

Bewertung mikrobieller Kontaminationen in Prozeßwässern mit Hilfe von Farbklassifikation in Fluoreszenzmikroskopie-Bildern

Ralf Knöfel

Gesellschaft zur Förderung angewandter Informatik e.V.

Rudower Chaussee 30

12489 Berlin

knoefel@gfai.de

www.gfai.de

Hintergrund

In vielen Bereichen der Lebensmittel-, pharmazeutischen und chemischen Industrie ist eine schnelle, möglichst automatische, quantitative sowie qualitative Bestimmung kleinster mikrobieller Kontaminationen in klaren Flüssigkeiten erwünscht. Zum einen eröffnet eine solche Bestimmung neue Möglichkeiten der Prozesssteuerung und –optimierung, z. B. in Produktions und Abfüllanlagen der Getränkeindustrie, zum anderen kann sie in der Qualitätsprüfung und –sicherung von klaren, flüssigen Produkten, wie Mineralwässern, Eistees, usw. Anwendung finden.

Als Beispiel für den Einsatz der mikrobiellen Kontaminationsbestimmung ist im Folgenden die Optimierung von Reinigungsvorgängen in aseptischen Abfüllanlagen, Vorrats- und Lagertanks ausgeführt: Um bei diesen Reinigungsvorgängen Wasser- und Energieeinsparungen zu realisieren, wurde die Mehrfachnutzung von Reinigungslösungen bzw. die Stapelung von Spülwässern, bei der das letzte Spülwasser zum Vorspülen für den nächsten Reinigungszyklus verwendet wird, als Stand der Technik etabliert. Die Mehrfachverwendung der Reinigungslösung erfordert eine Überwachung des jeweils eingetretenen Verschmutzungsgrades der einzelnen Kreisläufe. Mit der Kontaminationsbestimmung müssen die mikrobiellen Veränderungen in den Lösungen zeitnah analysiert und bewertet werden, so dass bei vorliegender Kontamination geeignete Maßnahmen, wie das Entfernen der Verschmutzungen über ein Filtrationsmodul oder der komplette Austausch der Lösungen, eingeleitet werden können. Im Ergebnis kann eine „Verlaufskurve“ des Verschmutzungsgrades über mehrere Spülungen erstellt werden, so dass davon Grundlagen für eine „vorhersehende“ Strategie des Austauschs ableitbar sind.

Problemstellung

Bisherige Methoden zur Bestimmung geringster Vorkommen von lebenden bzw. vermehrungsfähigen kontaminierenden Mikroorganismen in klaren Flüssigkeiten erfordern eine zeitaufwendige Laborauswertung von Proben (Fluoreszenzfiltertechnik), sind nur für größere Keimzahlen geeignet (Impedanzmessung, Flow-Cytometrie, Biolumineszenz) oder detektieren nur bestimmte Mikroorganismen (RNA-Sonden, Polymerasekettenreaktion, Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay). Zur Kontrolle von Spül- und Prozeßwässern mit der Möglichkeit zur Anlagensteuerung müssen jedoch in einem automatisierten Vorgang prozeßnah umfassende und differenzierte

Messwerte ermittelt werden. Die Qualitätssicherung von klaren, flüssigen Produkten stellt ähnliche Anforderungen an ein Messverfahren. Neben der Erfassung der Menge und Art der Organismen ist hierbei die Feststellung ihrer Lebensfähigkeit (Vitalität) von herausragender Bedeutung, da nur die lebensfähigen Organismen aufgrund ihrer potentiellen Vermehrungsfähigkeit die Kontamination im Zeitverlauf über einzuhalten Grenzwerte hinaus erhöhen können. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Farbmarkern (Fluochromen) für lebende und abgestorbene Mikroorganismen wird bei der Fluoreszenzfiltertechnik durch manuelle mikroskopische Sichtauswertung bereits eine Vitalitätsbestimmung vorgenommen, die jedoch neben dem Zeit- und Arbeitsaufwand den subjektiven Faktor des Auswerters beinhaltet, und deren Verfahrensschritte nicht automatisch dokumentierbar sind.

Bildgewinnung

Die Automatisierung der Fluoreszenzfiltertechnik [1] kann im Gegensatz zur Automatisierung der anderen genannten Verfahren alle beschriebenen Nachteile ausräumen. Gleichzeitig werden die Vorteile der genauen Detektion und des breiten Spektrums erfassbarer Kontaminationen einem größeren Anwendungskreis zugänglich gemacht. Der Einsatz von Farbbildverarbeitung im Kernbereich Vitalitätsbestimmung ermöglicht mit Hilfe der, dem menschlichen Auge überlegenen, Kamera-Farbauflösung, zudem genauere Ergebnisse. Ein automatisches Verfahren ist objektiv und Schritt für Schritt dokumentierbar. Voraussetzung für die Automatisierung ist die Gewinnung digitaler Probenbilder zur computergestützten Auswertung. Der Ablauf der Bildgewinnung für die Farb- und Formklassifizierung enthaltener Mikroorganismen geschieht dabei folgendermaßen: Die Probenflüssigkeit wird mit den Fluochromen für lebende und abgestorbene Mikroorganismen versehen und durch einen Mikrofilter angesaugt, wodurch sich die nicht flüssigen Inhaltsstoffe auf dem Filter ansammeln. Über eine Vergrößerungsvorrichtung werden Aufnahmen mit einer Auflösung von mindestens 2500 Pixeln pro mm gemacht. Damit können auch sehr kleine Organismen, wie z.B. Bakterien, noch erfasst werden. Derart erzeugte Aufnahmen (siehe Abbildung 2) bilden die Grundlage zur Entwicklung von Methoden zur automatischen Segmentierung, Objektdetektion, Klassifikation und Vitalitätsbestimmung durch Farbauswertung.

Segmentierung und Objektdetektion

Da es in vielen Fällen genügt, von möglichen mikrobiellen Kontaminationen Hefen [2] und Bakterien sicher zu detektieren, wurde zunächst das Augenmerk auf diese Organismen gerichtet. Beide heben sich durch die Intensität des von den Fluochromen emittierten Lichts deutlich vom Hintergrund ab und lassen sich damit nach einer Transformation des RGB-Bildes in den HSI-Raum im Intensitätskanal detektieren. Allerdings ist das Signal der Hefen stärker als das der Bakterien. Aufgrund dieses Unterschieds kann die Trennung vom Hintergrund durch Binarisierung nur durch eine getrennte Schwellwertfindung für die jeweilige Organismenart erfolgen. Da im Gesamtbild die schwachen Bakteriensignale kaum ins Gewicht fallen, können in diesem mit Hilfe eines Kantenoperators und der Minimum-Varianz-Methode (Methode von Otsu) zunächst die Hefensegmente ermittelt und anschließend ihre Signale zur Bakterienermittlung maskiert werden. Die Bakterien können dann analog in den verbleibenden Signalen segmentiert werden. Die Segmente beider Objektarten werden

danach geschlossen und gefüllt und Verbände vereinzelt. Die detektierten Objekte sind damit zur Klassifizierung und Vitalitätsbestimmung vorbereitet [3].

Klassifizierung nach Größe und Morphologie

Die Objektdetektion brachte, wie beschrieben, eine Vorunterscheidung von Hefen und Bakterien, die jedoch nicht immer eindeutig ist und sonstige Objekte beinhalten kann. Deshalb wird eine Klassifizierung der gesamten Objektmenge nach Form und Größe vorgenommen. Durch einen oberen und unteren Grenzwert für Rundheit und Größe sowohl für die Bakterien als auch für die Hefen, der je nach Vergrößerung und Art der zu detektierenden Organismen variiert werden kann, wird der Umfang der Klassen festgelegt. Große, runde Objekte werden somit als Hefen, kleine, längliche als Bakterien klassifiziert. Sehr große und sehr kleine Objekte können als sonstige Verunreinigungen bzw. Störungen, wie Rauschen oder ähnliches, angesehen werden (siehe Abbildung 3).

Vitalitätsbestimmung nach Farbe

Für die Feststellung der Vitalität der mikrobiellen Kontaminationen ist die Art der Farbsignale ausschlaggebend. Die verwendeten Fluochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren es bei einer anderen längeren Wellenlänge. Bei der Bildaufnahme wird die Probe mit UV-Licht beleuchtet, das von den Fluochromen absorbiert und als Licht im sichtbaren Bereich emittiert wird. Die Fluochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) und PJ (Propiumjodid), von denen DAPI als Marker für vitale [4] und PJ für nicht vitale Mikroorganismen dient, zeigen für diese Anwendung eine gute Korrelation zwischen Farbe und Vitalität. Lebende Organismen mit intakter Membran lassen nur DAPI eindringen und fluoreszieren dadurch bei UV-Anregung blau. Organismen mit defekter Membran hingegen lassen vor allem Propiumjodid eindringen und fluoreszieren bei der selben Anregung gelb.

Damit kann nun der Farbton-Kanal zur Vitalitätsbestimmung der gefundenen Organismen herangezogen werden. Aufgrund der Sichtklassifizierung durch Experten der Fluoreszenzfiltertechnik wird festgelegt, bei welchen Farbton-Werten die Grenze zwischen lebend und abgestorben liegt. Der mittlere Farbton innerhalb des Umrisses eines Organismus' ist Ausgangspunkt für die Berechnung eines Vitalitätsmaßes. Die Vitalität ist umso größer je größer der Abstand dieses Wertes vom nächstgelegenen Grenzwert in Richtung Blauton ist. Sie ist andererseits umso kleiner je größer dieser Abstand in Richtung des Gelbtönen ist (siehe Abbildung 1). Weitere Informationen liefert der Sättigungskanal, da durch ihn eine Gewichtung des Vitalitätsmaßes vorgenommen werden kann: um so größer die Farbsättigung, um so stärker fällt das aus dem Farbton ermittelte Vitalitätsmaß ins Gewicht (siehe Abbildung 4).

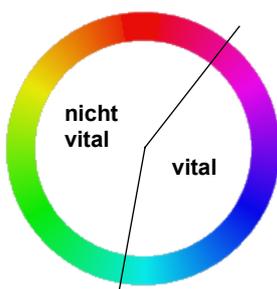


Abbildung 1: Farbtonbereiche für vital und nicht vital

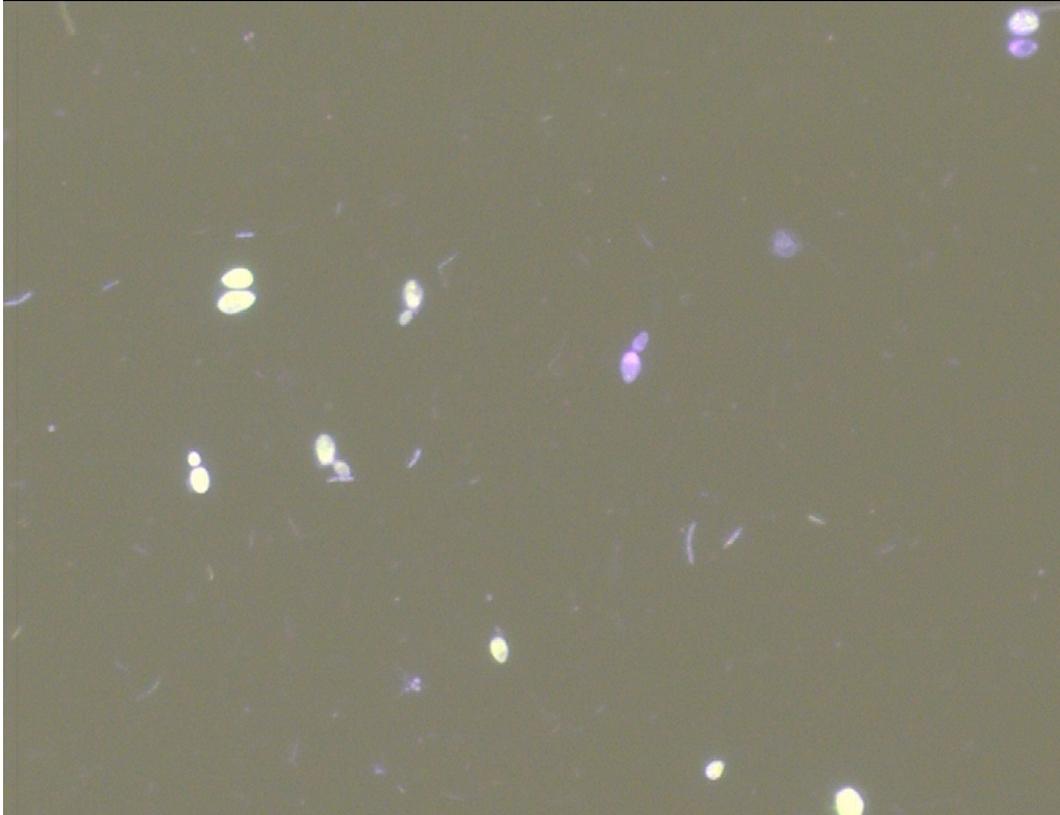


Abbildung 2: Labor-Probenbild mit Hefen und Bakterien, eingefärbt mit DAPI und PJ, UV-Anregung, 752Pixel x 582Pixel, 0,120mm x 0,093mm

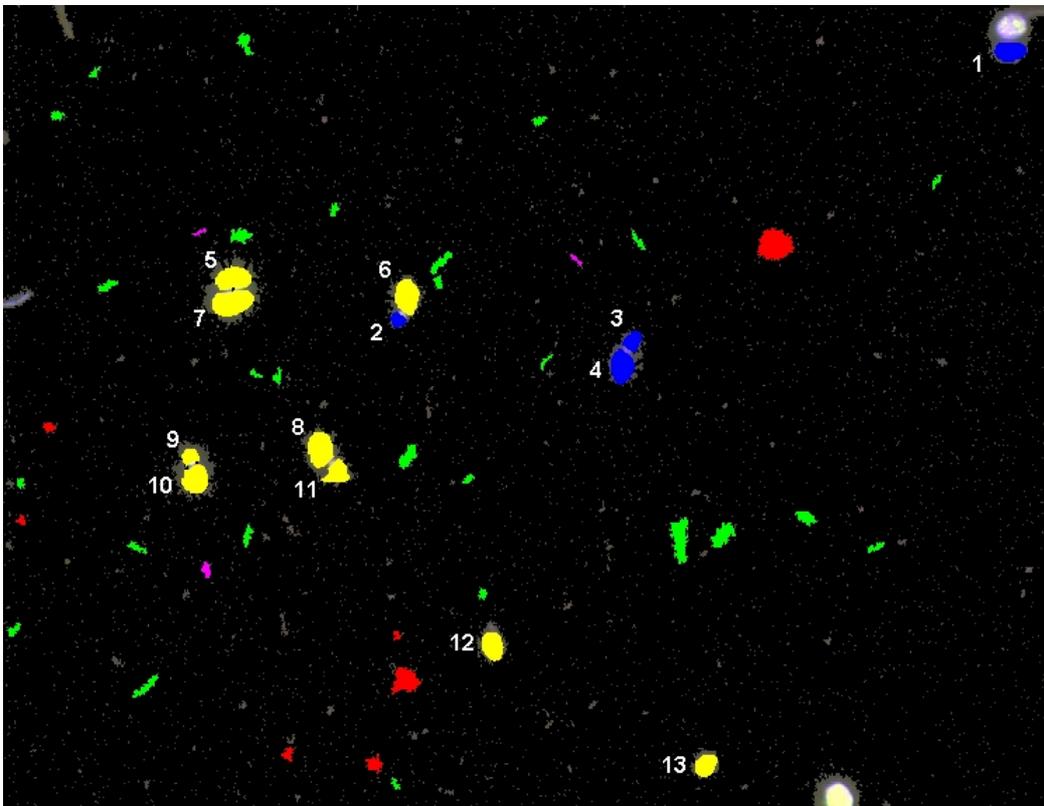


Abbildung 3: Die monochrom dargestellten Objekte wurden detektiert. Vitalitätsbereich: Farbton 120-240; Klassifizierung: Blau: vitale Hefen, Gelb: nicht vitale Hefen, Grün: vitale Bakterien, Magenta: nicht vitale Bakterien, Rot: sonstige Verunreinigungen; Nummerierung zum Vitalitätsmaß (siehe Abbildung 4)

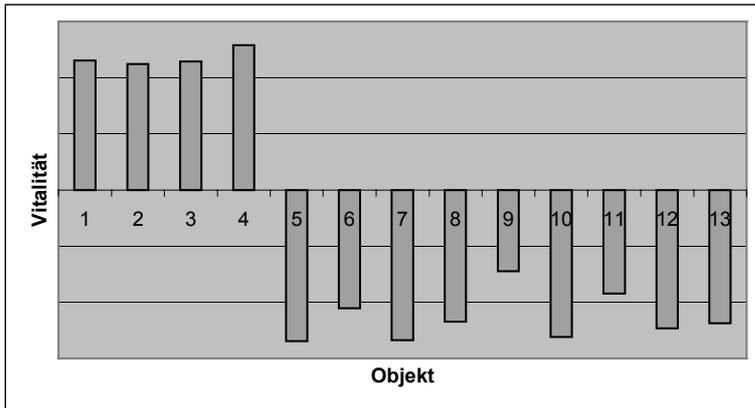


Abbildung 4: Vitalitätsdiagramm der Hefen zu den Bildern Abbildung 2 und 3

Ergebnis

Bei der Auswertung von Reinigungswässern aus einer Anlage der Käseherstellung konnte das auf der Basis von Laborproben entwickelte Verfahren validiert werden. Durch die Einstellung von Parametern, wie Größen-, Formfaktor- und Farbgrenzwerte für die Klassifizierung wird es auf den Anwendungsfall eingestellt. Die Ergebnisse sind in Puncto Genauigkeit den Sichtauswertungen gleichwertig, bieten aber die Vorteile Schnelligkeit, Objektivität und durchgehende Dokumentierbarkeit und können als Basis für weitere Automatisierung in der Anlagensteuerung und -regelung dienen. Teile einer Beispielauswertung solcher Reinigungswässer sind in den Abbildungen 5-7 dargestellt.

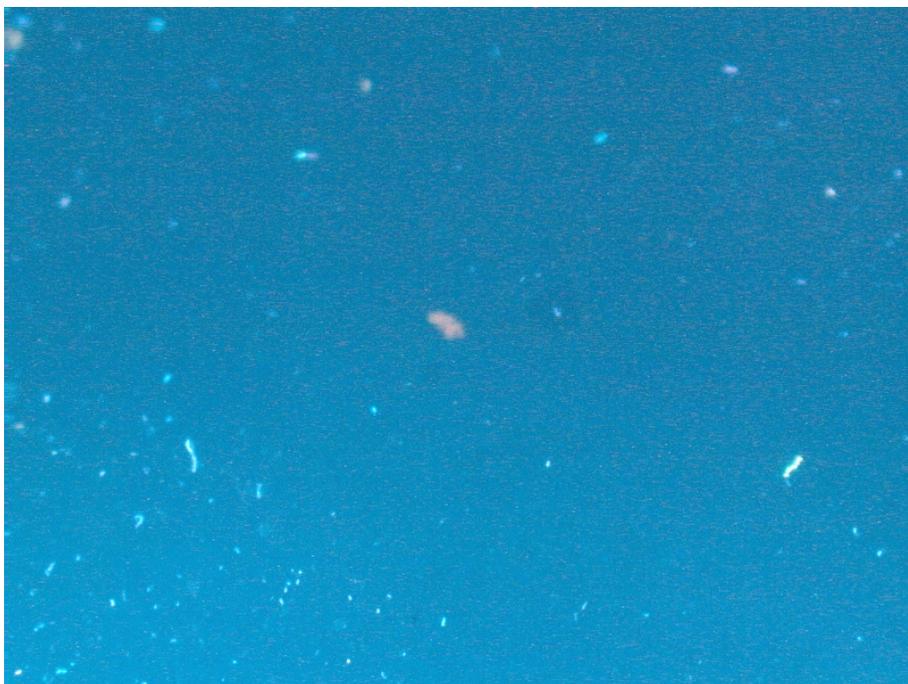


Abbildung 5: Probenbild von Reinigungswasser aus der Käseherstellung, enthält Hefen und Bakterien, eingefärbt mit DAPI und PJ, UV-Anregung, 800Pixel x 600Pixel, 0,320mm x 0,240mm

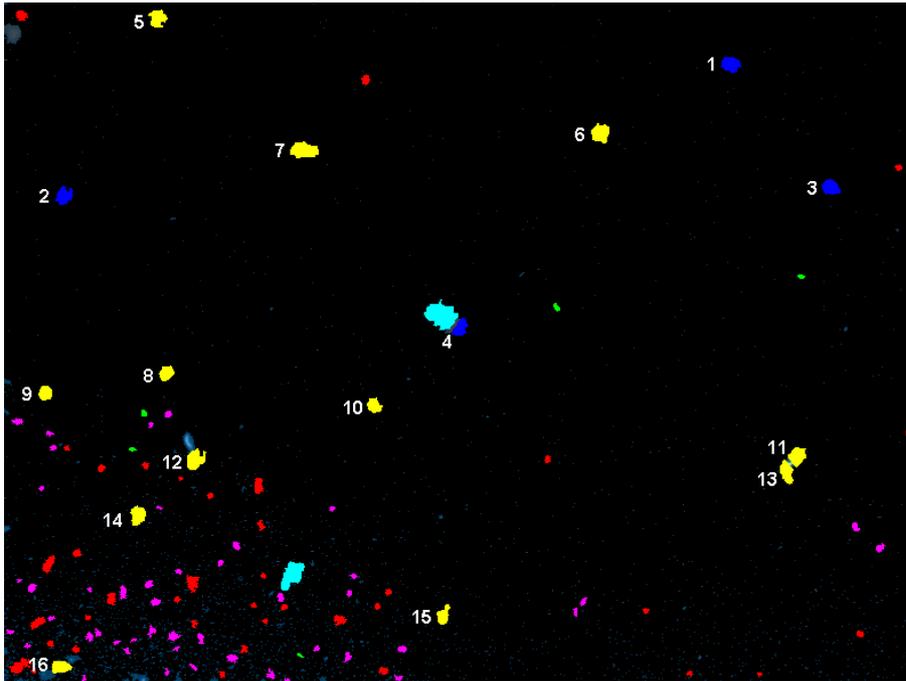


Abbildung 6: Die monochrom dargestellten Objekte wurden detektiert. Vitalitätsbereich: Farbton 145-235; Klassifizierung: Blau: vitale Hefen, Gelb: nicht vitale Hefen, Grün: vitale Bakterien, Magenta: nicht vitale Bakterien, Rot: sonstige kleine Verunreinigungen, Türkis: sonstige große Verunreinigungen.

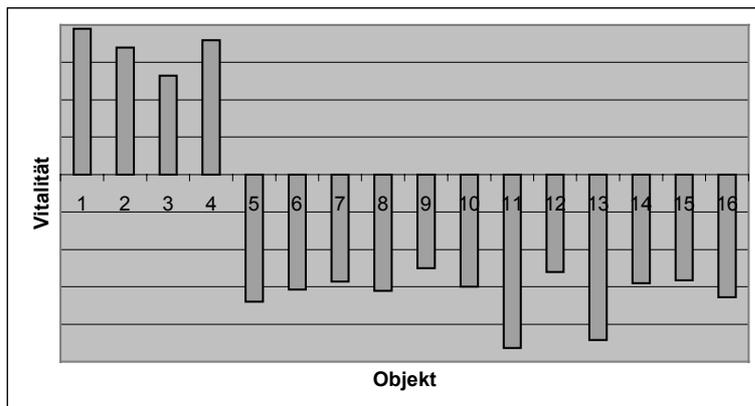


Abbildung 7: Vitalitätsdiagramm der Hefen zu den Bildern Abbildung 5 und 6

Danksagung

Die vorgestellten Arbeiten werden in Kooperation mit der IBN GmbH Dresden im Rahmen des Forschungsprojekts „Zeitnahe, rückgekoppelte Detektion und Bewertung mikrobieller Kontaminationen in Prozeßwässern mittels prozeßangepaßter Probenahme und digitaler Bildverarbeitung (KonDek)“, das von der AiF e.V. im Rahmen der industriellen Gemeinschaftsforschung des Initiativprogrammes ZuTech für kleine und mittlere Unternehmen unter dem Förderkennzeichen 12801 BR gefördert wird, durchgeführt.

Literatur

- [1] Betts, R. P.; Farr, L.; Bankes, P.; Stringer, M.F.: The detection of irradiated foods using the Direct Epifluorescent Filter Technique. *Journal of Applied Bacteriology* 64 (1988), S. 329-335
- [2] Zalewski, K.: Entwicklung eines Bildanalyse-Systems zur on-line Charakterisierung von Hefesuspensionen. Diplomarbeit, TU Berlin 1995
- [3] Russ, J. C.: *The Image Processing Handbook*, CRC Press LLC, 1999
- [4] Ross, J.; Boon, P. I.; Sharma, R.; Beckett, R.: Variations in the Fluorescence Intensity of Intact Dapi-Stained Bacteria and Their Implications for Rapid Bacterial Quantification. *LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY* 22 (1996) 4, S. 283-287