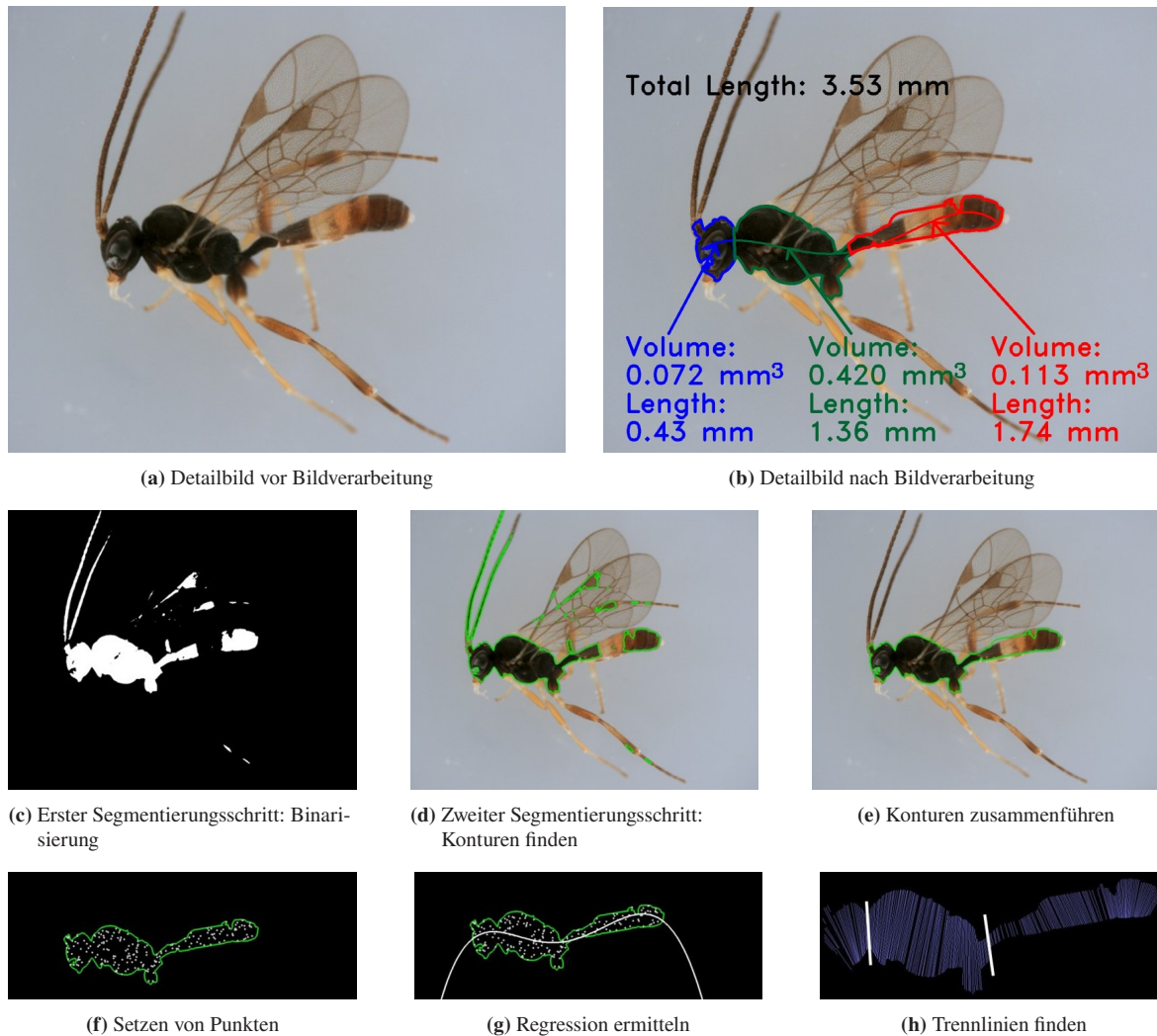
mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 g gewogen, sobald innerhalb von 10 Sekunden erstmals weniger als zwei Tropfen vom Sieb abtropfen.

Eine bildbasierte Methode beschreiben Ärje et al. (2020) [110]. Dabei bestimmen sie die Fläche der Insekten in den Bildern, die mit dem von ihnen entwickelten teilautomatisierten System (vgl. Kapitel 5.1) aufgezeichnet werden. Da das System mehrere Bilder der Insekten beim Herabsinken in einer Küvette aufnimmt, wird der Mittelwert über alle Bilder eines Insekts gebildet. Zur Bestimmung des Flächen-Massen Verhältnisses, werden fotografierte Insekten drei verschiedener Arten für 48 h bei 70 °C getrocknet und anschließend mit einer Waage mit einer Auflösung von 0,1 mg gewogen. Die Erzeugung eines generalisierten Modells für alle drei Arten ist nicht zielführend, daher entwickeln Ärje et al. [110] Modelle für die einzelnen Arten. Die Verwendung von Modellen zur Approximation der Trockenbiomasse aus einfachen Messwerten, wie der Länge der Insekten wird schon seit längerem eingesetzt [162–165] und zeigt, dass zusätzlich zur Fläche auch die Körperlänge ein wichtiger Messwert ist, welcher aus den Bildern abgeleitet werden sollte. Zur Bestimmung der Körperlänge kommen nach Stand der Technik einfache, manuelle Methoden zum Einsatz. Bspw. wird eine Petrischale mit der Probe auf Millimeterpapier platziert und die Länge abgelesen [164] oder die Insekten (> 5 mm) werden mit Messschiebern, kleinere Insekten mit einem Okularmikrometer auf einem Mikroskop vermessen [166].

## 10.2 Material und Methoden

Zur Messung der Länge und Schätzung des Volumens eines jeden Insekts sind mehrere Bildverarbeitungsvorgänge erforderlich. Zunächst wird die Kontur mit morphologischen Operatoren bestimmt. Es werden nur die Flächen ausgewählt, die einen Mindestwert aufweisen, um zu vermeiden, dass sehr dünne Strukturen (Flügel oder Staub) fälschlicherweise als zum Körper gehörig angesehen werden. Wird mehr als eine Fläche gefunden (z. B. zwei Körperteile desselben Insekts, die durch einen hellen Bereich getrennt sind), werden sie miteinander verbunden, sodass nur eine Kontur entsteht. Innerhalb dieser Kontur werden Punkte nach dem Zufallsprinzip platziert und dann zur Erstellung einer Regression verwendet. Dabei erhöht eine größere Anzahl von Punkten die Genauigkeit der Regression und die Präzision der Schätzung. Um die Trennlinien zwischen den Körperteilen (d. h. Kopf, Thorax/Mesosoma, Abdomen/Metasoma) zu finden, werden gerade Linien im rechten Winkel zu und entlang der Regressionslinie gelegt. Es werden nur die Punkte einer Linie verwendet, die innerhalb der Kontur liegen. Anschließend wird die Trennlinie zwischen Kopf und Thorax bzw. zwischen Thorax und Abdomen durch Untersuchung der Längenveränderungen bestimmt. Um das Volumen eines Exemplars zu schätzen, wird eine gerade Linie durch jedes Körperteil gezogen. Anschließend werden zusätzliche senkrechte Geraden gezeichnet, die innerhalb der Körperkontur liegen müssen. Aus dem Abstand und der Länge der Geraden wird dann scheibenweise

das Volumen ermittelt. Die Längen und Volumina des Insekts können im Originalbild dargestellt und gespeichert werden. Abbildung 10.1 zeigt ein Beispiel für ein Detailbild (a) vor und (b) nach der Volumenschätzung sowie die erforderlichen Schritte (c) - (h). Alle Bildverarbeitungsschritte sind in Python (Version 3.8) implementiert.



**Abbildung 10.1:** Schritte der Bildverarbeitung zur Volumenschätzung von Insekten mit den Entomoscoptes und dem DiversityScanner. Modifiziert nach [49].

## 10.3 Evaluation und Diskussion

Die vorgestellte Methode wird auf dem DiversityScanner implementiert [49]. Das Pixel-Längen Verhältnis ist demnach immer bekannt ( $10,5 \mu\text{m}$  pro Pixel) und ändert sich nicht. Die Methode soll die Möglichkeit der Gewinnung morphometrischer Merkmale aus den Detailbildern verdeutlichen. Die Bestimmung der Länge ist stark von der erkannten Kontur abhängig. Demzufolge muss die Erkennung der Kontur bzw. auch einzelner Körperteile (bspw. Kopf,

Thorax/Mesosoma, Abdomen/Metasoma) als Voraussetzung betrachtet werden, um exakte Messungen an den Insekten durchführen zu können. Die vorgestellte Methode nutzt klassische Schwellwertverfahren, um die Konturen zu erkennen. Alternativ wäre auch eine Segmentierung mit Methoden des maschinellen Lernens denkbar. Diese würden jedoch wiederum einen Datensatz mit entsprechenden Labels voraussetzen. Zusätzlich ist zu erwarten, dass aufgrund der großen phänotypischen Unterschiede der Insekten für gute Ergebnisse ein relativ großer Datensatz notwendig ist. Da nicht alle Arten eine eindeutige Trennlinie zwischen den Körpersegmenten aufweisen, können einige Trennlinien falsch gesetzt werden und müssen manuell angepasst werden, bevor das Gesamtvolumen bestimmt werden kann. Derzeit funktionieren die Volumenschätzungen am besten für Körperteile, die rotationssymmetrisch sind, d. h. die Methode funktioniert besser bei Insekten mit rotationssymmetrischer Morphologie (z. B. bei vielen Hymenopteren). Aufgrund der sehr geringen Größe der Insekten ( $< 3$  mm) ist eine Bestimmung des Volumens zur Evaluation der Methode sehr aufwendig. Wird die Annahme getroffen, dass alle Bilder auf die gleiche Weise verarbeitet werden, kann jedoch eine relative Veränderung festgestellt werden. Für genauere Ergebnisse muss eine Aufnahme aus mehreren Perspektiven, bspw. mit dem DiversityScanner-360° erfolgen. Idealerweise wird anhand der Bilder ein 3D-Modell errechnet, was eine wesentlich genauere Bestimmung des Volumens zulassen würde. Weiterhin können zukünftig eventuell bei Verwendung der Entomoscoptes oder des DiversityScanner 4K die in den Fokusebenen (FE) enthaltenen Tiefeninformationen als mögliche Quelle zur genaueren Bestimmung der dreidimensionalen Konturen herangezogen werden.

# 11 Zusammenfassung und Ausblick

Der Rückgang der Biodiversität, insbesondere bei Insekten, stellt eine große Herausforderung dar. Obwohl Insekten einen Großteil der Biomasse und Artenvielfalt ausmachen und eine wichtige Rolle in Ökosystemen spielen, sind viele Arten (ca. 80 %) noch unbekannt [2] und falls sie bekannt sind, können sie nur von wenigen Expert:innen sicher identifiziert werden. Dies gilt insbesondere für die sogenannten '*dark taxa*', kleine Insekten, von denen mehr als 90 % der Arten noch nicht beschrieben sind [15]. Um die Biodiversität effektiv zu schützen, sind schnelle, einfache und kostengünstige Methoden zur Bestimmung von Insektenarten, insbesondere aus *dark taxa*, dringend erforderlich. Hierbei kann die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Biologie, Ingenieurwesen und Informatik hilfreich sein. Nach Stand der Forschung werden zur Überwachung der Insektenpopulationen standardisierte Fallen wie Malaise Fallen oder Schalenfallen verwendet. Mit Malaise Fallen können an einem Tag über 3.000 Insekten gefangen werden, die anschließend in Ethanol (80 %) konserviert werden. Die vollständige Auswertung dieser Fallen ist noch nicht in angemessener Zeit und für eine breit angelegte Untersuchung der Biodiversität unter Insekten möglich (vgl. Kapitel 1). Dies liegt unter anderem auch daran, dass es einen Mangel an Expert:innen gibt, die überhaupt in der Lage sind, die Insekten zu klassifizieren. Zudem spezialisieren sich Entomolog:innen häufig auf bestimmte Gruppen, weswegen zur Auswertung einer Massenprobe mehrere Expert:innen notwendig sind. Dies wiederum verlangsamt die Auswertung.

Die vorliegende Dissertation beantwortet drei Forschungsfragen (F1 - F3) und fokussiert sich zu Beginn auf die Beantwortung von F1: Wie kann Automatisierung die Biodiversitätsforschung bei wirbellosen Tieren unterstützen, welche Methoden eignen sich dafür und welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein? Die vorliegende Dissertation identifiziert drei Bereiche, die von einer Automatisierung stark profitieren würden. Der erste Bereich ist die Vereinzelung, Handhabung und Sortierung von Insekten in Massenproben. Die Insekten in den Proben haben unterschiedliche Phänotypen und variieren stark in ihrer Größe, von weniger als einem Millimeter bis zu mehreren Zentimetern, was die automatisierte Vereinzelung und Handhabung zu einer großen Herausforderung macht. Da die unterschiedlichen Phänotypen der Insekten nicht beeinflussbar sind, wird eine Vorsortierung nach Größe als mögliche Maßnahme identifiziert, um die nachfolgenden Prozessschritte der Vereinzelung und Handhabung zu vereinfachen. Zu diesem Zweck werden vier Größenklassen definiert. Diese umfassen Insekten < 3 mm, Insekten 3 mm - 8 mm, Insekten 8 mm - 15 mm und Insekten > 15 mm. Es zeigt sich, dass Insekten der ersten Größenkategorie (< 3 mm) einen Großteil der Insekten

in den Fallen ausmachen und daher erste Schritte zur Automatisierung der Auswertung sich auf diese Größenkategorie konzentrieren sollten. Darüber hinaus wird die Bildgebung der Insekten als notwendiger Schritt zur automatisierten Bearbeitung von Insekten-Massenproben identifiziert. Digital verfügbare Bilder der Insekten eröffnen viele Möglichkeiten zur Untersuchung der Proben und bieten zudem den Vorteil, dass die Auswertung der Fallen unabhängig von den physischen Proben erfolgen kann. Dies betrifft z. B. den dritten identifizierten Bereich, die Klassifizierung der Insekten. Ist diese anhand der Bilder sicher möglich, kann die Auswertung von Massenproben sehr schnell erfolgen. Vorausgesetzt, die Bilder der einzelnen Insekten können mit effizienten Methoden teilautomatisiert oder automatisiert erstellt werden, wozu zunächst genügend Trainingsdaten mit entsprechenden Labels benötigt werden. Die Bereiche Bildgebung und Klassifizierung sind somit direkt miteinander verknüpft, während die Handhabung je nach Automatisierungsgrad notwendig sein kann, aber nicht muss. Systeme, die zur Automatisierung der Auswertung von Insekten-Massenproben entwickelt werden, müssen einfach und kostengünstig zugänglich sein, um eine wirklich breite Anwendung zu finden. Hierfür bieten sich *Open Source Software* (OSS) und *Open Source Hardware* (OSH) an. Indem alle Entwicklungen und Fortschritte ohne finanzielle Hürden frei zugänglich publiziert werden (*Open Science*) und mit den Publikationen auch Bauanleitungen, Stücklisten, Software sowie die notwendigen Modelle veröffentlicht werden, können alle Systeme mit minimalen Kosten nachgebaut werden. Dies setzt jedoch voraus, dass der Aufbau der Systeme auch von technischen Laien durchgeführt werden kann, die Funktionsweise also leicht nachvollziehbar ist, die Dokumentation für die Zielgruppe (in diesem Fall Entomolog:innen bzw. Biolog:innen) erfolgt und bei nicht kommerziell erhältlichen Teilen auf weit verbreitete und einfache Fertigungstechniken geachtet wird. Da 3D-Drucker immer günstiger und leistungsfähiger werden und in vielen wissenschaftlichen Einrichtungen bereits vorhanden sind, bieten sich 3D-gedruckte Bauteile für die Umsetzung an. Als Voraussetzung für eine automatisierte Probenverarbeitung und zur Erleichterung der Bedienung teilautomatisierter Systeme sollten die Insekten-Massenproben vorverarbeitet werden. Insbesondere die Vorsortierung der Insekten nach Größe kann die nachfolgenden Prozessschritte vereinfachen. Teil I der vorliegenden Dissertation fokussiert sich auf die Vorsortierung der Proben. Dazu wird der Stand der Forschung ausgewertet. Die Literaturrecherche ergibt, dass lediglich ein System zur Größenvorsortierung von Massenproben aus Malaise Fallen publiziert wurde, welches in zwei Größenklassen fraktioniert, die sich aus der Verwendung eines Küchensiebes mit fester Lochgröße ergeben [89]. Da die Möglichkeit der Fraktionierung in mehr als zwei Größenklassen die Automatisierung weiter vereinfachen würde, wird ein System vorgestellt, welches Aluminium Lochbleche nutzt, um die Insekten zu fraktionieren. Dazu wird statt einer horizontalen Bewegung auf einem Orbitalschüttler wie bei Buffington und Gates (2008) [89] eine vertikale Bewegung mit einer einfachen Linearachse realisiert. Die Aluminiumlochbleche werden in einen Siebbehälter gelegt, der mit der Probe gefüllt wird. Dieser wird dann mit der Linearachse wiederholt in einen mit Wasser gefüllten Behälter eingetaucht. Beim Herausheben werden die Insekten ausgespült. Das System eignet sich zur Fraktionierung in

viele Fraktionen unterschiedlicher Probengröße, wenn Lochbleche mit verschiedenen Perforationsgrößen verwendet werden. Diese sind kommerziell günstig erhältlich. Eine quantitative Auswertung der Ergebnisse steht derzeit noch aus. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine klare Fraktionierung stattfindet. Das System basiert ausschließlich auf leicht verfügbaren und 3D-gedruckten Komponenten und bietet somit eine einfache und leicht reproduzierbare Lösung zur Fraktionierung von Insekten-Massenproben. Dies schafft die Grundlage für die Implementierung von Bildgebungs- und Handhabungssystemen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Beantwortung von F2: Wie können teilautomatisierte Systeme die Biodiversitätsforschung an Wirbellosen Tieren unterstützen? Dazu wird eine Literaturrecherche durchgeführt, die zeigt, dass es nach aktuellem Stand der Forschung kein leicht reproduzierbares, kostengünstiges und anpassbares System zur Bildgebung von Insekten in Ethanol gibt. Ein solches teilautomatisiertes System, das die Bildaufnahme und Datenverarbeitung automatisiert, aber erfordert, dass die Insekten einzeln und manuell vor der Kamera platziert werden, kann bereits einen erheblichen Beitrag zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung an Insekten leisten. Es bietet die Möglichkeit, mit minimalem Aufwand standardisierte Bilder zu erzeugen, um Datensätze für das Training neuronaler Netze zu generieren. Dazu werden in dieser Dissertation zwei Systeme vorgestellt, die die definierten Anforderungen erfüllen. Das 'Entomoscope' ist ein einfach zu reproduzierendes, nahezu vollständig 3D-druckbares, teilautomatisiertes Bildgebungssystem. Es werden zwei Versionen des Entomosopes vorgestellt, die beide die Möglichkeit bieten, hochauflösende Bilder (12 Megapixel (MP)) von in Ethanol konservierten Insekten aufzunehmen. Um Proben unterschiedlicher Größe aufnehmen zu können, besitzen sie eine standardisierte Objektivaufnahme (C-/Cs-Mount), an der Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungen befestigt werden können. Zusätzlich verfügen sie über einen *Focus Stacking* Mechanismus zur Aufnahme von Bildern mit erweiterter Schärfentiefe und eine in beiden Versionen gleiche Objektbeleuchtung zur Aufnahme einheitlicher Bilder. Die beiden Versionen des Entomosopes unterscheiden sich in der Implementierung des zentralen Steuerelements. Das 'Standalone Entomoscope' verwendet einen Einplatinencomputer (Raspberry Pi 4) und verfügt über einen Monitor. Dadurch ist das System eigenständig und benötigt außer einem Netzteil oder Akku keine externe Hardware zum Betrieb. Das 'Plug-In Entomoscope' hingegen muss an einen Laptop oder *Personal Computer* (PC) angeschlossen werden, ist aber kostengünstiger und schneller. Zusätzlich zur Bildgebung aus einer Perspektive mit dem Entomoscope wird in Teil II der vorliegenden Dissertation eine Methode zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol entwickelt. Durch die steigenden Anforderungen an ein solches System, im Vergleich zu einem Bildgebungssystem aus einer Perspektive, wie dem Entomoscope, fokussiert sich die Methodenentwicklung auf die in Malaise Fallen Massenproben am häufigsten vorkommende Größenkategorie, von Insekten  $< 3$  mm [49]. Eine Übertragung der Methode auf größere Insekten ist durch Skalierung des Systems denkbar, wird aber im Umfang der

vorliegenden Dissertation nicht untersucht. Das entwickelte System nutzt eine mit Ethanol gefüllte Bildgebungszelle aus Aluminium, welche um ein Glasröhrchen rotiert und zur Kamera hin mit einer Glasplatte verschlossen ist. Das Glasröhrchen ist zur Bildgebungszelle hin abgedichtet und durch das Sichtfenster in der Bildgebungszelle für die darüber platzierte Kamera sichtbar. Das zu fotografierende Insekt wird mit einer Spritzenpumpe im Bildgebungsbereich im Glasröhrchen platziert. Die Verwendung der mit Ethanol gefüllten Bildgebungszelle ist entscheidend, um die Brechung an der runden Oberfläche des Glasröhrchens zu minimieren.

Die Forschungsfrage F3 (Welche Vor- und Nachteile bieten automatisierte Systeme und welche Möglichkeiten zur Implementierung bestehen?) wird in Teil III untersucht. Dazu wird ein automatisiertes System zur Handhabung, Bildgebung und Klassifizierung von in Ethanol konservierten Insekten ( $< 3$  mm) entwickelt. Dieses automatisierte System, der 'Diversity-Scanner' erkennt in einer 120 mm x 120 mm großen, quadratischen Petrischale Insekten. Dafür nutzt er eine Übersichtskamera, die bei Hintergrundbeleuchtung Bilder der Petrischale aufnimmt. Die erkannten Objekte werden anhand von zwei Bedingungen in sortierbar oder nicht sortierbar eingestuft. Zunächst wird die Größe ermittelt, zu große Insekten ( $> 3$  mm) werden als nicht sortierbar eingestuft. Insekten geeigneter Größe müssen einen Mindestabstand zu weiteren Insekten aufweisen, um als sortierbar zu gelten. Anschließend wird eine Detailkamera über sortierbaren Insekten platziert, dazu wird eine Portalkinematik genutzt und ein Detailbild des Insekts angefertigt. Bei der Detailkamera handelt es sich entweder um eine 1,3 MP Kamera ohne oder eine 12 MP Kamera mit *Focus Stacking*. Die unterschiedlichen Detailkameras sind austauschbar und für verschiedene Anwendungsfälle vorgesehen. Das angefertigte Detailbild kann, wie die Bilder der Entomoscoptes, zur Klassifizierung genutzt werden. Im letzten Prozessschritt wird das fotografierte Insekt in eine 96er Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Mikrotiterplatte transportiert. Dazu wird eine, mit einer Spritzenpumpe angetriebene, automatisierte Pipette genutzt, die mit derselben Portalkinematik wie die Detailkamera bewegt wird. Das Handhabungswerkzeug sowie die Vergrößerung der Detailkamera sind die limitierenden Faktoren für die Maximalgröße der verarbeitbaren Insekten. Eine Anpassung der Vergrößerung ist mit einem anderen Objektiv problemlos möglich. Herausfordernd gestaltet sich die Entwicklung eines geeigneten Handhabungswerkzeugs für größere Proben. Im DiversityScanner wird als Saugspitze eine gekürzte Pipettenspitze verwendet. Die Evaluation zeigt, dass eine erfolgreiche Handhabung damit nur in 62 % der Fälle möglich ist. Die Fehleranalyse zeigt weiterhin, dass eine zu schwache Spritzenpumpe und somit ein zu geringer Volumenstrom beim Einsaugen, sowie die konische Form der Pipettenspitze beim Ablegen Mitursache für dieses Ergebnis sein können. Die Verwendung einer leistungsstärkeren Spritzenpumpe und einem Glasröhrchen mit parallel verlaufenden Wänden als Saugspitze erhöhen die Erfolgsrate auf 91 %. Vorversuche zeigen, dass mit dieser Modifikation und bei Vergrößerung des Saugspitzendurchmessers Insekten bis 6 mm gehandhabt werden können. Zusätzlich wird ein pneumatischer Mikrogreifer für größere Insekten entwickelt und evaluiert. Der Greifer besteht aus einer Membran mit darauf befindlichen Fingern. Durch Erhöhen des

Drucks auf der Innenseite und einer daraus resultierenden konvexen Verformung der Membran, öffnen sich die Finger. Die Reduktion des Drucks führt gegenteilig zu einem Schließen. Die Evaluation zeigt, dass sich der Greifer mit einem Membrandurchmesser von 45 mm und den dreieckig angeordneten, jeweils 3 mm starken und 15 mm langen Fingern zur Handhabung von Insekten ab einer Größe von 8 mm bis 15 mm eignet. Die Vorteile eines automatisierten Systems, wie dem DiversityScanner, liegen vor allem in der Parallelisierbarkeit und der damit erreichbaren hohen Durchsatzrate, ohne die Notwendigkeit von mehr Personal. Einer der größten Nachteile hingegen ist die steigende Kompliziertheit im Vergleich zu teilautomatisierten Systemen. Diese führt dazu, dass die Idee, dass die Systeme zur Biodiversitätsforschung, von Forschenden der Zielgruppe selbst nachgebaut werden, weniger angenommen wird.

Übergreifend über beide Forschungsfragen F2 und F3, wird die Verwendung, der mit den teilautomatisierten oder automatisierten Systemen generierten Bildern, entsprechend des unter F1 identifizierten Potenzials zur Klassifizierung in Teil IV untersucht. Dazu wird exemplarisch ein Datensatz mit dem DiversityScanner aufgenommen, der 5083 Bilder aus 14 verschiedenen Klassen<sub>ML</sub>, meist auf Familienebene und eine Restklasse beinhaltet. Es werden zwei Methoden verglichen. Die erste Methode nutzt die VGG19-Architektur und unterscheidet alle Klassen mit einem Netzwerk, während für die zweite Methode ein kaskadierter Ansatz mit zwei Resnet-50-Encodern gewählt wird. Beide Methoden liefern hohe Genauigkeiten (> 90 %) und zeigen, dass die Bilder dazu genutzt werden können, die Insekten anhand von Bildern zu klassifizieren. Dies stellt jedoch nur einen ersten Schritt in die richtige Richtung dar, da der Klassifikator nur die 14 am häufigsten auftretenden Familien berücksichtigt. Eine Klassifikation auf Gattungs- oder sogar Artniveau muss zukünftig erforscht werden. Zusätzlich untersucht Teil IV, ob sich die aufgenommenen Bilder zur Bestimmung morphometrischer Merkmale der Insekten eignen. Dazu wird eine Methode entwickelt, die zunächst die Kontur der Tiere im Bild bestimmt und anschließend die Gesamtlänge sowie die Länge einzelner Körperregionen erlaubt. Zusätzlich kann eine Schätzung des Volumens vorgenommen werden, indem die Annahme getroffen wird, dass das Insekt in Segmenten einen zylindrischen Querschnitt aufweist.

Der zukünftige Fokus zur Automatisierung der Biodiversitätserforschung bei Wirbellosen sollte sich verstärkt auf die Generierung von Datensätzen zur Klassifizierung konzentrieren. Die vorgestellten Methoden bieten hierzu eine vielversprechende Grundlage. Diese Datensätze können anschließend verwendet werden, um neuronale Netze zu trainieren, die einen Großteil der in Insekten-Massenproben enthaltenen Arten anhand von Bildern klassifizieren können. Diese können dann auf den Entomoscoptes eingesetzt werden, um schnell und ohne die Notwendigkeit von Expert:innen eine Vorsortierung von Massenproben zu ermöglichen. Zudem bieten die Entomoscoptes dann die Möglichkeit mobil und ohne der Notwendigkeit einer Internetverbindung zur Detektion neuer Arten eingesetzt zu werden. Weiterhin können automatisierte Systeme wie der DiversityScanner gezielt eingesetzt werden, um unbekannte

Arten zu identifizieren und aus den Massenproben zu separieren. Durch den parallelen Einsatz mehrerer DiversityScanner und der Verwendung skalierter Systeme kann so zukünftig ein automatisiertes Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung unbekannter Arten realisiert werden. Dies ermöglicht eine schnellere Schließung von Wissenslücken und die Implementierung geeigneter Gegenmaßnahmen zur Bekämpfung des Rückgangs der Biodiversität unter Insekten.

Alle in der vorliegenden Dissertation präsentierten Methoden zur automatisierten Erforschung der Biodiversität unterstützen die Auswertung von Insekten-Massenproben und beschleunigen diesen Prozess erheblich. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da bereits zahlreiche solcher Proben vorhanden sind und bisher keine effiziente Möglichkeit besteht, die Biodiversität unter Insekten zu erfassen, ohne diese einzufangen und zu konservieren. Es ist jedoch auch wichtig, dass sich die zukünftige Forschung auf Systeme zur Überwachung der Biodiversität konzentriert, die keinen direkten Eingriff in Ökosysteme erfordern, damit bspw. Nützlinge wie Bestäuber nicht im Ethanol verenden. Die bildbasierte Klassifizierung von Insekten bietet hierfür großes Potenzial. Idealerweise sollten die mit den vorgestellten Systemen generierten Bilder auch auf lebende Insekten übertragbar sein, sodass beispielsweise der Fangbehälter einer Malaise Falle durch eine Kamera ersetzt werden kann und die Klassifizierung direkt anhand des Bildes erfolgt.

# A Anhang

Der Anhang umfasst detaillierte Anforderungen an die im Umfang dieser Dissertation entwickelten Systeme zur Automatisierung der Biodiversitätsforschung unter Insekten. Einige Anforderungen werden an alle Systeme gestellt und werden daher in Tabelle A.1 aufgeführt.

**Tabelle A.1:** Systemübergreifende detaillierte Anforderungen an Systeme zur Automatisierung der Erforschung der Biodiversität unter Invertebraten.

Systemübergreifende Anforderungen	
Sicherheit	Es darf zu keinem Zeitpunkt Gefahr für den oder die Anwender:in durch Gebrauch des Systems bestehen.
Unversehrtheit der Proben	Das System muss so gestaltet werden, dass die Proben durch das System nicht beschädigt werden. Zudem muss sichergestellt werden, dass die Probe durchgängig in Flüssigkeit verbleibt, um ein Austrocknen zu verhindern.
<i>Open Source</i>	Alle Komponenten des Systems sollen <i>Open Source</i> sein. Das beinhaltet sowohl die Hardware als auch die Software. Dies dient wiederum der Verfügbarkeit des Systems und unterstützt zudem weitere Anforderungen wie die <i>Anpassbarkeit</i> und <i>Reproduzierbarkeit</i> .
Reproduzierbarkeit	Das System soll möglichst leicht reproduzierbar sein. Daher ist die Verwendung aufwendiger und teurer Fertigungsmethoden zu reduzieren und Methoden der schnellen Prototypenentwicklung wie 3D-Druck und insbesondere <i>Fused Deposition Modeling</i> (FDM) 3D-Druck sind zu bevorzugen.
Anpassbarkeit	Das System soll möglichst anpassbar sein. Dies beinhaltet die Anpassbarkeit der Funktionalität, als auch die Anpassbarkeit an äußere Rahmenbedingungen, wie die Verfügbarkeit bestimmter Komponenten.
Stromversorgung	Das System muss mit 12 V - 24 V Gleichspannung betrieben werden. Diese wird über ein ausreichend dimensioniertes Steckernetzteil bereitgestellt. Die Dimensionierung ist abhängig von den verwendeten Komponenten.

## A.1 Anforderungen an ein System zur Größenvorsortierung von Insekten-Massenproben in Ethanol

Der Stand der Technik zeigt, dass das Sieben der Massenproben in Wasser grundsätzlich und mit hoher Effizienz möglich ist. Der von Buffington und Gates [89] entwickelte *Fractionator* ist aufgrund des verwendeten Küchensiebs jedoch auf zwei Fraktionen begrenzt und kann nicht angepasst werden. Das zu entwickelnde System soll daher ebenfalls Siebe zur Fraktionierung nutzen, jedoch anpassbare Größenfraktionen ermöglichen. Die Anforderungen sind in Tabelle A.2 dargelegt.

**Tabelle A.2:** Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines Systems zur Größenvorsortierung von Insekten-Massenproben unter Verwendung von Sieben zur Fraktionierung.

<b>Zielsetzung und Zweck</b>	
Vorsortierung von Massenproben	Hauptziel des Forschungsprojekts ist die Entwicklung eines Systems zur Vorsortierung von nass konservierten Insekten-Massenproben in definierte Größenkategorien.
Vereinfachung weiterer Verarbeitungsschritte	Die Vorsortierung dient primär der Vereinfachung weiterer Verarbeitungsschritte. Sie ermöglicht eine Reduktion der Anforderungen an Systeme, bspw. zur Bildgebung und Handhabung, da sie spezifisch für definierte Größenklassen entwickelt werden können. Weiterhin unterstützt die Größenvorsortierung auch eine Vereinfachung biologischer Fragestellungen, wenn bspw. nur Insekten einer Familie untersucht werden sollen, die eine bestimmte Größe nicht über- oder unterschreiten.
<b>Funktionalität</b>	
Größenklassen	Das System soll Insekten-Massenproben in alle definierten Größenklassen (vgl. Kapitel 2.2) fraktionieren können. Diese sind: < 3 mm, 3 mm - 8 mm, 8 mm - 15 mm und > 15 mm.
Effizienz	Das System soll möglichst effizient sein. Es sollen mindestens 90 % aller Insekten einer Größenfraktion auch in dieser vorzufinden sein.
<b>Hardwareanforderungen</b>	
Hardwareanforderungen: Mechanik	
Aufbau Siebe	Das System muss über geeignete Siebe verfügen, die mit geringem Aufwand getauscht werden können, um die Fraktionierung in die definierten Größenklassen zu ermöglichen.

Überführung der Probe	Die Überführung der Insekten zwischen den einzelnen Sieben muss einfach erfolgen können.
Siebbewegung	Das System muss eine geeignete Bewegung realisieren, um mit den ausgewählten Sieben eine effiziente Fraktionierung zu ermöglichen.
<b>Hardwareanforderungen: Elektronik</b>	
Steuerung	Die Steuerung des Systems soll möglichst einfach und kostengünstig sein. Die Verwendung eines Mikrocontrollers mit geeigneter Peripherie wird angestrebt.
Ein-/Ausgabe	Die Eingabe der notwendigen Parameter soll über einfache Drehregler oder Schalter erfolgen. Die Verwendung eines Touchscreens wird ausgeschlossen, da Anwender:innen ggf. Handschuhe tragen und nasse Hände haben können. Der Status des Systems soll entweder über ein Display oder über eine <i>Status-Light Emitting Diode</i> (LED) angezeigt werden.
<b>Softwareanforderungen</b>	
Programmierung	Die Programmierung erfolgt abhängig von der Plattform in der dafür geeigneten Programmiersprache und hängt direkt von der Hardwareanforderung (Elektronik): <i>Steuerung</i> ab.
Benutzerinteraktion	Die Software soll eine <i>Graphical User Interface</i> (GUI) aufweisen, wenn ein Display verwendet wird. Bei Verwendung einer Status-LED kann darauf verzichtet werden. Die LED muss dann jedoch durch Farbe oder Blinken den Status des Systems eindeutig anzeigen. Diese Anforderung hängt direkt von der Hardwareanforderung (Elektronik): <i>Ein-/Ausgabe</i> ab.
Eingabeparameter	Die Anzahl der Eingabeparameter soll gering sein, um die Bedienung des Systems möglichst intuitiv zu gestalten. Die Geschwindigkeit der Siebbewegung sowie ein Pausieren des Programms sollen jedoch mindestens möglich sein.
<b>Weitere Anforderungen</b>	
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 500 € nicht übersteigen.
Zeit	Die Verarbeitungszeit pro Probe soll möglichst kurz sein, 2 h aber nicht überschreiten.

Materialien	Die verwendeten Materialien müssen mit den im System vorliegenden Flüssigkeiten kompatibel sein. Dabei handelt es sich primär um Wasser. Da die Proben jedoch in Ethanol gelagert werden, wird auch eine Ethanolbeständigkeit vorausgesetzt.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten.

## A.2 Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur Bildgebung von Invertebraten in Ethanol

Die für das teilautomatisierte System zur Bildgebung von Invertebraten in Ethanol zu erfüllenden Anforderungen sind in Tabelle A.3 aufgeführt.

**Tabelle A.3:** Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur Bildgebung von Insekten in Ethanol.

Zielsetzung und Zweck	
Bildgebung in Ethanol	Hauptziel des Forschungsprojekts ist die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur Bildgebung von wirbellosen Tieren (Invertebraten) in Ethanol.
Digitalisierung	Die Bildgebung von Invertebraten, insbesondere von Insekten und damit deren Digitalisierung bietet viele Möglichkeiten, wie bspw. die Klassifizierung oder Bestimmung morphometrischer Merkmale. Die Bilder sollen dazu einheitlich und kostengünstig aufgenommen werden können.
Funktionalität	
Bildgebung	Das System soll für Insekten aller definierten Größenklassen (vgl. Kapitel 2.2; < 3 mm, 3 mm - 8 mm, 8 mm - 15 mm und > 15 mm) geeignet sein und diese bildfüllend abbilden können. Dazu müssen die verwendeten Objektive austauschbar sein oder über einen optischen Zoom verfügen, um eine gleichbleibend hohe Auflösung der Bilder zu gewährleisten. Für die letzte Größenkategorie (> 15 mm) wird eine Beschränkung auf maximal 40 mm festgelegt. Größere Insekten sind in Malaise Fallen Proben nur sehr selten vertreten [20].

Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten aller Größenklassen (vgl. <i>Probengröße</i> ) vollständig und in allen Bereichen scharf abbilden zu können. Dazu muss die Möglichkeit zum automatisierten Aufnehmen unterschiedlicher Fokusebenen (FE) ermöglicht werden. Dies garantiert, dass unabhängig vom verwendeten Objektiv und dessen optischen Eigenschaften alle Bereiche der Insekten scharf abgebildet werden können.
Teilautomatisiert	Das System soll nach der in der Übersicht zu Teil II gegebenen Definition teilautomatisiert sein: <i>Ein System wird als teilautomatisiertes System zur Bildgebung definiert, wenn die abzubilden- den Objekte zwar manuell und einzeln zur Bildgebung vor der Kamera platziert werden müssen, die Bildaufnahme und das Datenmanagement, sowie die Bildverarbeitung anschließend jedoch automatisiert ablaufen.</i>
<b>Hardwareanforderungen</b>	
Hardwareanforderungen: Mechanik	
Linearführung	Das System muss eine Linearführung besitzen, auf der die Kamera zum Objekt hin und weg bewegt werden kann, um bei fester Brennweite eine Fokussierung zu ermöglichen, ohne das Objekt zu bewegen.
Automatisiertes Fokussieren	Die Bewegung der Kamera muss automatisiert erfolgen. Dazu muss eine geeignete Möglichkeit implementiert werden, um die Kamera mit einer Genauigkeit von 0,25 mm zu platzieren. Weiterhin muss die Position der Kamera jederzeit bekannt sein.
Probenaufnahme	Das System muss über eine geeignete Aufnahme für die Proben verfügen. Das heißt, es muss einen Bereich besitzen, in dem die Proben in Ethanol abgelegt werden können und der über einen geeigneten Hintergrund verfügt. Zudem muss er eine geeignete Beleuchtung zulassen, vgl. Hardwareanforderungen: Elektronik: <i>Beleuchtung</i> .
Hardwareanforderungen: Elektronik	
Kamera	Die Auflösung des Kamerasensors des Systems soll möglichst hoch sein, mindestens aber 12 Megapixel (MP) (4K) betragen, um feine Strukturen sicher abbilden zu können. Zudem muss die Kamera die Montage von Objektiven über einen standardisierten Anschluss ermöglichen.

Steuerung	Zur Steuerung des Systems soll eine geeignete Plattform gefunden werden, die als zentrales Steuerelement dient. Diese soll die Programmierung in Python ermöglichen, Schnittstellen bieten und die Implementierung einer GUI erlauben. Zudem muss sie die Bildverarbeitung und das Datenmanagement ermöglichen.
Ein-/Ausgabe	Zur Ein-/ und Ausgabe soll als Schnittstelle zum/zur Anwender:in ein Display verwendet werden, auf dem eine GUI angezeigt werden kann. Die Eingabe kann entweder über einen Touchscreen oder Maus und Tastatur realisiert werden. Ein Touchscreen ist jedoch zu bevorzugen, da keine weiteren Eingabegeräte erforderlich sind.
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen auf dem Objekt sowie auf der Ethanoloberfläche, da diese die Bildqualität beeinflussen können, ist demnach möglichst diffus. Zusätzlich dürfen helle Strukturen des abzubildenden Objekts nicht zu stark, dunkle nicht zu wenig beleuchtet werden.
<b>Softwareanforderungen</b>	
Software	Das System muss über eine geeignete Software verfügen, um eine einfache Bedienung zu gewährleisten.
Frontend	Als Frontend soll eine GUI auf dem Monitor des Systems angezeigt werden. Das Frontend muss die Möglichkeit bieten alle Eingabeparameter zu bestimmen, soll leicht verständlich und intuitiv zu bedienen sein und eine Vorschau des Kamerabilds anzeigen.
Eingabeparameter	Die Eingabeparameter für das teilautomatisierte System zur Bildgebung von Invertebraten variieren basierend auf den gewählten Komponenten. Grundlegend müssen jedoch Parameter zur Bildgebung, wie die <i>Focus Stacking</i> -Parameter und Informationen zum Datenmanagement, wie die Benennung der Bilder angegeben werden können. Weitere Parameter ergeben sich in Folge der Implementierung und sind nicht detailliert als Anforderung definierbar.

Backend	Das Backend muss alle Hardwarekomponenten des Systems einbinden und entsprechende Funktionen bieten, um leicht darauf zugreifen zu können. Weiterhin muss es die Datenverwaltung übernehmen und entsprechend der im Frontend definierten Parameter abspeichern.
<b>Weitere Anforderungen</b>	
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 1500 € nicht übersteigen. Dabei umfassen die Kosten nur die notwendigen Materialkosten. Diese Anforderung soll die Verfügbarkeit des Systems auch für Institutionen mit eingeschränkter Finanzierung ermöglichen.
Materialien	Die verwendeten Materialien müssen mit den im System vorliegenden Flüssigkeiten kompatibel sein. Dabei handelt es sich primär um Ethanol. Daher wird für alle mit Ethanol in Berührung kommenden Komponenten eine Ethanolbeständigkeit vorausgesetzt.
Größe und Gewicht	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 300 mm x 300 mm x 600 mm (b x t x h) nicht überschreiten und nicht schwerer als 5 kg sein. So wird die Transportierbarkeit des Systems gewährleistet.

### A.3 Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur multiperspektivischen Bildgebung von Invertebraten (< 3 mm) in Ethanol

In Tabelle A.4 sind die Anforderungen an ein System zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol dargelegt.

**Tabelle A.4:** Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol.

<b>Zielsetzung und Zweck</b>	
Bildgebung in Ethanol	Ziel des Forschungsprojekts ist die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol. Das System soll mehrere Perspektiven eines Insekts aufnehmen können, ohne dass das Insekt manuell neu platziert werden muss.

Digitalisierung	Die Bildgebung von Invertebraten, insbesondere von Insekten und damit deren Digitalisierung bietet viele neue Möglichkeiten. Die multiperspektivische Bildgebung stellt dabei sicher, dass charakteristische morphologische Merkmale sicher abgebildet werden. Zudem können durch die multiperspektivische Bildgebung schnell viele Bilder für das Training neuronaler Netze generiert werden.
<b>Funktionalität</b>	
Bildgebung	Es sollen Insekten der ersten Größenkategorie ( $< 3$ mm, vgl. Kapitel 2.2) gehandhabt und abgebildet werden können.
Perspektiven	Das System soll eine frei wählbare Anzahl an Perspektiven aufnehmen und vollständige $360^\circ$ um die Probe rotieren können. Dabei ist zu beachten, dass die relative Beziehung der Perspektiven zueinander bekannt ist.
Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten der ersten Größenklasse ( $< 3$ mm) vollständig und in allen Bereichen scharf abbilden zu können.
Teilautomatisiert	Das System soll nach der in der Übersicht zu Teil II gegebenen Definition teilautomatisiert sein: <i>Ein System wird als teilautomatisiertes System zur Bildgebung definiert, wenn die abzubildenden Objekte zwar manuell und einzeln zur Bildgebung vor der Kamera platziert werden müssen, die Bildaufnahme und das Datenmanagement, sowie die Bildverarbeitung anschließend jedoch automatisiert ablaufen.</i>
<b>Hardwareanforderungen</b>	
Hardwareanforderungen: Mechanik	
Linearführung	Das System muss eine Linearführung besitzen, auf der die Kamera zum Objekt hin und weg bewegt werden kann, wenn die Schärfentiefe der verwendeten Kamera mit Objektiv nicht ausreicht, um die Proben in allen Bereichen scharf abzubilden.
Automatisiertes Fokussieren	Die Bewegung der Kamera muss automatisiert erfolgen. Dazu muss eine geeignete Möglichkeit implementiert werden, um die Kamera mit einer Genauigkeit von 0,25 mm zu platzieren, wenn die Schärfentiefe der verwendeten Kamera mit Objektiv nicht ausreicht, um die Proben in allen Bereichen scharf abzubilden.

Automatisierte Rotation	Das System muss über eine geeignete Mechanik verfügen, um die Kamera um die Probe herumzubewegen. Es soll mindestens eine Auflösung von $0,5^\circ$ erreicht werden, d. h. es müssen mindestens 720 Perspektiven aufgenommen werden können. Weiterhin muss die Position der Kamera jederzeit bekannt sein.
<b>Hardwareanforderungen: Elektronik</b>	
Kamera	Die Auflösung des Kamerasensors des Systems soll möglichst hoch sein, mindestens aber 12 MP (4K) betragen, um feine Strukturen sicher abbilden zu können. Zudem muss die Kamera die Montage von Objektiven über einen standardisierten Anschluss ermöglichen.
Steuerung	Zur Steuerung des Systems soll eine geeignete Plattform gefunden werden, die als zentrales Steuerelement dient. Sie soll die Programmierung in Python ermöglichen, Schnittstellen bieten und die Implementierung einer GUI erlauben. Zudem muss sie die Bildverarbeitung und das Datenmanagement ermöglichen.
Ein-/Ausgabe	Zur Ein- und Ausgabe soll als Schnittstelle zum/zur Anwenderin ein Display verwendet werden, auf dem ein <i>Comand-Line Interface</i> (CLI) angezeigt werden kann. Die Eingabe kann entweder über einen Touchscreen oder Maus und Tastatur realisiert werden.
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen auf dem Objekt sowie auf dem Ethanol oder anderen Oberflächen im Bildbereich, da diese die Bildqualität beeinflussen können. Zusätzlich dürfen helle Strukturen des abzubildenden Objekts nicht zu stark, dunkle nicht zu wenig beleuchtet werden.
<b>Softwareanforderungen</b>	
Frontend	Als Frontend soll ein CLI auf dem Monitor des Systems genutzt werden. Das Frontend muss die Möglichkeit bieten alle Eingabeparameter zu bestimmen und soll leicht verständlich und intuitiv zu bedienen sein. Der Verzicht auf eine GUI lässt sich damit begründen, dass langfristig entweder eine Integration in den DiversityScanner oder in die Entomoscope Umgebung geplant ist und die Funktionen in die für diese Systeme entwickelten GUIs erfolgen soll.

Eingabeparameter	Die Eingabeparameter für das teilautomatisierte System zur multiperspektivischen Bildgebung von Invertebraten variieren basierend auf den gewählten Komponenten. Grundlegend müssen jedoch Parameter zur Bildgebung, wie die <i>Focus Stacking</i> -Parameter (falls notwendig) und Informationen zum Datenmanagement, wie die Benennung der Bilder angegeben werden können. Zusätzlich muss die Anzahl der Perspektiven angegeben werden können. Weitere Parameter ergeben sich in Folge der Implementierung und sind nicht detailliert als Anforderung definierbar.
Backend	Das Backend muss alle Hardwarekomponenten des Systems einbinden und entsprechende Funktionen bieten, um leicht darauf zugreifen zu können. Weiterhin muss es die Datenverwaltung übernehmen und die Daten entsprechend der im Frontend definierten Parameter abspeichern.
<b>Weitere Anforderungen</b>	
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 2000 € nicht übersteigen.
Zeit	Die Verarbeitungszeit pro Probe soll möglichst kurz sein und zwei Stunden nicht überschreiten.
Materialien	Die verwendeten Materialien müssen mit den im System vorliegenden Flüssigkeiten kompatibel sein. Dabei handelt es sich primär um Ethanol. Daher wird für alle mit Ethanol in Berührung kommenden Komponenten eine Ethanolbeständigkeit vorausgesetzt.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Größe von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten, um auf einem Labortisch platziert werden zu können.

## A.4 Anforderungen an ein automatisiertes System zur Bildgebung von Invertebraten (< 3 mm) in Ethanol

Ein System zur automatisierten Handhabung und Bildgebung von Insekten in Ethanol muss die in Tabelle A.5 aufgeführten Anforderungen erfüllen.

**Tabelle A.5:** Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines automatisierten Systems zur Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol.

<b>Zielsetzung und Zweck</b>	
Bildgebung in Ethanol	Hauptziel des Forschungsprojekts ist die Entwicklung eines automatisierten Systems zur Bildgebung und Vereinzelung von wirbellosen Tieren (Invertebraten) mit einer Größe < 3 mm in Ethanol. Die Bilder dienen der Klassifizierung mittels <i>Convolutional Neural Networks</i> (CNNs) und der Bestimmung morphometrischer Merkmale. Die vereinzelt Insekten können anhand deren <i>Deoxyribonucleic acid</i> (DNA) bestimmt werden, wenn eine sichere Klassifizierung anhand der Bilder (noch) nicht möglich ist.
Digitalisierung und Sortierung	Das zu entwickelnde System dient der Automatisierung der bislang manuell durchgeführten Schritte bei der Untersuchung von Insekten-Massenproben. Ein Großteil der Insekten in Massenproben ist der Größenklasse < 3 mm zuzuordnen [49], gleichzeitig ist deren Sortierung und Bildgebung mühsam und zeitaufwendig. Deshalb bietet sich hierfür ein automatisiertes System an.
<b>Funktionalität</b>	
Automatisiert	Das System soll nach der in der Übersicht zu Teil III gegebenen Definition automatisiert sein: <i>Ein System wird als automatisiertes System zur Bildgebung definiert, wenn die abzubildenden Objekte nicht manuell und einzeln zur Bildgebung vor der Kamera platziert werden müssen, die Kamera demnach automatisiert verfahren werden kann oder die Proben automatisiert zugeführt und auch wieder entfernt werden. Zudem erfolgt die Bildaufnahme und das Datenmanagement, sowie die Bildverarbeitung anschließend automatisiert.</i>
Bildgebung	Das System soll von Insekten der ersten Größenkategorie (< 3 mm, vgl. Kapitel 2.2) automatisiert Detailaufnahmen anfertigen können.

Vereinzelung	Nach der Verarbeitung der Proben sollen die Insekten vereinzelt in einer 96er Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Mikrotiterplatte vorliegen und eindeutig den Bildern zugeordnet werden können. Dazu muss eine Objekterkennung implementiert werden.
Zuführung der Proben	Die Insekten sollen auf einer Ebene ausgebreitet werden und von dort aus automatisiert weiterverarbeitet werden. Diese Art der Zuführung erleichtert folgende Prozessschritte, da durch den/die Anwender:in sichergestellt werden kann, dass die Insekten nicht in Clustern vorliegen. Dies steigert jedoch die manuelle Arbeit zur Vorbereitung.
Schärfentiefe	Die Schärfentiefe des Bildgebungssystems muss ausreichen, um Insekten < 3 mm vollständig und in allen Bereichen scharf abbilden zu können.
<b>Hardwareanforderungen</b>	
Hardwareanforderungen: Mechanik	
Positioniersystem	Es wird ein Positioniersystem benötigt, das die Detailkamera über den einzelnen Insekten platziert. Weiterhin dient es der Bewegung des Handhabungswerkzeugs.
Probenaufnahme	Das System benötigt eine geeignete Aufnahme für die Proben. Diese muss die Beleuchtung zur Aufnahme der Bilder zulassen und vollständig im Arbeitsbereich des Positioniersystems liegen.
Probenablage	Die vereinzelt Insekten sollen in eine 96er PCR-Mikrotiterplatte abgelegt werden. Dazu muss eine Aufnahme im Arbeitsbereich des Positioniersystems vorgesehen werden, das die genaue Positionierung der <i>Wells</i> sicherstellt.
Handhabungswerkzeug	Zur Überführung der Insekten von der Probenaufnahme zur Probenablage, muss das System über ein geeignetes Handhabungswerkzeug verfügen. Der automatisierte Handhabungsprozess soll möglichst häufig erfolgreich sein, mindestens aber in 90 % der Fälle die Probe korrekt entnehmen und im Zielbehältnis ablegen.

Hardwareanforderungen: Elektronik	
Beleuchtung	Das Bildgebungssystem muss über eine geeignete Beleuchtung verfügen, um Insekten in Ethanol abbilden zu können. Dabei erzeugt die Beleuchtung idealerweise keine Reflexionen auf dem Objekt sowie auf der Ethanoloberfläche, da diese die Bildqualität beeinflussen können, ist demnach möglichst diffus. Zusätzlich dürfen helle Strukturen des abzubildenden Objekts nicht zu stark, dunkle nicht zu wenig beleuchtet werden.
Kamera	Die Anforderung an die Auflösung des Kamerasensors ist für das automatisierte System abhängig von verschiedenen Faktoren. Grundsätzlich soll die Auflösung des Kamerasensors, wie bei den teilautomatisierten Systemen möglichst hoch sein, um möglichst viele Details abzubilden. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass das automatisierte System sehr viele Bilder generiert und somit bei hochauflösenden Bildern viel Speicherplatz benötigen würde. Für das Training neuronaler Netze sind nach aktuellem Stand der Technik, sehr hohe Auflösungen (> 1 MP) nicht notwendig. Zur Reduktion der Verarbeitungszeit werden die Bilder für das Training ohnehin stark verkleinert. Daher ist der Anwendungsfall der Bilder zu betrachten, um die Auflösung des Sensors zu definieren. Werden die Bilder nur für das Training von neuronalen Netzen eingesetzt, genügt aktuell eine geringe Auflösung (1 MP). Sollen weiterhin morphometrische Merkmale ausgewertet oder die Bildung zur Beschreibung genutzt werden, ist eine hohe Auflösung (> 12 MP, 4K) zu bevorzugen, um feine Strukturen sicher abbilden zu können. In allen Fällen muss die Kamera die Montage von Objektiven über einen standardisierten Anschluss ermöglichen.
Steuerung	Zur Steuerung des Systems soll eine geeignete Plattform gefunden werden, die als zentrales Steuerelement dient. Sie soll die Programmierung in Python ermöglichen, Schnittstellen bieten und die Implementierung einer GUI erlauben. Zudem muss sie die Bildverarbeitung und das Datenmanagement ermöglichen.
Ein-/Ausgabe	Zur Ein- und Ausgabe soll als Schnittstelle zum/zur Anwender:in ein Display verwendet werden, auf dem eine GUI angezeigt werden kann. Die Eingabe kann entweder über einen Touchscreen oder Maus und Tastatur realisiert werden. Ein Touchscreen ist jedoch zu bevorzugen, da keine weiteren Eingabegeräte erforderlich sind.

<b>Softwareanforderungen</b>	
Software	Das System muss über eine geeignete Software verfügen, um eine einfache Bedienung zu gewährleisten.
Frontend	Als Frontend soll eine GUI auf dem Monitor des Systems angezeigt werden. Das Frontend muss die Möglichkeit bieten alle Eingabeparameter zu bestimmen, soll leicht verständlich und intuitiv zu bedienen sein.
Eingabeparameter	Die Eingabeparameter für das automatisierte System zur Bildgebung und Handhabung von Invertebraten variieren, basierend auf den gewählten Komponenten. Die Anzahl der Eingabeparameter über das Frontend soll möglichst gering gehalten werden, um die Bedienung des Systems so einfach wie möglich zu gestalten. Trotzdem muss die Möglichkeit bestehen notwendige Parameter anzupassen. Diese umfassen unter anderem Parameter an die Bildgebung, Parameter zur Optimierung des Handhabungswerkzeugs sowie zur Kalibrierung des Positioniersystems. Weitere Parameter ergeben sich in Folge der Implementierung und sind nicht detailliert als Anforderung definierbar.
Backend	Das Backend muss alle Hardwarekomponenten des Systems einbinden und entsprechende Funktionen bieten, um leicht darauf zugreifen zu können. Weiterhin muss es die Datenverwaltung übernehmen und entsprechend der definierten Parameter abspeichern.
<b>Weitere Anforderungen</b>	
Kosten	Die Kosten für das System sollen minimal sein und 5000 € nicht übersteigen.
Zeit	Die notwendige Verarbeitungszeit von einem Insekt soll 60 s nicht übersteigen.
Materialien	Die verwendeten Materialien müssen mit den im System vorliegenden Flüssigkeiten kompatibel sein. Dabei handelt es sich primär um Ethanol. Daher wird für alle mit Ethanol in Berührung kommenden Komponenten eine Ethanolbeständigkeit vorausgesetzt.
Größe des Systems	Das Gesamtsystem soll eine Gesamtgröße von 500 mm x 500 mm x 500 mm (b x t x h) nicht überschreiten, um auf einem Labortisch platziert werden zu können.

Skalierbarkeit	Das System soll skalierbar sein, d. h. die entwickelte Methode soll so gestaltet sein, dass durch Erweiterung des Systems die Zeit verlängert werden kann, in der das System selbständig arbeitet.
----------------	--



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Insekten-Massenprobe . . . . .	3
1.2	Taxonomische Systematik der Lebewesen . . . . .	4
1.3	Malaise Falle nach Townes zum Fangen von Insekten . . . . .	5
1.4	Schalenfalle zum Fangen von Insekten . . . . .	7
1.5	DNA-Barcoding Prozess . . . . .	9
2.1	Vision der automatisierten Insekten-Biodiversitätsforschung . . . . .	14
2.2	Vorgeschlagene Prozesskette . . . . .	18
3.1	Verschiedene Roboterbauformen . . . . .	22
3.2	Verschiedene Greiferprinzipien nach Wirkprinzip . . . . .	24
3.3	Aufbau eines <i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i> (CMOS) Sensors . . . . .	26
3.4	Strahlengang auf der optischen Achse liegender Punkte . . . . .	30
3.5	Visualisierung des Ablaufs beim Aufnehmen der Bilder für das <i>Focus Stacking</i> . . . . .	31
3.6	Insekten aus einer Malaise Fallen Probe . . . . .	37
4.1	<i>Fractionator</i> nach Buffington und Gates (2008) [89] . . . . .	42
4.2	Teilsysteme - System zur Fraktionierung nach Größe . . . . .	43
4.3	Siebsystem zur Fraktionierung von Insekten-Massenproben . . . . .	44
4.4	Elektronische Komponenten - System zur Größenvorsortierung . . . . .	45
4.5	Verschiedene Fraktionen gesiebt mit dem vorgeschlagenen Aufbau . . . . .	47
5.1	Teilsysteme - Entomoscope . . . . .	57
5.2	Standalone Entomoscope und Funktionsweise des <i>Focus Stacking Mechanismus</i> . . . . .	58
5.3	Elektronische Komponenten - Standalone Entomoscope . . . . .	61
5.4	Screenshots aus der ENIMAS für das Standalone Entomoscope . . . . .	62
5.5	Verschiedene Versionen des Standalone Entomoscopes . . . . .	64
5.6	Plug-In Entomoscope und Funktionsweise des <i>Focus Stacking Mechanismus</i> . . . . .	65
5.7	Elektronische Komponenten - Plug-In Entomoscope . . . . .	67
5.8	Screenshots aus der ENIMAS für das Plug-In Entomoscope . . . . .	68
6.1	Teilsysteme - DiversityScanner-360° . . . . .	78
6.2	Konzept zur Bildgebung mit dem DiversityScanner-360° . . . . .	80
6.3	Vorderansicht - DiversityScanner-360° . . . . .	81
6.4	Rückansicht - DiversityScanner-360° . . . . .	82
6.5	Explosionsansicht der Bildgebungszelle - DiversityScanner-360° . . . . .	83
6.6	<i>Focus Stacking</i> Einheit - DiversityScanner-360° . . . . .	84
6.7	/Elektronische Komponenten - DiversityScanner-360° . . . . .	85
6.8	Beispielbilder - DiversityScanner-360° . . . . .	88
7.1	Teilsysteme - DiversityScanner . . . . .	98

7.2	Vorderansicht - DiversityScanner . . . . .	100
7.3	Elektronische Komponenten - DiversityScanner . . . . .	101
7.4	Koordinatensysteme - DiversityScanner . . . . .	103
7.5	Kameraaufbau des DiversityScanner-4K . . . . .	104
7.6	Detailkamera und Handhabungssystem - DiversityScanner . . . . .	106
7.7	Objekterkennung - DiversityScanner . . . . .	107
7.8	GUI - DiversityScanner . . . . .	108
7.9	Programmablauf - DiversityScanner . . . . .	109
7.10	Drei beispielhaft auftretende Fehler bei der Objekterkennung . . . . .	112
7.11	Detailbild - DiversityScanner und DiversityScanner-4K . . . . .	113
7.12	Evaluierung der Verarbeitungszeit pro Probe mit dem DiversityScanner . . . . .	114
8.1	Saugspitze aus Glas - DiversityScanner . . . . .	123
8.2	Minigreifer zur automatisierten Handhabung . . . . .	124
8.3	Versuchsaufbau zum Testen des Minigreifers . . . . .	126
8.4	Ablagegenauigkeit mit dem implementierten Greifer . . . . .	127
9.1	Beispielbilder Datensatz . . . . .	138
9.2	Kaskadierte Architektur zur Klassifizierung nach <i>Methode 2</i> . . . . .	139
9.3	Klassifizierungsgenauigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der Bilder für verschiedene Klassen und Klassifikatoren . . . . .	143
10.1	Bildverarbeitung zur Volumenschätzung . . . . .	147

# Tabellenverzeichnis

1.1	Durchschnittliche Fangzahlen von Malaise Fallen . . . . .	6
3.1	Exemplarische <i>Confusion Matrix</i> . . . . .	34
4.1	Anforderungen an ein System zur Fraktionierung von Insekten-Massenproben . .	40
5.1	Anforderungen an ein teilautomatisiertes System zur Bildgebung von Insek- ten in Ethanol . . . . .	54
5.2	Kooperationspartner Entomoscope . . . . .	72
6.1	Anforderungen an ein System zur multiperspektivischen Bildgebung . . . . .	76
6.2	Brechungsindizes verschiedener Materialien, sowie deren Quellen . . . . .	82
7.1	Anforderungen an ein System zur automatisierten Handhabung und Bildgebung .	96
7.2	Ergebnisse Evaluation Handhabungsprozess - Pipettenspitze . . . . .	112
8.1	Ergebnisse Evaluation Handhabungsprozess - Saugspitze Glas . . . . .	126
8.2	Ergebnisse der Tests des Greifers mit Proben von 15 mm, 8 mm bzw. 4 mm . . .	127
8.3	Ergebnisse der Prüfung der Abhängigkeit des Greifers von Insekten in ver- schiedenen Ausrichtungen . . . . .	128
8.4	Prüfung des Minigreifers mit Insekten abnehmender Größe . . . . .	128
9.1	Datensatz zur Klassifizierung in 15 Klassen <sub>ML</sub> . . . . .	137
9.2	<i>Confusion Matrix</i> der Klassifikation nach <i>Methode 1</i> . . . . .	140
9.3	<i>Confusion Matrix</i> der Klassifikation nach <i>Methode 2</i> . . . . .	141
A.1	Systemübergreifende detaillierte Anforderungen an Systeme zur Automati- sierung der Erforschung der Biodiversität unter Invertebraten . . . . .	155
A.2	Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines Systems zur Größen- vorsortierung von Insekten-Massenproben . . . . .	156
A.3	Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur Bildgebung von Insekten in Ethanol . . . . .	158
A.4	Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines teilautomatisierten Systems zur multiperspektivischen Bildgebung von Insekten in Ethanol . . . . .	161
A.5	Detaillierte Anforderungen für die Entwicklung eines automatisierten Sys- tems zur Bildgebung und Handhabung von Insekten in Ethanol . . . . .	165



# Eigene Veröffentlichungen

## Hauptpublikationen

- [49] L. Wührl, C. Pylatiuk, M. Giersch, F. Lapp, T. von Rintelen, M. Balke, S. Schmidt, P. Cerretti, und R. Meier, „DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 22, Nr. 4, S. 1626–1638, 2022. doi: 10.1111/1755-0998.13567

**Unter den zehn am häufigsten zitierten Publikationen in *Molecular Ecology Resources* im Zeitraum von 01. Januar 2022 bis 31. Dezember 2023. Journal Impact Factor (2022): 7,7.**

- [55] L. Wührl, L. Keller, N. Klug, H. Shirali, R. Meier, und C. Pylatiuk, „Automated handling of biological objects with a flexible gripper for biodiversity research,” *at - Automatisierungstechnik*, Vol. 72, Nr. 7, S. 672–678, 2024. doi: 10.1515/auto-2023-0238
- [86] A. Ascenzi, L. Wührl, V. Feng, N. Klug, C. Pylatiuk, P. Cerretti, und R. Meier, „EntoSieve: automated size-sorting of insect bulk samples to aid accurate megabarcoding and metabarcoding,” preprint, doi: 10.22541/au.172769814.48739807/v1, 2024, Zugriff am 04.02.2025
- [91] L. Wührl, L. Rettenberger, R. Meier, E. Hartop, J. Graf, und C. Pylatiuk, „Entomoscope: An Open-Source Photomicroscope for Biodiversity Discovery,” *IEEE Access*, Vol. 12, S. 11 785–11 794, 2024. doi: 10.1109/ACCESS.2024.3355272
- [119] L. Wührl, K. Rotmann, R. Meier, E. Hartop, N. Klug, und C. Pylatiuk, „DiversityScanner-360°: An Automated System for Digitizing Invertebrate Bulk Samples,” in *2023 3rd International Conference on Robotics, Automation and Artificial Intelligence (RAAI)*, S. 226–230, 14.-16. Dez. Singapur, 2023. doi: 10.1109/RAAI59955.2023.10601274
- [137] L. Wührl, C. Pylatiuk, M. Giersch, und R. Meier, „DiversityScanner 4K: A High Resolution Extended Focus Camera Setup as Extension for the DiversityScanner,” in *HEN-NIGXXXIX 2022*, 24.-28. Jul. Helsinki, Finnland, 2022. doi: 10.5445/IR/1000151154

## Weitere Publikationen

- [167] M. Brydegaard, R. D. Pedales, V. Feng, A. saint-doria Yamoá, B. Kouakou, H. Månefjord, L. Wührl, C. Pylatiuk, D. d. S. Amorim, und R. Meier, „Towards Global Insect Biomonitoring with Frugal Methods,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 379, Nr. 1904, 20230103, 2024. doi: 10.1098/rstb.2023.0103
- [168] L. Petani, L. Wührl, L. Koker, M. Reischl, J. Renz, U. Gengenbach, und C. Pylatiuk, „Development of an Experimental Setup for Real-Time In-Line Dissolved Ozone Measurement for Medical Therapy,” *Ozone: Science & Engineering*, Vol. 44, Nr. 5, S. 499–509, 2022. doi: 10.1080/01919512.2021.1932412
- [169] L. Petani, R. Barth, L. Wührl, I. Sieber, L. Koker, M. Reischl, U. Gengenbach, und C. Pylatiuk, „Investigation of a Simplified Photometer Design for the Measurement of Ozone Gas Concentration,” in *2022 IEEE-EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES)*, S. 94–99, 07.-09. Dez. Kuala Lumpur, Malaysia, 2022. doi: 10.1109/IECBES54088.2022.10079356
- [170] L. Petani, D. Tils, L. Wührl, I. Sieber, und C. Pylatiuk, „Design, simulation, and evaluation of a low-cost photometer for dissolved ozone measurement,” in *IEEE International Conference on Microwaves, Communications, Antennas, Biomedical Engineering & Electronic Systems (COMCAS)*, 09.-11. Jul. Tel Aviv, Israel, 2023/2024, (angenommen)

# Betreute Abschlussarbeiten

- [171] D. Borgel, „Entwicklung und Implementierung eines automatisierten, bildbasierten Systems zur Hochdurchsatz-Biodiversitätsforschung,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2024
- [172] P. M. Blum, „Concept Development for the Automation of Wet Conservation Methods for Invertebrates,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023
- [173] L. Keller, „Development and Implementation of Tools for the Automatic Manipulation of Invertebrate Samples of Different Sizes in Ethanol,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023
- [174] I. Ahrens, „Development and construction of a mechatronic system to perforate PCR microplates to allow targeted liquid drainage,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023
- [175] N. My Dung Klug, „Concept Development and Implementation of an Automated System for the Size Sorting of Insects,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022
- [176] W. Flaum, „Entwicklung von Handhabungswerkzeugen zum automatisierten Sortieren von in Ethanol konservierten Insekten,” Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022
- [177] K. A. F. Rotmann, „Entwicklung eines mechatronischen Systems zur Biomassenbestimmung von Insekten mithilfe von 360° Bildaufnahmen,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022
- [178] M. Giersch, „Automatisierte Positionsbestimmung von Insekten und Klassifikation mittels Machine Learning Methoden für einen Sortierroboter,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2021
- [179] F. Lapp, „Entwicklung einer Steuerung für einen kameragestützten Pipettierroboter,” Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2021



# Literaturverzeichnis

- [1] World-Economic-Forum, „Global Risks Report 2023,” <https://www.weforum.org/reports/global-risks-report-2023/>, Zugriff am 25.09.2023.
- [2] E. O. Wilson, „Biodiversity Research Requires More Boots on the Ground,” *Nature Ecology & Evolution*, Vol. 1, Nr. 11, S. 1590–1591, 2017. doi: 10.1038/s41559-017-0360-y
- [3] Y. M. Bar-On, R. Phillips, und R. Milo, „The biomass distribution on Earth,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 115, Nr. 25, S. 6506–6511, 2018. doi: 10.1073/pnas.1711842115
- [4] „Catalogue of Life (CoL),” <https://www.catalogueoflife.org/>, Zugriff am 08.01.2024.
- [5] N. E. Stork, „How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth?” *Annual Review of Entomology*, Vol. 63, Nr. 1, S. 31–45, 2018. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043348
- [6] P. Y. S. Chua, S. J. Bourlat, C. Ferguson, P. Korlevic, L. Zhao, T. Ekrem, R. Meier, und M. K. N. Lawniczak, „Future of DNA-based Insect Monitoring,” *Trends in Genetics*, Vol. 39, Nr. 7, S. 531–544, 2023. doi: 10.1016/j.tig.2023.02.012
- [7] J. Ollerton, R. Winfree, und S. Tarrant, „How Many Flowering Plants Are Pollinated by Animals?” *Oikos*, Vol. 120, Nr. 3, S. 321–326, 2011. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x
- [8] G. D. Powney, C. Carvell, M. Edwards, R. K. A. Morris, H. E. Roy, B. A. Woodcock, und N. J. B. Isaac, „Widespread Losses of Pollinating Insects in Britain,” *Nature Communications*, Vol. 10, Nr. 1, 1018, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-08974-9
- [9] C. W. Wardhaugh, „How Many Species of Arthropods Visit Flowers?” *Arthropod-Plant Interactions*, Vol. 9, Nr. 6, S. 547–565, 2015. doi: 10.1007/s11829-015-9398-4
- [10] L. H. Yang und C. Gratton, „Insects as Drivers of Ecosystem Processes,” *Current Opinion in Insect Science*, Vol. 2, S. 26–32, 2014. doi: 10.1016/j.cois.2014.06.004
- [11] T. W. Culliney, „Role of Arthropods in Maintaining Soil Fertility,” *Agriculture*, Vol. 3, Nr. 4, S. 629–659, 2013. doi: 10.3390/agriculture3040629

- [12] D. H. Morse, „The Insectivorous Bird as an Adaptive Strategy,” *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 2, Nr. 1, S. 177–200, 1971. doi: 10.1146/annurev.es.02.110171.001141
- [13] A. Jankielsohn, „The Importance of Insects in Agricultural Ecosystems,” *Advances in Entomology*, Vol. 6, Nr. 2, S. 62–73, 2018. doi: 10.4236/ae.2018.62006
- [14] J. E. Losey und M. Vaughan, „The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects,” *BioScience*, Vol. 56, Nr. 4, S. 311–323, 2006. doi: 10.1641/0006-3568(2006)56[311:TEVOES]2.0.CO;2
- [15] E. Hartop, A. Srivathsan, F. Ronquist, und R. Meier, „Towards Large-Scale Integrative Taxonomy (LIT): Resolving the Data Conundrum for Dark Taxa,” *Systematic Biology*, Vol. 71, Nr. 6, S. 1404–1422, 2022. doi: 10.1093/sysbio/syac033
- [16] A. Srivathsan, E. Hartop, J. Puniamoorthy, W. T. Lee, S. N. Kutty, O. Kurina, und R. Meier, „Rapid, Large-Scale Species Discovery in Hyperdiverse Taxa Using 1D MinION Sequencing,” *BMC Biology*, Vol. 17, Nr. 1, S. 96, 2019. doi: 10.1186/s12915-019-0706-9
- [17] A. Srivathsan, L. Lee, K. Katoh, E. Hartop, S. N. Kutty, J. Wong, D. Yeo, und R. Meier, „ONTbarcode and MinION Barcodes Aid Biodiversity Discovery and Identification by Everyone, for Everyone,” *BMC Biology*, Vol. 19, Nr. 1, S. 217, 2021. doi: 10.1186/s12915-021-01141-x
- [18] M. Upton, B. Mantle, und A. Hastings, *Methods for Collecting, Preserving and Studying Insects and other terrestrial arthropods*. Australian Entomological Society, 2010. ISBN 978-0-646-54337-6
- [19] C. A. Hallmann, M. Sorg, E. Jongejans, H. Siepel, N. Hofland, H. Schwan, W. Stenmans, A. Müller, H. Sumser, T. Hörrén, D. Goulson, und H. de Kroon, „More than 75 Percent Decline over 27 Years in Total Flying Insect Biomass in Protected Areas,” *PLOS ONE*, Vol. 12, Nr. 10, e0185809, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0185809
- [20] D. Karlsson, E. Hartop, M. Forshage, M. Jaschhof, und F. Ronquist, „The Swedish Malaise Trap Project: A 15 Year Retrospective on a Countrywide Insect Inventory,” *Biodiversity Data Journal*, Vol. 8, S. e47255, 2020. doi: 10.3897/BDJ.8.e47255
- [21] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, und J. R. deWaard, „Biological Identifications through DNA Barcodes,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, Vol. 270, Nr. 1512, S. 313–321, 2003. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- [22] V. Knoop und K. Müller, *Gene und Stammbäume*. Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag, 2009. ISBN 978-3-8274-1983-5

- [23] R. Malaise, „A New Insect Trap,” *Entomologisk Tidskrift*, S. 148–160, 1937.
- [24] H. Townes, „Design for a Malaise Trap,” *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, Vol. 64, Nr. 4, S. 253–262, 1962.
- [25] J. L. Gressitt und M. K. Gressitt, „An Improved Malaise Trap,” *Pacific Insects*, Vol. 4, Nr. 1, S. 87–90, 1962.
- [26] H. Townes, „A Light-Weight Malaise Trap,” *Entomological news*, Vol. 83, S. 239–247, 1972.
- [27] S. C. Henry, P. B. McQuillan, und J. B. Kirkpatrick, „An Alpine Malaise Trap,” *Alpine Entomology*, Vol. 2, S. 51–58, 2018. doi: 10.3897/alpento.2.24800
- [28] J. Uhler, P. Haase, L. Hoffmann, T. Hothorn, J. Schmidl, S. Stoll, E. A. R. Welte, J. Buse, und J. Müller, „A Comparison of Different Malaise Trap Types,” *Insect Conservation and Diversity*, Vol. 15, Nr. 6, S. 666–672, 2022. doi: 10.1111/icad.12604
- [29] R. Matthews und J. Matthews, „The Malaise Trap: Its Utility and Potential for Sampling Insect Populations,” *The Great Lakes Entomologist*, Vol. 4, Nr. 4, 2017. doi: 10.22543/0090-0222.1158
- [30] B. V. Brown, „Malaise Trap Catches and the Crisis in Neotropical Dipterology,” *American Entomologist*, Vol. 51, Nr. 3, S. 180–183, 2005. doi: 10.1093/ae/51.3.180
- [31] S. E. M. Fraser, C. Dytham, und P. J. Mayhew, „The Effectiveness and Optimal Use of Malaise Traps for Monitoring Parasitoid Wasps,” *Insect Conservation and Diversity*, Vol. 1, Nr. 1, S. 22–31, 2008. doi: 10.1111/j.1752-4598.2007.00003.x
- [32] J. L. P. Duarte, R. F. Krüger, C. J. B. de Carvalho, und P. B. Ribeiro, „Evidence of the Influence of Malaise Trap Age on Its Efficiency in the Collection of Muscidae (Insecta, Diptera),” *International Journal of Tropical Insect Science*, Vol. 30, Nr. 2, S. 115–118, 2010. doi: 10.1017/S1742758410000093
- [33] D. C. Darling und L. Packer, „Effectiveness of Malaise traps in collecting Hymenoptera: The influence of trap design, mesh size, and location,” *The Canadian Entomologist*, Vol. 120, Nr. 8-9, S. 787–796, 1988. doi: 10.4039/Ent120787-8
- [34] D. Steinke, V. Breton, E. Berzitis, und P. D. N. Hebert, „The School Malaise Trap Program: Coupling Educational Outreach with Scientific Discovery,” *PLOS Biology*, Vol. 15, Nr. 4, e2001829, 2017. doi: 10.1371/journal.pbio.2001829
- [35] J. W. Wägele, P. Bodesheim, S. J. Bourlat, J. Denzler, M. Diepenbroek, V. Fonseca, K.-H. Frommolt, M. F. Geiger, B. Gemeinholzer, F. O. Glöckner, T. Haucke, A. Kirse,

- A. Kölpin, I. Kostadinov, H. S. Kühl, F. Kurth, M. Lasseck, S. Liedke, F. Losch, S. Müller, N. Petrovskaya, K. Piotrowski, B. Radig, C. Scherber, L. Schoppmann, J. Schulz, V. Steinhage, G. F. Tschan, W. Vautz, D. Velotto, M. Weigend, und S. Wildermann, „Towards a Multisensor Station for Automated Biodiversity Monitoring,” *Basic and Applied Ecology*, Vol. 59, S. 105–138, 2022. doi: 10.1016/j.baae.2022.01.003
- [36] E. Homan, C. Mathis, C. Lee, H. Patch, C. Grozinger, und V. Narayanan, „InsectEye: An Intelligent Trap for Insect Biodiversity Monitoring,” in *2023 36th International Conference on VLSI Design and 2023 22nd International Conference on Embedded Systems (VLSID)*, S. 1–6, 8.-12. Jan. Hyderabad, Indien, 2023. doi: 10.1109/VLSID57277.2023.00085
- [37] S. M. Vrdoljak und M. J. Samways, „Optimising Coloured Pan Traps to Survey Flower Visiting Insects,” *Journal of Insect Conservation*, Vol. 16, Nr. 3, S. 345–354, 2012. doi: 10.1007/s10841-011-9420-9
- [38] J. W. Campbell und J. L. Hanula, „Efficiency of Malaise Traps and Colored Pan Traps for Collecting Flower Visiting Insects from Three Forested Ecosystems,” *Journal of Insect Conservation*, Vol. 11, Nr. 4, S. 399–408, 2007. doi: 10.1007/s10841-006-9055-4
- [39] J. K. Tuell und R. Isaacs, „Elevated Pan Traps to Monitor Bees in Flowering Crop Canopies,” *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Vol. 131, Nr. 1, S. 93–98, 2009. doi: 10.1111/j.1570-7458.2009.00826.x
- [40] Joa N. M. Leong und R. W. Thorp, „Colour-Coded Sampling: The Pan Trap Colour Preferences of Oligolectic and Nonoligolectic Bees Associated with a Vernal Pool Plant,” *Ecological Entomology*, Vol. 24, Nr. 3, S. 329–335, 1999. doi: 10.1046/j.1365-2311.1999.00196.x
- [41] D. Yeo, J. Puniamoorthy, R. W. J. Ngiam, und R. Meier, „Towards Holomorphology in Entomology: Rapid and Cost-Effective Adult–Larva Matching Using NGS Barcodes,” *Systematic Entomology*, Vol. 43, Nr. 4, S. 678–691, 2018. doi: 10.1111/syen.12296
- [42] W. Y. Wang, A. Srivathsan, M. Foo, S. K. Yamane, und R. Meier, „Sorting Specimen-Rich Invertebrate Samples with Cost-Effective NGS Barcodes: Validating a Reverse Workflow for Specimen Processing,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 18, Nr. 3, S. 490–501, 2018. doi: 10.1111/1755-0998.12751
- [43] A. Srivathsan, V. Feng, D. Suárez, B. Emerson, und R. Meier, „ONTbarcode 2.0: Rapid Species Discovery and Identification with Real-Time Barcoding Facilitated by Oxford Nanopore R10.4,” *Cladistics*, Vol. 40, Nr. 2, S. 192–203, 2024. doi: 10.1111/cla.12566

- 
- [44] D. W. Yu, Y. Ji, B. C. Emerson, X. Wang, C. Ye, C. Yang, und Z. Ding, „Biodiversity Soup: Metabarcoding of Arthropods for Rapid Biodiversity Assessment and Biomonitoring,” *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 3, Nr. 4, S. 613–623, 2012. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x
- [45] M. Majaneva, O. H. Diserud, S. H. C. Eagle, M. Hajibabaei, und T. Ekrem, „Choice of DNA Extraction Method Affects DNA Metabarcoding of Unsorted Invertebrate Bulk Samples,” *Metabarcoding and Metagenomics*, Vol. 2, e26664, 2018. doi: 10.3897/mbmg.2.26664
- [46] T. J. Creedy, W. S. Ng, und A. P. Vogler, „Toward Accurate Species-Level Metabarcoding of Arthropod Communities from the Tropical Forest Canopy,” *Ecology and Evolution*, Vol. 9, Nr. 6, S. 3105–3116, 2019. doi: 10.1002/ece3.4839
- [47] A. Kirse, S. J. Bourlat, K. Langen, und V. G. Fonseca, „Metabarcoding Malaise Traps and Soil eDNA Reveals Seasonal and Local Arthropod Diversity Shifts,” *Scientific Reports*, Vol. 11, Nr. 1, 10498, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-89950-6
- [48] J. Batovska, A. M. Piper, I. Valenzuela, J. P. Cunningham, und M. J. Blacket, „Developing a Non-Destructive Metabarcoding Protocol for Detection of Pest Insects in Bulk Trap Catches,” *Scientific Reports*, Vol. 11, Nr. 1, 7946, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-85855-6
- [49] L. Wühlrl, C. Pylatiuk, M. Giersch, F. Lapp, T. von Rintelen, M. Balke, S. Schmidt, P. Cerretti, und R. Meier, „DiversityScanner: Robotic handling of small invertebrates with machine learning methods,” *Molecular Ecology Resources*, Vol. 22, Nr. 4, S. 1626–1638, 2022. doi: 10.1111/1755-0998.13567
- [50] M. Martineau, D. Conte, R. Raveaux, I. Arnault, D. Munier, und G. Venturini, „A Survey on Image-Based Insect Classification,” *Pattern Recognition*, Vol. 65, S. 273–284, 2017. doi: 10.1016/j.patcog.2016.12.020
- [51] F. Sánchez-Bayo und K. A. G. Wyckhuys, „Worldwide Decline of the Entomofauna: A Review of Its Drivers,” *Biological Conservation*, Vol. 232, S. 8–27, 2019. doi: 10.1016/j.biocon.2019.01.020
- [52] S. Ravindran, „How DIY Technologies Are Democratizing Science,” *Nature*, Vol. 587, Nr. 7834, S. 509–511, 2020. doi: 10.1038/d41586-020-03193-5
- [53] J. Bonvoisin, J. Molloy, M. Häuer, und T. Wenzel, „Standardisation of Practices in Open Source Hardware,” *Journal of Open Hardware*, Vol. 4, Nr. 1, S. 2, 2020. doi: 10.5334/joh.22

- [54] J. M. Pearce, „Building Research Equipment with Free, Open-Source Hardware,” *Science*, Vol. 337, Nr. 6100, S. 1303–1304, 2012. doi: 10.1126/science.1228183
- [55] L. Wühlrl, L. Keller, N. Klug, H. Shirali, R. Meier, und C. Pylatiuk, „Automated handling of biological objects with a flexible gripper for biodiversity research,” *at - Automatisierungstechnik*, Vol. 72, Nr. 7, S. 672–678, 2024. doi: 10.1515/auto-2023-0238
- [56] M. Haun, *Handbuch Robotik: Programmieren und Einsatz intelligenter Roboter*, 2. Aufl., Serie VDI-Buch. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg Imprint Springer Vieweg, 2013. ISBN 978-3-642-39858-2
- [57] W. Weber und H. Koch, *Industrieroboter: Methoden der Steuerung und Regelung*, 5. Aufl. München, Deutschland: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, 2022. ISBN 978-3-446-46869-6
- [58] J. Mareczek, *Grundlagen der Roboter-Manipulatoren – Band 1: Modellbildung von Kinematik und Dynamik*. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2020. ISBN 978-3-662-52758-0
- [59] K. Feldmann, V. Schöppner, und G. Spur, *Handbuch Fügen, Handhaben, Montieren*, Serie Edition Handbuch der Fertigungstechnik. München, Deutschland: Hanser, 2014. ISBN 978-3-446-43656-5
- [60] S. Hesse und V. Malisa, *Grundlagen der Handhabungstechnik*, 5. Aufl. München, Deutschland: Hanser, 2020. ISBN 978-3-446-46359-2
- [61] S. Hesse, *Greifertechnik: Effektoren Für Roboter Und Automaten*. München, Deutschland: Hanser, 2011. ISBN 978-3-446-42422-7
- [62] E. Hering und R. Martin, *Optik in Ingenieur- und Naturwissenschaften: Grundlagen und Anwendungen*, 2. Aufl. München, Deutschland: Hanser, 2023. ISBN 978-3-446-47750-6
- [63] H. Sun, *Basic Optical Engineering for Engineers and Scientists*. Bellingham, USA: SPIE, 2019. ISBN 978-1-5106-2206-7
- [64] K. D. Stefanov, *CMOS Image Sensors*. Bristol, UK: IOP Publishing, 2022. ISBN 978-0-7503-3235-4
- [65] M. Löffler-Mang und G. Schröder, *Handbuch Bauelemente der Optik: Grundlagen, Werkstoffe, Geräte, Messtechnik*, 8. Aufl. München. Deutschland: Hanser, 2020. ISBN 978-3-446-46032-4

- 
- [66] M. Bass und Optical Society of America, Hrsgg., *Handbook of Optics*, 2. Aufl. New York, USA: McGraw-Hill, 1995. ISBN 978-0-07-047740-7
- [67] A. Rowlands, *Physics of Digital Photography*, Second edition Aufl., Serie IOP Series in Emerging Technologies in Optics and Photonics. Bristol, UK: IOP Publishing, 2020. ISBN 978-0-7503-2558-5
- [68] J. E. Mertens, M. V. Roie, J. Merckx, und W. Dekoninck, „The Use of Low Cost Compact Cameras with Focus Stacking Functionality in Entomological Digitization Projects,” *ZooKeys*, Nr. 712, S. 141–154, 2017. doi: 10.3897/zookeys.712.20505
- [69] J. Brecko, A. Mathys, W. Dekoninck, M. Leponce, D. VandenSpiegel, und P. Semal, „Focus Stacking: Comparing Commercial Top-End Set-Ups with a Semi-Automatic Low Budget Approach. A Possible Solution for Mass Digitization of Type Specimens,” *ZooKeys*, Nr. 464, S. 1–23, 2014. doi: 10.3897/zookeys.464.8615
- [70] F. Friedrich, Y. Matsumura, H. Pohl, M. Bai, T. Hörnschemeyer, und R. G. Beutel, „Insect Morphology in the Age of Phylogenomics: Innovative Techniques and Its Future Role in Systematics,” *Entomological Science*, Vol. 17, Nr. 1, S. 1–24, 2014. doi: 10.1111/ens.12053
- [71] J. Gulbins, R. Gulbins, und R. Gulbins, *Multishot-Techniken in der digitalen Fotografie: hochwertige Aufnahmen aus Bildserien: Auflösung erhöhen, Schärfentiefe erweitern, Blickwinkel vergrößern, HDRI-Bilder erstellen, Mikrokontraste verbessern*. Heidelberg, Deutschland: dpunkt-Verl, 2008. ISBN 978-3-89864-552-2
- [72] C. Heribert, „PICOLAY,” <http://www.picolay.de/>, Zugriff am 01.02.2024.
- [73] „Helicon Focus - Helicon Soft,” <https://www.heliconsoft.com/heliconsoft-products/helicon-focus/>, Zugriff am 01.02.2024.
- [74] „Zerene Stacker,” <https://www.zerenesystems.com/cms/stacker>, Zugriff am 01.02.2024.
- [75] B. Jähne, *Digitale Bildverarbeitung: und Bildgewinnung*. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2012. ISBN 978-3-642-04951-4
- [76] J. Wlodek, K. J. Gofron, und Y. Q. Cai, „Achieving 3D Imaging through Focus Stacking,” *AIP Conference Proceedings*, Vol. 2054, Nr. 1, 050001, 2019. doi: 10.1063/1.5084619
- [77] A. Wu, Y. Shi, R. Lu, und Z. Zhang, „Sequence Image Registration for Large Depth of Microscopic Focus Stacking,” *IEEE Access*, Vol. 8, S. 6533–6542, 2020. doi: 10.1109/ACCESS.2019.2963633

- [78] Y. Qiu, D. Inagaki, K. Kohiyama, H. Tanaka, und T. Ijiri, „Focus Stacking by Multi-Viewpoint Focus Bracketing,” in *SIGGRAPH Asia 2019 Posters*, Serie SA '19, S. 1–2, 17.–20. Nov. Brisbane, Queensland, Australien, 2019. doi: 10.1145/3355056.3364592
- [79] G. Glaeser, „Focus Stacking from a Purely Geometrical Point of View,” *KoG - Journal of the Croatian Society for Geometry and Graphics*, Vol. 23, Nr. 23, S. 18–27, 2019. doi: 10.31896/k.23.2
- [80] P. H. Kerr, E. M. Fisher, und M. L. Buffington, „Dome Lighting for Insect Imaging under a Microscope,” *American Entomologist*, Vol. 54, Nr. 4, S. 198–200, 2008. doi: 10.1093/ae/54.4.198
- [81] T. Gockel, *Kompodium digitale Fotografie: Von der Theorie zur erfolgreichen Fotopraxis*, Serie X.media.press. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Berlin Heidelberg, 2012. ISBN 978-3-642-11238-6
- [82] F. Bäumler, A. Koehnsen, H. T. Tramsen, S. N. Gorb, und S. Büsse, „Illuminating Nature’s Beauty: Modular, Scalable and Low-Cost LED Dome Illumination System Using 3D-printing Technology,” *Scientific Reports*, Vol. 10, Nr. 1, 12172, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-69075-y
- [83] G. Paaß und D. Hecker, *Künstliche Intelligenz: Was steckt hinter der Technologie der Zukunft?* Wiesbaden, Deutschland: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2020. ISBN 978-3-658-30210-8
- [84] C. M. Bishop und H. Bishop, *Deep Learning: Foundations and Concepts*. Cham, Schweiz: Springer International Publishing, 2024. ISBN 978-3-031-45467-7
- [85] K. D. Toennies, *An Introduction to Image Classification: From Designed Models to End-to-End Learning*. Singapur: Springer Nature Singapore, 2024. ISBN 978-981-9978-81-6
- [86] A. Ascenzi, L. Wühlrl, V. Feng, N. Klug, C. Pylatiuk, P. Cerretti, und R. Meier, „EntoSieve: automated size-sorting of insect bulk samples to aid accurate megabarcoding and metabarcoding,” preprint, doi: 10.22541/au.172769814.48739807/v1, 2024, Zugriff am 04.02.2025.
- [87] T. Hörren, M. Sorg, C. A. Hallmann, W. Stenmans, A. Ssymank, H. Theumert, J. Jürgens, B. Fleischer, und H. Schwan, „Development of an Insect Sample Fractionizer for Biodiversity Research,” bioRxiv, doi: 10.1101/2022.11.04.515206, 2022, Zugriff am 13.05.2024.
- [88] V. Elbrecht, S. J. Bourlat, T. Hörren, A. Lindner, A. Mordente, N. W. Noll, L. Schäffler, M. Sorg, und V. M. A. Zizka, „Pooling Size Sorted Malaise Trap Fractions to

- Maximize Taxon Recovery with Metabarcoding,” *PeerJ*, Vol. 9, *e12177*, 2021. doi: 10.7717/peerj.12177
- [89] M. Buffington und M. Gates, „The Fractionator: A Simple Tool for Mining ‘Black Gold’,” *Skaphion*, Vol. 2, 2008.
- [90] M. Haas-Renninger, N. Schwabe, M. Moser, und L. Krogmann, „Black Gold Rush - Evaluating the Efficiency of the Fractionator in Separating Hymenoptera Families in a Meadow Ecosystem over a Two Week Period,” *Biodiversity Data Journal*, Vol. 11, *e107051*, 2023. doi: 10.3897/BDJ.11.e107051
- [91] L. Wühlrl, L. Rettenberger, R. Meier, E. Hartop, J. Graf, und C. Pylatiuk, „Entomoscope: An Open-Source Photomicroscope for Biodiversity Discovery,” *IEEE Access*, Vol. 12, S. 11 785–11 794, 2024. doi: 10.1109/ACCESS.2024.3355272
- [92] N. Larios, H. Deng, W. Zhang, M. Sarpola, J. Yuen, R. Paasch, A. Moldenke, D. A. Lytle, S. R. Correa, E. N. Mortensen, L. G. Shapiro, und T. G. Dietterich, „Automated Insect Identification through Concatenated Histograms of Local Appearance Features: Feature Vector Generation and Region Detection for Deformable Objects,” *Machine Vision and Applications*, Vol. 19, Nr. 2, S. 105–123, 2008. doi: 10.1007/s00138-007-0086-y
- [93] D. A. Lytle, G. Martínez-Muñoz, W. Zhang, N. Larios, L. Shapiro, R. Paasch, A. Moldenke, E. N. Mortensen, S. Todorovic, und T. G. Dietterich, „Automated Processing and Identification of Benthic Invertebrate Samples,” *Journal of the North American Benthological Society*, Vol. 29, Nr. 3, S. 867–874, 2010. doi: 10.1899/09-080.1
- [94] M. L. Buffington, R. A. Burks, und L. McNeil, „Advanced Techniques for Imaging Parasitic Hymenoptera (Insecta),” *American Entomologist*, Vol. 51, Nr. 1, S. 50–56, 2005. doi: 10.1093/ae/51.1.50
- [95] P. Carrington-Hoekstra, J. Fernandez-Triana, L. A. Dyer, und J. Whitfield, „*Larissimusnigricans* Sp. Nov. (Hymenoptera, Braconidae), a New Reared Species of a Rare Neotropical Genus Recovered through Biodiversity Inventory in Ecuador,” *ZooKeys*, Vol. 1156, S. 15–24, 2023. doi: 10.3897/zookeys.1156.101396
- [96] B. Wipfler, H. Pohl, M. I. Yavorskaya, und R. G. Beutel, „A Review of Methods for Analysing Insect Structures — the Role of Morphology in the Age of Phylogenomics,” *Current Opinion in Insect Science*, Vol. 18, S. 60–68, 2016. doi: 10.1016/j.cois.2016.09.004
- [97] A. Cannet, C. Simon-chane, A. Histace, M. Akhoundi, O. Romain, M. Souchaud, P. Jacob, D. Sereno, P. Bousses, und D. Sereno, „An Annotated Wing Interferential

- Pattern Dataset of Dipteran Insects of Medical Interest for Deep Learning,” *Scientific Data*, Vol. 11, Nr. 1, 4, 2024. doi: 10.1038/s41597-023-02848-y
- [98] Z. Gharaee, Z. Gong, N. Pellegrino, I. Zarubiieva, J. B. Haurum, S. C. Lowe, J. T. A. McKeown, C. C. Y. Ho, J. McLeod, Y.-Y. C. Wei, J. Agda, S. Ratnasingham, D. Steinke, A. X. Chang, G. W. Taylor, und P. Fieguth, „A Step Towards Worldwide Biodiversity Assessment: The BIOSCAN-1M Insect Dataset,” arXiv, doi: 10.48550/arXiv.2307.10455, 2023, Zugriff am 08.05.2024.
- [99] D. R. Bourne, C. J. Kyle, H. N. LeBlanc, und D. Beresford, „Technical Note: A Rapid, Non-Invasive Method for Measuring Live or Preserved Insect Specimens Using Digital Image Analysis,” *Forensic Science International: Synergy*, Vol. 1, S. 140–145, 2019. doi: 10.1016/j.fsisy.2019.07.006
- [100] P. Boniecki, K. Koszela, H. Piekarska-Boniecka, J. Weres, M. Zaborowicz, S. Kujawa, A. Majewski, und B. Raba, „Neural Identification of Selected Apple Pests,” *Computers and Electronics in Agriculture*, Vol. 110, S. 9–16, 2015. doi: 10.1016/j.compag.2014.09.013
- [101] S. M. Al-Saqer und G. M. Hassan, „Artificial Neural Networks Based Red Palm Weevil (*Rynchophorus Ferrugineus*, Olivier) Recognition System,” *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, Vol. 6, Nr. 3, S. 356–364, 2011. doi: 10.3844/ajabssp.2011.356.364
- [102] L.-Q. Zhu und Z. Zhang, „Auto-Classification of Insect Images Based on Color Histogram and GLCM,” in *2010 Seventh International Conference on Fuzzy Systems and Knowledge Discovery*, Vol. 6, S. 2589–2593, 10.-12. Nov. Yantai, China, 2010. doi: 10.1109/FSKD.2010.5569848
- [103] L. K. Leow, L.-L. Chew, V. C. Chong, und S. K. Dhillon, „Automated Identification of Copepods Using Digital Image Processing and Artificial Neural Network,” *BMC Bioinformatics*, Vol. 16, Nr. 18, S4, 2015. doi: 10.1186/1471-2105-16-S18-S4
- [104] H.-P. Yang, C.-S. Ma, H. Wen, Q.-B. Zhan, und X.-L. Wang, „A Tool for Developing an Automatic Insect Identification System Based on Wing Outlines,” *Scientific Reports*, Vol. 5, Nr. 1, S. 12786, 2015. doi: 10.1038/srep12786
- [105] P. K. Mendez, S. Lee, und C. E. Venter, „Imaging Natural History Museum Collections from the Bottom up: 3D Print Technology Facilitates Imaging of Fluid-Stored Arthropods with Flatbed Scanners,” *ZooKeys*, Vol. 795, S. 49–65, 2018. doi: 10.3897/zookeys.795.28416
- [106] A. Tofilski, „DrawWing, a Program for Numerical Description of Insect Wings,” *Journal of Insect Science*, Vol. 4, Nr. 1, 17, 2004. doi: 10.1093/jis/4.1.17

- 
- [107] M. Tuda und A. I. Luna-Maldonado, „Image-Based Insect Species and Gender Classification by Trained Supervised Machine Learning Algorithms,” *Ecological Informatics*, Vol. 60, 101135, 2020. doi: 10.1016/j.ecoinf.2020.101135
- [108] S. Kiranyaz, T. Ince, J. Pulkkinen, M. Gabbouj, J. Ärje, S. Kärkkäinen, V. Tirronen, M. Juhola, T. Turpeinen, und K. Meissner, „Classification and Retrieval on Macroinvertebrate Image Databases,” *Computers in Biology and Medicine*, Vol. 41, Nr. 7, S. 463–472, 2011. doi: 10.1016/j.compbiomed.2011.04.008
- [109] J. Raitoharju, E. Riabchenko, I. Ahmad, A. Iosifidis, M. Gabbouj, S. Kiranyaz, V. Tirronen, J. Ärje, S. Kärkkäinen, und K. Meissner, „Benchmark Database for Fine-Grained Image Classification of Benthic Macroinvertebrates,” *Image and Vision Computing*, Vol. 78, S. 73–83, 2018. doi: 10.1016/j.imavis.2018.06.005
- [110] J. Ärje, C. Melvad, M. R. Jeppesen, S. A. Madsen, J. Raitoharju, M. S. Rasmussen, A. Iosifidis, V. Tirronen, M. Gabbouj, K. Meissner, und T. T. Høye, „Automatic Image-Based Identification and Biomass Estimation of Invertebrates,” *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 11, Nr. 8, S. 922–931, 2020. doi: 10.1111/2041-210X.13428
- [111] S. Fudickar, E. J. Nustede, E. Dreyer, und J. Bornhorst, „Mask R-CNN Based C. Elegans Detection with a DIY Microscope,” *Biosensors*, Vol. 11, Nr. 8, 257, 2021. doi: 10.3390/bios11080257
- [112] C. Pylatiuk, M. Vogt, P. Scheikl, Gottwald, und Eric, „Automated Versatile DIY Microscope Platform,” in *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, S. 5310–5312, 18.-12. Jul. Honolulu, Hawaii, 2010. doi: 10.1109/EMBC.2018.8513465
- [113] S. H. Needs, T. T. Diep, S. P. Bull, A. Lindley-Decaire, P. Ray, und A. D. Edwards, „Exploiting Open Source 3D Printer Architecture for Laboratory Robotics to Automate High-Throughput Time-Lapse Imaging for Analytical Microbiology,” *PLOS ONE*, Vol. 14, Nr. 11, e0224878, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0224878
- [114] A. Gervasi, P. Cardol, und P. E. Meyer, „Automated Open-Hardware Multiwell Imaging Station for Microorganisms Observation,” *Micromachines*, Vol. 13, Nr. 6, 833, 2022. doi: 10.3390/mi13060833
- [115] J. Hohlbein, B. Diederich, B. Marsikova, E. G. Reynaud, S. Holden, W. Jahr, R. Haase, und K. Prakash, „Open Microscopy in the Life Sciences: Quo Vadis?” *Nature Methods*, Vol. 19, Nr. 9, S. 1020–1025, 2022. doi: 10.1038/s41592-022-01602-3
- [116] A. C. Zehrer, A. Martin-Villalba, B. Diederich, und H. Ewers, „An Open-Source, High Resolution, Automated Fluorescence Microscope,” *eLife*, Vol. 12, 2023. doi: 10.7554/eLife.89826.1

- [117] J. T. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. Jieh Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski, und R. Bowman, „Robotic Microscopy for Everyone: The OpenFlexure Microscope,” *Biomedical Optics Express*, Vol. 11, Nr. 5, 2447, 2020. doi: 10.1364/BOE.385729
- [118] V. D. Ingenieure, „VDI/VDE 2206 - 2021-11,” <https://www.beuth.de/de/technische-regel/vdi-vde-2206/342674320>, 2021.
- [119] L. Wühl, K. Rotmann, R. Meier, E. Hartop, N. Klug, und C. Pylatiuk, „DiversityScanner-360°: An Automated System for Digitizing Invertebrate Bulk Samples,” in *2023 3rd International Conference on Robotics, Automation and Artificial Intelligence (RAAI)*, S. 226–230, 14.-16. Dez. Singapur, 2023. doi: 10.1109/RAAI59955.2023.10601274
- [120] B. Ströbel, S. Schmelzle, N. Blüthgen, und M. Heethoff, „An Automated Device for the Digitization and 3D Modelling of Insects, Combining Extended-Depth-of-Field and All-Side Multi-View Imaging,” *ZooKeys*, Vol. 759, S. 1–27, 2018. doi: 10.3897/zookeys.759.24584
- [121] T.-N. Doan und C. V. Nguyen, „A Low-Cost Digital 3D Insect Scanner,” *Information Processing in Agriculture*, Mar. 2023. doi: 10.1016/j.inpa.2023.03.003
- [122] C. V. Nguyen, D. R. Lovell, M. Adcock, und J. L. Salle, „Capturing Natural-Colour 3D Models of Insects for Species Discovery and Diagnostics,” *PLOS ONE*, Vol. 9, Nr. 4, e94346, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094346
- [123] M. Sarpola, R. Paasch, E. Mortensen, T. Dietterich, D. Lytle, A. Moldenke, und L. Shapiro, „An Aquatic Insect Imaging System to Automate Insect Classification,” *Transactions of the ASABE*, Vol. 51, 2008. doi: 10.13031/2013.25375
- [124] R. Pulak, „Tools for Automating the Imaging of Zebrafish Larvae,” *Methods*, Vol. 96, S. 118–126, 2016. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.11.021
- [125] W. A. Pliskin und R. P. Esch, „Refractive Index of SiO<sub>2</sub> Films Grown on Silicon,” *Journal of Applied Physics*, Vol. 36, Nr. 6, S. 2011–2013, 1965. doi: 10.1063/1.1714393
- [126] P. Schiebener, J. Straub, J. M. H. Levelt Sengers, und J. S. Gallagher, „Refractive Index of Water and Steam as Function of Wavelength, Temperature and Density,” *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, Vol. 19, Nr. 3, S. 677–717, 1990. doi: 10.1063/1.555859
- [127] R. J. Jiménez Riobóo, M. Philipp, M. A. Ramos, und J. K. Krüger, „Concentration and Temperature Dependence of the Refractive Index of Ethanol-Water Mixtures: Influence

- of Intermolecular Interactions,” *The European Physical Journal E*, Vol. 30, Nr. 1, S. 19–26, 2009. doi: 10.1140/epje/i2009-10496-4
- [128] T. A. Scott, „Refractive Index of Ethanol–Water Mixtures and Density and Refractive Index of Ethanol–Water–Ethyl Ether Mixtures,” *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 50, Nr. 5, S. 406–412, 1946. doi: 10.1021/j150449a003
- [129] Bürkle, „Chemische Beständigkeit von Kunststoffen,” [https://www.buerkle.de/files\\_pdf/wissenswertes/liste\\_chemische\\_bestaeendigkeiten\\_de.pdf](https://www.buerkle.de/files_pdf/wissenswertes/liste_chemische_bestaeendigkeiten_de.pdf), 2022, Zugriff am 08.03.2024.
- [130] M. Chamblin, D. Paasch, D. A. Lytle, A. R. Moldenke, L. G. Shapiro, und T. G. Dietterich, „Design of an Automated System for Imaging and Sorting Soil Mesofauna,” *Biological Engineering Transactions*, Vol. 4, Nr. 1, S. 17–41, 2011. doi: 10.13031/2013.37174
- [131] A. Pfriem, C. Pylatiuk, R. Alshut, B. Ziegner, S. Schulz, und G. Bretthauer, „A Modular, Low-Cost Robot for Zebrafish Handling,” in *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, S. 980–983, 18. Aug.-01. Sep. San Diego, USA, 2012. doi: 10.1109/EMBC.2012.6346097
- [132] A. Pfriem, „Neues Konzept für ein modulares Robotersystem zur automatischen Untersuchung von Zebrabärblingen in Hochdurchsatzverfahren,” Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2016.
- [133] C. Pardo-Martin, T.-Y. Chang, B. K. Koo, C. L. Gilleland, S. C. Wasserman, und M. F. Yanik, „High-Throughput in Vivo Vertebrate Screening,” *Nature Methods*, Vol. 7, Nr. 8, S. 634–636, 2010. doi: 10.1038/nmeth.1481
- [134] P. Dettinger, T. Kull, G. Arekatla, N. Ahmed, Y. Zhang, F. Schneiter, A. Wehling, D. Schirmacher, S. Kawamura, D. Loeffler, und T. Schroeder, „Open-Source Personal Pipetting Robots with Live-Cell Incubation and Microscopy Compatibility,” *Nature Communications*, Vol. 13, Nr. 1, 2999, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-30643-7
- [135] E. Li, A. T. Lam, T. Fuhrmann, L. Erikson, M. Wirth, M. L. Miller, P. Blikstein, und I. H. Riedel-Kruse, „DIY Liquid Handling Robots for Integrated STEM Education and Life Science Research,” *PLOS ONE*, Vol. 17, Nr. 11, e0275688, 2022. doi: 10.1371/journal.pone.0275688
- [136] W. Ouyang, R. W. Bowman, H. Wang, K. E. Bumke, J. T. Collins, O. Spjuth, J. Carreras-Puigvert, und B. Diederich, „An Open-Source Modular Framework for Automated Pipetting and Imaging Applications,” *Advanced Biology*, Vol. 6, Nr. 4, 2101063, 2022. doi: 10.1002/adbi.202101063

- [137] L. Wühlrl, C. Pylatiuk, M. Giersch, und R. Meier, „DiversityScanner 4K: A High Resolution Extended Focus Camera Setup as Extension for the DiversityScanner,” in *HEN-NIGXXXIX 2022*, 24.-28. Jul. Helsinki, Finnland, 2022. doi: 10.5445/IR/1000151154
- [138] G. Jocher, A. Chaurasia, und J. Qiu, „Ultralytics YOLO,” <https://github.com/ultralytics/ultralytics>, 2023, Zugriff am 27.03.2024.
- [139] H. Shirali, J. Hübner, R. Both, M. Raupach, S. Schmidt, und C. Pylatiuk, „Image-Based Recognition of Parasitoid Wasps Using Advanced Neural Networks,” *bioRxiv*, doi: 10.1101/2024.01.01.573817, 2024, Zugriff am 08.05.2024.
- [140] S. Baghbani Kordmahale, J. Qu, A. Muliana, und J. Kameoka, „A Hydraulic Soft Microgripper for Biological Studies,” *Scientific Reports*, Vol. 12, Nr. 1, 21403, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-25713-1
- [141] C. Wen, D. E. Guyer, und W. Li, „Local Feature-Based Identification and Classification for Orchard Insects,” *Biosystems Engineering*, Vol. 104, Nr. 3, S. 299–307, 2009. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2009.07.002
- [142] Z. Le-Qing und Z. Zhen, „Automatic Insect Classification Based on Local Mean Colour Feature and Supported Vector Machines,” *Oriental Insects*, Vol. 46, Nr. 3-4, S. 260–269, 2012. doi: 10.1080/00305316.2012.738142
- [143] S. Badirli, C. J. Picard, G. Mohler, F. Richert, Z. Akata, und M. Dundar, „Classifying the Unknown: Insect Identification with Deep Hierarchical Bayesian Learning,” *Methods in Ecology and Evolution*, Vol. 14, Nr. 6, S. 1515–1530, 2023. doi: 10.1111/2041-210X.14104
- [144] A. Knyshov, S. Hoang, und C. Weirauch, „Pretrained Convolutional Neural Networks Perform Well in a Challenging Test Case: Identification of Plant Bugs (Hemiptera: Miridae) Using a Small Number of Training Images,” *Insect Systematics and Diversity*, Vol. 5, Nr. 2, 3, 2021. doi: 10.1093/isd/ixab004
- [145] D. Milošević, A. Milosavljević, B. Predić, A. S. Medeiros, D. Savić-Zdravković, M. Stojković Piperac, T. Kostić, F. Spasić, und F. Leese, „Application of Deep Learning in Aquatic Bioassessment: Towards Automated Identification of Non-Biting Midges,” *Science of The Total Environment*, Vol. 711, 135160, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135160
- [146] M. Valan, K. Makonyi, A. Maki, D. Vondráček, und F. Ronquist, „Automated Taxonomic Identification of Insects with Expert-Level Accuracy Using Effective Feature Transfer from Convolutional Networks,” *Systematic Biology*, Vol. 68, Nr. 6, S. 876–895, 2019. doi: 10.1093/sysbio/syz014

- 
- [147] D. Xia, P. Chen, B. Wang, J. Zhang, und C. Xie, „Insect Detection and Classification Based on an Improved Convolutional Neural Network,” *Sensors*, Vol. 18, Nr. 12, 4169, 2018. doi: 10.3390/s18124169
- [148] J. Deng, W. Dong, R. Socher, L.-J. Li, K. Li, und L. Fei-Fei, „ImageNet: A Large-Scale Hierarchical Image Database,” in *2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, S. 248–255, 20.-25. Jun. Miami, USA, 2009. doi: 10.1109/CVPR.2009.5206848
- [149] L. Fei-Fei, J. Deng, O. Russakovsky, A. Berg, und K. Li, „ImageNet,” <https://image-net.org/>, Zugriff am 27.03.2024.
- [150] A. Popkov, F. Konstantinov, V. Neimorovets, und A. Solodovnikov, „Machine Learning for Expert-Level Image-Based Identification of Very Similar Species in the Hyperdiverse Plant Bug Family Miridae (Hemiptera: Heteroptera),” *Systematic Entomology*, Vol. 47, Nr. 3, S. 487–503, 2022. doi: 10.1111/syen.12543
- [151] O. L. P. Hansen, J.-C. Svenning, K. Olsen, S. Dupont, B. H. Garner, A. Iosifidis, B. W. Price, und T. T. Høye, „Species-Level Image Classification with Convolutional Neural Network Enables Insect Identification from Habitus Images,” *Ecology and Evolution*, Vol. 10, Nr. 2, S. 737–747, 2020. doi: 10.1002/ece3.5921
- [152] K. Bjerger, J. B. Nielsen, M. V. Sepstrup, F. Helsing-Nielsen, und T. T. Høye, „An Automated Light Trap to Monitor Moths (Lepidoptera) Using Computer Vision-Based Tracking and Deep Learning,” *Sensors*, Vol. 21, Nr. 2, 343, 2021. doi: 10.3390/s21020343
- [153] A. N. Alves, W. S. R. Souza, und D. L. Borges, „Cotton Pests Classification in Field-Based Images Using Deep Residual Networks,” *Computers and Electronics in Agriculture*, Vol. 174, 105488, 2020. doi: 10.1016/j.compag.2020.105488
- [154] D. C. Amarathunga, J. Grundy, H. Parry, und A. Dorin, „Methods of Insect Image Capture and Classification: A Systematic Literature Review,” *Smart Agricultural Technology*, Vol. 1, 100023, 2021. doi: 10.1016/j.atech.2021.100023
- [155] J. Park, D. I. Kim, B. Choi, W. Kang, und H. W. Kwon, „Classification and Morphological Analysis of Vector Mosquitoes Using Deep Convolutional Neural Networks,” *Scientific Reports*, Vol. 10, Nr. 1, S. 1012, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-57875-1
- [156] R. Akter, M. S. Islam, K. Sohan, und M. I. Ahmed, „Insect Recognition and Classification Using Optimized Densely Connected Convolutional Neural Network,” in *12th International Conference on Information Systems and Advanced Technologies “ICISAT 2022”*, S. 251–264, 26.-27. Aug. Cham, Schweiz, 2022. doi: 10.1007/978-3-031-25344-7-23

- [157] K. S. Gill, V. Anand, R. Gupta, und V. Pahwa, „Insect Classification Using Deep Convolutional Neural Networks and Transfer Learning On MobileNetV3 Model,” in *2023 World Conference on Communication & Computing (WCONF)*, S. 1–5, 14.–16. Jul. 2022. doi: 10.1109/WCONF58270.2023.10235196
- [158] S. Lim, S. Kim, und D. Kim, „Performance Effect Analysis for Insect Classification Using Convolutional Neural Network,” in *2017 7th IEEE International Conference on Control System, Computing and Engineering (ICCSCE)*, S. 210–215, 24.–26. Nov. Penang, Malaysia, 2017. doi: 10.1109/ICCSCE.2017.8284406
- [159] K. Simonyan und A. Zisserman, „Very Deep Convolutional Networks for Large-Scale Image Recognition,” arXiv, doi: 10.48550/arXiv.1409.1556, 2015, Zugriff am 27.03.2024.
- [160] K. He, X. Zhang, S. Ren, und J. Sun, „Deep Residual Learning for Image Recognition,” arXiv, doi: 10.48550/arXiv.1512.03385, 2015, Zugriff am 27.03.2024.
- [161] C. S. Svenningsen, B. Peters, D. E. Bowler, R. R. Dunn, A. Bonn, und A. P. Tøttrup, „Insect Biomass Shows a Stronger Decrease than Species Richness along Urban Gradients,” *Insect Conservation and Diversity*, Vol. 17, Nr. 2, S. 182–188, 2024. doi: 10.1111/icad.12694
- [162] B. E. Sample, R. J. Cooper, R. D. Greer, und R. C. Whitmore, „Estimation of Insect Biomass by Length and Width,” *The American Midland Naturalist*, Vol. 129, Nr. 2, S. 234–240, 1993. doi: 10.2307/2426503
- [163] T. A. Johnston und R. A. Cunjak, „Dry Mass–Length Relationships for Benthic Insects: A Review with New Data from Catamaran Brook, New Brunswick, Canada,” *Freshwater Biology*, Vol. 41, Nr. 4, S. 653–674, 1999. doi: 10.1046/j.1365-2427.1999.00400.x
- [164] C. J. Brady und R. A. Noske, „Generalised Regressions Provide Good Estimates of Insect and Spider Biomass in the Monsoonal Tropics of Australia,” *Australian Journal of Entomology*, Vol. 45, Nr. 3, S. 187–191, 2006. doi: 10.1111/j.1440-6055.2006.00533.x
- [165] C. A. Martin, R. Proulx, und P. Magnan, „The Biogeography of Insects’ Length–Dry Mass Relationships,” *Insect Conservation and Diversity*, Vol. 7, Nr. 5, S. 413–419, 2014. doi: 10.1111/icad.12063
- [166] S. R. Ganihar, „Biomass Estimates of Terrestrial Arthropods Based on Body Length,” *Journal of Biosciences*, Vol. 22, Nr. 2, S. 219–224, 1997. doi: 10.1007/BF02704734
- [167] M. Brydegaard, R. D. Pedales, V. Feng, A. saint-doria Yamo, B. Kouakou, H. Månefjord, L. Wühl, C. Pylatiuk, D. d. S. Amorim, und R. Meier, „Towards Global Insect Bio-monitoring with Frugal Methods,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 379, Nr. 1904, 20230103, 2024. doi: 10.1098/rstb.2023.0103

- [168] L. Petani, L. Wühl, L. Koker, M. Reischl, J. Renz, U. Gengenbach, und C. Pylatiuk, „Development of an Experimental Setup for Real-Time In-Line Dissolved Ozone Measurement for Medical Therapy,” *Ozone: Science & Engineering*, Vol. 44, Nr. 5, S. 499–509, 2022. doi: 10.1080/01919512.2021.1932412
- [169] L. Petani, R. Barth, L. Wühl, I. Sieber, L. Koker, M. Reischl, U. Gengenbach, und C. Pylatiuk, „Investigation of a Simplified Photometer Design for the Measurement of Ozone Gas Concentration,” in *2022 IEEE-EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES)*, S. 94–99, 07.-09. Dez. Kuala Lumpur, Malaysia, 2022. doi: 10.1109/IECBES54088.2022.10079356
- [170] L. Petani, D. Tils, L. Wühl, I. Sieber, und C. Pylatiuk, „Design, simulation, and evaluation of a low-cost photometer for dissolved ozone measurement,” in *IEEE International Conference on Microwaves, Communications, Antennas, Biomedical Engineering & Electronic Systems (COMCAS)*, 09.-11. Jul. Tel Aviv, Israel, 2023/2024, (angenommen).
- [171] D. Borgel, „Entwicklung und Implementierung eines automatisierten, bildbasierten Systems zur Hochdurchsatz-Biodiversitätsforschung,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2024.
- [172] P. M. Blum, „Concept Development for the Automation of Wet Conservation Methods for Invertebrates,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023.
- [173] L. Keller, „Development and Implementation of Tools for the Automatic Manipulation of Invertebrate Samples of Different Sizes in Ethanol,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023.
- [174] I. Ahrens, „Development and construction of a mechatronic system to perforate PCR microplates to allow targeted liquid drainage,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2023.
- [175] N. My Dung Klug, „Concept Development and Implementation of an Automated System for the Size Sorting of Insects,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022.
- [176] W. Flaum, „Entwicklung von Handhabungswerkzeugen zum automatisierten Sortieren von in Ethanol konservierten Insekten,” Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022.
- [177] K. A. F. Rotmann, „Entwicklung eines mechatronischen Systems zur Biomassenbestimmung von Insekten mithilfe von 360° Bildaufnahmen,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2022.

- [178] M. Giersch, „Automatisierte Positionsbestimmung von Insekten und Klassifikation mittels Machine Learning Methoden für einen Sortierroboter,” Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2021.
- [179] F. Lapp, „Entwicklung einer Steuerung für einen kameragestützten Pipettierroboter,” Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland, 2021.