

**Digitale Bildsignalverarbeitung in der Bioinformatik:  
Methoden zur Segmentierung und Klassifizierung  
biologischer Merkmale  
am Beispiel ausgewählter Diatomeen**

**Masterarbeit**

vorgelegt von

**Michael Kloster, Matr. Nr. 5010849**



Fachbereich Technik, Abteilung Naturwissenschaftliche Technik  
Studiengang Applied Life Sciences (Master of Engineering)

Emden, Mai 2013

Diese wissenschaftliche Arbeit wurde  
von Dezember 2012 bis Mai 2013  
an der Hochschule Emden/Leer in Emden,  
betreut von Prof. Dr. Gerhard Kauer,  
und am Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven,  
betreut von Dr. Bank Beszteri, angefertigt.

Gutachter der Arbeit:  
Prof. Dr. Gerhard Kauer  
Prof. Dr. Martin Sohn  
Hochschule Emden/Leer

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die beiliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Emden, 21. Mai 2013

\_\_\_\_\_

Michael Kloster

## Zusammenfassung

Die geographische Verteilung von Diatomeenarten bzw. die unterschiedliche morphologische Ausprägung derselben Diatomeenart sind Gegenstand aktueller biologischer und paläoklimatologischer Forschung. Computergestützte Verfahren können in diesen Bereichen die hierzu notwendige Analyse erheblich beschleunigen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Schwerpunkte:

Zum einen die Entwicklung einer praxistauglichen Lösung für die rechnergestützte Auswertung von Massenscreenings lichtmikroskopischer Aufnahmen der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis*. Diese identifiziert relevante Valven, ermittelt ihre geometrischen Grunddaten und ordnet sie einer bestimmten Formausprägung zu.

Zum anderen die Untersuchung von Algorithmen für die rechnerunterstützte taxonomische Klassifizierung von Diatomeenvalven. Diese basieren auf vertieften Strukturanalysen unter besonderer Beachtung der Problematik dreidimensionaler Aspekte und der Verwendung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren.

## Abstract

The geographical distribution of diatom species as well as the morphological characteristics of the same diatom species are the subject of current biological and paleoclimatological research. Computer assisted procedures can help to considerably accelerate the necessary analysis in this area of research.

The presented paper covers two main points:

First of all, the development of a practicable solution for a computer supported evaluation of mass screenings concerning light microscopic pictures of *Fragilariopsis kerguelensis*. This technique identifies relevant valves, calculates their basic geometric data and matches them to a specific manifestation of shape.

Secondly, the examination of algorithms for the computer assisted taxonomic classification of diatom valves. These are based on detailed structural analyses with regard to the problematic nature of three dimensional aspects and the application of different light microscopical procedures.

# Inhalt

1	Einführung.....	1
1.1	Allgemeines zu Diatomeen.....	1
1.2	Biologische Bedeutung von Diatomeen.....	3
1.3	Friedrich-Hustedt-Zentrum für Diatomeenforschung.....	5
1.4	Probleme bei der Klassifizierung.....	5
1.5	Bisherige Projekte zur computergestützten Identifizierung und Klassifizierung.....	6
1.5.1	ADIA.....	6
1.5.2	DIADIST.....	6
1.5.3	Common Freshwater Diatoms of Britain and Ireland.....	7
1.6	Schwerpunkte dieser Arbeit.....	7
1.6.1	Automatisierte Identifikation relevanter Diatomeenvalven in Massenscreenings.....	7
1.6.2	Rechnergestützte Analyse morphologischer Strukturmerkmale für die taxonomische Klassifizierung.....	7
2	Geräte - Bildaufnahme.....	9
2.1	Verwendete Technik.....	9
2.1.1	Metafer Slide Scanning Platform für Massenscreenings.....	9
2.1.2	Axio Imager.Z2 für hochaufgelöste Lichtmikroskopie zur Strukturuntersuchung.....	10
2.2	Optische Auflösung.....	11
2.3	Kontrastverstärkende lichtmikroskopische Verfahren.....	13
2.4	Problematische Objekte.....	14
3	Methoden - Massenscreening.....	17
3.1	Bildvorverarbeitung / Verminderung des Rauschanteils.....	17
3.1.1	Gaußfilter.....	18
3.1.2	Medianfilter.....	19
3.2	Segmentierung.....	19
3.2.1	Segmentierungsverfahren.....	20
3.2.2	Ergebnisstreuung durch Kombination von Segmentierungsverfahren.....	32
3.3	Bildnachbearbeitung / morphologisches Closing.....	33
3.4	Merkmalsextraktion.....	34
3.4.1	Ermittlung von Konturen.....	34
3.4.2	Parameter zum Eingrenzen valider Konturen.....	34
3.5	Klassifikation / Qualitätsindikatoren.....	35
3.5.1	Vergleich mit Templates.....	35

3.5.2	Konvexität als Maß für die Segmentierungsqualität sowie die Form und Intaktheit von Valven .....	39
3.5.3	Auswertung des Höhen-/Breitenverhältnisses .....	43
3.5.4	Ranking.....	44
3.5.5	Verworfenen Indikatoren.....	44
3.6	Software „DiatomorphoTo“ .....	45
3.6.1	Libraries.....	45
3.6.2	Architektur und Funktionen .....	46
3.6.3	Funktionalität von DiatoMorphoTo .....	50
3.6.4	Wichtige interne Funktionsweisen.....	50
4	Methoden - Analyse taxonomisch relevanter Strukturmerkmale .....	53
4.1	2D-Focus-Stacking .....	53
4.1.1	Helicon Focus .....	53
4.1.2	2,5D-Stacking.....	54
4.2	3D-Stacking.....	54
4.3	Analyse repetitiver Valvenstrukturen in der Frequenzdomäne.....	57
4.4	Analyse der Chromophor-Verteilung mittels Auflichtfluoreszenz .....	58
5	Ergebnisse und Diskussion – Massenscreening .....	60
5.1	Beschränkungen der Binarisierung .....	60
5.2	Verbesserung der Valvenidentifikation durch Kombination mehrerer Segmentierungsverfahren.....	61
5.3	Ergebnisunterschiede bei Anwendung verschiedener Segmentierungsverfahren.....	67
5.4	Empfohlene Parameter .....	70
5.5	Verwendung von 2D-Focus-Stacking.....	71
5.6	Beschränkungen des vorgeschlagenen Verfahrens .....	71
6	Ergebnisse und Diskussion - Analyse taxonomisch relevanter Strukturmerkmale.....	72
6.1	Vergleich der lichtmikroskopischen Verfahren .....	72
6.2	Vergleich der Stackingverfahren .....	78
6.3	Perspektivische Korrektur anhand von 3D-Stacks .....	84
6.4	Analyse repetitiver Valvenstrukturen in der Frequenzdomäne auf Basis von perspektivisch korrigierten 3D-Stacks.....	85
6.5	Vermessung von 3D-Strukturen für die taxonomische Analyse .....	86
6.6	Vergleich Chromophore – Schale .....	87
7	Ausblick .....	88
7.1	Massenscreening.....	88
7.2	Strukturanalyse .....	89

8	Anhang .....	90
8.1	Anleitung DiatoMorphoTo .....	90
8.1.1	Templates.....	91
8.1.2	Bilddaten .....	92
8.1.3	Konturanalyse.....	97
8.1.4	Settings.....	101
8.2	Literaturverzeichnis.....	102
8.3	Datenträger .....	106

# 1 Einführung

Untersuchungen zur Artenverteilung oder unterschiedlichen morphologischen Ausprägung derselben Diatomeenart bilden die Grundlage für eine Reihe biologischer und paläoklimatologischer Forschungsbereiche. Entsprechende Datenanalysen werden häufig auf Grundlage umfangreicher Massenscreenings vorgenommen, da das Ausgangsmaterial aus Sediment- oder Planktonproben gewonnen wird, welche in großer Anzahl vorliegen bzw. eine hohe Dichte an Untersuchungsobjekten aufweisen. Diatomeen werden im mikroskopischen Maßstab untersucht, entsprechend hoch ist der Aufwand, welcher mit dem manuellen Sichten, Identifizieren und Vermessen umfangreicher Probenmengen verbunden ist. Eine ganz oder zumindest teilweise automatisierte Lösung würde zu einer deutlichen Reduzierung dieses Aufwands führen. Daher wurde bereits eine Reihe von Projekten zur automatischen Identifizierung und Klassifizierung von Diatomeen anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen durchgeführt, jedoch scheint für diese Aufgabe bisher keine kostenlose oder als Open Source verfügbare Software zu existieren, die den Anforderungen an einen routinemäßigen Einsatz gerecht würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Schwerpunkte verfolgt: Es wurde eine automatisierte und praxistaugliche Lösung zur Identifizierung relevanter Diatomeenvalven in lichtmikroskopischen Massenscreenings entwickelt. Darüber hinaus wurden Algorithmen für die rechnergestützte taxonomische Klassifizierung auf Basis vertiefter Strukturanalysen untersucht, hierbei wurde besonders die Problematik dreidimensionaler Aspekte und der Verwendung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren beachtet.

Diese Arbeit kombiniert die Disziplinen Bildverarbeitung und biologische Taxonomie, daher sei auf die unterschiedliche Verwendung der Begriffe „Klassifikation“ bzw. „Klassifizierung“ in beiden Bereichen hingewiesen: Im Rahmen der Bildverarbeitung entsprechen beide Begriffe innerhalb dieser Arbeit der Identifikation eines Objektes als Diatomeenvalve einer bestimmten Formgebung. In der Taxonomie hingegen werden sie für die exakte Zuordnung des Untersuchungsobjektes zu einer biologischen Spezies verwendet. Der Eindeutigkeit halber bezieht sich im Folgenden der Begriff „Klassifikation“ auf die Identifizierung relevanter Valven, während der Begriff „Klassifizierung“ für die taxonomische Zuordnung verwendet wird.

## 1.1 Allgemeines zu Diatomeen

(Vgl. [1, p. 706ff.], [2]) Die einzelligen Diatomeen (Kieselalgen) verfügen über ein größtenteils aus Silikat aufgebautes, als Frustel bezeichnetes Skelett (s. Abbildung 1). Dieses ist in Form zweier übereinander geschobener Schalen (Theken) aufgebaut, ähnlich einer Hutschachtel. Die Schalen umgeben das Cytoplasma, werden jedoch innerhalb der äußeren Plasmaschicht gebildet; die größere wird als Epi- die kleinere als Hypotheka bezeichnet. Beide Theken bestehen jeweils aus der Valve, die dem Deckel bzw. Boden der „Schachtel“ entspricht, und den Gürtelbändern, die den Seitenwänden der „Schachtel“ entsprechen. Die äußeren Gürtelbänder der Epitheka umschließen diejenigen der Hypotheka. In Sedimenten verbleiben meistens nur die in Valven und Gürtel zerfallenen Silikatskelette, ebenso von lebenden Diatomeen nach der Präparation. Die taxonomische und morphometrische Klassifizierung basiert auf Merkmalen der Valven wie ihren in typischen Mustern (Striae) angeordneten feinen Poren (Areolen), Rippen (Costae) und den Strukturen der Raphe, welche sich von Art zu Art unterscheiden, die z.T. jedoch auch von Umweltbedingungen wie der Nährstoffverfügbarkeit abhängen. Bei lebenden Diatomeen können darüber hinaus Bestimmungsmerkmale wie z.B. Anzahl, Größe und Verteilung von Zellstrukturen wie Plastiden und Ölvakuolen (s. Abbildung 2) untersucht



werden. Diatomeen enthalten Chlorophyll a und c sowie Carotinoide und Xanthophylle, welche den Chromatophoren meistens eine bräunliche Färbung verleihen; Chlorophyll b fehlt hingegen grundsätzlich. Der Reservestoff Chrysolaminarin ist bei Diatomeen im Zellsaft der Vakuolen gelöst.

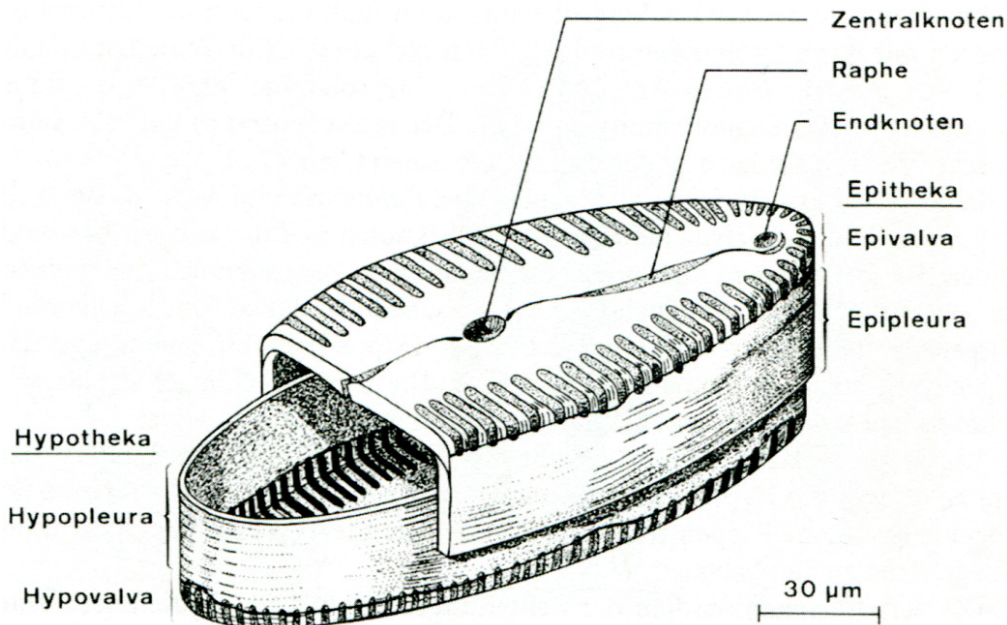


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Silikatschalen von Kieselalgen, hier am Beispiel einer typischen pennaten Diatomee, aus [3, p. 107]. Epi- und Hypotheka stecken ähnlich einer Hutschachtel aufeinander, die Theken bilden Deckel und Boden dieser „Schachtel“.

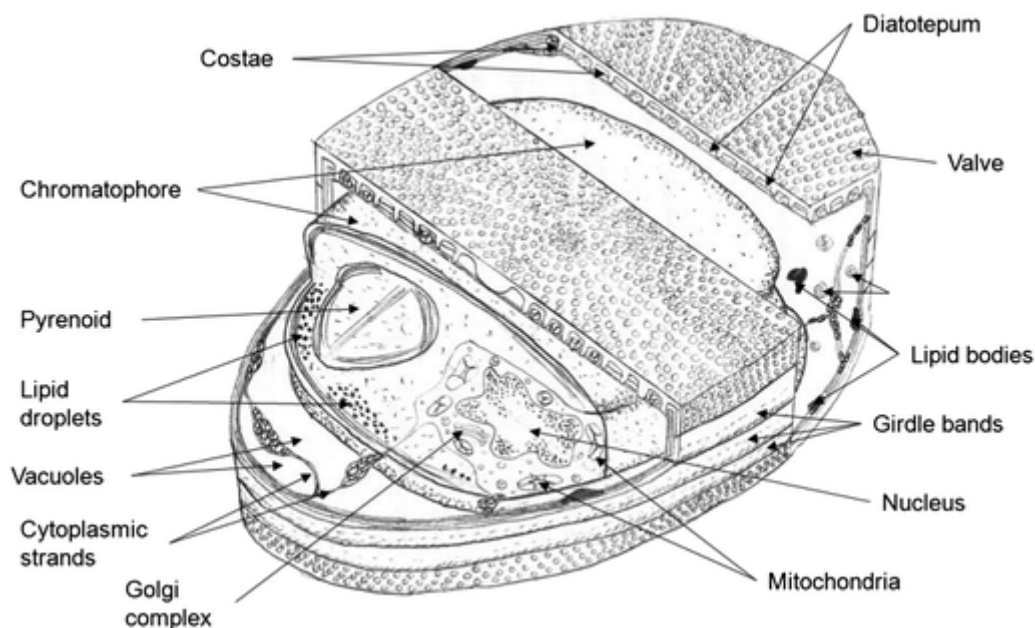


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer typischen zentrischen Diatomee, aus [4, p. 43]

Während der asexuellen Vermehrung (s. Abbildung 3), die durch einfache Zellteilung (Mitose) erfolgt, wird zu beiden Theken jeweils eine neue Hypotheka gebildet. Weil die ehemalige Hypotheka zur neuen Epitheka wird, nimmt bei jeder Generation für die Hälfte der neu gebildeten Diatomeen die Größe ab. Wird eine bestimmte Mindestgröße (ca. die Hälfte der Ausgangsgröße) unterschritten, setzt die sexuelle Vermehrung mit Bildung und Verschmelzung haploider Geschlechtszellen (Gameten) ein. Hierbei entstehen Exemplare maximaler Größe, die wiederum Ausgangspunkt für eine Reihe asexueller Teilungen sind.

Aus taxonomischer Sicht gliedern sich Diatomeen in mehr als 10.000 Arten, über 200 Gattungen und zwei Ordnungen der Klasse Bacillariophyceae innerhalb der Abteilung der Heterokontophyta. Die Ordnung der Centrales (zentrische Diatomeen) bildet dabei runde oder dreieckige radiärsymmetrische, die der Pennales (pennate Diatomeen) längliche lateralsymmetrische Schalen aus. Letztere verfügen meistens über eine in Längsrichtung angeordnete Raphe, welche Kriechbewegungen ermöglicht.

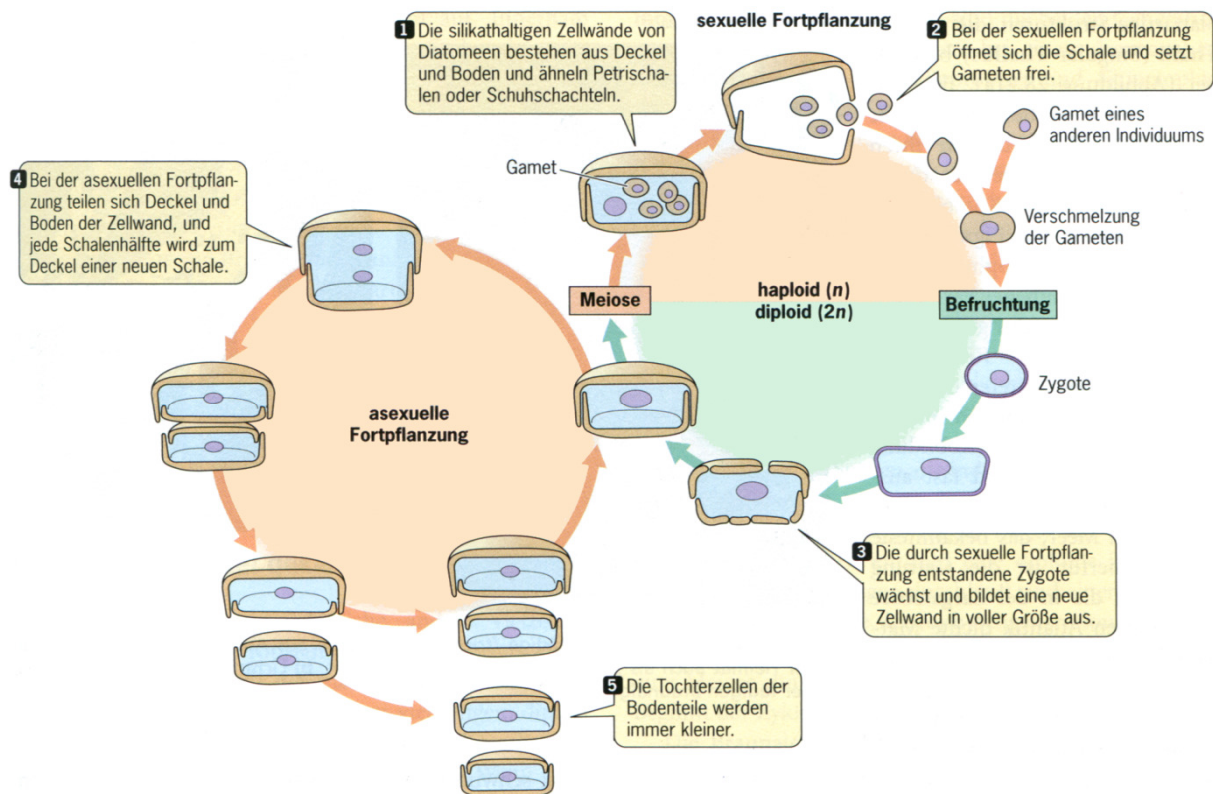


Abbildung 3: Schema der Fortpflanzung der Diatomeen, aus [5, p. 677]. 1-3 zeigt die sexuelle Fortpflanzung zur Erzeugung neuer Zellen voller Größe, 4-5 die asexuelle Fortpflanzung, bei der die Hälfte aller neu gebildeten Zellen kleiner als die Elternzelle ist.

## 1.2 Biologische Bedeutung von Diatomeen

(Vgl. [6, p. 9ff.], [7]) Diatomeen stellen einen großen, oft sogar den größten Anteil des marinen Phytoplanktons und spielen somit eine wichtige Rolle als Primärproduzenten, aber auch für globale  $\text{CO}_2$ - und Nährstoffkreisläufe. Die mechanisch stabilen Kieselschalen bieten durch den Schutz vor Fressfeinden einen Selektionsvorteil, daher werden Phytoplanktonblüten oft von Diatomeen dominiert. Entsprechend hoch ist der Anteil an Diatomeen, der sedimentiert und somit  $\text{CO}_2$  aus der Atmosphäre bindet. Hiervon zeugen auch bis ins Jura zurückreichende, besonders in Kreide und Tertiär entstandene versteinerte Ablagerungen [8], die als Kieselgur industriell ausgebeutet werden. Die in dieser Arbeit vorrangig behandelte Art *Fragilariopsis kerguelensis* bildet besonders starke Schalen aus (s. Abbildung 4), was über massenhaftes Auftreten („Algenblüte“) zu einer Verknappung von Silikat mit weitreichenden ökologischen Folgen führt. „Rund 70% der marinen biogenen Silicate sedimentieren im Südpolarmeer [...], und 80% des dortigen Diatomeenschlammes gehen auf *F. kerguelensis* zurück“ [7].

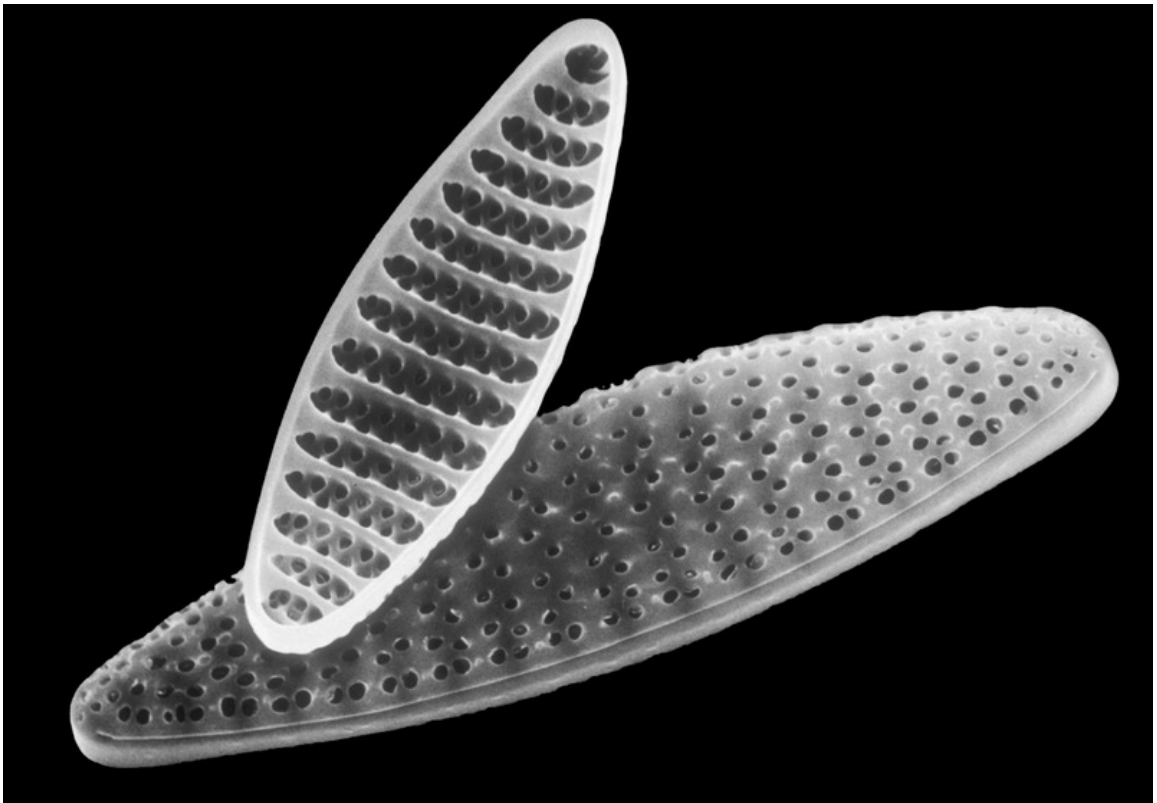


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Valven der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis*, Foto: F. Hinz, AWI

In Sedimentproben bleiben die Valven meistens gut erhalten, somit können Aussagen über die Artenverteilung und Morphologie fossiler Diatomeen und damit über die in vergangenen Perioden herrschenden Umweltbedingungen getroffen werden. Lebende Exemplare von *Fragilariopsis kerguelensis* bilden oft Ketten, in denen sie Valve an Valve nebeneinanderliegen (s. Abbildung 5).

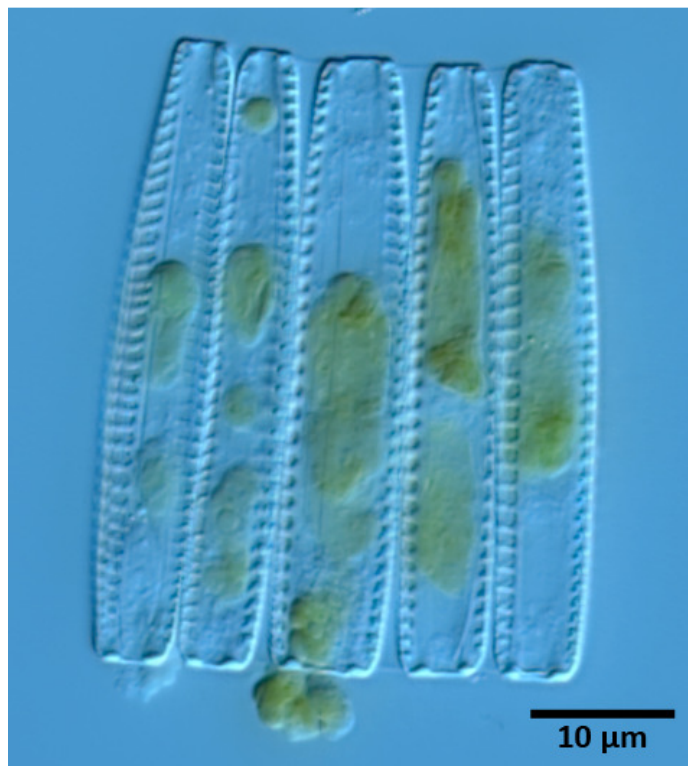


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von lebenden *Fragilariopsis kerguelensis* (Differenzieller Interferenzkontrast, Diatomeen in Gürtellage)

### 1.3 Friedrich-Hustedt-Zentrum für Diatomeenforschung

Die am Alfred-Wegener-Institut (AWI) angesiedelte, ursprünglich von Friedrich Hustedt (1886-1968) begründete Diatomeen-Referenzsammlung „gehört auch heute noch zu den größten Diatomeensammlungen der Welt und umfasst inzwischen über 35.000 Proben und fast 90.000 Präparate aus den meisten Gegenden der Welt, aus Süßwasser gleichermaßen wie aus dem Meer, rezent wie auch fossil“ [9]. Der historische Sammlungs-Stamm wird kontinuierlich erweitert durch Material aktueller Expeditionen. Darüber hinaus bietet das Friedrich-Hustedt-Zentrum für Diatomeenforschung eine Fachbibliothek mit über 7.000 Publikationstiteln sowie eine im Internet frei verfügbare Datenbank mit Informationen zu allen in der Sammlung benannten Arten [9]. Die Hustedt-Sammlung dient somit als zentrale Anlaufstelle für die Diatomeenforschung.

### 1.4 Probleme bei der Klassifizierung

Die taxonomische Klassifizierung von Diatomeen anhand lichtmikroskopischer Abbildungen ihrer Silikatskelette ist Stand der Technik, zumal die organischen Bestandteile der Diatomeen in Sedimentproben kaum erhalten sind. Diese Vorgehensweise ist jedoch mit einigen Schwierigkeiten behaftet: So existiert meistens eine ganze Reihe morphologisch sehr ähnlicher Arten, deren exakte taxonomische Differenzierung ausschließlich anhand der Valven oft nur eingeschränkt oder gar nicht möglich ist. Erschwert wird die Bestimmung dadurch, dass die morphologischen Merkmale abhängig von Umweltbedingungen und der Anzahl erfolgter mitotischer Teilungen einer gewissen Variabilität unterliegen (s. Abbildung 6).

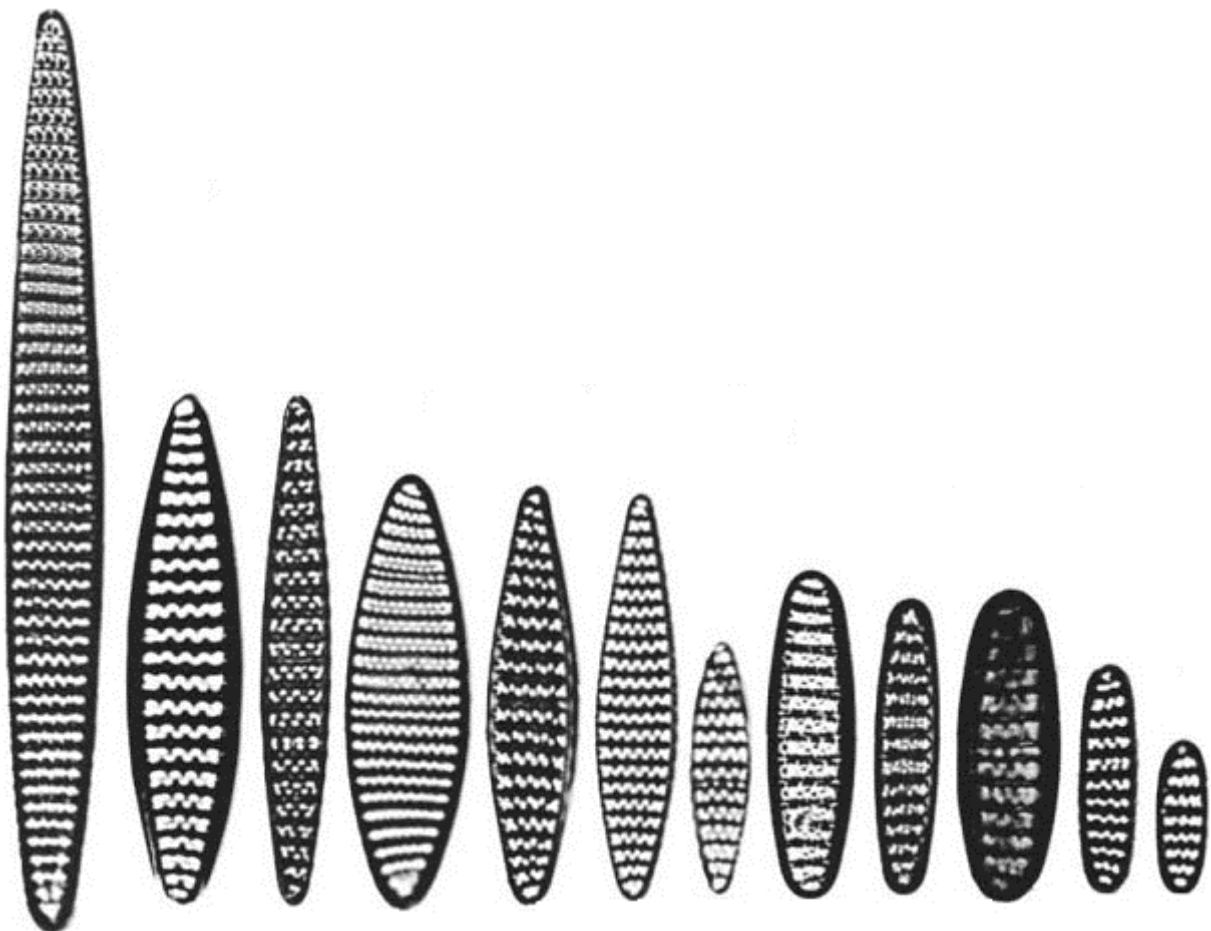


Abbildung 6: Variabilität der Valven von *Fragilariopsis kerguelensis*, aus [10], dort noch als *Nitzschia kerguelensis* bezeichnet

Auch liegt die Größenordnung feiner morphologischer Strukturen wie der Areolen oder Striae im Grenzbereich oder unterhalb der mittels Lichtmikroskopie möglichen Auflösung, so dass sie gar nicht oder nur durch Beugungsartefakte verfälscht abgebildet werden können [11]. Selbst optisch auflösbare Strukturen auf den oft dreidimensional geformten Valvenoberflächen werden mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Verfahren, bedingt durch deren geringe Schärfentiefe, nur begrenzt wiedergegeben. Alternative Untersuchungsmethoden wie die Rasterelektronenmikroskopie oder die optische Konfokalmikroskopie scheiden wegen des hohen Arbeits- und Kostenaufwands für Routineanalysen meistens aus, genetische Untersuchungen können an Proben aus Sedimentkernen nur selten durchgeführt werden.

## **1.5 Bisherige Projekte zur computergestützten Identifizierung und Klassifizierung**

Der Einsatz computergestützter Bildanalyse für die Identifizierung und Klassifizierung von Diatomeen auf Basis lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde bereits untersucht. Die wichtigsten Projekte dieser Art waren „ADIAC“ (Automatic Diatom Identification and Classification) [6] und „DIADIST“ (Diatom and Desmid Identification by Shape and Texture) [12], jedoch führte keines dieser Projekte zu einer praxistauglichen, einfach zu bedienenden und frei verfügbaren Software. Der interaktive Bestimmungsschlüssel „Common Freshwater Diatoms of Britain and Ireland. An interactive identification key“ [13] bietet keine automatisierten Bildverarbeitungsfunktionen, beschreibt jedoch eine Reihe taxonomisch wichtiger morphologischer Merkmale, die sich zum Teil auch für eine automatisierte Analyse eignen.

### **1.5.1 ADIAC**

Ein groß angelegtes Pilotprojekt zur Entwicklung rechnergestützter Methoden für Massenscreenings von Diatomeen war „ADIAC“ (Automatic Diatom Identification and Classification) [6], welches im Zeitraum 1998 bis 2001 von einer Reihe von Arbeitsgruppen durchgeführt wurde. Im Verlauf des Projektes wurde ein kompletter Workflow vom Einsatz automatisierter Slide-Scanning-Mikroskope bis zur computergestützten Bildauswertung entwickelt; die für die Identifizierung und Klassifizierung erarbeiteten Methoden wurden anhand eigens erstellter umfangreicher Musterdatensätze validiert. Sowohl für ADIAC als auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von in der Bildverarbeitung gängigen Ansätzen verfolgt. Daher finden sich einige Parallelen bei Segmentierung und Klassifikation, wie z.B. die Schwellwertfindung nach Otsu, die Segmentierung mittels Canny Edge Detector oder die Verwendung von Hu-Invarianten für die Objektklassifikation. Diese Techniken werden jedoch weit verbreitet eingesetzt und sind als Standard-Verfahren der Bildverarbeitung etabliert [14].

Die ADIAC-Software wurde nicht frei zugänglich veröffentlicht, auch wenn sie z.T. in Form webbasierter Komponenten zur Verfügung steht [15]. Diese können jedoch nur mit festgelegten Datensätzen zu Demonstrationszwecken verwendet werden.

### **1.5.2 DIADIST**

Das von 2001 bis 2004 durchgeführte Projekt „DIADIST“ (Diatom and Desmid Identification by Shape and Texture) [12] der Cardiff University, Wales, und des Royal Botanic Garden Edinburgh, Schottland, verfolgte nicht die taxonomische Klassifizierung von Diatomeen, sondern die automatisierte Zuordnung von wissenschaftlichen Zeichnungen zu lichtmikroskopischen Aufnahmen. Auf diese Weise sollte ein neuer Zugang zu in Datenbanken abgelegten Bildsammlungen über eine „visuelle Indizierung“ ermöglicht werden. Im Rahmen dieses Projektes wurde zwar C-Code für die Konturermittlung und Matlab-Code für die Texturanalyse veröffentlicht [16], jedoch keine praxistaugliche und umfassende Software.

### 1.5.3 Common Freshwater Diatoms of Britain and Ireland

Der computergestützte Bestimmungsschlüssel „Common Freshwater Diatoms of Britain and Ireland. An interactive identification key“ [13] bietet zwar keine automatisierte taxonomische Klassifizierung auf der Basis von Bildanalyse, verwendet als klassischer Bestimmungsschlüssel jedoch eine Reihe morphologischer Merkmale [17]. Diese können z.T. automatisiert erfasst und für eine Klassifizierung herangezogen werden. Voruntersuchungen zu diesem Thema sind Bestandteil dieser Arbeit (s. Kapitel 4), für den Schwerpunkt „Massenscreening“ wurde jedoch ein rein umrissbasierter Ansatz gewählt (s. Kapitel 3.5.1).

## 1.6 Schwerpunkte dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Schwerpunkte:

Zum einen die Entwicklung einer praxistauglichen Lösung für die rechnergestützte Auswertung von Massenscreenings lichtmikroskopischer Aufnahmen der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis*. Diese identifiziert relevante Valven, ermittelt ihre geometrischen Grunddaten und ordnet sie einer bestimmten Formausprägung zu.

Zum anderen die Untersuchung von Möglichkeiten für die rechnerunterstützte taxonomische Klassifizierung von Diatomeenvalven. Diese basieren auf vertieften Strukturanalysen unter besonderer Beachtung der Problematik dreidimensionaler Aspekte und der Verwendung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren.

### 1.6.1 Automatisierte Identifikation relevanter Diatomeenvalven in Massenscreenings

Für Analysen auf Basis von Massenscreening wurde eine praxistaugliche Softwarelösung entwickelt, die in erster Linie der Identifikation von Valven der Gattung *Fragilariopsis* dient. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, stellt *Fragilariopsis kerguelensis* einen der wichtigsten Vertreter der Diatomeen dar. In den untersuchten Proben finden sich jedoch auch Exemplare anderer Arten dieser Gattung, welche eine ähnliche Morphologie aufweisen.

Die Erkennung der Valven basiert auf lichtmikroskopischen Aufnahmen und erfolgt über eine Konturanalyse, Texturmerkmale werden nicht betrachtet. Bei Beschränkung auf *Fragilariopsis spec.* erscheint dieser Ansatz ausreichend, da sich Form und Konvexität des Umrisses für eine Beurteilung der Ergebnisqualität und die Identifikation relevanter Valven heranziehen lassen (s. Kapitel 3.5). Solange die Valvenkonturen keine konkaven Anteile aufweisen, können jedoch auch andere Arten identifiziert werden.

Die Software wurde in Hinblick auf eine möglichst einfache Bedienbarkeit, universelle Einsatzfähigkeit (mit der Einschränkung auf die Analyse von Konturdaten konvexer Valven), hohe Verarbeitungsgeschwindigkeit, robuste Objekterkennung und spätere Erweiterbarkeit konzipiert. Bildausschnitte mit den identifizierten Valven können zusammen mit den erhobenen morphometrischen Daten für detailliertere Analysen exportiert werden.

### 1.6.2 Rechnergestützte Analyse morphologischer Strukturmerkmale für die taxonomische Klassifizierung

Für die taxonomische Klassifizierung von Diatomeen ist die Analyse morphologischer Strukturmerkmale unabdingbar. Diese müssen möglichst detailliert erfasst werden, was durch die Beugungsbegrenzung der Auflösung, die geringe Schärfentiefe des Fokusbereichs sowie die meistens dreidimensionale Ausprägung der relevanten Strukturen erschwert wird. Darüber hinaus bestehen Di-

atomeenskelette größtenteils aus Silikat und bilden daher Phasenobjekte, welche im lichtmikroskopischen Hellfeld nur einen schwachen Amplitudenkontrast bieten.

Diese Rahmenbedingungen erfordern den Einsatz kontrastverstärkender lichtmikroskopischer Verfahren wie Phasenkontrast oder Differenziellem Interferenzkontrast (s. Kapitel 2.3) unter Verwendung möglichst hochauflösender und –vergrößernder Optiken. Die geringe Schärfentiefe der Fokusebene kann durch die Aufnahme eines Bildstapels über einen die komplette Valve umfassenden Fokusbereich und die Verrechnung der scharf abgebildeten Bereiche dieses Stapels zu einem zweidimensionalen „Fokus-Bild“ ausgeglichen werden (Focus-Stacking). Dieses kann, je nach verwendetem Verfahren, auf Basis einer Tiefenkarte um Höheninformationen zu einer 2,5D-Abbildung ergänzt werden, indem jedem Punkt des Fokus-Bildes eine einzelne Höheninformation zugewiesen wird. Die bei diesen Betrachtungsweisen unvermeidlichen perspektivischen Verzerrungen räumlicher Strukturen können jedoch zu Fehlern bei der Vermessung und Interpretationen führen. Daher wird in Kapitel 4.2 ein neuer Ansatz für ein dreidimensionales Focus-Stacking beschrieben, der an der Hochschule Emden/Leer im Rahmen einer Bachelorarbeit [18] entwickelt und innerhalb eines studentischen Projekts [19] weitergeführt wurde.

Bei lebenden Exemplaren können über die Strukturmerkmale der Valven hinaus auch Kriterien wie Anzahl, Lage und Größe von Chloroplasten, Pyrenoiden, Öltröpfchen, usw. für die Klassifizierung herangezogen werden, wofür z.T. Untersuchungen in Auflichtfluoreszenz wertvolle Informationen liefern. Eine gute Übersicht relevanter Merkmale bietet [17].

## 2 Geräte - Bildaufnahme

Die in dieser Arbeit entwickelte Software beinhaltet keine Funktionen für die eigentliche Bilderfassung, sondern verarbeitet nur bereits gespeicherte digitale Bilddaten in Form von Dateien gängiger Grafikformate. Daher wird die eigentliche Bildaufnahme gesondert und unter Berücksichtigung verschiedener Mikroskopiertechniken dargestellt.

### 2.1 Verwendete Technik

Massenscreening und taxonomische Strukturanalysen beginnen mit der Aufnahme lichtmikroskopischer Bilder, hierfür standen zwei unterschiedliche Mikroskopiesysteme zur Verfügung. Beide beruhen auf dem gleichen Basisgerät (Zeiss Axio Imager.Z2); um Verwechslungen zu vermeiden, wird das für Massenscreenings am AWI verwendete Mikroskop im Folgenden als „Metafer-System“ bezeichnet, das an der Hochschule Emden/Leer für Strukturuntersuchungen genutzte als „Axio Imager.Z2“.

#### 2.1.1 Metafer Slide Scanning Platform für Massenscreenings

Für das Massenscreening kam am Alfred-Wegener-Institut ein automatisiertes Metafer Slide Scanning Mikroskop (Hersteller: MetaSystems GmbH, Altlußheim) zum Einsatz. Dieses kann komplette Objektträger in niedriger Vergrößerung scannen, zu untersuchende Objekte identifizieren, und diese anschließend bei hoher Vergrößerung als Bildstapel über den gesamten Fokusbereich aufnehmen. Dieser Vorgang ist teilautomatisiert, so dass bis zu acht Objektträger nacheinander ohne oder mit nur geringer Benutzerinteraktion bearbeitet werden können.



Abbildung 7: Metafer Slide Scanning Platform, Foto: MetaSystems GmbH

Die in dieser Arbeit verwendeten Datensätze wurden mit einem Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 im Hellfeld mit Ölimmersion aufgenommen. Hierfür kam statt eines auf die hohe Objektivapertur abgeglichenen Kondensors eine LED-Beleuchtung zum Einsatz, woraus eine reduzierte optische Auflösung resultiert. Da für die Identifizierung auf die Beurteilung von Texturmerkmalen verzichtet wurde, ergibt sich hieraus jedoch kein gravierender Nachteil, für eine weitergehende Analyse morphologischer Merkmale wäre jedoch eine höhere Auflösung wünschenswert.

Es wurden zwar komplette Bildstapel über die gesamte Höhe der Valven aufgenommen, durch die Autofokus-Funktion wurde aber jeweils nur die am besten auf das Objekt fokussierte Bildebene für das Screening ausgewählt. Obwohl auf die in der Metafer-Software integrierte automatische Korrektur von Beleuchtungsinhomogenitäten verzichtet wurde, sind die Aufnahmen der in dieser Arbeit untersuchten Datensätze sehr homogen ausgeleuchtet und weisen keine sichtbare Vignettierung auf,



wodurch die Bildverarbeitung deutlich vereinfacht wird. Zwei der acht Datensätze (ca. 2500 von über 5900 Aufnahmen) zeigen eine deutliche Überstrahlung und somit einen reduzierten Kontrastumfang, waren jedoch trotzdem auswertbar.

Die für die Aufnahmen verwendete Kamera „CoolCube 1m“ (ebenfalls Hersteller MetaSystems) verfügt über eine Intensitäts-Auflösung von 12Bit (monochrom), die Bilddaten wurden jedoch in Form von 8Bit-Graustufen-Daten im TIFF-Format gespeichert. Bei Verwendung des Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 entsprechen 980 Pixel einer Strecke von 100 µm.

### 2.1.2 Axio Imager.Z2 für hochaufgelöste Lichtmikroskopie zur Strukturuntersuchung

Die Bildstapel-Aufnahmen für die Untersuchung morphologischer Strukturmerkmale wurden an der Hochschule Emden/Leer an einem Zeiss Axio Imager.Z2 durchgeführt. Dieser ist für eine Reihe unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren wie Hellfeld, Phasenkontrast, Differenziellem Interferenzkontrast (DIK) und Auflichtfluoreszenz mit hoher optischer Auflösung ausgestattet.

Die für die Analyse taxonomischer Strukturmerkmale, 2D- und 3D-Visualisierungen von *Fragilariopsis kerguelensis* gefertigten Aufnahmen (Hellfeld und Differenzieller Interferenzkontrast) entstanden unter Verwendung eines Zeiss Plan-Apochromaten 63x/1,4 DIC mit Ölimmersion (n = 1,515). Die Aufnahmen anderer Diatomeen wurden unter Verwendung eines Zeiss Plan-Apochromaten 40x/0,95 Ph3 (Hellfeld und Phasenkontrast) bzw. EC Plan-Neofluar 40x/0,90 Pol (Differenzieller Interferenzkontrast) ohne Immersion (s. Tabelle 1.) durchgeführt.

**Tabelle 1: Für die Analyse taxonomischer Strukturmerkmale, 2D- und 3D-Visualisierungen von *Fragilariopsis kerguelensis* verwendete Objektive**

Objekt	Lichtmikroskopisches Verfahren	Objektiv
<i>Fragilariopsis kerguelensis</i>	Hellfeld, Differentieller Interferenzkontrast und Auflichtfluoreszenz	Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 DIC mit Ölimmersion (n = 1,515)
Andere Diatomeen	Hellfeld, Phasenkontrast	Zeiss Plan-Apochromat 40x/0,95 Korr Ph 3
	Differentieller Interferenzkontrast	Zeiss EC Plan-Neofluar 40x/0,90 Pol

Als Lichtquelle diente für die Auflichtfluoreszenz eine Metallhalogenidleuchte „HXP 120 C“ in Kombination mit einem DAPI-Filterwürfel, für die anderen Verfahren wurde eine Anbauleuchte „VIS-LED“ von Zeiss in Kombination mit einem Kondensator mit der numerischen Apertur 0,9 verwendet.



Abbildung 8: Axio Imager.Z2, Foto: Carl Zeiss AG

Die Höhenposition des Objektstisches wurde über ein Heidenhain-Längenmessgerät ermittelt, was die Aufnahme von Bildstapeln mit äquidistanten Höhenabständen ermöglichte. Für alle Aufnahmen kam eine AxioCam MRc 3 zum Einsatz. Bei Verwendung des 63x-Objektivs entspricht die Kantenlänge eines Bildpixels  $0,100 \pm 0,0003 \mu\text{m}$ , bei Verwendung der 40x-Objektive  $0,159 \pm 0,0003 \mu\text{m}$  (ermittelt mit E.L.M.I. [20]).

Um eine eindeutige Beschreibung des Bezugssystems für die Bildstapel zu gewährleisten, wird durchgängig folgende Konvention eingehalten: Die Fokusebene des Objektivs entspricht einem einzelnen Bild des Bildstapels und der X/Y-Ebene der Visualisierung, die unterschiedlichen Ebenen des Bildstapels sind entlang der Z-Achse angeordnet.

## 2.2 Optische Auflösung

Die feinen Strukturen der Diatomeenskelette lassen sich z.T. nicht mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden auflösen, so dass sie gar nicht oder durch Beugungsartefakte verfälscht abgebildet werden (s. Abbildung 9).

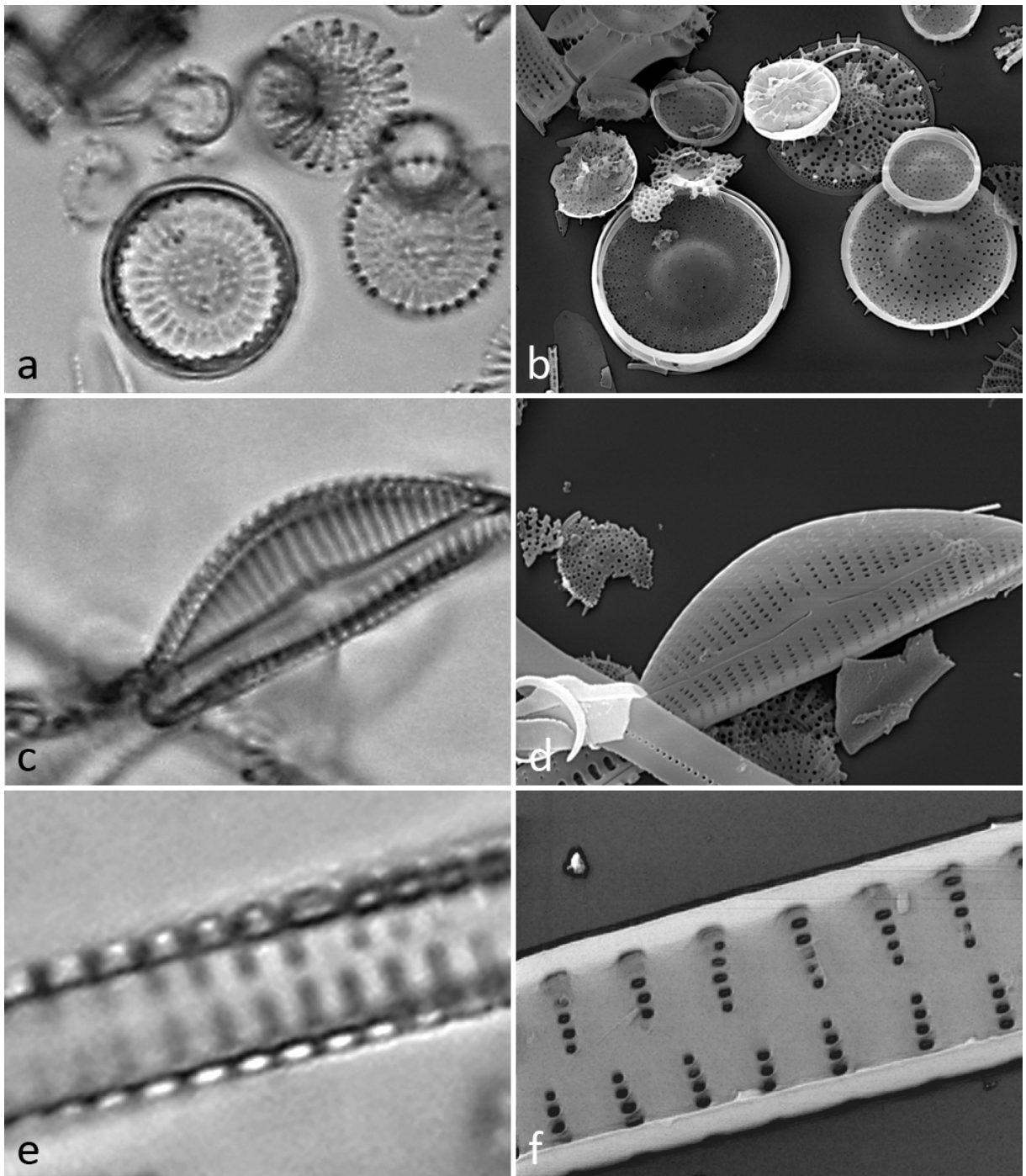


Abbildung 9: Gegenüberstellung lichtmikroskopischer (a, c, e) und rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (b, d, f) von Diatomeenvalven zur Verdeutlichung lichtmikroskopischer Beugungsartefakte, aus [11, p. 89 & 93]. Durch Beugungsartefakte werden im lichtmikroskopischen Bild Strukturen vorgespiegelt, die nicht der Realität entsprechen und zu Fehlinterpretationen führen können, wie z.B. vorgeblich eingebuchtete Valvenränder.

Für das Massenscreening am AWI wurden die Umrisskonturen, jedoch nicht die Strukturmerkmale der Valven untersucht. Daher sind in diesem Zusammenhang Beugungsartefakte und Auflösungsbe-grenzung im Innenbereich der Valven, wie sie im Bereich von Areolen und Striae auftreten (s. Abbildung 9 a, b runde Valve links unten), für die Analyse unkritisch. Beugungsartefakte, welche Verzerrungen der Abbildung des Valvenrandes verursachen, führen hingegen zu deutlichen Ein-schränkungen bei der Konturerkennung. Derartige Artefakte werden z.B. durch sehr nah an den Rand heranreichende Striae (s. Abbildung 9 c-f) verursacht, treten bei *Fragilariopsis* aufgrund der verhält-nismäßig groben Strukturen jedoch nicht in störendem Umfang auf.

Die Analyse von morphologischen Strukturmerkmalen zur taxonomischen Klassifizierung bedingt eine möglichst hohe Auflösung zur Untersuchung auch sehr feiner Strukturdetails. Trotz der hochwertigen Optik des Axio Imager.Z2 an der Hochschule Emden/Leer müssen Beugungsartefakte und Auflösungsbegrenzung in Kauf genommen werden, wenn auch in einem geringeren Maße als mit dem Metafer-System.

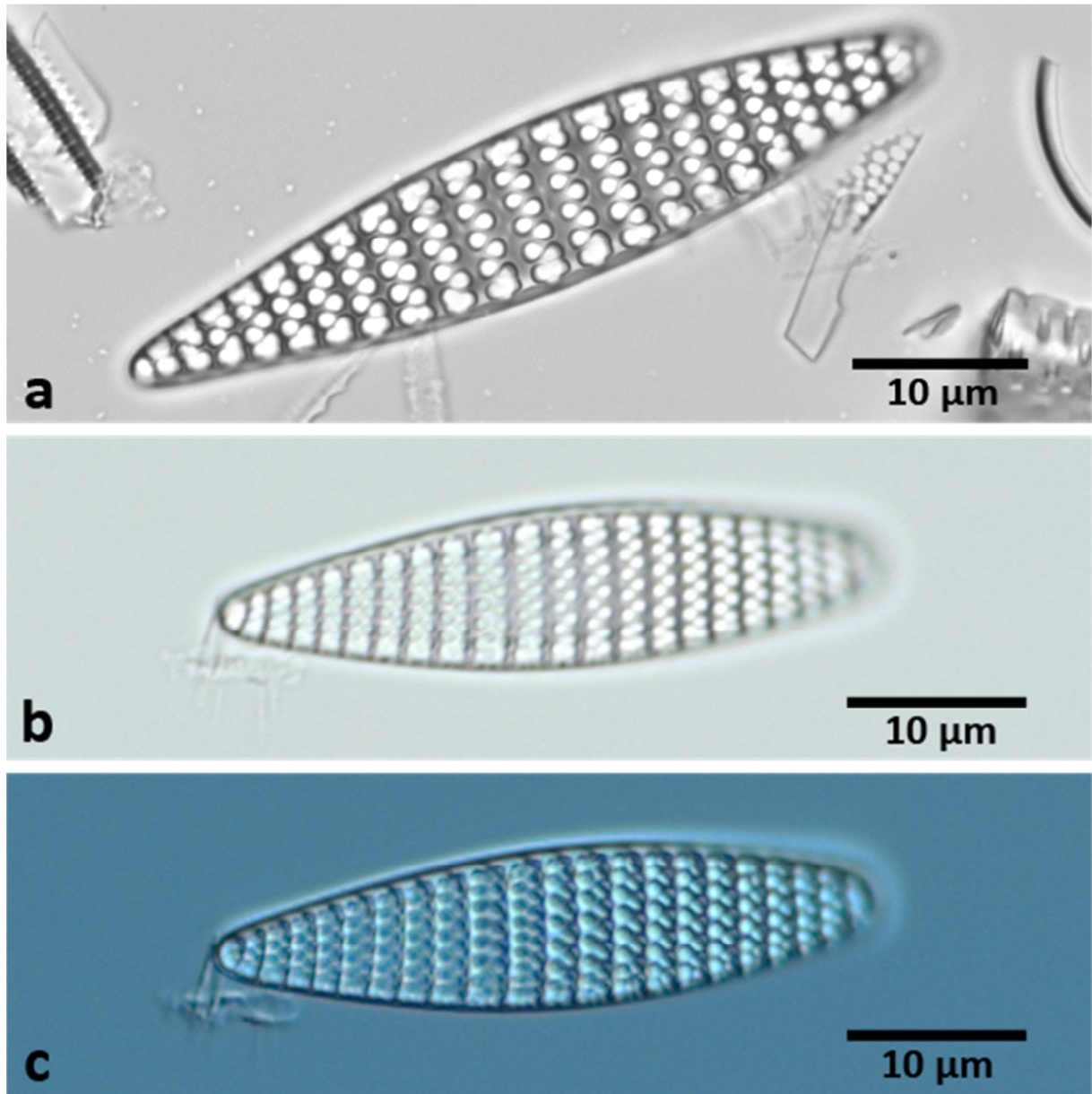


Abbildung 10: Vergleich der Abbildungsleistung der beiden Mikroskopie-Systeme. a) Metafer-System mit Plan-Apochromat 63x/1,4 im Hellfeld, b) Zeiss Axio Imager.Z2 mit Plan-Apochromat 63x/1,4 im Hellfeld, c) Zeiss Axio Imager.Z2 mit Plan-Apochromat 63x/1,4 im Differentiellen Interferenzkontrast

### 2.3 Kontrastverstärkende lichtmikroskopische Verfahren

Die Diatomeenskelette bieten nur wenig Amplitudenkontrast, da sie in ihren optischen Eigenschaften Silikatglas ähneln, entsprechend kontrastarm und schwach werden feine Strukturen abgebildet (s. Abbildung 11 a). Die kontrastverstärkenden lichtmikroskopischen Verfahren Differentieller Interferenzkontrast (DIK) und Phasenkontrast (PhaKo) ergänzen den Amplitudenkontrast durch Informationen, welche auf den Brechungsindizes der einzelnen Objektbestandteile beruhen. Die durch die Änderungen der optischen Dichte bzw. Objektdicke bedingten Lauflängenunterschiede im Lichtpfad werden durch Interferenzbildung in sichtbare Amplitudenschwankungen umgewandelt. Daher er-

scheint der Kontrastumfang bei Verwendung dieser beiden Verfahren höher (s. Abbildung 11 b, c), feine Strukturen werden klarer dargestellt (s. a. Abbildung 49).

Durch kontrastverstärkende Verfahren wird jedoch nicht die tatsächliche optische Auflösung, sondern nur die Beobachtbarkeit kontrastschwacher Strukturen verbessert. DIK setzt dabei die differenzielle Interpretation unterschiedlicher Brechungsindizes auf eine Weise um, die vom menschlichen Auge meistens fälschlicherweise als reliefartige Struktur interpretiert wird, obwohl keine echten Höheninformationen vorliegen. Der Phasenkontrast hingegen erzeugt einen Halo-Effekt, der besonders um größere Strukturen herum hellere Lichtsäume bildet. Die Ergebnisse beider Verfahren können aufgrund dieser Artefakte zu fehlerhaften Interpretationen bei der automatisierten Bildverarbeitung führen.

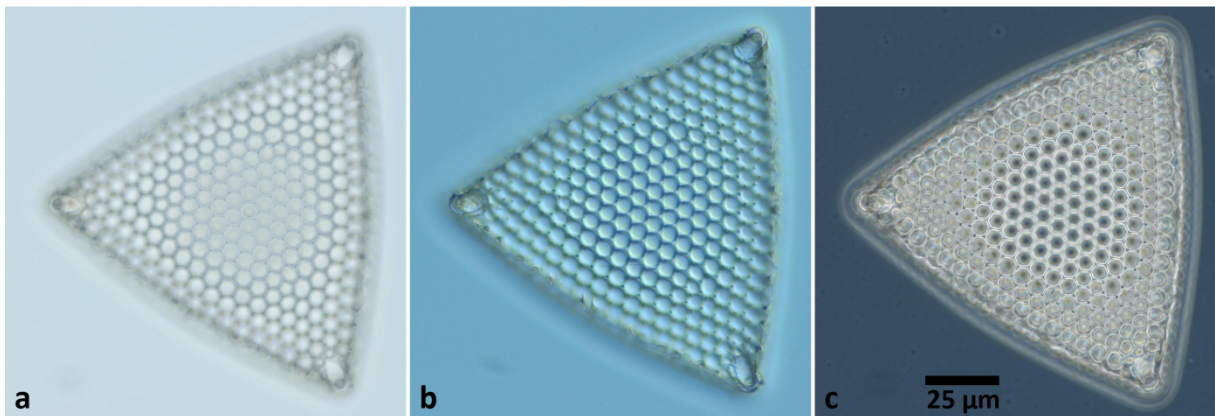


Abbildung 11: Vergleich lichtmikroskopischer Verfahren am Beispiel einer Valve von *Triceratium favus* Ehrenberg. a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. DIK und PhaKo ermöglichen eine deutliche Steigerung des Objektcontrastes.

## 2.4 Problematische Objekte

Parameter wie Bildverzerrungen, Rauschen oder ungleichmäßige Kontrast- und Helligkeitsverteilung sind mit beiden Mikroskopie-Systemen beherrschbar. Jedoch kann eine Reihe von Problemen, welche mit dem eigentlichen Untersuchungsobjekt zusammenhängen, die Struktur- und Konturerkennung erschweren oder sogar unmöglich machen (s. Abbildung 12). Folgende Effekte wurden beobachtet und z.T. auch im ADIAC-Projektbericht [6, pp. 63ff., p. 94] beschrieben:

- Die Valven liegen z.T. mit der Ober-, z.T. mit der Unterseite Richtung Objektiv (s. Abbildung 12 a, b). Dies führt zu unterschiedlichen Texturen, verursacht bei der Konturanalyse für das Massenscreening jedoch keine Probleme. Bei der Beurteilung morphologischer Strukturdetails hingegen ist die Lage der Valven von Bedeutung.
- Die Valve liegt außerhalb der Fokus-Ebene und wird nur unscharf abgebildet (s. Abbildung 12 c). Dies geschieht gelegentlich, obwohl die Metafer-Software über eine Autofokus-Funktion verfügt. Das Ergebnis ist unbrauchbar.
- Die Theke liegt in Gürtelansicht, die Valvenoberfläche somit senkrecht zur Fokusebene. Aus derartigen Aufnahmen können keine brauchbaren Ergebnisse ermittelt werden.
- Die Valve liegt aufgrund ihrer Ausrichtung oder ihrer dreidimensionalen Struktur nicht vollständig parallel zur Fokusebene und wird daher teilweise unscharf abgebildet (s. Abbildung 12 d), oder sie liegt parallel zur Fokusebene, die vom Autofokus-System ausgewählte Fokusebene stellt jedoch nicht den Rand, sondern andere Strukturen scharf dar (s. Abbildung 12 e). Diese Probleme sind häufig zu beobachten, die Segmentierung liefert bei geringeren Unschärfen jedoch oft noch verwertbare, wenn auch leicht fehlerbehaftete Ergebnisse. Größere Schrägstellungen führen meistens zu deutlichen Segmentierungsfehlern und damit zu unbrauchbaren Ergebnissen. Hier

könnte eine Steigerung der Schärfentiefe durch 2D-Focus-Stacking Abhilfe schaffen (s. Kapitel 4.1), wobei jedoch zu beachten wäre, dass durch die Schräglage verursachte perspektivische Verzerrungen zu Messfehlern führen.

- Die Valve überlappt mit anderen Objekten (s. Abbildung 12 f). Dieses Phänomen ist sehr häufig zu beobachten und erfordert u.U. eine weitere Verdünnung des Probenmaterials, teilweise können die Objekte jedoch auch während der Bildsegmentierung getrennt werden.
- Die Valve ist unvollständig (s. Abbildung 12 h). Da in dieser Arbeit Proben aus Sedimentkernen betrachtet wurden, waren Beschädigungen recht häufig zu beobachten. Die Ergebnisse sind nicht verwertbar, die automatisierte Erkennung solcher Valvendefekte gelingt jedoch nicht immer.
- Es befinden sich im Bild Objekte, die keine Valven sind, wie z.B. Trümmer, Fremdkörper oder Luftblasen im Einschlussmedium. Diese erfüllen jedoch einen Teil der Kriterien (s. Kapitel 3.4.2 und 3.5) für die Valvenerkennung (s. Abbildung 12 g).

Für das Massenscreening müssen Objekte aussortiert werden, die nicht als relevante Valven erkennbar sind; dies geschieht auf Basis einer Reihe von Indikatoren für die Beurteilung der Konturform (s. Kapitel 3.4.2 und 3.5). Kleinere Konturdefekte können bei Bedarf manuell korrigiert werden (s. Kapitel 3.6.2.4), um die Ausbeute an brauchbaren Ergebnissen zu erhöhen. Die Strukturanalyse für die taxonomische Klassifizierung wird auf Basis von Bildstapeln und Focus-Stacks durchgeführt. Sie könnte auch an ausreichend großen Bruchstücken oder teilweise überdeckten Valven durchgeführt werden, daher stellen die meisten der o.g. Problemfälle hier keine zwingende Einschränkung dar. Wenn die Strukturanalyse an den während des Massenscreenings identifizierten Valven durchgeführt werden soll, ergeben sich jedoch dieselben Beschränkungen.

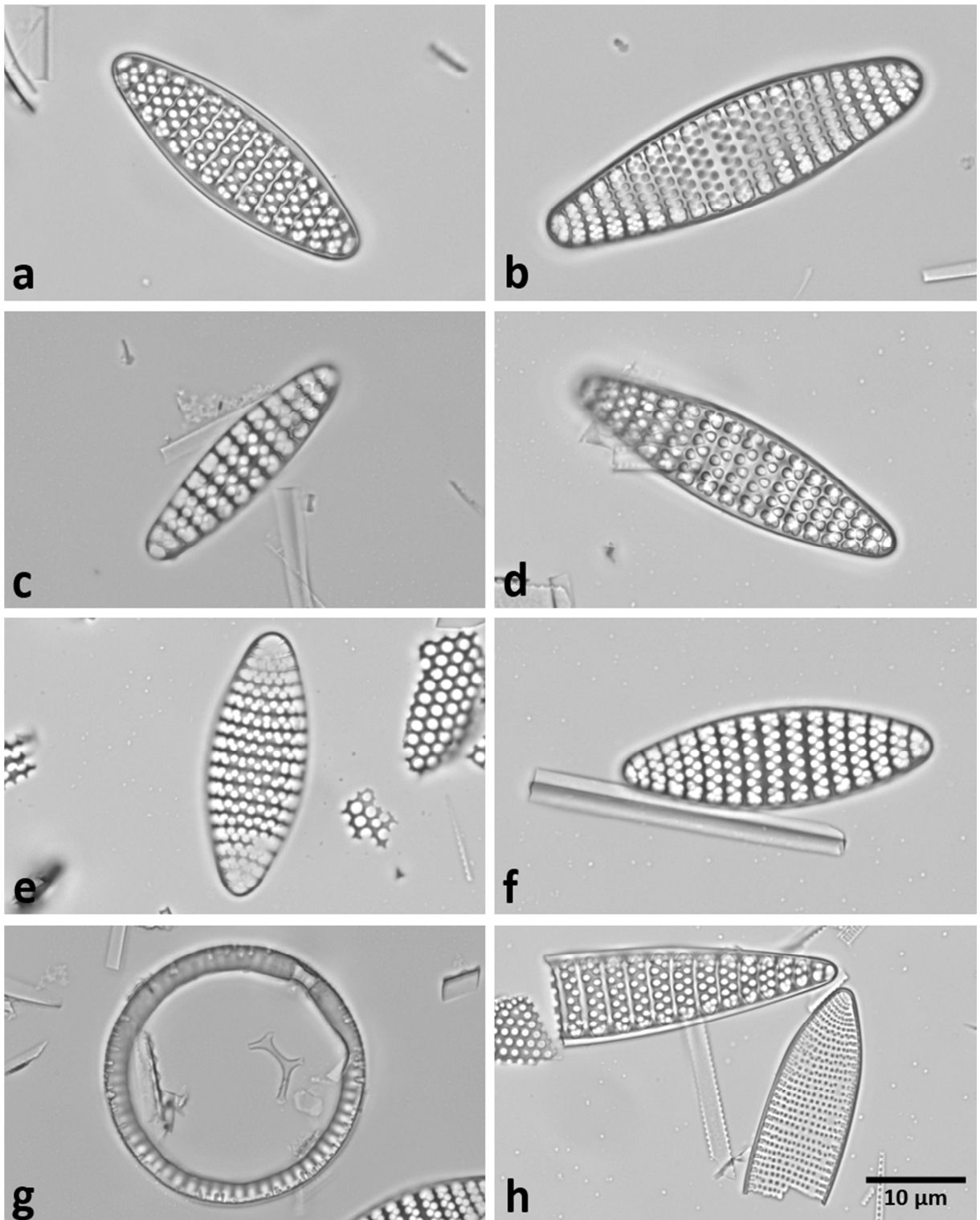


Abbildung 12: Typische Situationen bei der Erkennung von Valven in lichtmikroskopischen Aufnahmen: a) Aufsicht auf die Valvenunterseite, b) Aufsicht auf die Valvenoberseite, c) Valve komplett unscharf, d) Valve liegt schräg in der Fokusebene, e) Fokusebene liegt nicht auf dem Valvenrand, f) Überlappung mit anderen Objekten, g) Objekte, die keine Valven sind, aber einen Teil der Kriterien für die Erkennung erfüllen, h) Bruchstücke von Valven

### 3 Methoden - Massenscreening

Für die automatisierte Identifizierung relevanter Diatomeenvalven in Massenscreenings wurde eine Reihe von Verfahren untersucht und bei Eignung in Form einer einfach zu benutzenden und robust arbeitenden Software realisiert. Diese setzt eine für die Objekterkennung übliche Bildverarbeitungs-pipeline [21, p. 50] um (s. Abbildung 13), welche aus einer linearen Abfolge von aufeinander aufbauenden Operationen besteht. Die Erfassung der Bilddaten entfällt für diese Software, da Bilddateien gängiger Grafikformate als Ausgangsmaterial verwendet werden. In der Bildvorverarbeitung wird der Rauschanteil der Bilddaten vermindert, mittels der folgenden Segmentierung werden die Objekte vom Bildhintergrund getrennt. Eventuell aufgetretene Segmentierungsfehler können in der Bildnachbearbeitung durch Anwendung des morphologischen Closings behoben werden. Anschließend werden die Objekte in der Merkmalsextraktion parametrisiert, was im vorliegenden Fall über die Ermittlung der Konturgeometrie geschieht. Die Objektparameter führen auf Basis einer Klassifikation schließlich zu relevanten Objekten, d.h. Valven von *Fragilariopsis spec.*

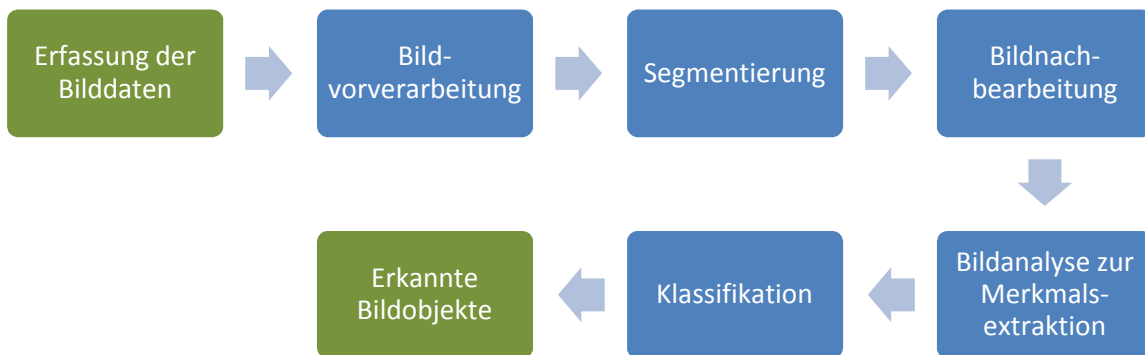


Abbildung 13: Typische Struktur einer Bildverarbeitungs-pipeline für die Objekterkennung, modifiziert nach [21, p. 50]

Ziel der Bildverarbeitungs-pipeline ist eine möglichst vollständige und eindeutige Segmentierung der Bildinhalte, gefolgt von einer möglichst eindeutigen Klassifikation der gefundenen Objekte.

#### 3.1 Bildvorverarbeitung / Verminderung des Rauschanteils

Während des Bildgebungs- und Aufnahmeprozesses wird die Abbildung des Untersuchungsobjektes durch Rauschen verschlechtert. Im vorliegenden Fall wird vereinfachend angenommen, dass das Rauschen durch den Sensor und die Signalverstärkung in der Kamera entsteht, dass es räumlich und zeitlich unabhängig ist und dass es nicht von der Signalstärke abhängt. Das Rauschen stört nachfolgende Bildverarbeitungsoperationen und sollte daher reduziert werden. Zwei in der Bildverarbeitung bewährte Verfahren zur Reduzierung solch additiven Rauschens wurden realisiert, der lineare Gauß- und der nichtlineare Medianfilter.



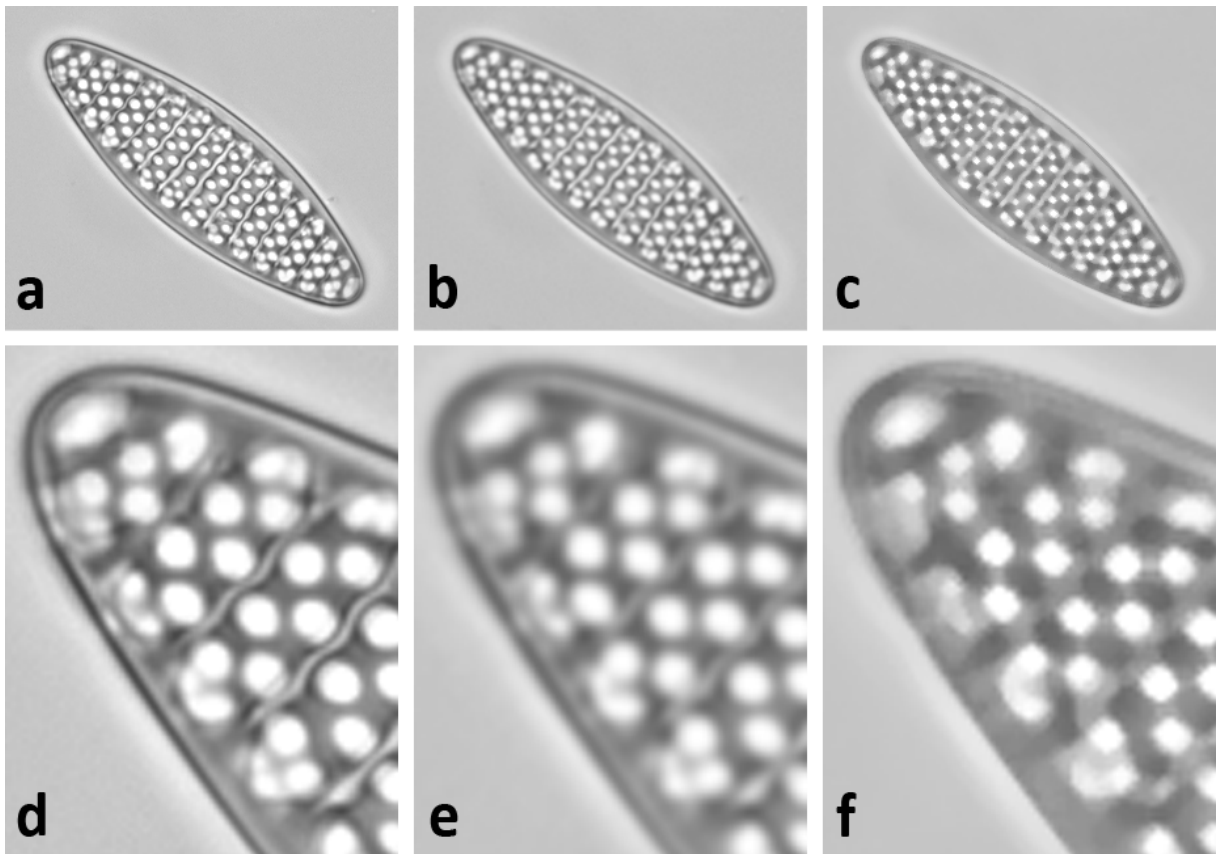


Abbildung 14: Vergleich der Ergebnisse der Rauschreduzierung. a) Original, b) nach Anwendung eines Gaußfilters mit 5 Pixel breitem Kern, c) nach Anwendung eines Medianfilters mit 5 Pixel breitem Kern, d-f) jeweils Ausschnittvergrößerungen von a-c). Die Anwendung des Gaußfilters führt zum Verlust hochfrequenter Bildanteile und damit an Bildschärfe, durch den Medianfilter werden kleine kontraststarke Strukturen homogenisiert.

### 3.1.1 Gaußfilter

Der Gaußfilter faltet die Bilddaten mit einem Gauß'schen Filterkern. Dies entspricht einer gewichteten Mittelwertbildung, welche als Tiefpass hohe Frequenzen (das Rauschen, aber ebenfalls hoch aufgelöste Bilddetails) ausfiltert, so dass auch von einer Glättung oder Weichzeichnung des Bildes gesprochen wird. Die zweidimensionale normalisierte Gauß-Funktion ist nach [22, p. 95] definiert als:

$$w(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}} \quad (1)$$

mit  $w$  = Filterkern,  $\sigma$  = Standardabweichung,  $x, y$  = Koordinaten des Filterkerns, bezogen auf den Mittelpunkt

Das Verhältnis zwischen  $\sigma$  und der Filterkernbreite/-höhe beläuft sich nach [23, p. 112] auf

$$\sigma = 0,3 \left( \frac{n}{2} - 1 \right) + 0,8 \quad (2)$$

mit  $\sigma$  = Standardabweichung,  $n$  = Filterkernbreite/-höhe

Die Faltung der Bilddaten mit dem Filterkern erfolgt nach [14, p. 149] als:

$$g(x, y) = w * f(x, y) = \sum_{s=-a}^a \sum_{t=-b}^b w(s, t) f(x - s, y - t) \quad (3)$$

mit  $g$  = gefiltertes Bild;  $w$  = Filterkern;  $f$  = Bild;  $a = \frac{\text{Filterkernbreite}-1}{2}$ ;  $b = \frac{\text{Filterkernhöhe}-1}{2}$ ;  $s, t$  = Koordinaten des Filterkerns, bezogen auf den Mittelpunkt;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes

Die Glättung durch Anwendung eines Gaußfilters hat einen Verlust hochfrequenter Bilddetails zur Folge, wodurch Objektkanten unschärfer dargestellt werden (s. Abbildung 14 e). Um signifikante Fehler bei der Konturerkennung zu vermeiden, sollten nur kleine Filterdurchmesser (3 bis 7 Pixel) verwendet werden

### 3.1.2 Medianfilter

Der nichtlineare Medianfilter ist ein Rangordnungsfiler, welcher einem Bildpunkt den Median der Intensitäten seiner Umgebung, inklusive des Bildpunktes selbst, zuweist. Hieraus resultiert eine sehr gute Reduktion besonders von Impulsauschen, aber auch für additives Rauschen, das in Bezug auf die Leistung normalverteilt ist, werden gute Ergebnisse erzielt. Die Medianfilterung führt bei gleichgroßem Filterkern zu weniger Unschärfe als eine Gaußfilterung, homogenisiert jedoch feine kontraststarke Strukturen (s. Abbildung 14 c, f). Daher sollten, wie auch bei der Anwendung des Gaußfilters, nur kleine Filterdurchmesser verwendet werden.

## 3.2 Segmentierung

Mit Hilfe der Segmentierung werden Objekte im Bild identifiziert, die weitere Differenzierung der einzelnen Objekte bleibt der anschließenden Klassifikation vorbehalten. Durch die Segmentierung wird für jeden einzelnen Bildpunkt festgestellt, ob er zu einem Objekt oder zum Bildhintergrund, bzw. im Fall des Canny Edge Detectors (s. Kapitel 3.2.1.4) zu einer Objektkante oder einer nicht relevanten (meistens homogenen) Struktur gehört. Diese vollständige überdeckungsfreie Segmentierung wird auch als Binarisierung bezeichnet.

Vier in ihrer Wirkung sehr unterschiedliche Segmentierungsverfahren und eine Methode zur Verbesserung des Bildkontrastes wurden umgesetzt: Otsu's Thresholding [24] basiert auf einer bimodalen Verteilung des Intensitätshistogramms und berechnet einen Schwellwert, der die beiden Intensitätsklassen „Objekt“ und „Hintergrund“ durch Maximierung der Varianz zwischen diesen Klassen trennt. Der Robust Automated Threshold Selector [25] (RATS) führt eine lokale Gewichtung der Intensitätswerte auf Basis des Intensitätsgradienten durch, um einen Schwellwert zu ermitteln, der sich vor allem an kontraststarken Objektkanten orientiert. Der Canny Edge Detector [26] lokalisiert Objektkanten möglichst exakt durch die Identifizierung eindeutiger Kanten, die auf Basis einer Konnektivitätsanalyse um ursprünglich nicht eindeutige Anteile ergänzt werden, während Adaptive Thresholding [23, p. 138] für jeden Bildpunkt einen Schwellwert durch die gewichtete Mittelung seiner lokalen Umgebung bestimmt. Otsu's Thresholding wurde zusätzlich in einer Variante implementiert, die vor der Segmentierung mit Hilfe eines Histogrammausgleichs [23, p. 186ff.] den Kontrastumfang der Bilddaten erhöht.

Diejenigen Verfahren, welche die Segmentierung auf Basis globaler Kriterien durchführen (Otsu's Thresholding, Canny Edge Detector), setzen zwingend eine ausreichend homogene Ausleuchtung des Bildes voraus. Auf lokalen Kriterien beruhende Verfahren, wie RATS oder Adaptive Thresholding, analysieren hingegen nur das Kontrastverhalten im direkten Umfeld eines Bildpunktes, so dass sich als Intensitätsverläufe äußernde Beleuchtungsinhomogenitäten nicht negativ auswirken. Weiterhin lassen sich die hier ausgeführten Ansätze in pixel- und kantenorientierte Methoden unterscheiden: Die pixelorientierte Segmentierung mittels Otsu's Thresholding oder Adaptive Thresholding orientiert sich an der Intensität der Bildpunkte, die kantenbasierte durch RATS und Canny Edge Detector an den Intensitätsgradienten. Modell-, textur- oder regionenbasierte Segmentierungsverfahren kommen nicht zu Anwendung.

Die für die jeweiligen Segmentierungsverfahren notwendigen Parameter wurden in Form von global für alle Datensätze geltenden Einstellungen realisiert, da bei den verwendeten Daten die Aufnahmebedingungen relativ konstant und die Segmentierungsergebnisse somit gut vergleichbar waren. Diese Einstellungen werden, soweit notwendig, einmalig vom Benutzer exemplarisch ermittelt und festgelegt.

Bei der Segmentierung von Bilddaten muss ein Kompromiss eingegangen werden zwischen Über- (zu viele kleinteilige Objekte werden identifiziert) und Untersegmentierung (die Objekte werden nicht oder nicht komplett vom Hintergrund bzw. voneinander getrennt). Bei der in dieser Arbeit umgesetzten Vorgehensweise wird eine Übersegmentierung in Kauf genommen, und die relevanten Objekte werden in einem der nachfolgenden Arbeitsschritte durch eine Validierung der Konturdaten ermittelt (s. Kapitel 3.4.2). Eine Untersegmentierung muss durch die Wahl geeigneter Methoden und Parameter vermieden werden. Da sich mehrere Verfahren parallel verwenden lassen, können ihre individuellen Vorteile kombiniert und somit auch Objekte identifiziert werden, welche schwer zu erkennen sind (s. Kapitel 5.2). Die aus der Filterung und dem Einsatz verschiedener Segmentierungsverfahren resultierenden Fehler werden als gering erachtet (s. Kapitel 5.3).

### 3.2.1 Segmentierungsverfahren

Die hier verwendeten Segmentierungsalgorithmen beruhen auf der Anwendung von Schwellwerten, wobei der Canny Edge Detector eine Sonderstellung einnimmt, da er nicht Objekte, sondern Objektkanten erkennt (s. Kapitel 3.2.1.4). Mit Hilfe der anderen Verfahren wird ein Bildpunkt als dem gesuchten Objekt zugehörig klassifiziert, wenn seine Intensität oberhalb eines bestimmten Schwellwertes liegt, andernfalls wird er dem Bildhintergrund zugerechnet:

$$C(x, y) = \begin{cases} \text{Objekt, wenn } I(x, y) > T \\ \text{Hintergrund, wenn } I(x, y) \leq T \end{cases} \quad (4)$$

mit  $C$  = Klassifikation des Bildpunktes;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes;  $I$  = Intensität des Bildpunktes;  $T$  = Schwellwert

Der Schwellwert  $T$  wird, je nach Verfahren, global für das komplette Bild oder lokal für die direkte Umgebung jedes Bildpunktes ermittelt. Für die weiteren Schritte der Bildverarbeitungspipeline werden Objektpixel weiß, Hintergrundpixel schwarz eingefärbt. Hierbei erfordern einige Segmentierungsverfahren eine Invertierung des segmentierten Bildes, da aufgrund des in Hellfeldaufnahmen intensitätsstarken Bildhintergrundes die Zuordnung Objekt/Hintergrund nach Gleichung (4) vertauscht ist. Die im Folgenden vorgestellten Segmentierungsverfahren werden am Beispiel der Bilddaten von Abbildung 15 exemplarisch durchgeführt.



Abbildung 15: Beispieldaten für die Segmentierungsverfahren, lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis* sowie mehrerer Valvenbruchstücke und Fremdkörper

### 3.2.1.1 Otsu's Thresholding

Für Otsu's Thresholding [24], [14, p. 742ff.], auch als „Otsu's Method“ bezeichnet, wird ein globaler Schwellwert auf Basis des Intensitätshistogramms berechnet. Grundannahme für Otsu's Thresholding ist eine bimodale Verteilung des Histogramms, d.h. es existieren zwei Klassen, in diesem Fall Objekte und Hintergrund, mit unterscheidbaren, möglichst normalverteilten Intensitätsstärken. Für die Schwellwertfindung wird versucht, die Varianz zwischen diesen beiden Klassen zu maximieren, was gleichzeitig die Varianz innerhalb der Klassen minimiert. Als Basis dient das normalisierte Histogramm, das die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Intensität beschreibt:

$$p_i = \frac{n_i}{MN}; \quad \sum_{i=0}^{L-1} p_i = 1; \quad p_i \geq 0 \quad (5)$$

mit  $p_i$  = normalisiertes Histogramm (Wahrscheinlichkeit für Auftreten eines Pixels der Intensität  $i$ );  
 $n_i$  = Anzahl der Pixel der Intensität  $i$ ;  $MN$  = Gesamtzahl der Bildpixel;  $L$  = Anzahl unterschiedlicher Intensitäten

Auf Grundlage der Intensitätsverteilung werden die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der beiden Objektklassen definiert:

$$P_1(k) = \sum_{i=0}^k p_i \quad (6)$$

$$P_2(k) = \sum_{i=k+1}^{L-1} p_i = 1 - P_1(k) \quad (7)$$

mit  $k$  = Schwellwert zur Trennung in die Klassen  $C_1$  und  $C_2$ , wobei  $C_1$  alle Pixel der Intensitäten  $[0, k]$ ,  $C_2$  alle Pixel der Intensitäten  $[k + 1, L - 1]$  beinhaltet;  $P_1, P_2$  = Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit des Pixels zu  $C_1, C_2$

Die durchschnittliche Intensität der Pixel der beiden durch den Schwellwert  $k$  getrennten Klassen errechnet sich zu:

$$m_1(k) = \frac{1}{P_1(k)} \sum_{i=0}^k ip_i \quad (8)$$

$$m_2(k) = \frac{1}{P_2(k)} \sum_{i=k+1}^{L-1} ip_i \quad (9)$$

mit  $m_1, m_2$  = Durchschnittsintensität der Pixel in Klasse  $C_1, C_2$

Die durchschnittlichen Intensitäten basieren auf dem normalisierten Histogramm:

$$m_G = \sum_{i=0}^{L-1} ip_i = P_1(k) m_1(k) + P_2(k) m_2(k) \quad (10)$$

mit  $m_G$  = Durchschnittsintensität aller Bildpixel

$$m(k) = \sum_{i=0}^k ip_i \quad (11)$$

mit  $m(k)$  = kumulative Wahrscheinlichkeit für die Intensität  $k$  (diese entspricht der durchschnittlichen Intensität für die Intensitäten  $[0, k]$ )

Die Varianz der Intensitäten aller Bildpixel berechnet sich nach:

$$\sigma_G^2 = \sum_{i=0}^{L-1} (i - m_G)^2 p_i \quad (12)$$

mit  $\sigma_G^2$  = Varianz der Intensitäten aller Bildpixel

Für die Interklassenvarianz ergibt sich:

$$\begin{aligned} \sigma_B^2(k) &= P_1(m_1(k) - m_G)^2 + P_2(m_2(k) - m_G)^2 \\ &= \frac{(m_G P_1(k) - m(k))^2}{P_1(k)(1 - P_1(k))} \end{aligned} \quad (13)$$

mit  $\sigma_B^2$  = Interklassenvarianz zwischen  $C_1$  und  $C_2$  für den Schwellwert  $k$

Für alle Schwellwerte wird die resultierende Interklassenvarianz berechnet. Der optimale Schwellwert liegt vor, wenn eine maximale Interklassenvarianz erreicht wird:

$$\sigma_B^2(k^*) = \max_{0 \leq k \leq L-1} [\sigma_B^2(k)] \quad (14)$$

mit  $k^*$  = optimaler Schwellwert in Hinblick auf die Maximierung der Interklassenvarianz

Die Güte der Klassentrennung findet im vorliegenden Fall keine Anwendung, sei jedoch der Vollständigkeit halber aufgeführt:

$$\eta = \frac{\sigma_B^2(k)}{\sigma_G^2} \quad (15)$$

mit  $\eta$  = Güte des Schwellwerts in Hinblick auf die Maximierung der Interklassenvarianz

Obwohl die Histogramme der verwendeten Valvenaufnahmen nicht bimodal sind (s. Kapitel 5.1), eignet sich Otsu's Thresholding gut für die Segmentierung. Der ermittelte Schwellwert liegt dabei zwischen den dunklen Bereichen des Valvenrandes und dem helleren Hintergrund (entsprechend ungefähr dem Übergang Rot-Blau in Abbildung 40), so dass im Anschluss an die Segmentierung eine Invertierung des Ergebnisses vorgenommen werden muss, um die Valven für die Konturerkennung weiß auf schwarzem Hintergrund darzustellen.

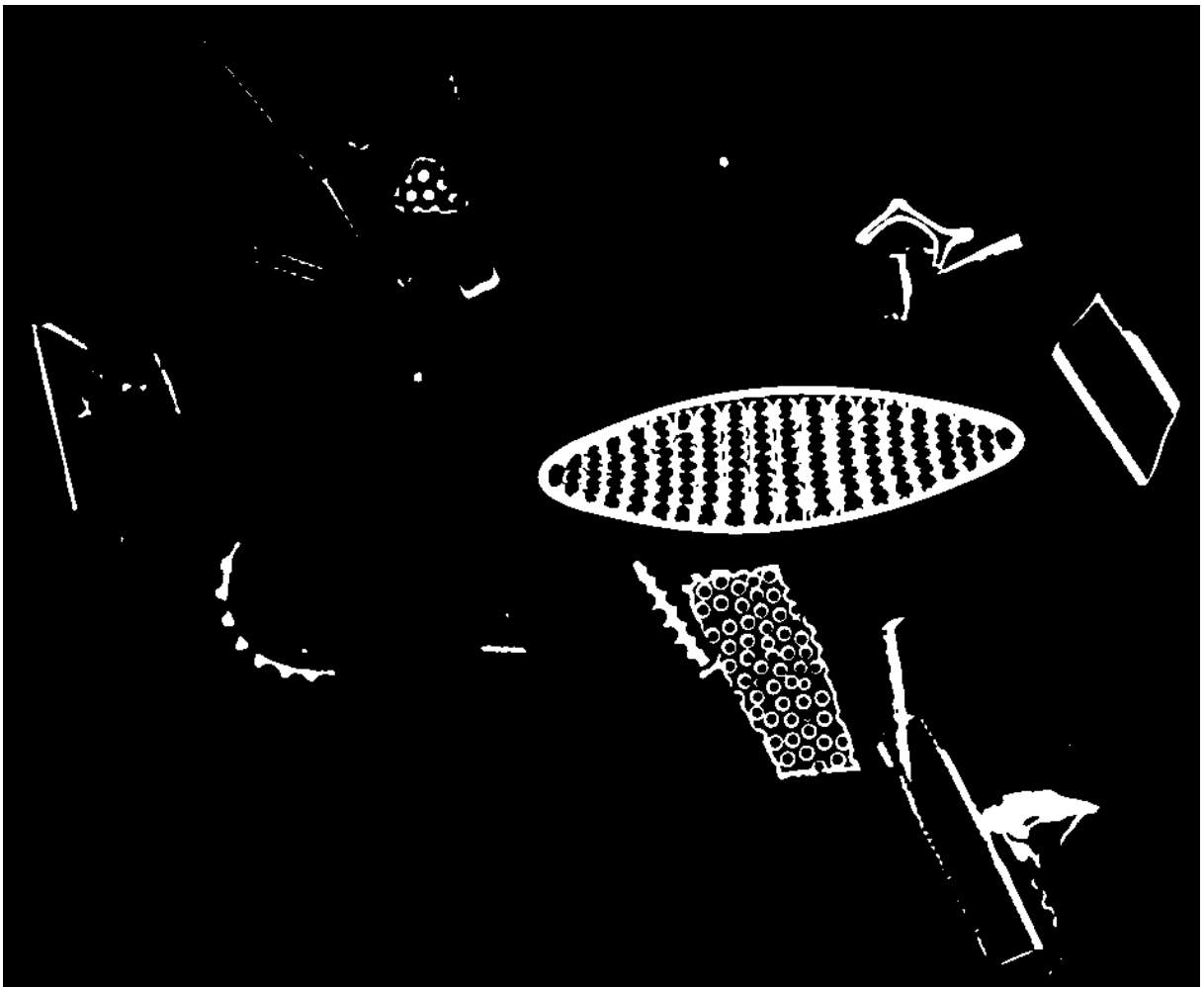


Abbildung 16: Daten aus Abbildung 15, gefiltert mit einem Gauß-Kern von 5 Pixeln Durchmesser und segmentiert durch Otsu's Thresholding. Die äußeren Konturlinien entsprechen für die Valve dem tatsächlichen Objektrand.

Da für die Segmentierung mittels Otsu's Thresholding keine Parameter definiert werden müssen, eignet sich diese Methode besonders gut für die automatisierte Anwendung ohne Benutzerinteraktion.

### 3.2.1.2 Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding

Die Durchführung eines Histogrammausgleichs [23, p. 186ff.] gehört in der Bildverarbeitungs pipeline normalerweise zum Schritt der Bildvorverarbeitung. Sie wurde jedoch, kombiniert mit der Schwellwertbildung nach Otsu, in dieser Arbeit aus praktischen Gründen als eigenständiges Segmentierungsverfahren realisiert. Durch den Histogrammausgleich wird versucht, eine gleichmäßige Verteilung der Intensitätswerte im Bild zu erreichen, indem häufig auftretende Intensitäten auf einen größeren Intensitätsbereich gespreizt, seltener auftretende auf einen kleineren Bereich gestaucht werden. Dies geschieht mit Hilfe einer Transferfunktion, die auf dem kumulativen normalisierten Histogramm basiert, das der kumulativen Verteilungsfunktion entspricht:

$$T(i) = (L - 1) \sum_{i=0}^{L-1} p_i \quad (16)$$

mit  $T(i)$  = Transferfunktion für den Histogrammausgleich;  $p_i$  = normalisiertes Histogramm (Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Pixels der Intensität  $i$ ), s. Formel (5) ;  $L$  = Anzahl unterschiedlicher Intensitäten

Die Transferfunktion wird auf jeden Punkt des Ausgangsbildes angewendet, um ein Ergebnisbild mit ausgeglichener Intensitätsverteilung zu erhalten:

$$F'(x, y) = T(F(x, y)) \quad (17)$$

mit  $F'$  = Ergebnisbild;  $F$  = Ausgangsbild;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes

Üblicherweise wird der Histogrammausgleich angewendet, um einen durch falsche Belichtung reduzierten Kontrastumfang zu erhöhen. Da sich durch die Spreizung von häufig im Bild vorhandenen Intensitäten die Intensitätsverteilung ändert, können anschließend über eine Schwellwertfindung nach Otsu (s. Kapitel 3.2.1.1) z.T. auch Objektkanten segmentiert werden, die unscharf abgebildet sind, weil sie außerhalb der Fokusebene liegen (s. Kapitel 5.2).

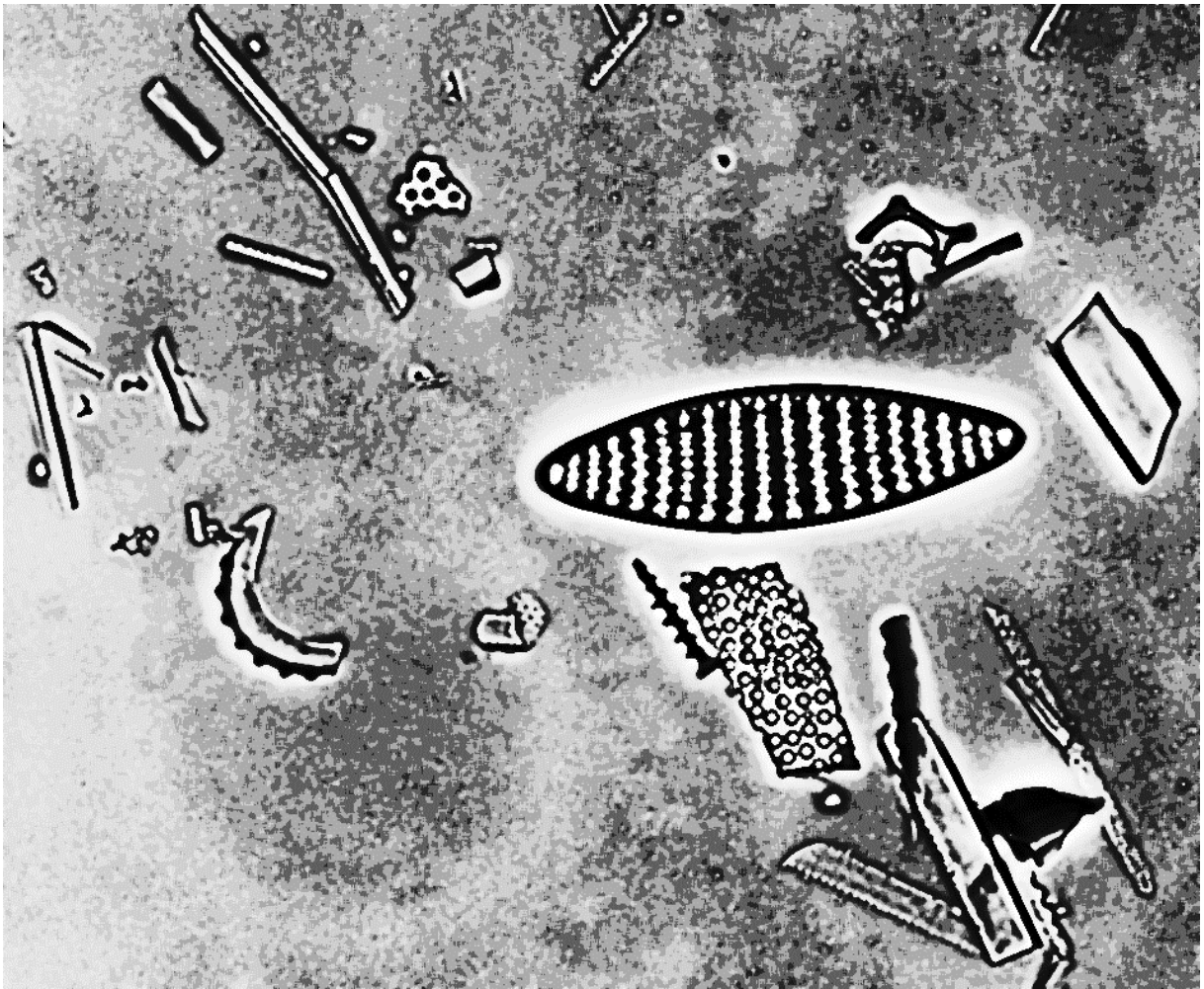


Abbildung 17: Ergebnis des Histogrammausgleichs der Daten aus Abbildung 15, diese wurden zuvor mit einem Medianfilter von 5 Pixeln Durchmesser gefiltert. Besonders der Bildhintergrund erhält neue Intensitätswerte, die Struktur der Valve bleibt deutlich und kontraststark erkennbar.

Da durch die Kontrastverstärkung Strukturen in Erscheinung treten, die ohne Histogrammausgleich bei der Segmentierung dem Hintergrund zugeordnet würden (s. Abbildung 17), tritt eine deutliche Übersegmentierung auf (s. Abbildung 18). Diese wird in der nachgeschalteten Merkmalsextraktion durch eine Objektvalidierung reduziert (s. Kapitel 3.4.2).



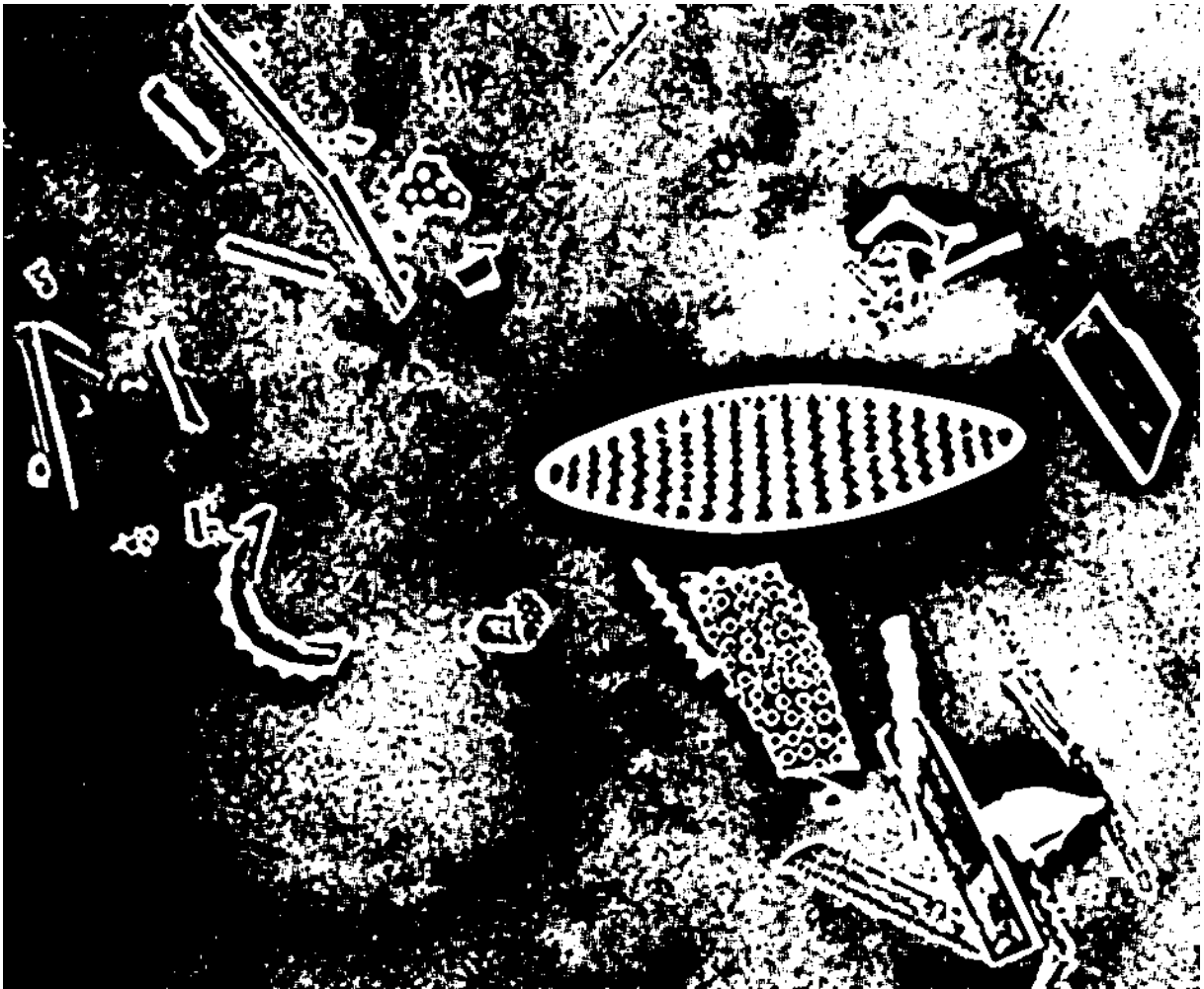


Abbildung 18: Daten aus Abbildung 15, gefiltert mit einem Medianfilter von 5 Pixeln Durchmesser und segmentiert durch Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding. Besonders Anteile des Bildhintergrundes werden fälschlich als Objekt klassifiziert, was zu einer deutlichen Übersegmentierung führt, die äußeren Konturlinien entsprechen im Fall der Valve jedoch dem tatsächlichen Objektrand.

### 3.2.1.3 Robust Automatic Threshold Selector (RATS)

Die Schwellwertfindung mittels RATS [25] erfolgt lokal durch die gewichtete Summierung der Intensitätswerte auf Basis der Intensitätsgradienten. Hierdurch fließen Werte von Bereichen mit steilen Intensitätsgradienten, d.h. in der Nähe von Objektkanten, besonders stark in die Schwellwertberechnung ein.

Die Gradientenmagnituden können auf unterschiedliche Weise ermittelt werden [25]. In dieser Arbeit wird der Ansatz [27] verfolgt, die Gradientenmagnituden durch Filter mit unendlicher Impulsantwort (IIR) zu ermitteln, die einer Faltung mit der ersten Ableitung eines Gauß-Kerns (s. Kapitel 3.1.1) entsprechen [28, p. 154] (s. Abbildung 19). Canny [26, p. 688] hat gezeigt, dass die Filterung mit der ersten Ableitung des Gauß-Kerns nur ca. 20% schlechtere Ergebnisse liefert als der optimale Kantenfiter.

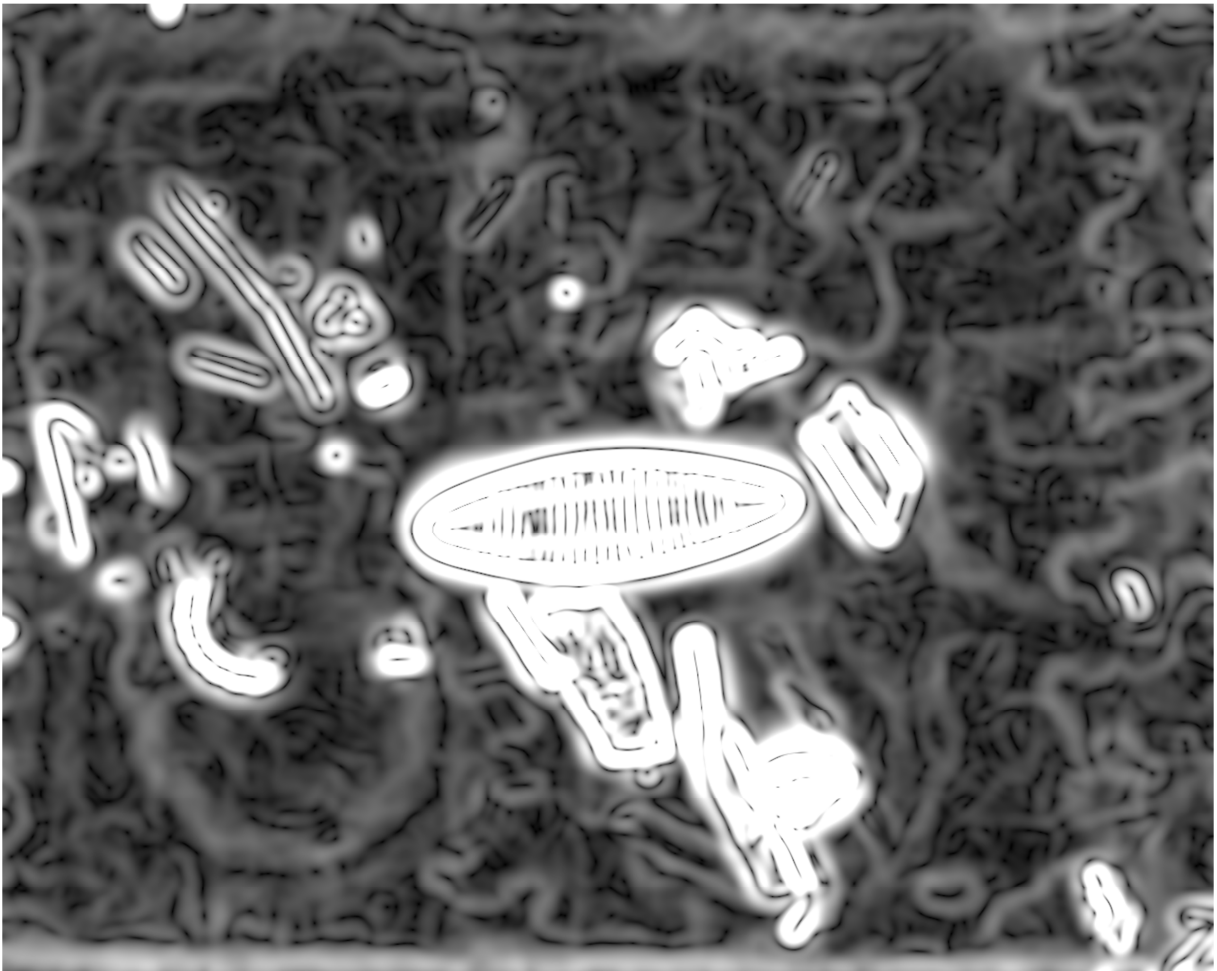


Abbildung 19: Gradientenmagnitudenbild der Daten aus Abbildung 15 ( $\sigma = 3, 0$ ). Helle Bereiche entsprechen hohen Magnituden, diese befinden sich in der Nähe von Objektkanten.

Für die gewichtete Summierung wird das Gradientenmagnitudenbild iterativ in immer kleinere Bereiche (Quadrees) zerlegt [25, p. 136]. Für jeden dieser Bereiche wird jeweils ein Schwellwert ermittelt. Dies gelingt in sinnvoller Form jedoch nur, wenn im untersuchten Bereich Objektkanten vorliegen, andernfalls ist die Summe der Gradientenmagnituden gleich null bzw. sie liegt in der Größenordnung des Bildrauschens. In diesem Fall wird die iterative Zerlegung dieses Bereichs beendet und der Schwellwert des im Quadtree übergeordneten Bereichs verwendet. Nach [29] hat sich eine Potenzierung des Gradienten zur stärkeren Gewichtung steiler Gradienten bewährt, was zu einer Verbesserung der Robustheit gegenüber Rauschen führt.

Der Schwellwert errechnet sich nach [27] als:

$$T = \frac{\sum_{x,y} G(x,y)^p I(x,y)}{\sum_{x,y} G(x,y)^p} \quad (18)$$

mit  $T$ = Schwellwert;  $I$ = Intensität des Bildpixels;  $G$  = Intensitätsgradientenmagnitude des Bildpunktes;  $p$ = Exponent zur Verbesserung der Robustheit;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes

Ebenso wie bei der Segmentierung nach Otsu ist das Ergebnis invertiert, d.h. die Intensität des Bildhintergrundes liegt oberhalb der ermittelten Schwellwerte.



Abbildung 20: Daten aus Abbildung 15, gefiltert mit einem Gauß-Kern von 5 Pixeln Durchmesser und segmentiert mittels RATS ( $\sigma = 3,0$ ; Exponent = 2,0). Die äußeren Konturlinien entsprechen für die Valve dem tatsächlichen Objektrand.

Die Segmentierung mit dem Robust Automatic Threshold Selector führt zu gut verwertbaren Ergebnissen, jedoch müssen zwei Parameter (das  $\sigma$  zur Bestimmung der Breite des Filterkerns für die Gradientenberechnung, sowie der Exponent, mit dem die Gradientenmagnitude in die Berechnung eingeht) jeweils dem Bildmaterial angepasst werden.

#### 3.2.1.4 Canny Edge Detector

Die Kantendetektion nach Canny [26], [14, p. 719ff.] verfolgt die drei für die Kantensegmentierung üblichen Ziele, die Canny mathematisch formuliert und deren Erfüllung er numerisch nachgewiesen hat:

1. Geringe Fehlerrate: Es sollen möglichst alle im Bild vorhandenen Kanten gefunden werden, dabei aber möglichst wenige Fehldetektionen auftreten.
2. Gute Lokalisierung der Kantenpunkte: Die gefundenen Kantenpunkte sollen möglichst mittig auf den tatsächlich im Bild vorhandenen Kanten liegen.
3. Minimierung der Kantenbreite: Die gefundenen Kanten sollen auf die Breite eines einzelnen Pixels reduziert werden.

Der Algorithmus wird in vier Schritten ausgeführt:

1. Glättung der Bilddaten
2. Berechnung der Gradienten
3. Unterdrückung von lokalen Nicht-Maxima zur Reduzierung der Kantenbreite
4. Verifizierung der Kantenlinien durch Schwellwert- und Konnektivitätsanalyse

Zusätzlich zur Reduktion des Bildrauschens während der Vorverarbeitung erfolgt durch die Anwendung des Sobel-Operators bei der Gradientenberechnung eine weitere Glättung. Die Berechnung der Gradienten erfolgt über die Faltung mit den beiden Sobel-Kernen [30, p. 165], z.B.:

$$h_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad h_y = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (19)$$

mit  $h_x$  = Kern für vertikale Kanten;  $h_y$  = Kern für horizontale Kanten; hier exemplarisch für einen Filter der Größe  $3 \times 3$

Die Gradienten errechnen sich entsprechend [30, p. 136]:

$$g_x(x, y) = h_x * f(x, y) = \sum_{k=-n_2}^{n_2} \sum_{j=-m_2}^{m_2} h_x(j, k) f(x - j, y - k) \quad (20)$$

$$g_y(x, y) = h_y * f(x, y) = \sum_{k=-n_2}^{n_2} \sum_{j=-m_2}^{m_2} h_y(j, k) f(x - j, y - k) \quad (21)$$

mit  $g_x, g_y$  = Gradienten in horizontaler bzw. vertikaler Richtung;  $m_2 = \frac{\text{Kernelbreite}-1}{2}$ ;  $n_2 = \frac{\text{Kernelhöhe}-1}{2}$ ;  $f$  = Bild;  $j, k$  = Koordinaten des Filterkerns, bezogen auf den Mittelpunkt;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes

Aus den richtungsabhängigen Gradienten ergibt sich die Gradientenmagnitude:

$$M(x, y) = \sqrt{g_x(x, y)^2 + g_y(x, y)^2} \quad (22)$$

mit  $M$  = Gradientenmagnitude

Die Gradientenmagnitude wird in der verwendeten Implementation aus Geschwindigkeitsgründen über den Betrag der Gradienten angenähert [30, p. 165]:

$$M_a(x, y) = |g_x(x, y)| + |g_y(x, y)| \quad (23)$$

mit  $M_a$  = angenäherte Gradientenmagnitude

Für ein 8Bit-Graustufenbild ergibt sich bei einer Filterkernbreite von 3 Pixeln die maximal mögliche Gradientenmagnitude z.B. für eine Objektkante der Form:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 255 \\ 0 & 255 & 255 \\ 255 & 255 & 255 \end{bmatrix}$$

Hieraus resultieren, bezogen auf den Mittelpunkt der o.g. Wertematrix, die Gradienten:

$$g_x = g_y = 765 \quad (24)$$

und die Gradientenmagnituden:

$$M = 1081,9 \text{ bzw. } M_a = 1530 \quad (25)$$

Trotz der für den o.g. Fall erheblichen Differenz zwischen tatsächlicher und angenäherter Gradientenmagnitude kann die Näherung verwendet werden, da derart steile Objektkanten in der Praxis nur selten auftreten und der Magnitudenwert in den folgenden Schritten des Algorithmus nur dem qualitativen Vergleich mit benachbarten Magnitudenwerten bzw. den Schwellwerten für die Kantendetektion dient.

Die Richtung des Gradienten berechnet sich nach [30, p. 165]:

$$\theta(x, y) = \tan^{-1} \frac{g_y(x, y)}{g_x(x, y)} \quad (26)$$

mit  $\theta$  = Richtung des Gradienten

Gradientenmagnitude und Gradientenrichtung dienen als Grundlage für die weitere Kantendetektion. Hierfür werden in einem ersten Schritt lokale Maxima der Gradientenmagnitude aufgefunden, indem lokale Nicht-Maxima unterdrückt werden („nonmaxima suppression“). Als Ergebnis ergibt sich ein „Kantenbild“ mit derselben Auflösung wie Original- und Gradientenbild, in dem ausschließlich Kanten vorkommen, die einen einzelnen Pixel breit sind.

Für die „nonmaxima suppression“ wird für jeden Punkt der Gradientenmagnitude die Kantenrichtung, welche senkrecht zur Gradientenrichtung verläuft, auf die Winkel  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  und  $135^\circ$  diskretisiert, was den vier möglichen Verlaufsrichtungen der Kante durch den Mittelpunkt einer  $3 \times 3$ -Umgebung entspricht. Anschließend werden für jeden Punkt der Gradientenmagnitude die beiden Nachbarpunkte, welche senkrecht zur Kantenrichtung stehen, bezüglich ihres Betrags verglichen. Ist der Betrag mindestens eines der Nachbarpunkte höher, wird der Wert für das Kantenbild an der untersuchten Stelle auf 0 gesetzt, andernfalls auf den Wert der Gradientenmagnitude. Hieraus resultieren auf die Breite eines einzelnen Pixels reduzierte und dem Verlauf der steilsten Gradienten folgende Kanten.

Im letzten Schritt werden die nach der „nonmaxima suppression“ gefundenen, verdünnten Kanten durch Schwellwert- und Konnektivitätsanalyse verifiziert. Hierfür werden zwei Schwellwerte auf die Gradientenmagnituden angewendet, ein höherer zur Identifizierung „starker“ und ein niedrigerer zur Identifizierung „schwacher“ Kanten:

$$C(x, y) = \begin{cases} \text{starker Kantenpunkt, wenn } M_a(x, y) > T_H \\ \text{schwacher Kantenpunkt, wenn } T_L < M_a(x, y) \leq T_H \\ \text{kein Kantenpunkt, wenn } M_a(x, y) \leq T_L \end{cases} \quad (27)$$

mit  $C$  = Klassifikation des Punktes;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes;  $M_a$  = angenäherte Gradientenmagnitude;  $T_H$  = Schwellwert für starke Kanten;  $T_L$  = Schwellwert für schwache Kanten

Starke Kantenpunkte dienen als Ausgangspunkt für die Konnektivitätsanalyse und werden grundsätzlich als valide Kanten angenommen. Diese validen Kanten werden um die direkt mit ihnen verbundenen schwachen Kantenpunkte verlängert. Schwache Kanten, die nicht mit starken verbunden sind, werden hierdurch entfernt. Im Ergebnisbild werden Kanten als weiße Pixel auf schwarzem Hintergrund ausgegeben (s. Abbildung 21).

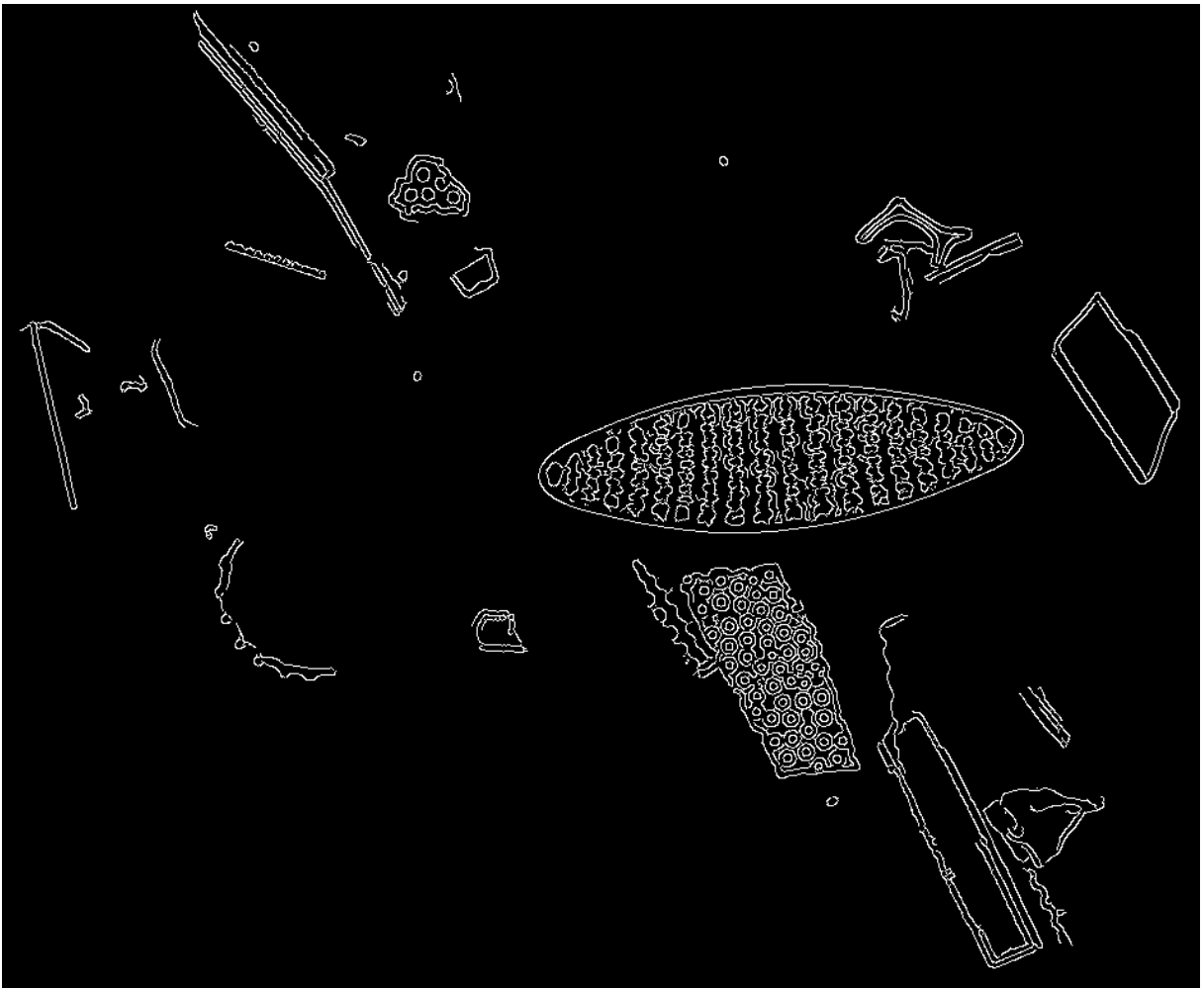


Abbildung 21: Daten aus Abbildung 15, gefiltert mit einem Gauß-Kern von 7 Pixeln Durchmesser und segmentiert mittels Canny Edge Detector (Schwellwert für schwache Kanten = 25; Schwellwert für starke Kanten = 125; Durchmesser für Sobelfilter 3 Pixel). Die äußeren Konturlinien entsprechen für die Valve dem tatsächlichen Objektrand.

Die Segmentierung mit dem Canny Edge Detector führt zu gut verwertbaren Ergebnissen, jedoch müssen drei Parameter (Schwellwerte für starke und schwache Kanten sowie Durchmesser des Sobelfilters) jeweils dem Bildmaterial angepasst werden.

### 3.2.1.5 Adaptive Thresholding

Adaptive Thresholding realisiert die Schwellwertfindung auf Basis der lokalen Nachbarschaft des zu untersuchenden Pixels, statt wie z.B. bei Otsu's Thresholding auf Grundlage des gesamten Bildes. Der Schwellwert wird im vorliegenden Fall durch die Mittelung der mit einem Gauß-Kern (s. Kapitel 3.1.1) gewichteten Intensitäten der benachbarten Pixel ermittelt [23, p. 138].



Abbildung 22: Daten aus Abbildung 15, gefiltert mit einem Gauß-Kern von 7 Pixeln Durchmesser und segmentiert mit Adaptive Thresholding (Durchmesser der lokalen Nachbarschaft 13 Pixel). Statt des tatsächlichen Objektrandes wird ein ihn umgebender Saum segmentiert, was zu verfälschten Ergebnissen führt.

Zwar wird mittels Adaptive Thresholding die Objektkante meistens eindeutig segmentiert, bei den untersuchten Datensätzen geschieht dies jedoch auf eine Weise, die eine korrekte Auswertung nicht zulässt, da der Bereich des Valvenrandes dem Hintergrund, ein ihn umgebender Saum dem Objekt zugeordnet wird. Da der Bildhintergrund außerhalb dieses Saumes korrekt klassifiziert wird, kann dieses Problem nicht durch eine Invertierung behoben werden. Die hieraus resultierenden Fehler werden in Kapitel 5.3 diskutiert, die Eignung des Adaptive Thresholdings muss in Abhängigkeit von Bildmaterial und gewünschter Ergebnisgenauigkeit entschieden werden.

### 3.2.2 Ergebnisstreuung durch Kombination von Segmentierungsverfahren

Unterschiedliche Segmentierungsverfahren führen zu unterschiedlichen Objektkanten, d.h. die für eine Valve ermittelte Konturlinie verschiebt sich, entsprechend variieren die Ergebnisse für Fläche, Umfang, Breite und Höhe der Kontur (s. Kapitel 5.3). Für die Bewertung der Streuung dieser Ergebnisse bei Verwendung mehrerer Segmentierungsverfahren wird ein Maß zugrunde gelegt, das die maximale prozentuale Abweichung der Werte von einem dem Mittel der beiden Extremwerte entsprechenden hypothetischen Mittelwert wiedergibt:

$$\text{Prozentuale Streuung} = \frac{MAX - MIN}{MAX + MIN} \cdot 100\% \quad (28)$$

mit  $MAX$  = maximaler,  $MIN$  = minimaler Wert für ein einzelnes Kriterium (Fläche, Umfang, usw.) bei Verwendung mehrerer Segmentierungsverfahren

### 3.3 Bildnachbearbeitung / morphologisches Closing

Besonders bei Valven, welche nicht komplett innerhalb der Fokusebene liegen und daher z.T. unscharf abgebildet werden, ergeben sich bei der Segmentierung häufig Konturdefekte, bei denen die Konturlinie nicht den tatsächlichen äußeren Rand der Valve umfasst. Derartige Defekte können z.T. durch ein an die Segmentierung angeschlossenes morphologisches Closing behoben werden (s. Abbildung 23). Hierdurch werden jedoch auch nahe beieinander liegende, aber korrekt als getrennte Objekte erkannte Konturen miteinander verschmolzen (s. Abbildung 24). Die Abwägung, ob die Anwendung des Closings zu einer Verbesserung der Ergebnisse beiträgt oder diese sogar verschlechtert, muss im Einzelfall getroffen werden. Bei simultaner Verwendung mehrerer Segmentierungsverfahren erscheint sie für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Daten nicht sinnvoll.

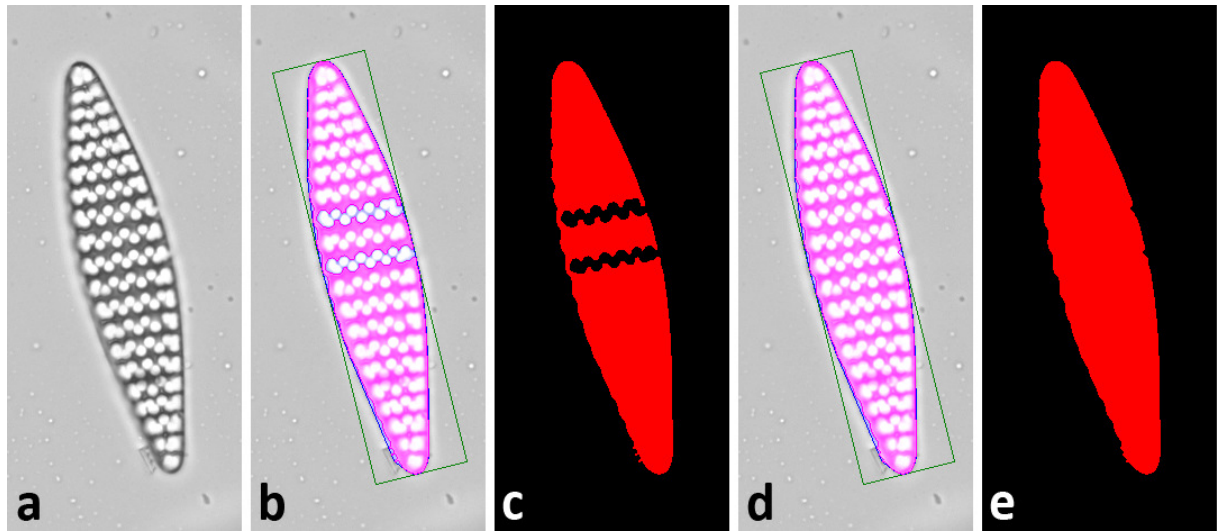


Abbildung 23: Erwünschte Wirkungsweise des morphologischen Closings. a) Original, b) und c) fehlerhafte Segmentierung, d) und e) Segmentierungsfehler durch morphologisches Closing reduziert, das Ergebnis ist brauchbar für die weitere Analyse. Die identifizierte Valvenfläche ist rot bzw. lila eingefärbt, das kleinste umhüllende Rechteck grün eingezeichnet.

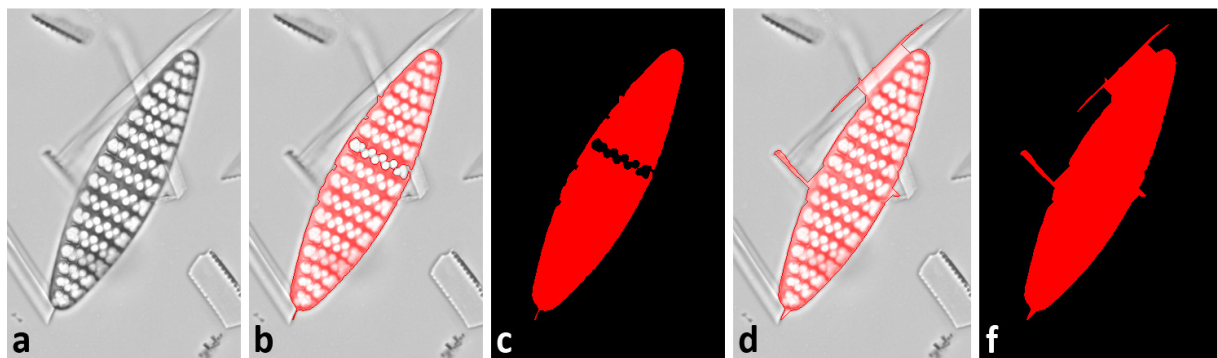


Abbildung 24: Unerwünschte Wirkungsweise des morphologischen Closings. a) Original, b) und c) fehlerhafte Segmentierung, d) und e) Segmentierungsfehler durch morphologisches Closing reduziert, aber umgebende Strukturen wurden eingebunden, das Ergebnis ist unbrauchbar. Die identifizierte Valvenfläche ist rot eingefärbt.

Auf die Anwendung eines an die Segmentierung angeschlossenen morphologischen Openings zur Entfernung sehr kleiner und daher nicht relevanter Strukturen wurde verzichtet, die sich aus solchen Strukturen ergebende Übersegmentierung wird im Verlauf der Konturanalyse durch die Validierung von Konturfläche und -umfang beseitigt (s. Kapitel 3.4.2).



### 3.4 Merkmalsextraktion

Der Segmentierung der Bilddaten folgt die Extrahierung von Objektmerkmalen. Im vorliegenden Fall wird für jedes räumlich separierbare Objekt der äußere Umriss in Form einer Konturlinie ermittelt. Dieser wird anhand einer Reihe einfach zu untersuchender Parameter als möglicher Kandidat für die weitere Konturanalyse validiert oder als nicht relevant verworfen.

#### 3.4.1 Ermittlung von Konturen

Zur Ermittlung der Konturlinien wird ein von Suzuki [31] vorgeschlagener Algorithmus verwendet, der zusätzlich zu den Konturpunkten auch topologische Strukturinformationen, d.h. Angaben über die Hierarchien von ineinander verschachtelten Konturen liefert. In dieser Arbeit werden jedoch ausschließlich die äußeren Umrisse der Objekte betrachtet, also nur Konturen, welche direkt im Bildhintergrund liegen, daher werden diese Hierarchieinformationen nicht erhoben. Als Folge der Verwendung des Suzuki-Algorithmus bleiben allerdings Punkte des äußersten, einen Pixel breiten Bildrandes unberücksichtigt.

Die Unterscheidung zwischen Bildhintergrund und Objekt erfolgt anhand des Intensitätswertes:

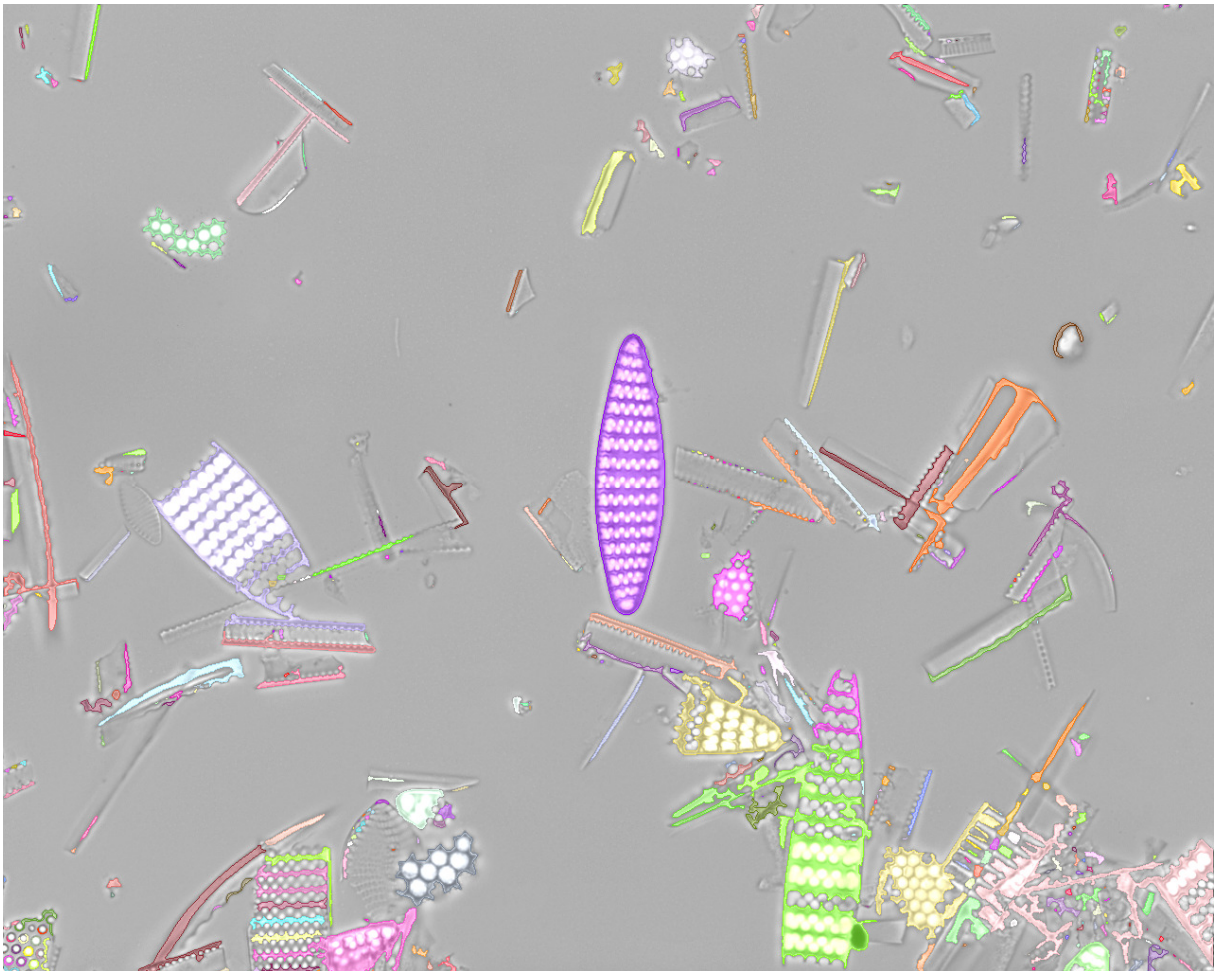
$$C(x, y) = \begin{cases} \text{Objekt, wenn } I(x, y) > 0 \\ \text{Hintergrund, wenn } I(x, y) = 0 \end{cases} \quad (29)$$

mit  $C$  = Klassifikation des Bildpunktes;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes;  $I$  = Intensität des Bildpunktes im segmentierten Bild

Die Konturverfolgung orientiert sich an Bildpunkten, die als Objekt klassifiziert sind, aber in direkter Nachbarschaft zum Bildhintergrund liegen. Bildpunkte mit der Intensität 0 werden als dem Hintergrund, solche mit Intensitäten  $> 0$  als dem Objekt zugehörig klassifiziert, deswegen ist vor der Konturenerrmittlung abhängig vom verwendeten Segmentierungsverfahren eine Invertierung des Segmentierungsergebnisses erforderlich, hierauf wird gegebenenfalls in Kapitel 3.2.1 hingewiesen.

#### 3.4.2 Parameter zum Eingrenzen valider Konturen

Aufgrund von Übersegmentierung, Bruchstücken und Fremdkörpern werden bis zu mehrere tausend Konturen pro Bild ermittelt, daher müssen die Parameter für die Validierung schnell und einfach zu ermitteln und gleichzeitig invariant gegenüber Translation und Rotation sein.



**Abbildung 25: Verdeutlichung der Ergebnisse der Konturermittlung. Die einzelnen Konturen sind unterschiedlich eingefärbt und müssen für die weitere Analyse auf sinnvolle Ergebnisse reduziert und anschließend klassifiziert werden.**

Als Parameter für die Validierung dienen in erster Linie zu erfüllende Intervalle für Fläche und Umfang der Konturen. Darüber hinaus können Objekte ausgeschlossen werden, welche die Bildränder berühren oder ihnen sehr nahe kommen und daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vollständig erfasst wurden. Das Metafer-System positioniert die Objekte während der Aufnahme so, dass sie innerhalb einer mittig im Bild angeordneten „Region of Interest“ liegen, daher können alternativ zur Betrachtung des Abstands zum Bildrand auch Objekte außerhalb eines prozentual definierbaren zentralen Bereichs von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Hierdurch wird die Mehrfachzählung von Ventilen vermieden, die nahe beieinander liegen und deswegen auf mehreren Aufnahmen erscheinen.

### **3.5 Klassifikation / Qualitätsindikatoren**

Die validierten Konturen werden einer weiteren Klassifikation unterzogen, hierbei wird anhand von fünf Qualitätsindikatoren ein Ranking erstellt. Dieses schätzt ab, ob es sich bei dem Objekt um eine der gesuchten Ventilverformen handelt, ob die Valve unbeschädigt ist und ob sie fehlerfrei segmentiert wurde. Die Qualitätsindikatoren basieren auf dem Vergleich der Konturgeometrie mit einer Reihe von passend zur Problemstellung definierten Vorlagen, der Überprüfung des Konturumrisses auf konkave Anteile und der Beschränkung auf sinnvolle Längen-/Breitenverhältnisse.

#### **3.5.1 Vergleich mit Templates**

Der Vergleich der Konturen mit bekannten Vorlagen (Templates) ermöglicht die Identifizierung relevanter Ventile. Innerhalb gewisser Grenzen, die durch die Beschränkung auf die Betrachtung des reinen Konturumrisses gegeben sind, erlaubt er auch die grobe Zuordnung zu bestimmten Morphoty-

pen (s. Abbildung 26). Für eine verlässliche taxonomische Klassifikation ist ein rein konturbasierter Ansatz jedoch nicht ausreichend.



Abbildung 26: Auswahl von Templates, obere Reihe für *Fragilariopsis kerguelensis*, untere Reihe für *Fragilariopsis separanda* und *rhombica*

Die Vergleichsmethode muss translations-, rotations- und skalierungsinvariant sowie möglichst schnell durchzuführen sein, eine herkömmliche Kreuzkorrelation von pixelbasierten Template- und Objektdaten ist daher ungeeignet. Durch Betrachtung der durch die äußere Konturlinie umschlossenen Fläche können jedoch verschiedene geometrische Eigenschaften bestimmt und diese miteinander verglichen werden.

### 3.5.1.1 Momente

Momente geben, basierend auf der Intensitätsverteilung des Bildes, Auskunft über geometrische Eigenschaften wie Schwerpunkt, Flächengröße, Verteilung und Ausrichtung von Flächen etc. Eine Reihe von Normalisierungen führt zu den von Hu [32] eingeführten Invarianten, welche Eigenschaften von Flächen invariant gegenüber Translation, Rotation und Skalierung charakterisieren. Die Hu-Invarianten sind nicht einzeln interpretierbar, bieten als kompletter Satz jedoch die Möglichkeit, im Vergleich ein Maß für die Ähnlichkeit von Objektgeometrien zu ermitteln.

Die 2D-Momente eines Digitalbildes sind definiert [14, p. 839] als:

$$m_{pq} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} x^p y^q f(x, y) \quad (30)$$

mit  $m_{pq}$  = 2D-Moment der Ordnung  $(p + q)$ ;  $p, q = 0, 1, 2, \dots$ ;  $f$  = Bild;  $x, y$  = Koordinaten des Bildpunktes;  $M \times N$  = Größe des Bildes

### 3.5.1.2 Zentrale Momente

Werden die 2D-Momente  $m_{pq}$  auf den Flächenschwerpunkt bezogen, ergeben sich nach [14, p. 840] die translationsinvarianten zentralen Momente:

$$\mu_{pq} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} (x - \bar{x})^p (y - \bar{y})^q f(x, y) \quad (31)$$

mit  $\mu_{pq}$  = zentrales Moment der Ordnung  $(p + q)$ ;  $p, q = 0, 1, 2, \dots$ ;  $\bar{x} = \frac{m_{10}}{m_{00}}$ ;  $\bar{y} = \frac{m_{01}}{m_{00}}$ ;  $(\bar{x}, \bar{y})$  ist der Flächenschwerpunkt.

### 3.5.1.3 Skalierungsinvariante Momente

Werden die translationsinvarianten zentralen Momente  $\mu_{pq}$  zum Moment  $\mu_{00}$  in Bezug gesetzt, ergeben sich nach [14, p. 840] die skalierungs- und translationsinvarianten Momente:

$$\eta_{pq} = \frac{\mu_{pq}}{\mu_{00}^\gamma} \quad (32)$$

mit  $\eta_{pq}$  = skalierungsinvariantes Moment der Ordnung  $(p + q)$ ;  $p, q = 0, 1, 2, \dots$ ;  $\gamma = \frac{p+q}{2} + 1$

### 3.5.1.4 Hu-Invarianten

Nach Hu [32] können aus den skalierungs- und translationsinvarianten Momenten  $\eta_{pq}$  der ersten drei Ordnungen sieben Momente abgeleitet werden, welche sowohl skalierungs- und translations- als auch rotationsinvariant sind, die sogenannten Hu-Invarianten [14, p. 841]:

$$\phi_1 = \eta_{20} + \eta_{02} \quad (33)$$

$$\phi_2 = (\eta_{20} - \eta_{02})^2 + 4\eta_{11}^2 \quad (34)$$

$$\phi_3 = (\eta_{30} - 3\eta_{12})^2 + (3\eta_{21} - \eta_{03})^2 \quad (35)$$

$$\phi_4 = (\eta_{30} + \eta_{12})^2 + (\eta_{21} + \eta_{03})^2 \quad (36)$$

$$\phi_5 = (\eta_{30} - 3\eta_{12})(\eta_{30} + \eta_{12})[(\eta_{30} + \eta_{12})^2 - 3(\eta_{21} + \eta_{03})^2] + (3\eta_{21} - \eta_{03})(\eta_{21} + \eta_{03})[3(\eta_{30} + 3\eta_{12})^2 - (\eta_{21} + \eta_{03})^2] \quad (37)$$

$$\phi_6 = (\eta_{20} - \eta_{02})[(\eta_{30} + \eta_{12})^2 - (\eta_{21} + \eta_{03})^2] + 4\eta_{11}(\eta_{30} + \eta_{12})(\eta_{21} + \eta_{03}) \quad (38)$$

$$\phi_7 = (3\eta_{21} - \eta_{03})(\eta_{30} + \eta_{12})[(\eta_{30} + \eta_{12})^2 - 3(\eta_{21} + \eta_{03})^2] - (\eta_{30} - 3\eta_{12})(\eta_{21} + \eta_{03})[3(\eta_{30} + 3\eta_{12})^2 - (\eta_{21} + \eta_{03})^2] \quad (39)$$

mit  $\phi$  = Hu-Invarianten

Die Hu-Invarianten stellen eine gängige Methode [14, p. 839ff.] zur Klassifikation von Segmentierungsergebnissen dar.

### 3.5.1.5 Matching der Hu-Invarianten

Für eine Klassifikation der nach Segmentierung und Validierung erhaltenen Konturen werden diese anhand ihrer Hu-Invarianten mit den Templates verglichen. Der Vergleich (Matching) zwischen den Hu-Invarianten zweier Konturen  $A, B$  erfolgt nach [33], wobei die Konturen sich ähnlicher sind, je kleiner der Wert für das Matching ist:

$$I(A, B) = \sum_{i=1 \dots 7} \left| \frac{1}{m_i^A} - \frac{1}{m_i^B} \right| \quad (40)$$

mit  $I$  = Matching,  $m_i^A = \text{sgn}(\phi_i^A) \cdot \log |\phi_i^A|$ ;  $m_i^B = \text{sgn}(\phi_i^B) \cdot \log |\phi_i^B|$

Die Valve kann auf Basis desjenigen Templates, für welches das beste Matching ermittelt wurde, einer bestimmten Konturgeometrie (s. Abbildung 26) zugeordnet werden. Diese Zuordnung erlaubt auch eine sehr grobe taxonomische oder morphometrische Klassifizierung, diese ist aufgrund der Beschränkung auf die Betrachtung des Valvenumrisses jedoch nur sehr eingeschränkt aussagekräftig. Die Funktionsweise des Matchings wird exemplarisch in Tabelle 2 und Tabelle 3 anhand der in Abbildung 27 dargestellten Valvenkonturen verdeutlicht.

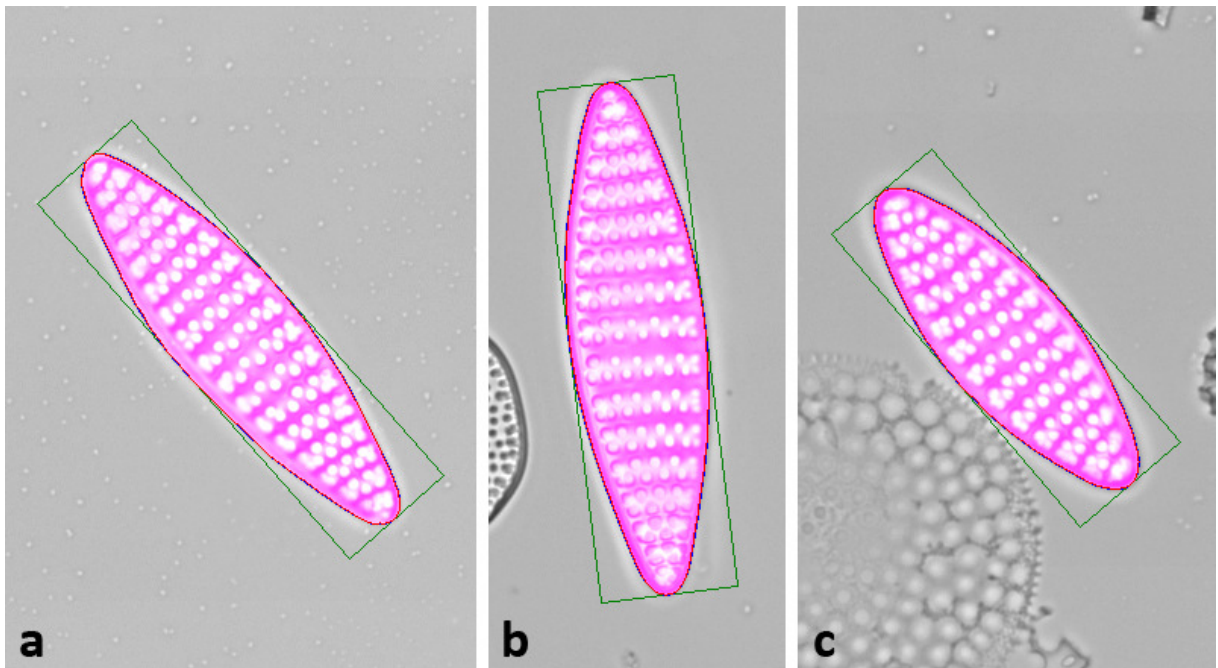


Abbildung 27: Drei Valvenkonturen (lila eingefärbt, das kleinste umgebende Rechteck ist grün eingezeichnet) zur Veranschaulichung der Wirkungsweise von Hu-Invarianten. a) und b) zeigen eine ähnliche Form, sind jedoch in Größe, Lage und Ausrichtung unterschiedlich, c) zeigt eine andere Form als die anderen beiden Konturen, ist jedoch in Lage und Ausrichtung ähnlich zu a)

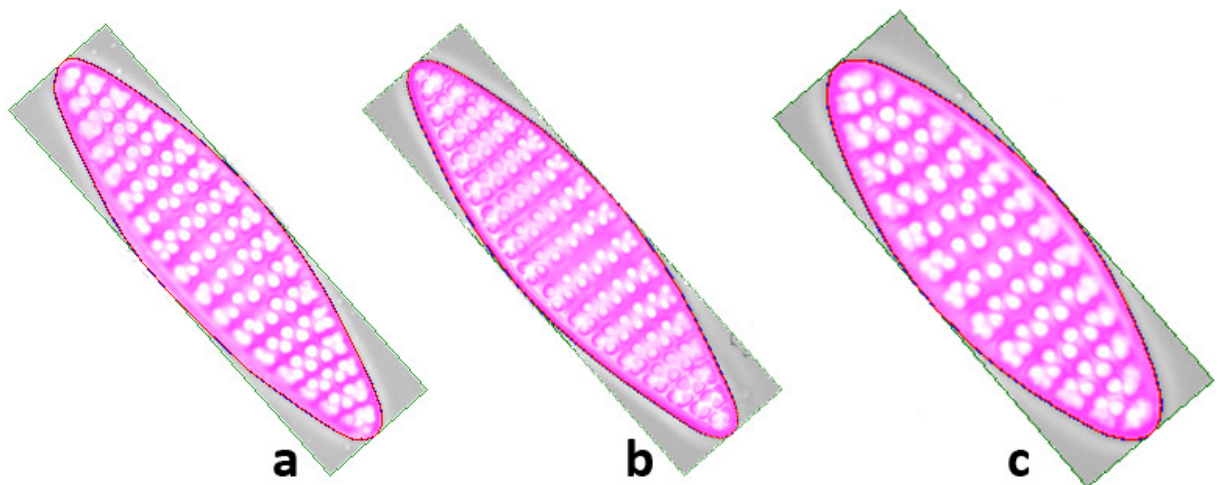


Abbildung 28: Die drei Valvenkonturen aus Abbildung 27, identisch rotiert, auf eine einheitliche Apikallänge skaliert und auf das kleinste sie umgebende Rechteck zugeschnitten. Hier wird die Ähnlichkeit der Form von a) und b) deutlich erkennbar, während c) im Verhältnis zur Länge deutlich ist. Dies spiegelt sich in den Hu-Invarianten wieder.

Die drei Valvenkonturen aus Abbildung 27 zeigen teils gemeinsame, teils unterschiedliche Charakteristika. Die Valven (a) und (b) verfügen über eine ähnliche Form bei unterschiedlicher Größe, Lage und Ausrichtung. Valve (c) unterscheidet sich in der Form von den Valven (a) und (b), ähnelt hinsichtlich Lage und Ausrichtung jedoch Valve (a). Abbildung 28 verdeutlicht Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Valvenformen, hierfür wurden alle drei Valvenkonturen in dieselbe Ausrichtung und Position gebracht und die Größe angeglichen, als Folge erscheint Valve (c) nun deutlich gedrungener als die anderen beiden. In Tabelle 2 spiegeln sich diese Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der Konturform wieder: Die Hu-Invarianten der Valvenkonturen (a) und (b) sind zueinander ähnlich, unterscheiden sich jedoch deutlich von den Hu-Invarianten der Valvenkontur (c).

**Tabelle 2: Hu-Invarianten der drei Valvenkonturen aus Abbildung 27. Die Werte für die Valvenkonturen (a) und (b) ähneln sich, differieren jedoch deutlich von den Werten für Valve (c).**

	Valvenkontur (a)	Valvenkontur (b)	Valvenkontur (c)
<b>Hu-1</b>	$3,263 \cdot 10^{-1}$	$3,264 \cdot 10^{-1}$	$2,635 \cdot 10^{-1}$
<b>Hu-2</b>	$8,100 \cdot 10^{-2}$	$8,099 \cdot 10^{-2}$	$4,401 \cdot 10^{-2}$
<b>Hu-3</b>	$1,962 \cdot 10^{-5}$	$2,870 \cdot 10^{-5}$	$5,897 \cdot 10^{-7}$
<b>Hu-4</b>	$1,202 \cdot 10^{-5}$	$1,796 \cdot 10^{-5}$	$2,795 \cdot 10^{-7}$
<b>Hu-5</b>	$1,845 \cdot 10^{-10}$	$4,077 \cdot 10^{-10}$	$1,134 \cdot 10^{-13}$
<b>Hu-6</b>	$3,408 \cdot 10^{-6}$	$5,069 \cdot 10^{-6}$	$5,829 \cdot 10^{-8}$
<b>Hu-7</b>	$2,668 \cdot 10^{-12}$	$8,336 \cdot 10^{-12}$	$-3,803 \cdot 10^{-15}$

Das Matching der Hu-Invarianten der drei Valvenkonturen (s. Tabelle 3) ergibt für den Vergleich von Kontur (a) mit (b) Werte kleiner als 0,03, für den Vergleich von Kontur (a) bzw. (b) mit (c) Werte größer als 0,8. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Datensätzen hat sich ein Wert kleiner als 0,25 als gutes Kriterium für die Ähnlichkeit der Hu-Invarianten von Kontur und Template erwiesen. Somit werden die Konturen (a) und (b) als ähnlich zueinander, aber unähnlich zu Kontur (c) beurteilt.

**Tabelle 3: Ergebnisse des Matchings (s. Formel (40)) der Hu-Invarianten (s. Tabelle 2) der drei Valvenkonturen aus Abbildung 27. Die Valven (a) und (b) ergeben miteinander ein gutes Matching, Valve (c) ist deutlich unterschiedlich.**

	Valvenkontur (a)	Valvenkontur (b)	Valvenkontur (c)
<b>Valvenkontur (a)</b>	0,0	0,0293	0,8370
<b>Valvenkontur (b)</b>	0,0293	0,0	0,8663
<b>Valvenkontur (c)</b>	0,8370	0,8663	0,0

### 3.5.2 Konvexität als Maß für die Segmentierungsqualität sowie die Form und Intaktheit von Valven

Der Umriss der Valven von *Fragilariopsis kerguelensis* ist, soweit bisher beschrieben, konvex geformt (s. Abbildung 6). Werden zu einer konvexen Kontur durch Segmentierungsfehler Strukturen hinzugefügt oder Anteile entfernt, resultiert daraus nahezu immer eine Kontur mit konkaven Anteilen (s. Abbildung 31 b, c). Auch beschädigte Valven von *Fragilariopsis kerguelensis* und Fremdkörper weisen meistens konkave Anteile auf (s. Abbildung 31 d). Daher kann bei Beschränkung auf diese und morphologisch ähnliche Diatomeenarten die Konturkonvexität als guter Indikator für die Segmentierungsqualität sowie die Form und Intaktheit der Valven herangezogen werden. Die hierfür eingesetzten Konvexitätsmaße beruhen auf dem Vergleich zwischen einer Kontur und der sie umschließenden konvexen Hülle [34] (s. Abbildung 29). Erst die Kombination von drei unterschiedlichen Konvexitätsmaßzahlen führt jedoch zu einer guten Erkennung von Segmentierungsfehlern und unpassenden bzw. beschädigten Valven, zwei dieser Maße sind Ergebnisse dieser Arbeit.

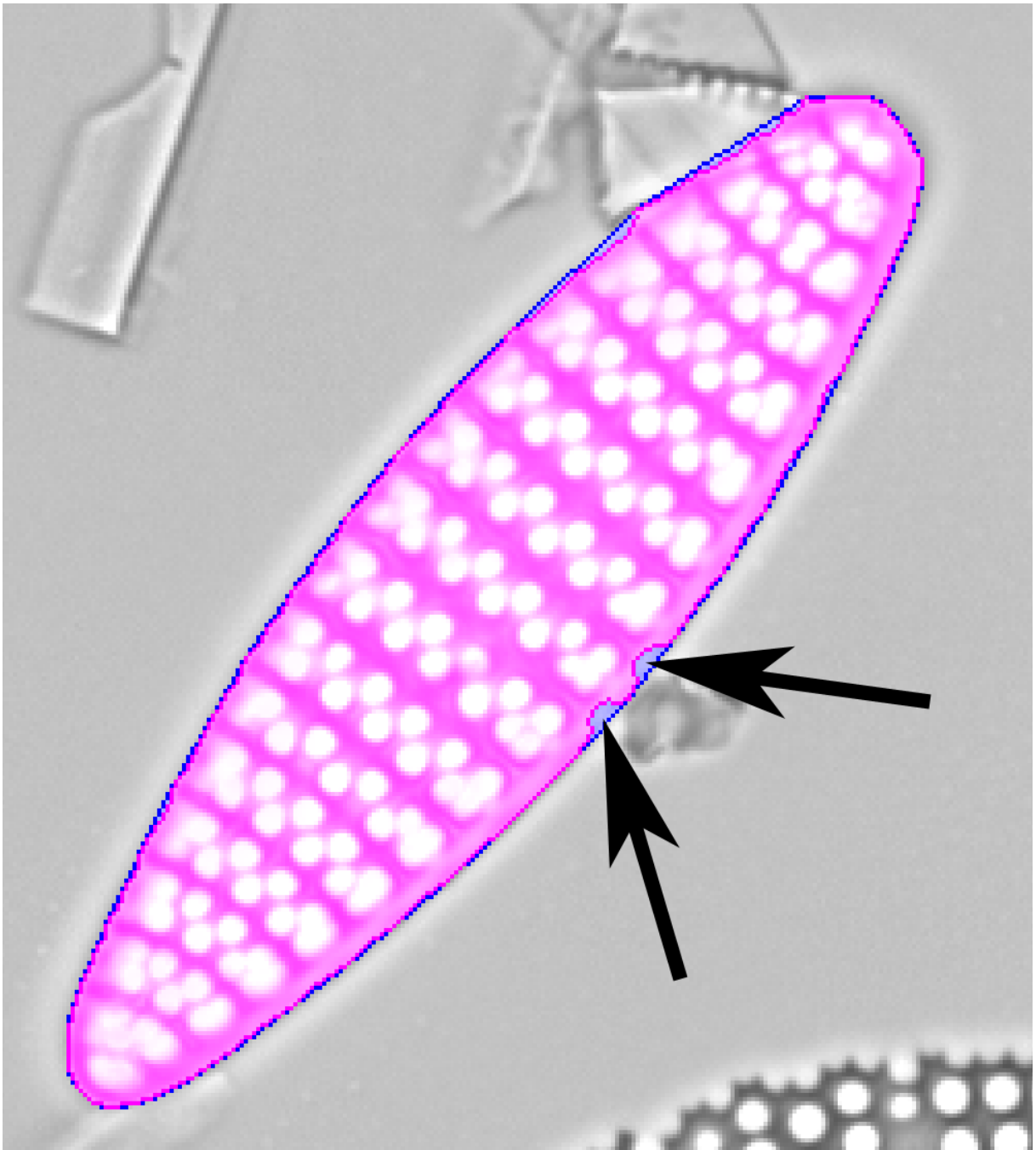


Abbildung 29: Typische Konvexitätsdefekte. Konturfläche lila, konvexe Hülle blau eingefärbt, die schwarzen Pfeile verdeutlichen die Position zweier größerer Konvexitätsdefekte in Form von Einbuchtungen der Konturfläche.

### 3.5.2.1 Convexity Defection Factor

Für die Bemessung von Unterschieden zwischen der Fläche bzw. dem Umfang einer Kontur und der sie umschließenden konvexen Hülle wurde eine neue Maßzahl namens „Convexity Defection Factor“ (CDF) entwickelt. Der CDF mittelt die prozentuale Abweichung von Fläche und Umfang nach:

$$CDF = 0,5 \cdot \left( \frac{A_H}{A_K} + \frac{P_K}{P_H} \right) \quad (41)$$

mit  $A_H$  = Fläche der konvexen Hülle;  $A_K$  = Fläche der Kontur;  $P_H$  = Umfang der konvexen Hülle;  $P_K$  = Umfang der Kontur

Für fehlerfrei konvexe Konturen liegt der CDF bei 1, während er bei zunehmenden Konvexitätsdefekten ansteigt. Der CDF eignet sich besonders gut, um Segmentierungsfehler und Valvenbeschädigungen zu identifizieren, die zu deutlichen Ein- oder Ausbuchtungen der Kontur führen.

### 3.5.2.2 Percent Concave Area Fraction

Die Maßzahl „Percent Concave Area Fraction“ (PCAF) [35] gibt Auskunft über das Verhältnis der Flächen von Kontur und konvexer Hülle und ist definiert als:

$$PCAF = 100 \cdot \frac{A_H - A_K}{A_K} \quad (42)$$

mit  $A_H$  = Fläche der konvexen Hülle;  $A_K$  = Fläche der Kontur

Für fehlerfrei konvexe Konturen liegt der PCAF bei 0, während er bei zunehmenden Konvexitätsdefekten ansteigt. Der PCAF ist als reines Flächenmaß relativ unempfindlich gegen Segmentierungsfehler, die hauptsächlich die Konturlänge beeinflussen, reagiert jedoch empfindlich auf Flächenunterschiede.

### 3.5.2.3 Convex Hull Maximum Distance Faktor

Ein weiteres, im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes, Konvexitätsmaß ist der „Convex Hull Maximum Distance Faktor“ (CHMDF). Dieser reagiert empfindlicher als CDF und PCAF auf starke lokale Konturstörungen, da die Größe des Defektes im Quadrat in die Berechnung eingeht; die Defektgröße wird über den maximalen Abstand zwischen Kontur und konvexer Hülle für jeden einzelnen Defekt ermittelt (s. Abbildung 30). Dabei kann schon die Verschiebung eines Konturpunktes um einen einzelnen Pixel eine auf längerer Strecke minimal verschobene Kontur zur Folge haben (s. Abbildung 29, blaue Randlinie). Dies hat eine Vielzahl von Konvexitätsdefekten zur Folge, die jedoch nicht zu starken lokalen Konturstörungen führen, daher werden für den CHMDF nur Distanzen größer als  $\sqrt{2}$  Pixel betrachtet:

$$CHMDF = \sum D_K^2 : \{\forall D_K > \sqrt{2}\} \quad (43)$$

mit  $D_K$  = größter Abstand zwischen Kontur und konvexer Hülle innerhalb jedes einzelnen Konvexitätsdefektes



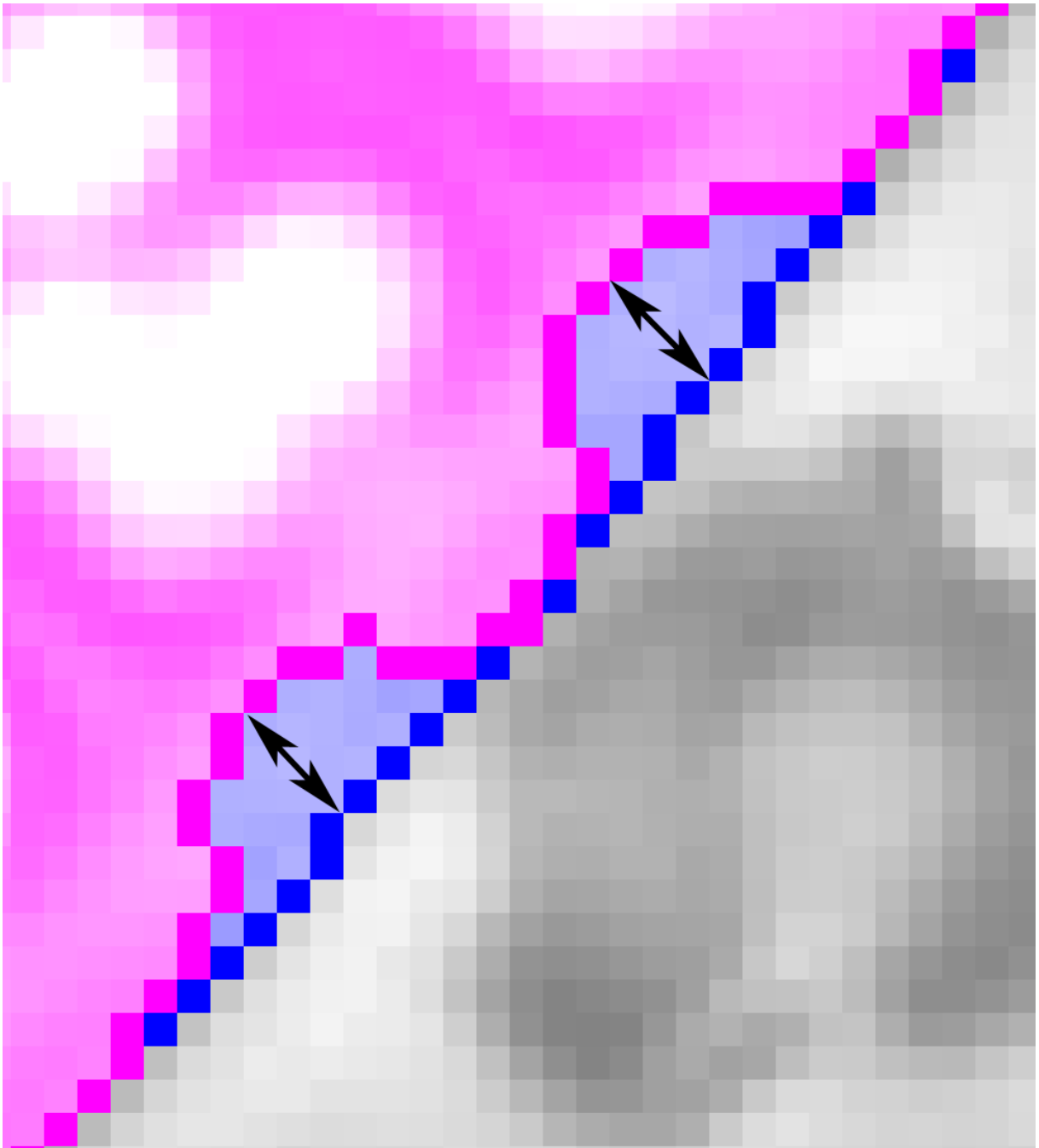


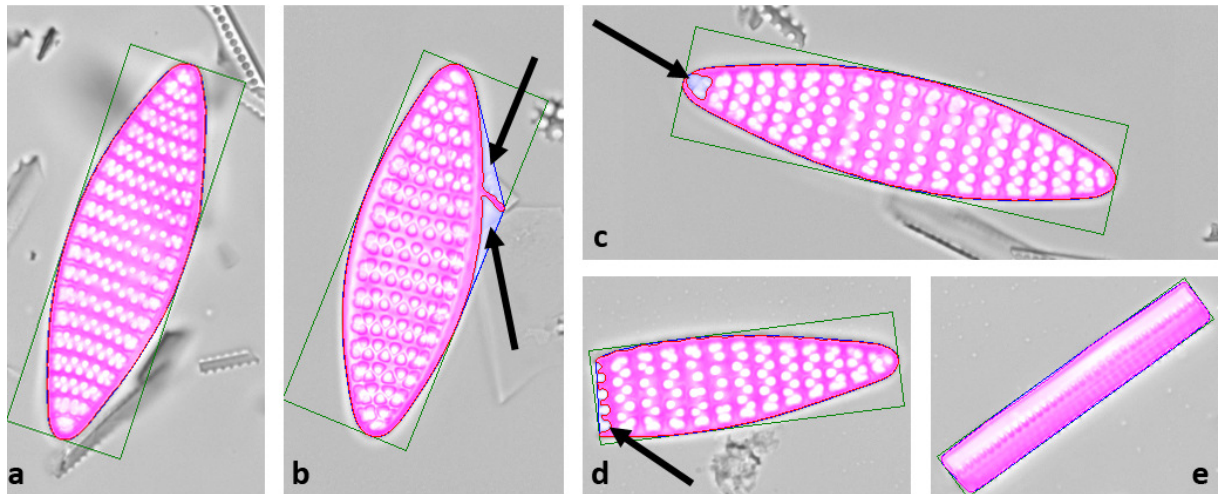
Abbildung 30: Verdeutlichung des größten Abstandes  $D_K$  (schwarze Doppelpfeile) zwischen konvexer Hülle (blau eingefärbt) und Kontur (lila eingefärbt), Ausschnitt aus Abbildung 29

Für fehlerfreie Konturen liegt der CHMDF bei 0, mit zunehmender Anzahl und Größe der Konvexitätsdefekte steigt er an. Gegenüber kleinen Konturdefekten zeigt er sich aufgrund der Nichtbeachtung kleiner Distanzen sehr robust, während der Wert aufgrund der Quadrierung der eingehenden Distanzen bei größeren Konturfehlern steil ansteigt. Für die in dieser Arbeit untersuchten Datensätze war als meistens aussagekräftiger als die beiden anderen Konvexitätsmaße und wird daher als wichtigster Qualitätsindikator für das Ranking (s. Kapitel 3.5.4) verwendet.

### 3.5.2.4 Beispiele von Konvexitätsdefekten

Wegen der großen Vielzahl möglicher Konvexitätsdefekte wird im Folgenden nur eine Auswahl beschrieben. Typische Konvexitätsdefekte beruhen auf Segmentierungsfehlern, Überlagerungen, beschädigten Valven oder Fremdkörpern (s. Abbildung 31). Das Verhalten der drei Konvexitätsmaße in Hinblick auf die hier exemplarisch vorgestellten Defekte wird in Tabelle 4 dargestellt: Größere Diffe-

renzen zwischen Kontur und konvexer Hülle führen zu einem starken, eindeutig erkennbaren Anstieg der Maße; kleinere Defekte, wie sie z.B. von Fremdkörpern mit nur geringen konkaven Anteilen verursacht werden, sind hingegen schwieriger zu erkennen.



**Abbildung 31:** Verdeutlichung typischer Konvexitätsdefekte (blau eingefärbt und mit schwarzen Pfeilen markiert). a) kein nennenswerter Defekt, b) durch Überlappung, c) durch Segmentierungsfehler, d) durch Beschädigung der Valve verursachter Konvexitätsdefekt, e) Fremdkörper. Die identifizierte Valvenfläche ist rot bzw. lila, die konvexe Hülle blau eingefärbt, das kleinste umhüllende Rechteck grün eingezeichnet. Tabelle 4 gibt die entsprechenden Konvexitätsmaße wieder.

Kontur (a) wurde fehlerfrei segmentiert und weist daher nur minimale konkave Defekte auf, alle drei Maße ergeben hier eine Klassifikation als ausreichend konvexe Kontur; die Grenzwerte für die Konvexitätskriterien beruhen auf den Erfahrungen mit den in dieser Arbeit untersuchten Datensätzen. Die fehlerhaft segmentierten Konturen (b) und (c) sowie diejenige der beschädigten Valve (d) erfüllen keines der Konvexitätskriterien. Deutlich erkennbar ist, dass der CHMDF bei konkaven Konturanteilen sehr steil ansteigt: Für die Valven (b) bis (d) liegen die Werte für den CDF nur knapp, die für den PCAF um bis zum ca. Dreifachen über den Grenzwerten, für den CHMDF ergeben sich jedoch bis zu ca. fünfunddreißigfach höhere Werte. Die Konvexitätsdefekte der Kontur des Fremdkörpers (e) sind so klein, dass der CHMDF nicht reagiert, sie wird jedoch durch die Kombination aller drei Konvexitätsmaße als nicht relevantes Objekt erkannt.

**Tabelle 4:** Verhalten der Konvexitätsmaße am Beispiel der Konturen aus Abbildung 31. Nur die fehlerfrei segmentierte konvexe Valvenkontur erfüllt alle drei Konvexitätskriterien, die konvexe Kontur des Fremdkörpers kann durch Kombination aller drei Konvexitätsmaße als nicht relevant klassifiziert werden.

Kontur aus Abbildung 31	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	Kriterium für ausreichende Konvexität
CDF	1,032	1,084	1,080	1,085	1,049	< 1,05
PCAF	1,19	5,93	2,76	4,04	4,22	< 2,00
CHMDF	0,00	697,98	593,00	135,73	8,03	< 20,00
Anzahl erfüllter Konvexitätskriterien	3	0	0	0	2	

### 3.5.3 Auswertung des Höhen-/Breitenverhältnisses

Für vollständige und in Aufsicht liegende Valven von *Fragilariopsis* kommen nur bestimmte Verhältnisse von Höhe und Breite in Betracht. Über die Auswahl eines geeigneten Intervalls kann ein Großteil der Trümmer, Blasen, Fremdkörper, kreisrunden Strukturen, zentrischen Diatomeen, Valven in

Gürtellage u.Ä. aussortiert werden, selbst wenn diese den Anforderungen an Konvexität und Matching-Güte entsprechen. Das Höhen-/Breitenverhältnis wird berechnet als:

$$R = \frac{\max(h, b)}{\min(h, b)} \quad (44)$$

mit  $R$  = Höhen-/Breitenverhältnis;  $h$  = Höhe,  $b$  = Breite des kleinsten die Kontur umhüllenden Rechtecks

Das kleinste umhüllende Rechteck liegt aufgrund von Konturdefekten nicht immer orthogonal zu den Valvenachsen. Der hieraus resultierende Fehler kann jedoch für Valven mit geringen Konturdefekten, welche die Konvexitätskriterien erfüllen, vernachlässigt werden. Größere Konturdefekte führen zu einer Klassifizierung als nicht relevantes Objekt, eine fehlerhafte Berechnung des Höhen-/Breitenverhältnisses bleibt dann ohne Konsequenzen.

### 3.5.4 Ranking

Die Ergebnisse der Konturanalyse werden nach folgenden Kriterien in der angegebenen Reihenfolge einem Ranking unterzogen, d.h. sie werden bewertet und sortiert:

1. Anzahl der erfüllten Qualitätsindikatoren (je mehr Indikatoren erfüllt werden, desto höher ist das Ranking)
2. Größe des CHMDF (je kleiner der Wert, desto höher das Ranking)
3. Bestmögliches Matching der Hu-Invarianten mit allen Templates (je kleiner der Wert, desto höher das Ranking)

Besonders bei eingeschränkten Vergleichsdaten oder neuen Datensätzen kommt es vor, dass eine korrekt segmentierte konvexe Valvenkontur gefunden wurde, zu der noch kein passendes Template vorliegt. Hieraus resultieren vier erfüllte Qualitätsindikatoren, weil das Kriterium für das Matching der Hu-Invarianten nicht erfüllt wird. Die Nichterfüllung dieses Kriteriums führt jedoch nicht zum Aussortieren während der Konturvalidierung, sondern das Matching gilt nach dem CHMDF als zweitwichtigstes Kriterium der Qualitätsindikatoren. Auf diese Weise erscheinen in der Ergebnisliste der Konturanalyse direkt unterhalb der eindeutig identifizierten Valven (fünf erfüllte Qualitätskriterien) die unbekannt, aber als korrekt segmentierte und konkav geformte Valven klassifizierten Ergebnisse (vier erfüllte Qualitätskriterien). Diese lassen sich mit geringem Aufwand in Templatedaten für zukünftige Analysedurchgänge umwandeln, eine entsprechende Funktion ist in der in dieser Arbeit entwickelten Software enthalten.

### 3.5.5 Verworfenen Indikatoren

Im Laufe der Entwicklung wurden weitere Indikatoren zur Beurteilung der Segmentierungsqualität untersucht, mangels Aussagekraft für die vorliegende Problemstellung jedoch verworfen.

#### 3.5.5.1 Roundness Factor

Für einen Kreis gilt:

$$U^2 = 4\pi A \quad (45)$$

mit  $U$  = Umfang;  $A$  = Fläche des Kreises

Der „Roundness Factor“ setzt Fläche und Umfang einer Kontur in Relation und gibt somit einen Vergleichswert zur „Rundheit“ eines Kreises, der bei zunehmender Irregularität der Kontur abnimmt [35, p. 3]:

$$\text{Roundness Factor} = 4\pi \frac{A}{U^2} \quad (46)$$

mit  $A$ = Fläche,  $U$ = Umfang der Kontur

### 3.5.5.2 Fraktale Dimension der Konturlinie

(Vgl. [35, p. 4f.]) Die fraktale Dimension einer zweidimensionalen Kurve ergibt sich nicht direkt aus der Elliptizität oder Konvexität, sondern wird auf Grundlage ihrer Länge und Flächenausdehnung ermittelt:

$$D = \frac{\log(L)}{\log(d)} \quad (47)$$

mit  $D$ = fraktale Dimension,  $L$ = Länge,  $d$ = Durchmesser der Fläche

Für eine Kontur mit diskreten Eckpunkten ergibt sich:

$$D = \frac{\log(n)}{\log(n) + \log(d/L)} \quad (48)$$

mit  $D$ = fraktale Dimension,  $L$ = Länge,  $d$ = Durchmesser der Fläche,  $n$ =Anzahl der Kurvensegmente

## 3.6 Software „DiatomorphoTo“

Das „Diatomeen Morphometrie Tool“ (DiatomorphoTo) bildet die für die Auswertung von Massenscreenings notwendigen Funktionen in einer einfach bedienbaren Benutzeroberfläche ab. Die Software wurde in C# mit Hilfe des Microsoft Visual Studio 2010 für .NET 3.5 entwickelt, als Zielplattform kam Windows7/64Bit zum Einsatz.

### 3.6.1 Libraries

Für die Bildverarbeitung wurden weitgehend etablierte Standardverfahren eingesetzt, daher konnte auf eine Reihe schon existierender Bibliotheken zurückgegriffen werden. Die Auswahl erfolgte nach den Gesichtspunkten freie Verfügbarkeit, weitreichende Verbreitung und Nutzung auch im wissenschaftlichen Bereich, wobei Aktualität und kontinuierliche Weiterentwicklung als besonders wichtig erachtet wurden. Die Verwendung von C#/.NET und die damit einhergehende Beschränkung auf „Managed Code“ machte hierbei die Verwendung entsprechender DLL-Wrapper bzw. die Einbindung als externes, über die Kommandozeile aufgerufenes Programm (Executable) erforderlich.

#### 3.6.1.1 OpenCV

Die im Jahr 1999 initiierte und seitdem stetig weiterentwickelte Bibliothek „OpenCV“ [36] bietet eine Vielzahl von Funktionen für verschiedene Bereiche des maschinellen Sehens, wie Bildverarbeitung, Stereoskopie und maschinelles Lernen. Ursprünglich von Intel mit breiter Unterstützung international renommierter Forscher entwickelt, werden Pflege und Weiterentwicklung der Bibliothek mittlerweile durch die Firma „Willow Garage“ geleistet bzw. koordiniert. Aufgrund ihrer hohen Verarbeitungsgeschwindigkeit, guter Robustheit und kontinuierlicher Weiterentwicklung ist OpenCV als Standard-Bibliothek für Bildverarbeitung und maschinelles Sehen etabliert; die BSD-Lizenz erlaubt die kostenlose Nutzung auch für kommerzielle und Closed-Source-Projekte. Die Verbreitung von OpenCV wird durch über sechs Millionen Downloads und eine mehr als 47.000 Mitglieder umfassende Entwicklergemeinschaft belegt [36] (Stand April 2013). Bekanntere Nutzer rekrutieren sich z.B. aus den Reihen von Firmen wie IBM, Microsoft, Intel, SONY, Siemens und Google, sowie Forschungseinrichtungen wie der Stanford University, dem Massachusetts Institute of Technology, der Carnegie Mellon University, der University of Cambridge und dem National Institute for Research in Computer Science and Control [23, p. 2].

OpenCV wurde in C/C++ entwickelt und ist plattformübergreifend für Microsoft Windows, Linux und andere Unix-Derivate, Android und Apple iOS verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem Funktionen für die Filterung und Segmentierung von Bilddaten sowie die Ermittlung und Bewertung von Konturen verwendet, somit konnte auf eine Eigenentwicklung großer Teile der für DiatoMorphoTo benötigten Funktionalität verzichtet werden. Da die OpenCV-DLLs auf „Unmanaged Code“ beruhen, wird für ihre Verwendung in C# ein Wrapper für „Managed Code“ benötigt. Hierfür stehen mehrere Lösungen zur Verfügung, die Wahl fiel aufgrund der weiten Verbreitung und Aktualität auf EmguCV.

### 3.6.1.2 EmguCV

Mit EmguCV [37] steht ein leistungsfähiger .NET-Wrapper für OpenCV zur Verfügung, der kontinuierlich weiterentwickelt wird und unter der „GNU GPL Version 3“ frei verfügbar ist. Diese Lizenz setzt zwingend eine Verbreitung auch des eigenen Codes unter der GNU GPL als Open-Source voraus, sie ist somit nicht mit Closed-Source-Projekten vereinbar. Für den kommerziellen Einsatz ohne zwangsweise Veröffentlichung des eigenen Codes wird gegen Bezahlung eine gesonderte Lizenz angeboten. EmguCV bietet nicht nur reines Wrapping von OpenCV-Funktionen und Datenstrukturen, sondern setzt eine Vielzahl dieser Strukturen nativ in „Managed Code“ um, so dass diese mit allen Vorteilen der .NET-Funktionalität wie Garbage Collection, Typsicherheit, Überlaufprüfung und XML-Serialisierung verwendet werden können. Da EmguCV komplett in C# entwickelt wurde, kann es neben Windows, unter Verwendung von Mono [38], auch unter Linux, Mac OS X, iOS und Android für die Cross-Plattform-Entwicklung eingesetzt werden.

### 3.6.1.3 ITK

Das „Insight Segmentation and Registration Toolkit“ (ITK) [39] ist eine Open-Source C++-Bibliothek mit Funktionen für die Bildsegmentierung und –registrierung, wobei der Schwerpunkt im Bereich der medizinischen Bildverarbeitung liegt. ITK wird unter der Apache-Lizenz Version 2.0 angeboten. Diese erlaubt die Verwendung in eigenen Projekten, ohne dass der selbst entwickelte Code ebenfalls unter die Apache-Lizenz fallen oder veröffentlicht werden muss. Ebenso wie OpenCV und EmguCV kann ITK für die Cross-Plattform-Entwicklung verwendet werden. Entwickelt wurde ITK vom Insight Software Consortium, bestehend aus Kitware, Inc., GE Corporate R&D, Mathsoft, der University of North Carolina, der University of Tennessee und der University of Pennsylvania. Aufgrund seiner weiten Verbreitung und des großen Funktionsumfangs darf ITK als Standard-Library für die medizinische Bildverarbeitung angesehen werden.

Seit kurzem steht mit „SimpleITK“ ein direkt vom ITK Software Consortium entwickelter C#-Wrapper zur Verfügung, der einen vereinfachten Zugang zu vielen ITK-Funktionen realisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die Segmentierung mittels RATS über ITK realisiert, diese ist allerdings nicht im SimpleITK implementiert. Daher wurde auf die Einbindung eines externen Executables zurückgegriffen. Die Integration von RATS in SimpleITK ist jedoch angekündigt, so dass dieser Umweg in Zukunft vermutlich nicht mehr notwendig sein wird.

## 3.6.2 Architektur und Funktionen

DiatoMorphoTo wurde objektorientiert entwickelt und verwendet eine Reihe von Klassen zur Realisierung der unterschiedlichen Funktionen. Die verwendeten Datenstrukturen sind größtenteils gekapselt, die Verwaltung globaler Konfigurationsdaten und Parameter für die Bildsegmentierung und Konturanalyse erfolgt der Einfachheit halber statisch. Die zentralen Datenstrukturen werden in Form dreier generischer Listen für Template-, Bild,- und Konturdaten verwaltet, aus denen drei ent-

sprechende, ungebundene DataGridViews für die Anzeige dieser Daten gefüllt werden. Die Nutzeroberfläche wurde auf Basis von Windows-Forms realisiert.

### 3.6.2.1 Haupt-Benutzeroberfläche, Klasse „MainGui“

Die Klasse „MainGui“ bildet die Haupt-Benutzeroberfläche von DiatoMorphoTo inkl. der zentralen Datenstrukturen und der Logik für den Programmablauf ab. Neben den visuell im Designer zusammengestellten Elementen werden hier die drei ungebundenen DataGridViews für die Anzeige von Template-, Bild- und Konturdaten definiert. Diese werden innerhalb dreier Tabs angezeigt, wobei das Tab für die Konturdaten auch die Eingabefelder für die Parameter der Konturanalyse enthält. Eine Reihe von Menüpunkten stellt für die Tabs spezifische sowie einige globale Funktionen zur Verfügung.

### 3.6.2.2 Anzeige von Bilddaten

Die vier Klassen „ShowBase“, „ShowTemplate“, „ShowImage“ und „ShowContour“ dienen der Anzeige von Bilddaten sowie damit zusammenhängenden Funktionen und Parametern.

Die Klasse „ShowBase“ dient als Basisklasse für die Bildanzeige und realisiert Funktionen zum Anzeigen, Zoomen, Scrollen und Speichern von Bilddaten, außerdem bietet sie eine automatische Anpassung der Fenstergröße an die dargestellten Bilddaten. Für die Darstellung werden die von EmguCV zur Verfügung gestellte Klassen „Image<TColor, TDepth>“ und die der .NET-PictureBox entsprechende „ImageBox“ verwendet. Die Ableitungen von „ShowBase“ sind über „Visual Inheritance“ im Designer von Visual Studio realisiert.

Die Klasse „ShowTemplate“ erweitert „ShowBase“ um eine Funktion zur automatischen Positionierung des Fensters für den Fall, dass sie nicht direkt von MainGui, sondern von ShowContour (s.u.) aufgerufen wird.

Die Klasse „ShowImage“ erweitert „ShowBase“ um Möglichkeiten zum Aufrufen der Dialoge für die Einstellung, Ausführung und Darstellung von Schritten der Bildverarbeitungspipeline (s. Kapitel 3.6.2.3).

Die Klasse „ShowContour“ erweitert „ShowBase“ um die Anzeige von Konturen, den dazugehörigen konvexen Hüllen und den kleinsten umschließenden Rechtecken. Darüber hinaus bietet sie Funktionen zum Durchblättern die Ergebnisliste der Konturanalyse, zum Selektieren von Konturen für den Export und den Aufruf von „ContourEdit“ zum manuellen Nachbearbeiten von Konturen.

### 3.6.2.3 Parameter für die Segmentierungsverfahren

Die sechs Klassen „SettingsBase“, „SettingsOtsuThresholding“, „SettingsHistogramEqualization“, „SettingsRats“, „SettingsCannyEdge“ und „SettingsAdaptiveThresholding“ bieten eine Vorschau auf Zwischenergebnisse der Bildverarbeitungspipeline. Für jedes der Segmentierungsverfahren kann ein einzelner Satz von Parametern für Rauschreduktion, Segmentierung und morphologisches Closing eingestellt werden. Diese Parameter werden in der Klasse „Config“ (s. Kapitel 3.6.2.5) gespeichert und kommen auch bei der Ausführung der Bildverarbeitungspipeline für die Objektklassifikation zur Anwendung. Aufgerufen werden die sechs Klassen von der Klasse „ShowImage“, welche die Anzeige der zu untersuchenden Bilddaten realisiert.

Die Klasse „SettingsBase“ dient als Basisklasse für die Dialoge der Segmentierungsmethoden. Sie verwaltet die Parameter für die Verminderung des Rauschanteils in der Bildvorverarbeitung sowie das morphologische Closing in der Bildnachbearbeitung und stellt Funktionen für die Anzeige der Zwischenergebnisse der Bildverarbeitungspipeline zur Verfügung. Für die Reduzierung des Bildraus-

schens kann ein Gauß- oder Medianfilter mit entsprechendem Durchmesser gewählt werden. Für das morphologische Closing kann die Größe des strukturierenden Elements sowie die Anzahl der Iterationen eingestellt werden, außerdem kann die Verwendung des Closings aktiviert bzw. deaktiviert werden. Eine Funktion zur automatischen Positionierung verschiebt das Fenster wenn möglich an den rechten Rand des aufrufenden „ShowImage“-Forms. Die eigentliche Segmentierung wird durch abgeleitete Klassen realisiert, welche entsprechende virtuelle Methoden überschreiben.

Die Klasse „SettingsOtsu“ verwaltet die Einstellungen für die Segmentierung mittels Otsu’s Thresholding. Da für die eigentliche Segmentierung keine Einstellungen notwendig sind, entfallen über Rauschreduzierung und morphologisches Closing hinausgehende Eingabefelder.

Die gleichen Funktionen wie „SettingsOtsu“ bietet die Klasse „SettingsHistogramEqualization“ für die Segmentierung auf Basis des Histogrammausgleichs und darauf folgendem Otsu’s Thresholding. Auch hier entfallen weitere Eingabefelder.

Der Dialog zur Einstellung der Parameter des Robust Automatic Threshold Selectors wird durch die Klasse „SettingsRATS“ realisiert. Für die eigentliche Segmentierung werden die Größe des Gradientenfilters und der Exponent, mit dem die Gradientenmagnitude in die Schwellwertberechnung eingeht, abgefragt.

Die Klasse „SettingsCannyEdge“ dient der Konfiguration der Parameter für den Canny Edge Detector. Hierbei lassen sich die Schwellwerte für starke und schwache Kanten sowie der Durchmesser des Gradientenfilters einstellen.

Den Dialog zur Einstellung der Segmentierung mittels Adaptive Thresholding bildet die Klasse „SettingsAdaptiveThresholding“ ab. Der Parameter „Blocksize“ gibt den Durchmesser des Bereichs an, der für die Schwellwertbildung auf seine lokalen Intensitäten untersucht werden soll.

#### **3.6.2.4 Manuelles Nachbearbeiten von Konturdaten, Klasse „EditContour“**

Die Klasse „EditContour“ bietet einige einfache Funktionen zur manuellen Nachbearbeitung von fehlerhaft segmentierten Konturen, hierdurch kann die Ausbeute an brauchbaren Ergebnissen gesteigert werden. Nach der Bearbeitung werden die Konturdaten in der Haupt-Benutzeroberfläche aktualisiert, so dass eine ursprünglich als ungeeignet bewertete Kontur dank manuell korrigierter Segmentierung ein hohes Ranking erhalten und damit erfolgreich ausgewertet werden kann.

#### **3.6.2.5 Verwalten von Konfigurationsparametern, Klasse „Config“**

Sämtliche einstellbaren Parameter z.B. für die Segmentierungsverfahren, Arbeitsverzeichnisse, Qualitätsindikatoren etc. werden über die statisch deklarierte Klasse „Config“ verwaltet. Die aktuellen Einstellungen werden hierfür via XML serialisiert und in der Datei „DiatoMorphoTo\config.ini“ im zum aktuellen Nutzer gehörenden Verzeichnis für lokale Applikationsdaten gespeichert, also z.B. in der Datei „C:\Users\User\AppData\Local\DiatoMorphoTo\config.ini“. Existiert diese Datei nicht oder enthält sie keine gültigen Daten für einzelne Parameter, werden diese mit in der Klasse definierten Vorgaben initialisiert.

#### **3.6.2.6 Verarbeitung zentraler Datenstrukturen, Klasse „Datahandling“**

In der statischen Klasse „Datahandling“ werden Funktionen für das Füllen und Auswerten der Datenstrukturen von Template-, Bild- und Konturdaten zur Verfügung gestellt. Diese werden in generischen Listen verwaltet („templateDataList“, „imageDataList“, „contourDataList“), die in der Klasse „MainGui“ definiert werden, wie auch die entsprechenden DataGridViews („dataGridViewTemplateData“, „dataGridViewImageData“, „dataGridViewContourData“). Die Klasse „Datahandling“ arbei-

tet mit Referenzen auf diese Datenstrukturen. Die Elemente der generischen Listen werden in der Datei „DataListItems.cs“ (s. Kapitel 3.6.2.7) definiert.

Die o.g. generischen Datenlisten werden durch die Methoden „populateTemplateDataList()“, „populateImageDataList()“ und „populateContourDataList()“ mit Inhalten gefüllt und dienen als Grundlage für die Inhalte der entsprechenden DataGridViews, welche über die Methoden „populateTemplateDataGridView()“, „populateImageDataGridView()“ und „populateContourDataGridView()“ befüllt werden.

Beim Füllen der Konturdatenliste durch die Funktion „populateContourDataList()“ wird nach erfolgter Segmentierung und Konturermittlung eine Ergebnisvalidierung vorgenommen, d.h. es gelangen nur Konturen in diese Liste, welche die Kriterien in Hinblick auf Fläche, Umfang und Abstand zum Bildrand bzw. zentrale Region of Interest erfüllen (s. Kapitel 3.4.2). Intern im OpenCV werden die ermittelten Konturen in verketteten Listen verwaltet, aus denen sich nicht ohne weiteres die Einträge für nicht validen Konturen löschen lassen. Hierfür musste eine Hilfskonstruktion entwickelt werden, welche in Kapitel 3.6.4.5 erläutert wird.

Während des Füllens des DataGridViews für die Konturdaten durch die Methode „populateContourDataGridView ()“ werden die Qualitätsindikatoren ermittelt. Diese beruhen auf dem Matching der Hu-Invarianten, den verschiedenen Konvexitäts-Maßen (s. Kapitel 3.5) und dem Breiten-/Höhenverhältnis der Konturen und dienen zur Ermittlung des Rankings. Die Beurteilung von Konturdoubletten (s. Kapitel 3.6.4.4) basiert auf dem Ranking, daher werden die Doubletten erst nach dem Füllen des DataGridViews durch Löschen der entsprechenden Zeilen mit der Methode „deleteContourDoublettesFromDataGridView()“ entfernt.

Auch die Funktionen für den Export von Konturdaten zur späteren Weiterverarbeitung mit externen Programmen sind Bestandteil der Klasse „DataHandling“. Darüber hinaus wird eine Reihe von Methoden z.B. für die Validierung gültiger Texteingaben oder die Generierung temporärer Dateinamen für den externen Aufruf der RATS-Segmentierung (s. Kapitel 3.6.4.3) zur Verfügung gestellt.

### **3.6.2.7 Definition zentraler Datenstrukturen, Datei „DataListItems.cs“**

Die Datei „DataListItems.cs“ beinhaltet eine Reihe von Klassen für die Definition und Verwaltung der Datenstrukturen für Templates, Bild- und Konturdaten, welche die Elemente der in Kapitel 3.6.2.6 aufgeführten generischen Listen stellen. Diese Klassen sind z.T. voneinander abgeleitet und wurden der Übersichtlichkeit halber in einer einzelnen Datei zusammengefasst. Die Klasse „baseDataItem“ bildet die grundlegende Struktur für die Verwaltung von Bilddateien ab und wird direkt als Klasse „imageDataItem“ abgeleitet. Diese wird für die Verwaltung grundlegender Konturdaten wie Fläche, Umfang, Breite und Höhe zu „templateDataItem“ erweitert. Hiervon wiederum leitet sich die deutlich erweiterte Klasse „contourDataItem“ ab, welche über die Methode „CalculateCharacteristics()“ zusätzlich die für die Berechnung der Qualitätsindikatoren (s. Kapitel 3.5) notwendigen Daten ermittelt.

### **3.6.2.8 Funktionen zum Laden von Dateien, Klasse „FileSelector“**

Die Klasse „FileSelector“ bietet Funktionen zum Laden einzelner Dateien, kompletter Verzeichnisse und kompletter Verzeichnisbäume inkl. Unterverzeichnisse, wobei auch Wildcards für Dateinamen verwendet werden können. Auf diese Weise können Templates und Bilder in beliebigen Verzeichnisstrukturen organisiert werden, um auch Teilauswertungen zu ermöglichen.



### 3.6.2.9 Bildsegmentierung, Klasse „Segmentation“

In der statisch deklarierten Klasse „Segmentation“ wird ein Großteil der eigentlichen Bildverarbeitungs-pipeline mit den Schritten Rauschminderung, Segmentierung, optionalem morphologischem Closing und Konturermittlung abgebildet. Die Methode „getContours()“ führt die einzelnen Schritte für je eine Bilddatei und ein Segmentierungsverfahren mit seinen jeweils in „Config“ gespeicherten Parametern durch. Sie wird von „populateContourDataList()“ entsprechend der Einträge in „imageDataList“ und der ausgewählten Segmentierungsverfahren mehrfach aufgerufen (s. Kapitel 3.6.2.6). Die Segmentierung mittels des Robust Automated Threshold Selectors wurde über eine auf ITK beruhende externe EXE-Datei realisiert (s. Kapitel 3.6.4.3).

### 3.6.3 Funktionalität von DiatoMorphoTo

Eine ausführliche Anleitung für den Gebrauch des Diatomeen Morphometrie Tools findet sich im Anhang in Kapitel 8.1, daher wird im Folgenden nur auf die grundlegenden Konzepte eingegangen. Die Bedienoberfläche gliedert sich in drei Teile für die Verwaltung von Templates, Bilddaten und Konturanalyse:

- Der Bereich „Templates“ ermöglicht das Laden und Betrachten der Templates, die während der Konturanalyse für die Klassifikation der Valvenumrisse verwendet werden.
- Im Bereich „Images“ können, analog zu den Funktionen für Templates, Bilddaten geladen und betrachtet werden. Darüber hinaus lassen sich während der Betrachtung die Parameter der Segmentierungsverfahren einstellen und testen, wobei Zwischenergebnisse der Bildverarbeitungs-pipeline dargestellt werden können. Die hier gemachten Einstellungen werden auch für die Segmentierung während der späteren Konturanalyse verwendet.
- Die Konturanalyse wird im Bereich „Contours“ durchgeführt. Hier werden die Parameter für die Validierung und Klassifikation von Konturen verwaltet, die zu verwendenden Segmentierungs-verfahren ausgewählt und die Ergebnisse der Analyse bewertet und angezeigt. Die ermittelten Konturen können eingehender untersucht, bei Bedarf manuell nachbearbeitet und exportiert werden. Zu exportierende Konturdaten werden zuerst interaktiv selektiert und dann in Form von CSV-Dateien mit allen wichtigen Konturdaten inkl. Punktkoordinaten und auf den Bereich der jeweiligen Valve zugeschnittenen Bilddaten abgespeichert.

### 3.6.4 Wichtige interne Funktionsweisen

Im Laufe der Entwicklung erforderten einige Probleme und Funktionen besondere Aufmerksamkeit, die wichtigsten werden im Folgenden vorgestellt.

#### 3.6.4.1 CvInvoke Exception

Auf einigen Rechnern traten Probleme im Zusammenhang mit EmguCV auf. Diese äußerten sich durch Werfen einer „EmguCV.CV.CvInvoke“-Exception beim Aufruf von OpenCV-Funktionen, z.B. nach dem Laden von Templates oder beim Anzeigen von Bildern. Hierfür wurden zwei Gründe identifiziert: Zum einen fehlen auf Rechnern, auf denen kein Visual Studio 2010 installiert ist, u.U. einige Libraries. Diese können in Form des „Microsoft Visual C++ 2010 Redistributable Package“ nachinstalliert werden, siehe [40]. Zum anderen scheint die Integration von CUDA in die aktuelle Version 2.4.2 des EmguCV fehlerhaft zu sein. Hier wird die Library „nvcuda.dll“ referenziert, auch wenn keine CUDA-fähige nVidia-Grafikkarte verfügbar ist. Auf Rechnern ohne nVidia-GPU muß daher die Datei „nvcuda.dll“ in das Verzeichnis von DiatoMorphoTo kopiert werden. Auf Rechnern mit CUDA-fähiger GPU ist dies nicht notwendig und wird auch nicht empfohlen, da dieses Vorgehen Konflikte mit anderen CUDA-Versionen auslösen könnte. Das Problem wurde im EmguCV-Nutzerforum gemeldet und wird hoffentlich in der nächsten EmguCV-Version behoben sein.

#### 3.6.4.2 Referenzierung von „opencv\_highgui.dll“

Obwohl in dieser Arbeit keine der OpenCV-eigenen GUI-Funktionen („HighGUI“) verwendet werden, ist das Hinzufügen der DLL „opencv\_highgui.dll“ zum Projekt notwendig. Die mit dem Metafer-System erzeugten TIFF-Dateien (8Bit Graustufen) werden unter .NET falsch dargestellt unter Verwendung einer Lookup-Table, die nur jeden 17. Graustufenwert anzeigt. Da dasselbe Verhalten auch beim Laden als Fensterhintergrund im Designer vom Visual Studio 2010 auftritt, wird ein Fehler in der entsprechenden .NET-Library vermutet, andere Programme wie die Windows-Fotoanzeige stellen die Bilddateien fehlerfrei dar. Nach Hinzufügen von „opencv\_highgui.dll“ trat dieser Fehler innerhalb von DiatoMorphoTo nicht mehr auf. Es wird daher vermutet, dass EmguCV bei Verfügbarkeit OpenCV-eigene Funktionen, andernfalls die Standard-Routinen aus .NET für die Verarbeitung von TIFF-Dateien verwendet. Das Problem wurde dem EmguCV-Entwicklerforum gemeldet und zur Diskussion gestellt.

#### 3.6.4.3 RATS.EXE

Da OpenCV keine Implementierung für den Robust Automated Threshold Selector anbietet, wurde auf eine Implementierung mittels des Insight Segmentation and Registration Toolkits (ITK) zurückgegriffen, die auf [27] basiert. Um den Aufwand für die Entwicklung eines eigenen C#-Wrappers zu vermeiden, wurde eine Umsetzung als externes Programm („Executable“) realisiert, welches über die Kommandozeile aufgerufen wird. Die Breite des für die Berechnung der Gradientenmagnituden verwendeten Filters wird über den Parameter „Sigma“ angegeben, der Parameter „Pow“ gibt den Exponenten an, mit dem die Gradientenmagnitude in die Schwellwertberechnung eingeht.

#### 3.6.4.4 Konturdoubling erkennen

Durch die kombinierte Anwendung mehrerer Segmentierungsmethoden werden Valven mehrfach detektiert, daher müssen Doubletten erkannt, bewertet und beseitigt werden. Eine Kontur wird als Doublette erkannt, wenn ihr Zentrum innerhalb einer anderen Kontur liegt. Als Parameter für die Bewertung, welche der Konturen die geeignetste ist, wird das Ranking entsprechend der Anzahl der erfüllten Qualitätsindikatoren, des Wertes des CHMDF und des Matchings der Hu-Invarianten ermittelt (siehe Kapitel 3.5.4). Die Kontur mit dem besten Ranking wird übernommen, die anderen Kontur-Doubletten werden gelöscht.

#### 3.6.4.5 Löschen nicht valider Konturdaten

Durch Übersegmentierung und Segmentierungsfehler wird eine Vielzahl nicht valider Konturen (s. Kapitel 3.4.2) ermittelt, welche größere Mengen Hauptspeicher belegen und daher entfernt werden müssen. In Testläufen mit einigen hundert Bildern ergab sich hierdurch eine Reduzierung des Speicherverbrauchs von über 6 GB auf etwa 300 MB. Jedoch können keine Teilergebnisse der Konturanalyse eines Bildes gelöscht werden, da sie nicht in gemanagten Strukturen verwaltet werden, sondern in Form einer internen verketteten Liste, welche direkt von OpenCV erzeugt wird. Funktionen zum Löschen einzelner Einträge aus dieser Liste stehen unter EmguCV nicht zur Verfügung, der Garbage Collector bereinigt nur die komplette Liste mit sämtlichen Daten aller Konturen eines Bildes. Es wurde daher eine alternative Herangehensweise entwickelt, die einzelne Einträge aus der verketteten Liste kopiert und aus den duplizierten Einträgen eine neue Liste aufbaut. Dies war jedoch mit einer Reihe von Stolpersteinen verbunden:

- Es existiert kein parameterloser Konstruktor zum Erzeugen einer leeren Konturenliste („Contour<Point>()“), es muss daher, im Gegensatz zur Erzeugung einer gefüllten Liste über die Methode „findContours()“, ein „MemStorage“ für die Speicherung der Konturdaten angegeben werden.

- Es existiert keine Funktion in EmguCV, um aus der internen verketteten Liste einzelne Einträge zu klonen. Daher wird der Eintrag in der leeren Konturliste punktweise mit den Koordinaten der zu kopierenden Kontur gefüllt.
- Der auf diesem Weg erzeugten Kontur fehlen Werte für eine Reihe von Eigenschaften wie z.B. Umfang, Fläche und konvexe Hülle, da diese durch das OpenCV während des Extraktionsprozesses über die Methode „FindContours()“, jedoch nicht beim Hinzufügen einzelner Konturpunkte generiert werden. Hier wurde ein Umweg über die Methode „ApproxPoly()“ gewählt, welche eine Kontur über eine polygonale Kurve annähert. Wird dabei als Parameter für die Genauigkeit der Approximation der Wert 0 übergeben, entspricht das Polygon exakt der zugrundeliegenden Kontur. Während der Berechnung dieses Polygons werden die fehlenden Konturparameter ermittelt und die Datenstruktur wird mit validen Werten gefüllt.
- Die so ermittelte Kontur liegt nun in einer aus einem einzelnen Element bestehenden Konturliste ohne Verkettung mit weiteren Konturen und belegt somit nur den minimal notwendigen Speicherplatz. Die ursprüngliche Datenstruktur mit der verketteten Liste aller in einem Bild gefundenen Konturen wird, nachdem sie abgearbeitet wurde, gelöscht und ihr Speicher vom Garbage Collector freigegeben.

#### 3.6.4.6 Bildverarbeitungspipeline

Die Bildverarbeitungspipeline wird von der Methode „DataHandling.populateContourDataList()“ für jede der zu analysierenden Bilddateien für jedes der anzuwendenden Segmentierungsverfahren in einem „BackgroundWorker“-Prozess gestartet. Segmentierung und Konturermittlung finden in der Methode „Segmentation.getContours()“ statt. Hier werden die Methoden für die jeweiligen Segmentierungsverfahren („Segmentation.doOtsuThresholding()“, „Segmentation.doCannyEdge()“, „Segmentation.doRATS()“ etc.) mit ihren in der Klasse „Config“ gespeicherten Einstellungen aufgerufen. Diese Methoden nehmen auch die Vorverarbeitung in Form einer Gauß- oder Medianfilterung sowie optional die Nachbearbeitung mittels morphologischen Closings vor. Im resultierenden Graustufenbild werden Objekte als weiße, der Hintergrund wird als schwarze Bildpunkte dargestellt. Im folgenden Aufruf von „Segmentation.getContourFromImage()“ werden hieraus die äußeren Konturen ermittelt, d.h. solche, die direkt im Bildhintergrund und nicht innerhalb anderer Konturen liegen.

Die so erhaltenen Daten werden im weiteren Verlauf von „DataHandling.populateContourDataList()“ über die Kriterien Fläche, Umfang und Abstand der Kontur zum Bildrand validiert. Ist die Kontur valide, werden ihre Daten entsprechend der in Kapitel 3.6.4.5 erläuterten Vorgehensweise auf einen möglichst kleinen Datensatz reduziert und in der Liste für die Konturdaten „contourDataList“ gespeichert.

Die weitergehende Merkmalsanalyse zur Ermittlung der Qualitätsindikatoren findet nach der Segmentierung sämtlicher Bilddateien in der Methode „DataHandling.populateContourDataGridView()“ statt. Hierbei werden die Ergebnisse in der DataGridView-Struktur „dataGridViewContourData“ gespeichert. Die Entfernung von Konturdoubletten (s. Kapitel 3.6.4.4), deren Auftreten sich bei kombinierter Anwendung mehrerer Segmentierungsverfahren nicht vermeiden lässt, greift auf die Qualitätsindikatoren zurück. Daher erfolgt die Entfernung der Doubletten erst nach dem Füllen von „dataGridViewContourData“ in der Methode „DataHandling.deleteContourDoublettesFromDataGridView()“. Das Ergebnis, die von Doubletten bereinigten, validierten und mit Qualitätsindikatoren versehenen Konturen, wird im Anschluss entsprechend des Rankings sortiert und angezeigt, das Ranking basiert auf den Qualitätsindikatoren.

## 4 Methoden - Analyse taxonomisch relevanter Strukturmerkmale

Die im Massenscreening identifizierten Valven können auf Basis ihrer Konturform nur unzureichend taxonomisch klassifiziert werden. Für eine genauere taxonomische Zuordnung müssen auch morphologische Strukturen analysiert werden, wofür mehrere Ansätze untersucht wurden. Aufgrund der geringen Schärfentiefe der Fokusebene und der meistens dreidimensional ausgeprägten Form der Strukturen gelingt die Analyse jedoch nicht auf Grundlage einzelner mikroskopischer Aufnahmen, sondern erfordert durch 2D-Focus- oder 3D-Stacking gewonnene Daten.

### 4.1 2D-Focus-Stacking

Zur Steigerung der Schärfentiefe lichtmikroskopischer Aufnahmen wird das sog. Focus-Stacking (auch als „Extended Depth of Field“ oder „Extended Depth of Focus“ bezeichnet) angewendet. Hierfür wird ein Stapel von Einzelbildern aufgenommen, der das Objekt in allen relevanten Fokusebenen deckungsgleich abbildet. Die jeweils scharfen Bildanteile der einzelnen Fokusebenen werden zu einem möglichst durchgängig fokussierten Gesamtbild vereinigt, das einer Projektion des gesamten Bildstapels in die X/Y-Ebene entspricht. Es existieren verschiedene frei verfügbare wie auch kostenpflichtige Lösungen für dieses Verfahren, im Rahmen dieser Arbeit wurde die Software „Helicon Focus“ [41] verwendet.

#### 4.1.1 Helicon Focus

Helicon Focus ist eine kommerzielle Software für das 2D-Focus-Stacking. Das Programm realisiert drei verschiedene Verfahren, wobei Methode „A (g. Durchschnitt)“ für das in dieser Arbeit verwendete Bildmaterial die subjektiv besten Ergebnisse erzielte, während mittels der Methoden „B (Tiefenkarte)“ und „C (Pyramide)“ berechnete 2D-Focus-Stacks z.T. deutliche Artefakte aufwiesen (s. auch Abbildung 57). Die Standardvorgaben „Radius 8“ und „Glättung 4“ waren durchgängig ausreichend für eine gute Ergebnisqualität, daher wurden alle Darstellungen mit diesen Parametern berechnet.

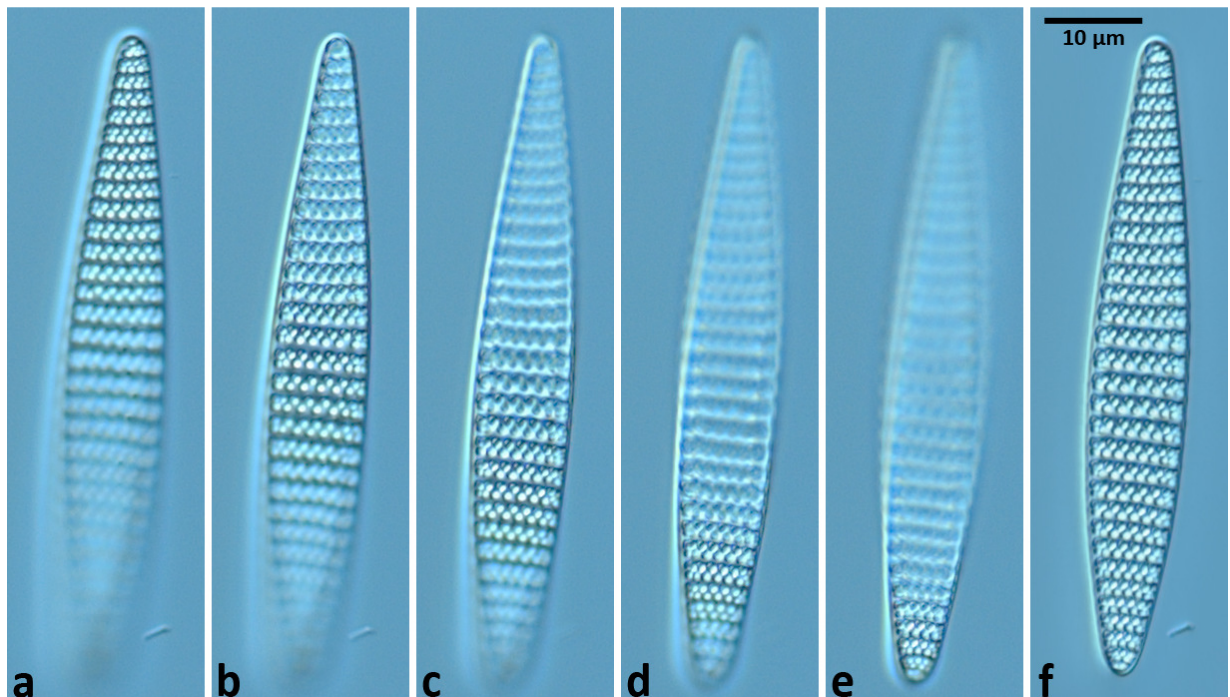


Abbildung 32: Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*, aufgenommen lichtmikroskopisch im Differenziellen Interferenzkontrast. a – e) Verschiedene Fokusebenen, f) der mittels Helicon Focus erzeugte 2D-Focus-Stack (basierend auf ca. 100 Fokusebenen), der die komplette Valve scharf abbildet

Der tiefenscharfe 2D-Focus-Stack (s. Abbildung 32 f) eignet sich für die Analyse feiner Strukturen, selbst wenn diese nicht innerhalb einer einzelnen Fokusebene scharf abgebildet werden können. Da bei dieser Darstellungsweise aufgrund der zweidimensionalen Projektion der Daten jedoch jegliche Höheninformationen verloren gehen, können keine Aussagen über die räumliche Ausprägung und das Auftreten ergebnisverfälschender perspektivischer Verzerrungen gemacht werden.

#### 4.1.2 2,5D-Stacking

Aus der Information, in welcher Fokusebene sich der jeweils schärfste Bildanteil befindet, kann eine Tiefenkarte (s. Abbildung 33 b) generiert werden. Diese liefert für jeden Bildpunkt des 2D-Focus-Stacks einen einzelnen Höhenwert und kann für eine Darstellungsart verwendet werden, die in Helicon Focus als „3D-Modell“ bezeichnet wird. Es ergibt sich jedoch eine flächige 2,5D-Darstellung, da für jeden Bildpunkt des Stacks (X/Y-Ebene) nur eine einzelne Höheninformation (Z-Achse) vorliegt.

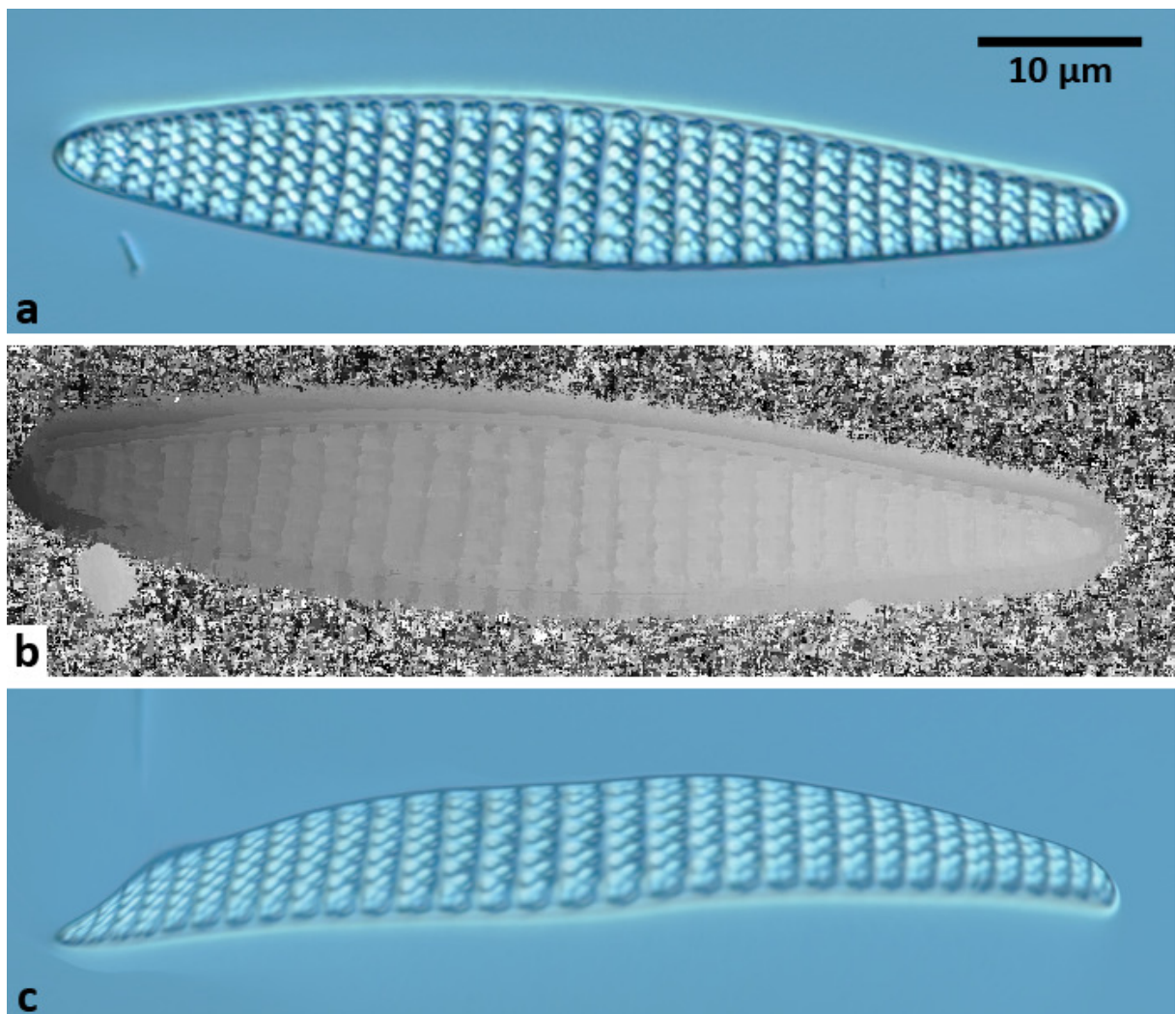


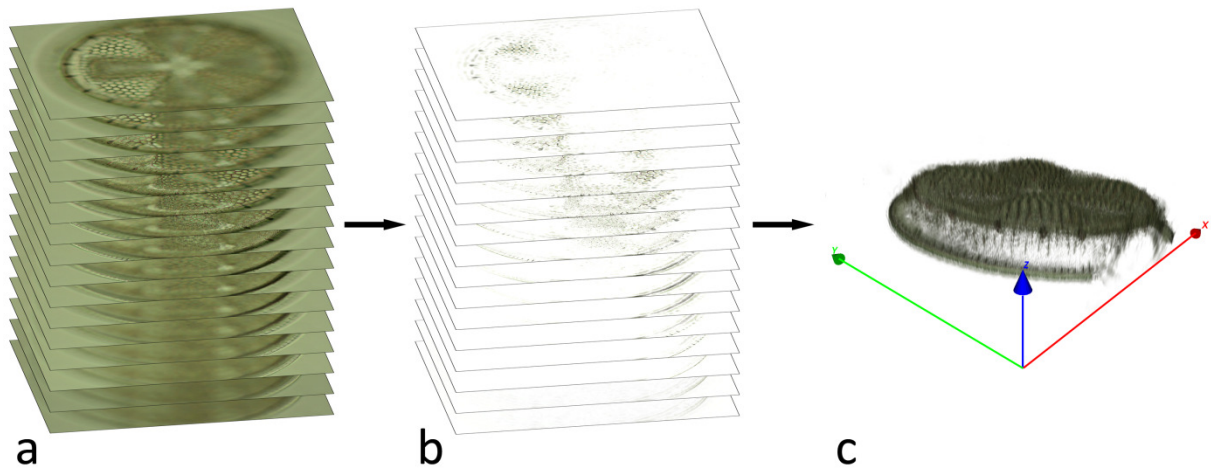
Abbildung 33: Visualisierung von DIK-Aufnahmen einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*: a) 2D-Focus-Stack, b) die dazugehörige Tiefenkarte, c) 2,5D-Darstellung des 2D-Focus-Stacks in perspektivischer Ansicht.

#### 4.2 3D-Stacking

Für taxonomische und morphometrische Untersuchungen sind auch dreidimensionale Strukturen oder zumindest ihre entsprechend einer senkrechten Aufsicht entzerrten zweidimensionalen Projektionen relevant. In der Arbeit mit dem Präparat direkt am Mikroskop lassen sich räumliche Informationen mittels Durchfokussieren des Objektes erhalten. Die korrekte dreidimensionale Interpretation erfordert jedoch einige Erfahrung seitens des Betrachters, eine exakte Vermessung räumlicher Strukturen ist nicht möglich. Eine dem Durchfokussieren entsprechende Herangehensweise kann auf

Grundlage von Bildstapeln erreicht werden, da diese Ebene für Ebene angezeigt werden können. Aus Bildstapeln lassen sich jedoch auch direkt Informationen über die räumliche Lage von Strukturen gewinnen und diese dreidimensional vermessen.

Das hierfür vorgeschlagene 3D-Stacking wurde im Rahmen von [18] und [19] an der Hochschule Em- den/Leer entwickelt und erfolgreich gelöst. Beim 3D-Stacking werden dreidimensionale Bildinformationen aus lichtmikroskopischen Bildstapeln extrahiert, welche Fokusebenen mit einem festen Höhenabstand abbilden. Die gewonnenen Daten können mit Hilfe von z.B. in der medizinischen Volumenvisualisierung verwendeten Verfahren wie Raycasting [42, p. 218ff.] dargestellt und weiter analysiert werden (s. Abbildung 34).



**Abbildung 34: Schematischer Ablauf des 3D-Stackings. a) lichtmikroskopischer Bildstapel, b) aus den jeweiligen Ebenen extrahierte relevante Anteile, c) 3D-Visualisierung der relevanten Bildanteile in perspektivischer Ansicht**

Das Verfahren ähnelt der dreidimensionalen Konfokalmikroskopie, erzielt aufgrund des nicht-konfokalen Charakters der Daten jedoch eine deutlich geringere Tiefendiskriminierung (s. Abbildung 35). Diese kann durch entsprechende Wahl der Darstellungsparameter (d.h. Anzeige nur sehr kontraststarker Strukturen durch Heraufsetzen der Opazitätsschwelle) verbessert werden, hierbei gehen jedoch feine Strukturdetails innerhalb der Fokusebenen verloren. Trotz der reduzierten Tiefenauflösung lassen sich deutlich bessere Aussagen erzielen als mittels der 2,5D-Darstellung, welche auf Basis von 2D-Focus-Stacks mit Höhendaten erzeugt wird. Da echte 3D-Informationen vorliegen (s. Abbildung 36), können z.B. Ansichten senkrecht zu schräg im Fokus liegenden Bereichen der Valvenoberfläche generiert werden. Dies ermöglicht die Vermessung von Strukturen ohne störende perspektivische Verzerrungen.

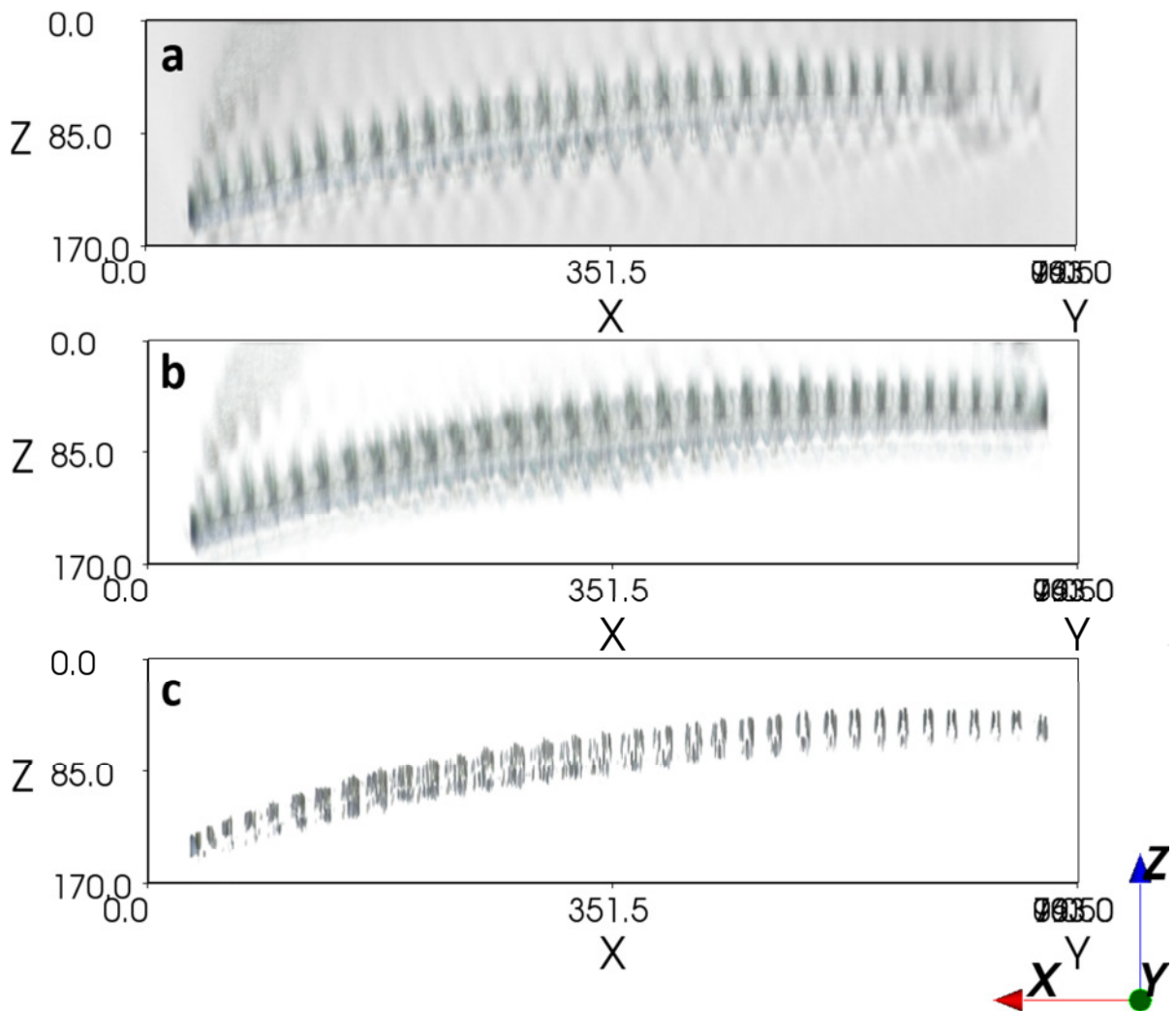


Abbildung 35: Geringe Tiefendiskriminierung (starke „Verschmierung“ in Z-Richtung) lichtmikroskopischer Hellfeldaufnahmen am Beispiel einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*, Ansicht quer zur Fokusebene in der X/Z-Ebene. a) Schnitt durch den Bildstapel entlang der Apikalachse der Valve, b) 3D-Stack mit Darstellung aller Strukturanteile (Hochpassfilter, auch Bereiche mit geringem Kontrast werden angezeigt), c) 3D-Stack mit für Tiefendiskriminierung optimierter Darstellung (Sobelfilter, nur Bereiche mit starken Kontrasten werden angezeigt). 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

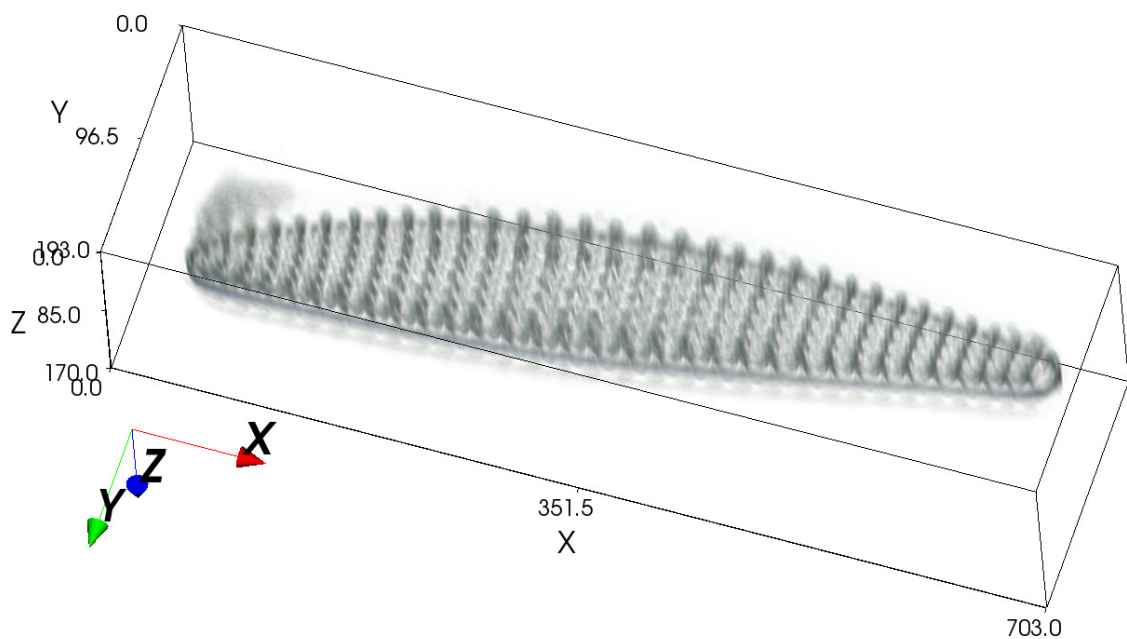


Abbildung 36: Visualisierung eines 3D-Stacks von Hellfeldaufnahmen einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*, gleicher Datensatz wie Abbildung 35 b). Da dreidimensionale Informationen vorliegen, können auch andere Perspektiven als die direkte Aufsicht auf die Fokusebene dargestellt werden. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

Für die Segmentierung der in der Visualisierung darzustellenden Daten wurde in [18] eine Kantendetektion mittels Hochpassfilterung entwickelt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Daten mit einem Filterdurchmesser von 1 % der Bildbreite/-höhe, dessen Kernbereich jeweils 80 % des Gesamtdurchmessers einnahm, gefiltert. Zusätzlich wurde eine Segmentierung auf Basis der Gradientenmagnitude entwickelt; hierfür kommt, analog zur Gradientenberechnung im Canny Edge Detector, ein Sobelfilter (s. Kapitel 3.2.1.4) zum Einsatz, wobei sich eine Filterkernbreite von drei Pixeln bewährt hat.

### 4.3 Analyse repetitiver Valvenstrukturen in der Frequenzdomäne

Striae und Costae bilden oft repetitive Strukturen (s. Abbildung 37), welche über einen gewissen Bereich der Valve in relativ konstanten Abständen auftreten (s. Abbildung 38) und deren Abstand ein taxonomisch oder morphometrisch relevantes Merkmal darstellt. Die räumliche Wiederholungsfrequenz solcher repetitiven Muster kann durch einfache Analysen in der Frequenzdomäne ermittelt werden. Hierfür wird das Powerspektrum der Bilddaten mit Hilfe der Fast-Fouriertransformation (FFT) ermittelt. Dessen Maxima bilden die Frequenzen besonders hervortretender Strukturen sowie den im Zentrum liegenden Nullfrequenzanteil ab (s. Abbildung 39).

Die Powerspektren wurden mit der frei verfügbaren Bildverarbeitungssoftware ImageJ [43] erstellt und ausgewertet, hierbei wurde die Raumfrequenz auf Basis des euklidischen Abstands der Maxima zum Mittelpunkt ermittelt:

$$d = \frac{N}{\sqrt{u^2 + v^2}} \quad (49)$$

mit  $d$  = Abstand der repetitiven Strukturen;  $N$  = Breite bzw. Höhe des Powerspektrums;  
 $u, v$  = Koordinaten des Maximums im Powerspektrum bezogen auf den Mittelpunkt

In Abbildung 39 liegen die beiden neben dem Nullfrequenzanteil stärksten Maxima 11 Pixel horizontal und 1 Pixel vertikal vom Mittelpunkt entfernt, entsprechend ergibt sich für die Costae aus Abbildung 38 ein Abstand von:

$$d = \frac{256 \text{ Pixel}}{\sqrt{11^2 + 1^2}} \cong 23 \text{ Pixel} \cong 2,3 \mu\text{m} \quad (50)$$

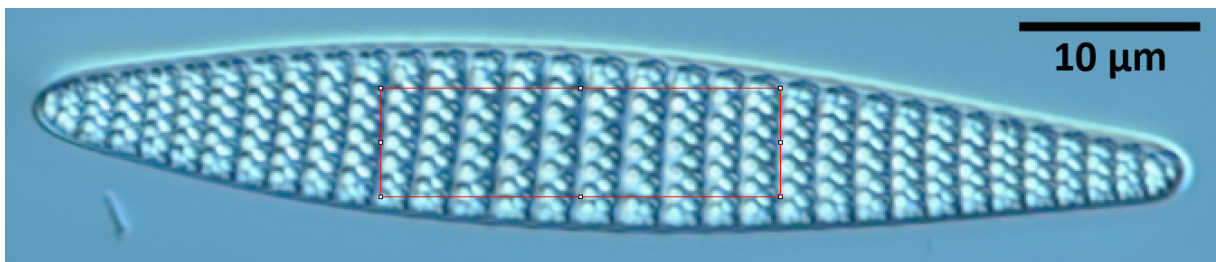


Abbildung 37: 2D-Focus-Stack einer Valve für die FFT-Analyse, aufgenommen im DIK. Der Bereich, der auf repetitive Strukturen untersucht werden soll, ist rot umrandet.

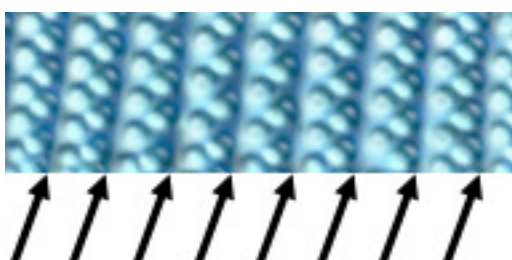


Abbildung 38: Darstellung des rot umrandeten Ausschnitts aus Abbildung 37. Die schwarzen Pfeile verdeutlichen die Position der regelmäßig angeordneten Costae.



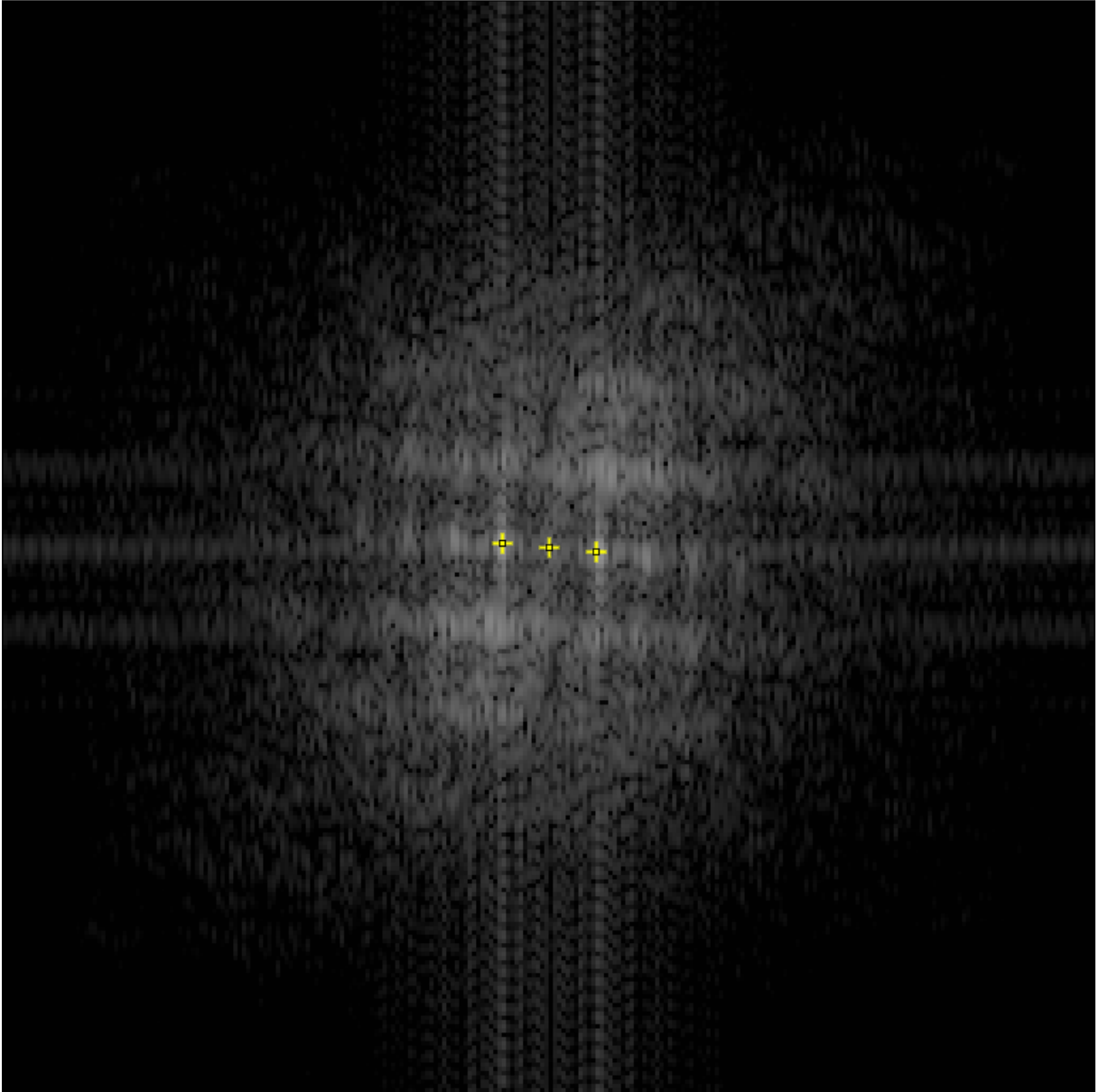


Abbildung 39: Powerspektrum der Fast-Fouriertransformierten des rot umrandeten Bildbereichs aus Abbildung 37. Die Positionen der drei stärksten Maxima sind gelb markiert, die beiden äußeren Maxima entsprechen der Wiederholungsfrequenz der Costae.

#### 4.4 Analyse der Chromophor-Verteilung mittels Auflichtfluoreszenz

Das Verhältnis von Chromophor- zu Zellvolumen sowie die Anzahl und Form der Chloroplasten können für die taxonomische Klassifizierung relevant sein. Die entsprechenden Strukturen lassen sich gut mit Hilfe von Auflichtfluoreszenz darstellen, hierbei ist jedoch die Verwendung lebender Diatomeen unabdingbar.

Viele Diatomeen, wie die hier untersuchten *Fragilariopsis kerguelensis*, sind aktiv mobil, und auch bei nicht mobilen Arten können Bewegungen auftreten, die durch das Medium vermittelt werden. Die lebenden Diatomeen werden innerhalb einer Kammer untersucht, die von Objektträger und mit Abstandshaltern aufgesetztem Deckglas gebildet wird. Nach dem Aufsetzen des Deckglases vergeht einige Zeit, bis sich ein Kräftegleichgewicht eingestellt hat und die Bewegung des Mediums zum Stillstand kommt. Auch nach Einstellung dieses Gleichgewichts entsteht durch die für höhere Auflösun-

gen erforderliche Ölimmersion eine Sogwirkung am Deckglas, die zu Verwirbelungen des Mediums und damit zur Bewegung des Untersuchungsobjektes führt.

Um Bewegungen der Untersuchungsobjekte zu minimieren, kann die Viskosität der Proben durch Zusatz von Dickungsmitteln erhöht werden. Hierdurch vergeht zwar eine längere Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts, die Bewegungen des Untersuchungsobjektes sind anschließend jedoch geringer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde handelsüblicher Tapetenkleister der Marke „Methylan“ zum Andicken verwendet, da dieser über keine nennenswerte Eigenfluoreszenz verfügt und sich sehr homogen mit dem für die Diatomeenkulturen verwendeten Salzwasser-Medium mischen lässt.

Während eine geringe Bewegung von Objekt oder Optik beim 2D-Focus-Stacking mittels Helicon Focus automatisch ausgeglichen werden kann, wurde ein entsprechender Ansatz für das 3D-Stacking noch nicht durchgeführt. Dies erscheint nur schwer umsetzbar, da für die räumliche Analyse Rotationen und Translationen in allen drei Raumdimensionen ermittelt und ausgeglichen werden müssten. Beim 2D-Focus-Stacking ist dies hingegen nur in zwei Dimensionen notwendig, da der Fehler, der durch höhenverändernde Transformationen entsteht, in der Regel so gering ist, dass er vernachlässigt werden kann.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Massenscreening

Eine Reihe von Problemstellungen musste für Entwicklung einer Software für Massenscreenings gelöst werden. Die Software sollte die automatisierte Auswertung lichtmikroskopischer Aufnahmen von Valven der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis* ermöglichen, und dabei eine möglichst fehlerfreie Identifikation und exakte Vermessung gewährleisten.

### 5.1 Beschränkungen der Binarisierung

Für die Binarisierung der Bilddaten in Objekte und Hintergrund muss für jeden Bildpunkt die eindeutige Zuordnung zu einer dieser beiden Klassen möglich sein. In mikroskopischen Hellfeldaufnahmen von Diatomeenvalven überschneidet sich der Intensitätsbereich des Bildhintergrundes jedoch mit demjenigen der Objekte (s. Abbildung 40 und Abbildung 41), die eindeutige Unterscheidung ist daher nicht für alle Bildpunkte möglich. Die Intensitätswerte der Valvenränder liegen jedoch generell unterhalb der Intensität des Hintergrundes, und die der Segmentierung folgenden Analysen beruhen ausschließlich auf der äußeren Kontur des Valvenrandes. Daher bedeutet eine fehlerhafte Segmentierung innerhalb der Valvenfläche keine Einschränkungen für die weitere Klassifikation und eindeutige Identifizierung der Objekte. Für eine korrekte Klassifikation nach Formel (4) muss jedoch eine Invertierung des Segmentierungsergebnisses vorgenommen werden, wenn die Intensitäten des Hintergrundes ober-, diejenigen des Objektes unterhalb des Schwellwertes liegen.

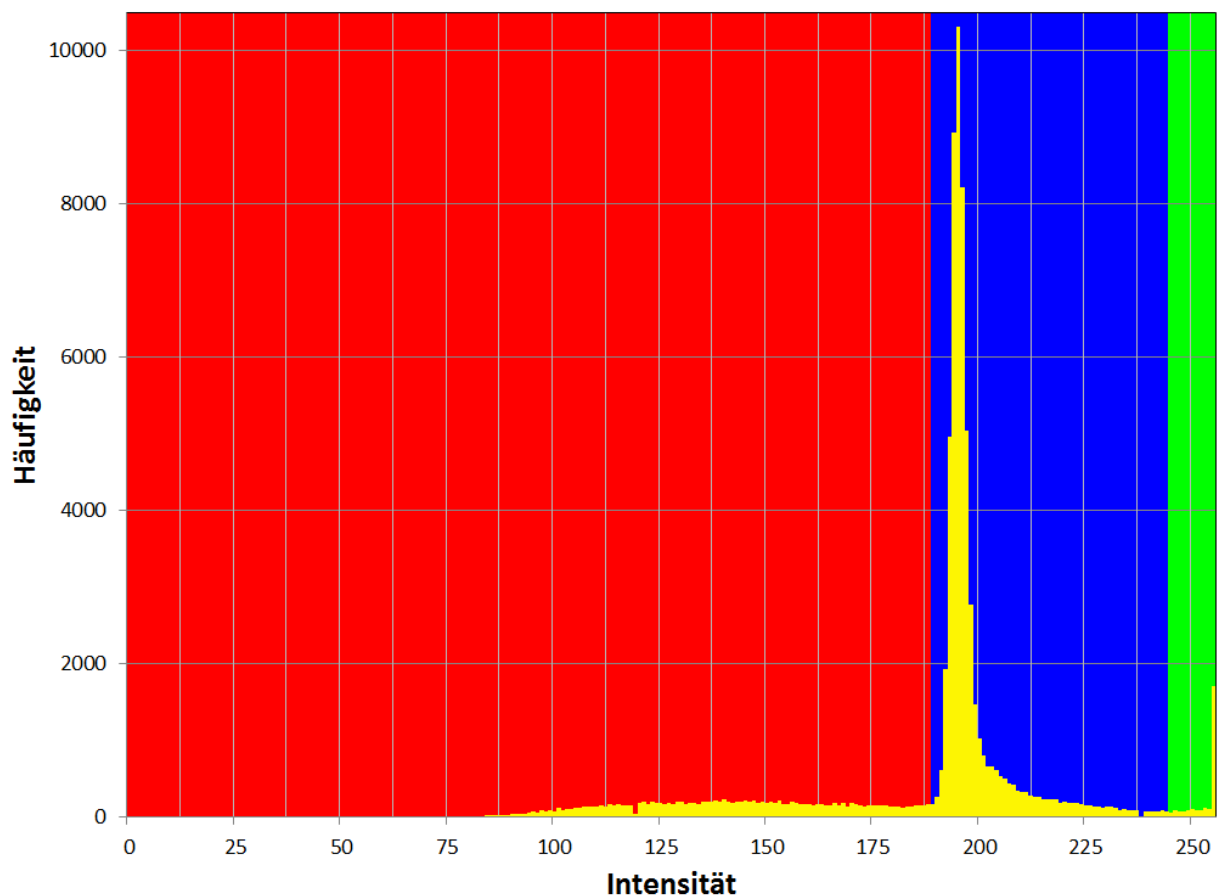


Abbildung 40: Histogramm (gelb) der Bilddaten aus Abbildung 41 a). Drei Intensitätsbereiche sind farblich hinterlegt (rot: Intensitäten 0-189, blau: Intensitäten 190-244, grün: Intensitäten 245-255); Intensitäten der Valvenstrukturen finden sich im gesamten Histogramm (rot, grün und blau), die des Bildhintergrundes im blau hinterlegten Bereich. Abbildung 41 verdeutlicht die drei Intensitätsbereiche.

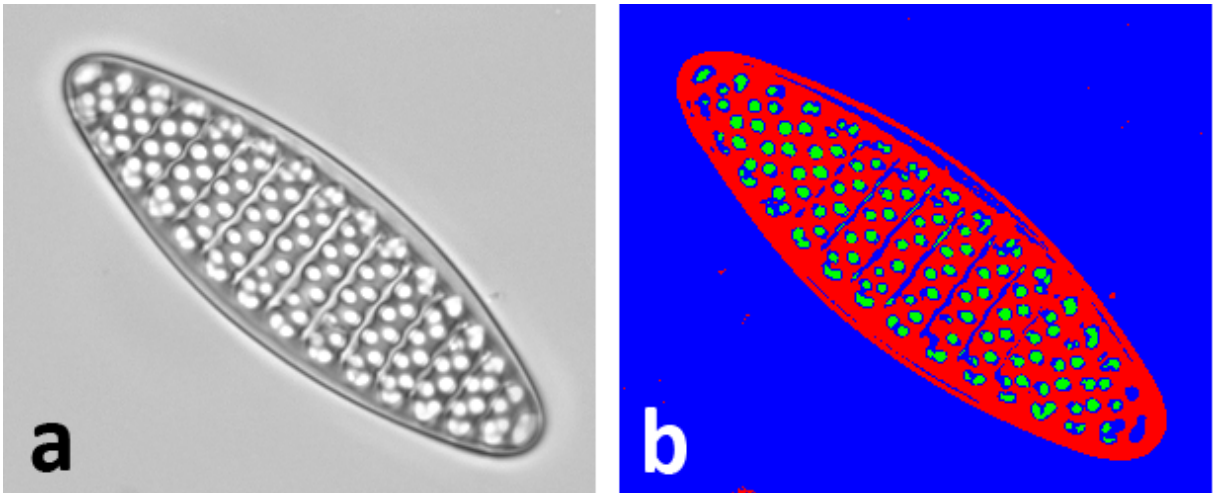


Abbildung 41: Segmentierung der Hellfeldaufnahme einer Valve anhand von Intensitätsschwellwerten. a) Originalbild, b) Einfärbung der drei Intensitätsbereiche entsprechend dem Histogramm aus Abbildung 40. Anhand der rot eingefärbten Segmentierung kann trotz fehlerhafter Binarisierung der Valveninnenfläche der äußere Valvenumriss bestimmt werden.

## 5.2 Verbesserung der Valvenidentifikation durch Kombination mehrerer Segmentierungsverfahren

Jedes der untersuchten Segmentierungsverfahren zeigt individuelle Vor- und Nachteile abhängig vom Bildinhalt, daher bietet sich keine dieser Methoden als generelle Lösung für sämtliche Segmentierungsaufgaben an. Durch Kombination mehrerer Segmentierungsverfahren wird die Ausbeute an verwertbaren Ergebnissen deutlich erhöht, da die jeweiligen Stärken der einzelnen Methoden zum Tragen kommen.

Abbildung 42 zeigt als typisches Beispiel für eine problembehaftete Segmentierung die Aufnahme zweier Valven, deren Rand durch andere Strukturen teilweise überlagert ist. Abbildung 42 b-f bildet die unterschiedlichen Segmentierungsergebnisse, Abbildung 43 die hieraus abgeleiteten Konturen ab. Deutlich ist das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Segmentierungsverfahren erkennbar: Die Valve am linken Bildrand wird mittels des Canny Edge Detectors einwandfrei erkannt (s. Abbildung 42 e und Abbildung 43 d), während die anderen Verfahren mehr oder weniger starke Konturdefekte verursachen und zu kaum oder gar nicht verwertbaren Ergebnissen führen (s. Abbildung 43 und Tabelle 5). Die Valve in der Bildmitte wird von keiner der eingesetzten Methoden fehlerfrei segmentiert, da das ihren unteren Rand überdeckende Fragment ebenfalls innerhalb der Fokusebene liegt; es wird somit scharf abgebildet und weist ein ähnliches Intensitäts- und Kontrastverhalten wie der Valvenrand auf.

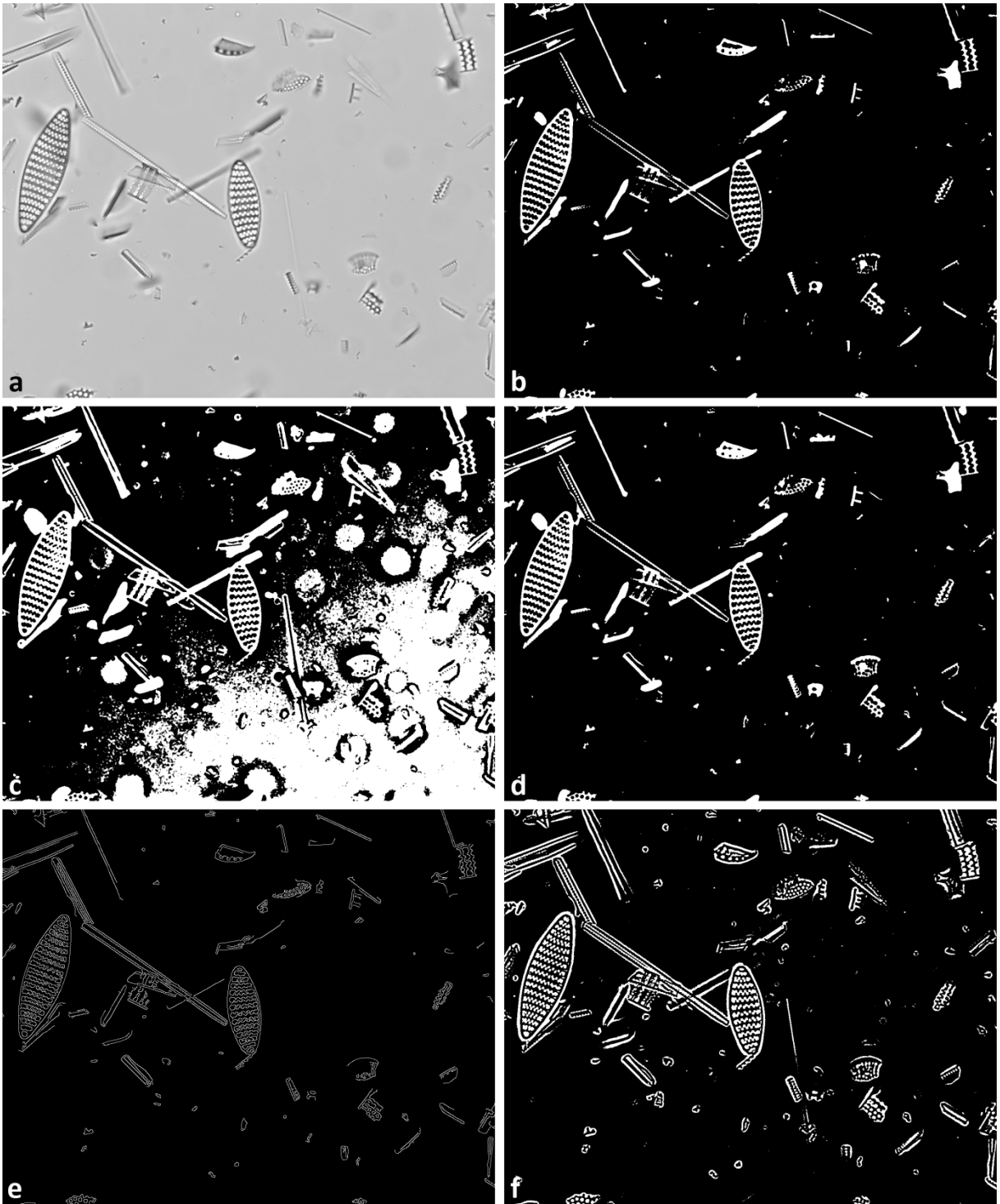


Abbildung 42: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Segmentierungsverfahren, a) Originalbild, b) Otsu's Thresholding, c) Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, d) RATS, e) Canny Edge Detector, f) Adaptive Thresholding, jeweils mit den in Kapitel 5.4 empfohlenen Filtern und Parametern angewendet. Die Segmentierungsergebnisse weisen deutliche Unterschiede auf, welche in Abbildung 43 detaillierter dargestellt werden.

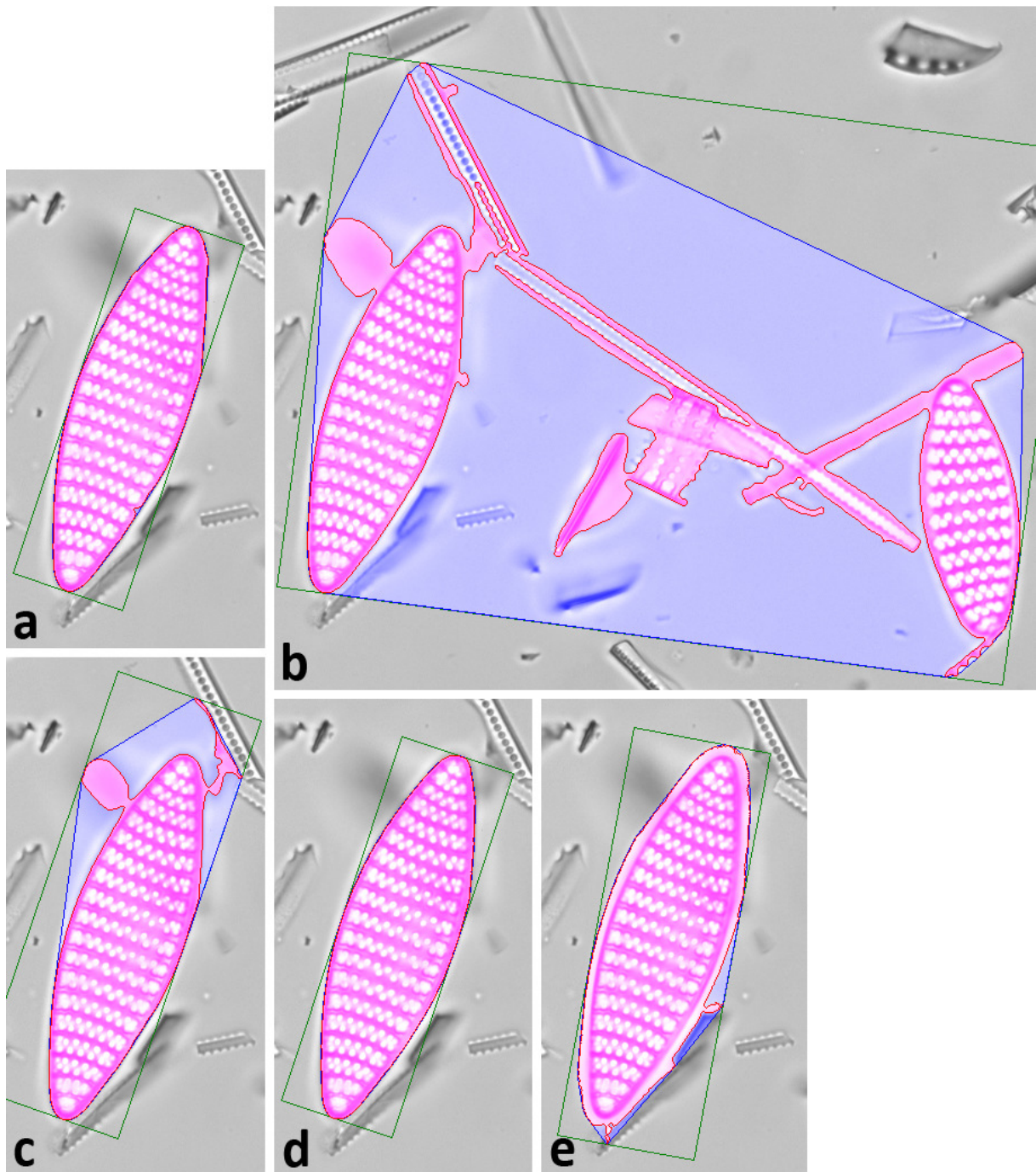


Abbildung 43: Vergleich von durch verschiedene Segmentierungsverfahren ermittelten Konturen (Konturfläche lila, konvexe Hülle blau, kleinstes umhüllendes Rechteck grün eingefärbt). a) Otsu's Thresholding, b) Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, c) RATS, d) Canny Edge Detector, e) Adaptive Thresholding, jeweils mit den in Kapitel 5.4 empfohlenen Filtern und Parametern angewendet. Die mittels Canny Edge Detector ermittelte Kontur (d) entspricht dem tatsächlichen Valvenumriss, während die mit Otsu's Thresholding ermittelte Kontur (a) geringe Fehler enthält. Die mit den Verfahren RATS (c) und Adaptive Thresholding (e) erzeugten Konturen sind deutlich fehlerbehaftet, mittels Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding (b) misslingt die Trennung überlappender und nahe beieinander liegender Strukturen, was zu einem unbrauchbaren Ergebnis führt. Tabelle 5 vergleicht die resultierenden Qualitätsindikatoren.

Tabelle 5: Vergleich der Qualitätsindikatoren von Konturen, die durch verschiedene Segmentierungsverfahren ermittelten wurden (s. Abbildung 43). Die mit dem Canny-Edge-Detector erkannte defektfreie Kontur erfüllt alle Qualitätskriterien, die durch Otsu's Thresholding ermittelte Kontur weist nur wenige kleine Defekte auf und erfüllt vier Qualitätskriterien. Die fehlerhaften Segmentierungen der anderen Verfahren führen zu einer geringeren Anzahl erfüllter Qualitätskriterien, die Ergebnisse werden somit als nicht relevante Objekte klassifiziert.

	Otsu's Thresholding s. Abbildung 43 a)	Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding s. Abbildung 43 b)	RATS s. Abbildung 43 c)	Canny Edge Detector s. Abbildung 43 d)	Adaptive Thresholding s. Abbildung 43 e)	Bedingung für die Erfüllung des Qualitätskriteriums
<b>Matching der Hu-Invarianten</b>	0,16047	10,31576	0,09934	0,14954	0,05095	< 0,25
<b>CDF</b>	1,035	3,173	1,319	1,032	1,119	< 1,05
<b>PCAF</b>	1,38	268,21	32,55	1,19	5,99	< 2,0
<b>CHMDF</b>	23,90	186469,31	7861,71	0,00	635,21	< 20,0
<b>Höhen-/Breitenverhältnis</b>	3,313	1,358	2,923	3,277	3,002	>2,0 <8,0
<b>Erfüllte Qualitätskriterien</b>	4	0	2	5	2	

In einem anderen Fall (s. Abbildung 44) ermöglicht die Anwendung des Histogrammausgleichs in Verbindung mit Otsu's Thresholding (c) die defektfreie Segmentierung einer teilweise unscharf abgebildeten Valve. Die resultierenden Konturdaten sind aufgrund der Unschärfe des Valvenrandes mit einer Ungenauigkeit behaftet. Diese wird jedoch als vertretbar angesehen, solange überhaupt eine verwertbare Kontur ermittelt werden kann. Adaptive Thresholding (f) segmentiert den Valvenrand zwar defektfrei, ermittelt jedoch eine zu große Kontur (s. Kapitel 5.3), die anderen Methoden führen zu unbrauchbaren Ergebnissen.

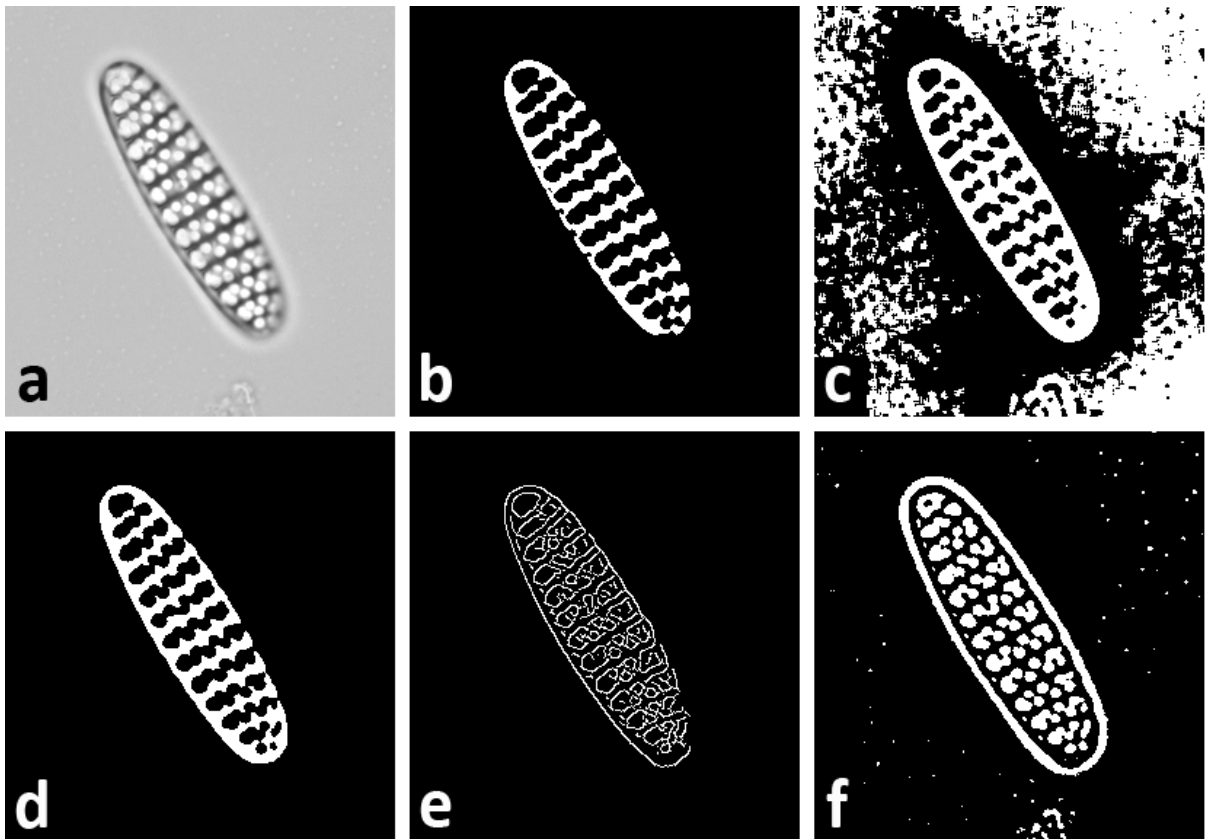


Abbildung 44: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Segmentierungsmethoden für eine Valve, die leicht außerhalb der Fokusebene liegt: a) Original, b) Otsu's Thresholding, c) Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, d) RATS, e) Canny Edge Detector, f) Adaptive Thresholding, jeweils mit den in Kapitel 5.4 empfohlenen Filtern und Parametern angewendet. Die Anwendung von Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding (c) sowie von Adaptive Thresholding (f) führt zu geschlossenen, defektfreien Konturen, wobei die durch Adaptive Thresholding ermittelte Kontur nicht mit dem tatsächlichen Valvenrand übereinstimmt und daher zu deutlich fehlerbehafteten Ergebnissen führt (s. Kapitel 5.3). Die anderen Verfahren erzeugen Segmentierungen, die nicht zur Identifikation als relevantes Objekt führen.

Die hier aufgeführten Beispiele stehen stellvertretend für eine Vielzahl unterschiedlicher Aufnahmesituationen und Bildinhalte, die Ergebnisse dürfen nicht verallgemeinert werden. Um verlässlichere Aussagen treffen zu können, wurden für einen umfangreichen Datensatz (5924 Valvenaufnahmen und 68 Templates) die Ergebnisausbeuten und der Zeitbedarf für die Anwendung verschiedener Segmentierungsverfahren bzw. ihrer Kombinationen ermittelt (s. Tabelle 6). Je mehr Segmentierungsverfahren parallel verwendet wurden, desto höher war die Ergebnisausbeute. Die Segmentierung mittels RATS war dabei ca. um den Faktor fünf bis sieben langsamer als die anderen Verfahren.



**Tabelle 6: Ergebnisse der Konturanalyse durch Kombination verschiedener Segmentierungsverfahren\*. Die Kombination aller fünf Verfahren führt zur besten Ausbeute verwertbarer Ergebnisse, die Verwendung von RATS verlängert die Bearbeitungszeit jedoch beträchtlich.**

Otsu's Thresholding	Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding	RATS	Canny Edge Detector	Adaptive Thresholding	Dauer der Konturanalyse	Ermittelte Konturen mit fünf Qualitätsindikatoren	Ermittelte Konturen mit vier Qualitätsindikatoren	Valide Konturen Gesamt	Valide Konturen ohne Doubletten
√					251 s	2474	388	10780	10776
	√				412 s	1803	403	18522	18488
		√			1946 s	2514	365	11809	11801
			√		382 s	2159	169	2696	2696
				√	367 s	1132	323	6264	6241
√	√				740 s	2984	501	29302	22982
√	√	√			2835 s	3096	521	41111	25040
√	√		√		1110 s	3261	531	31998	23099
√	√		√	√	1398 s	3377	550	38262	24849
√	√	√	√		3290 s	3332	552	43807	25128
√	√	√	√	√	3742 s	3445	570	50071	26751

\*) basierend auf 5924 Valvenaufnahmen und 68 Templates

Tabelle 7 und Abbildung 45 schlüsseln einige Zeilen aus Tabelle 6 nach den Anteilen der einzelnen Segmentierungsverfahren an der Ergebnisausbeute auf. Wie ersichtlich ist, trägt bei der Analyse umfangreicher Datensätze jedes der hier vorgestellten Verfahren zum Gesamtergebnis bei. Werden Otsu's Thresholding, Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding sowie Canny Edge Detector eingesetzt, wird die Ergebnisausbeute durch eine zusätzliche Verwendung von RATS oder Adaptive Thresholding nur noch in geringem Maße gesteigert.

**Tabelle 7: Anteile der verschiedenen Segmentierungsverfahren an den Ergebnissen der Konturanalyse (gleicher Datensatz wie Tabelle 6 für Ergebnisse mit fünf erfüllten Qualitätsindikatoren). Werden zusätzlich zu Otsu's Thresholding, Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding sowie Canny Edge Detector weitere Verfahren angewendet, weisen diese zwar einen deutlichen Anteil an der Ergebnisausbeute auf, die Gesamtausbeute vergrößert sich jedoch nur wenig (s. a. Abbildung 45).**

	Ohne RATS, ohne Adaptive Thresholding	ohne Adaptive Thresholding	Inkl. Adaptive Thresholding
<b>Ergebnisse mit fünf erfüllten Qualitätskriterien</b>	3261	3332	3445
<b>Anteil Otsu's Thresholding</b>	1258	888	824
<b>Anteil Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding</b>	834	666	563
<b>Anteil RATS</b>	./.	671	614
<b>Anteil Canny Edge Detector</b>	1169	1107	1011
<b>Anteil Adaptive Thresholding</b>	./.	./.	433

## Anteile der Segmentierungsverfahren an den Ergebnissen

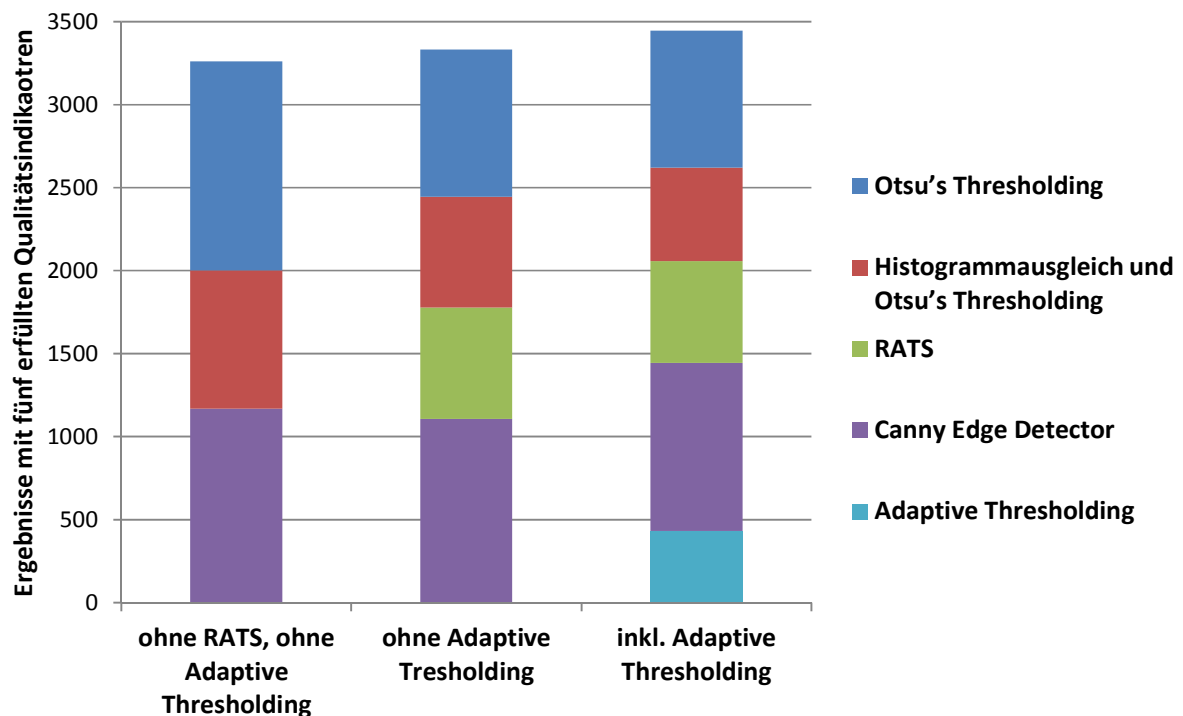


Abbildung 45: Anteile der verschiedenen Segmentierungsverfahren an den Ergebnissen der Konturanalyse mit fünf erfüllten Qualitätsindikatoren, s. Tabelle 7

Durch die Anwendung mehrerer Segmentierungsverfahren wird ein Großteil der Objekte mehrfach erkannt, solche Doubletten werden entsprechend der Vorgehensweise in Kapitel 3.6.4.4 aus der Ergebnisliste eliminiert. Hierdurch geht für jedes Objekt nur dasjenige Segmentierungsergebnis in die weitere Konturanalyse ein, welches als am besten geeignet angesehen wird. Empfohlen wird, für die Segmentierung zumindest die Verfahren „Otsu's Thresholding“, „Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding“ und „Canny Edge Detector“ einzusetzen. Wenn die Verarbeitungsgeschwindigkeit unkritisch ist, kann zur Steigerung der Ergebnisausbeute zusätzlich „RATS“ angewendet werden. Für die in dieser Arbeit untersuchten Datensätze stieg die Ergebnisausbeute dadurch um ca. 2 %, dies war jedoch mit einem ca. dreifach höheren Zeitbedarf verbunden.

Die Verwendung von Adaptive Thresholding wird nicht empfohlen. Wurden die drei bzw. vier o.g. Segmentierungsverfahren eingesetzt, ergab sich durch die zusätzliche Anwendung von Adaptive Thresholding für die in dieser Arbeit untersuchten Datensätze eine ca. 3 % höhere Ergebnisausbeute. Die zusätzlich gefundenen Konturen gaben jedoch nicht die tatsächlichen Valvenränder wieder und führten somit zu verfälschten Ergebnissen. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 5.3 diskutiert.

### 5.3 Ergebnisunterschiede bei Anwendung verschiedener Segmentierungsverfahren

Unterschiedliche Segmentierungsverfahren führen zu unterschiedlichen Valvenkonturen, die Ergebnisse der Konturanalyse dürfen jedoch nicht zu stark schwanken. Abbildung 46 vergleicht die Konturen, welche mit verschiedenen Verfahren für eine typische, gut segmentierbare Valve ermittelt wurden. Hierbei fällt auf, dass der Valvenrand durch Adaptive Thresholding fehlerhaft erkannt wird, während die Ergebnisse der anderen vier Segmentierungsverfahren sich deutlich ähneln.

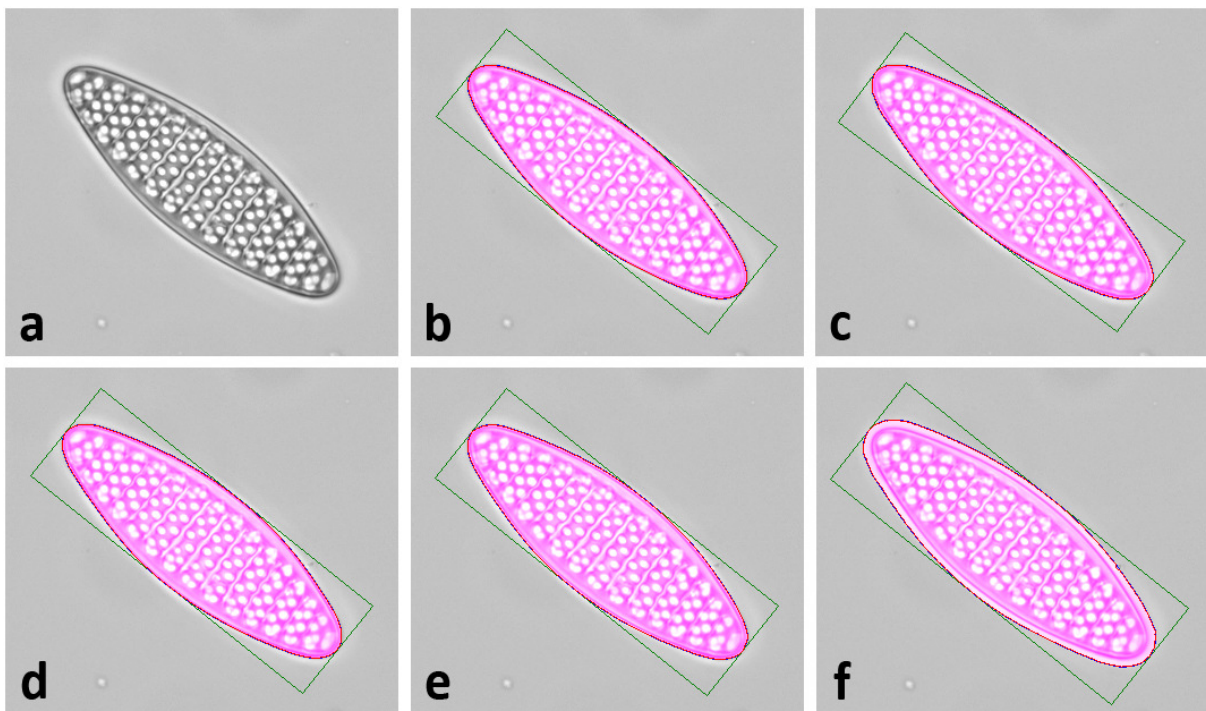


Abbildung 46: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Segmentierungsverfahren: a) Original, b) Otsu's Thresholding, c) Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, d) RATS, e) Canny Edge Detector, f) Adaptive Thresholding. Die Konturfläche ist lila eingefärbt, das kleinste umgebende Rechteck grün eingezeichnet. Die ersten vier Segmentierungsmethoden führen zu vergleichbaren Ergebnissen, Adaptive Thresholding erzeugt eine deutlich größere Kontur (vergleiche Tabelle 8).

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der Konturanalyse für die in Abbildung 46 aufgeführten Segmentierungen. Adaptive Thresholding (s. Abbildung 46 f) führt, verglichen mit den anderen Verfahren, zu meistens deutlich höheren Werten für Fläche, Umfang, Breite und Höhe der Kontur.

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse verschiedener Segmentierungsmethoden am Beispiel einer einzelnen Valve (s. Abbildung 46). Die Verwendung von Adaptive Thresholding führt zu meistens deutlich höheren Werten.

	Otsu's Thresholding	Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding	RATS	Canny Edge Detector	Adaptive Thresholding
<b>Fläche</b>	234,91	238,15	236,45	241,52	272,70
<b>Umfang</b>	72,58	72,93	72,64	72,99	76,93
<b>Breite</b>	31,27	31,45	31,31	31,36	32,46
<b>Höhe</b>	10,07	10,14	10,10	10,33	11,08

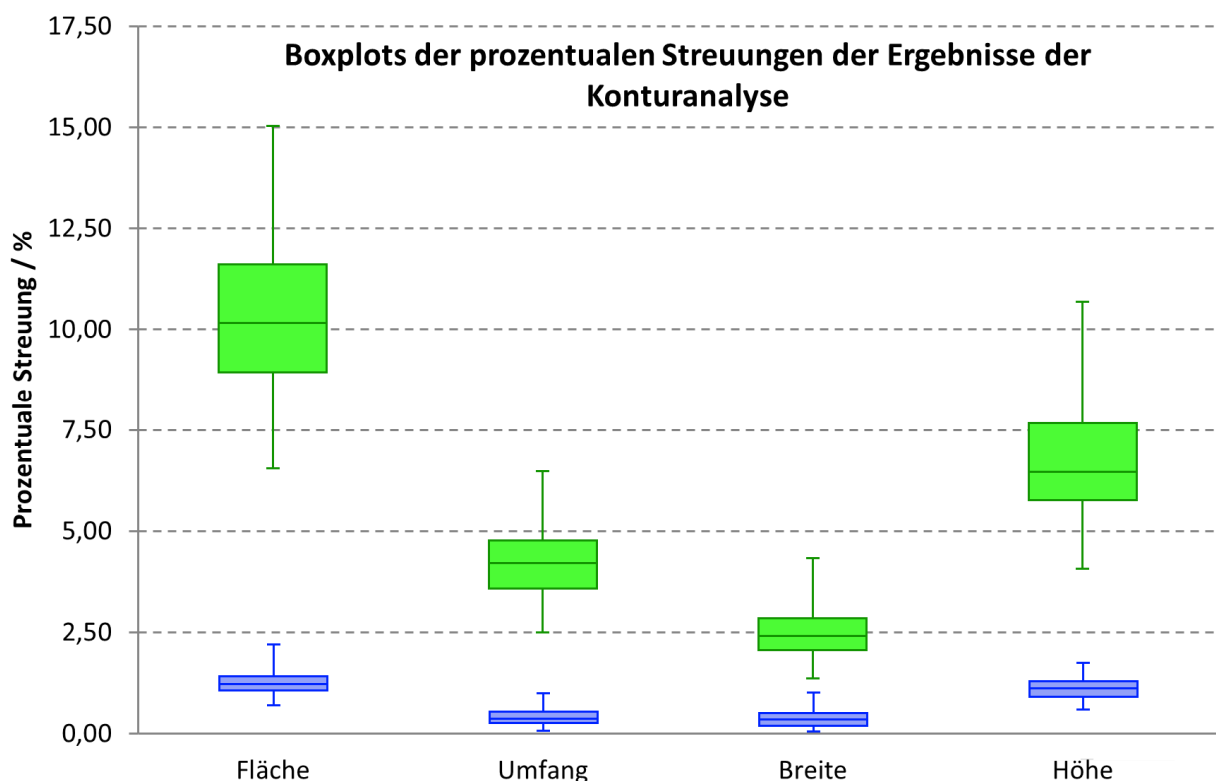
Zur Ermittlung des durch Adaptive Thresholding verursachten Fehlers wurden 78 repräsentative Valvenaufnahmen ausgewertet, welche mit jedem der fünf Verfahren eindeutig und defektfrei segmentiert werden konnten. Die prozentuale Streuung der Ergebnisse aller Segmentierungsverfahren wurde nach Formel (28) für Fläche, Umfang, Breite und Höhe jeder Valvenkontur ermittelt. Für die Konturermittlung wurden die vier Segmentierungsverfahren Otsu's Thresholding, Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, RATS und Canny Edge Detector kombiniert. Hierbei blieb die gemittelte

prozentuale Streuung der Konturanalyseergebnisse unterhalb von 1,3 % des hypothetischen Mittelwerts, wie in Tabelle 9, Spalte „Prozentuale Streuung ohne Adaptive Thresholding“ deutlich wird. Die zusätzliche Verwendung von Adaptive Thresholding führte zu einer deutlich erhöhten Streubreite, die teilweise mehr als 10 % erreichte (s. Tabelle 9, Spalte „Prozentuale Streuung inkl. Adaptive Thresholding“). Abbildung 47 verdeutlicht diesen Sachverhalt anhand entsprechender Boxplots.

**Tabelle 9: Vergleich der Ergebnisse\* verschiedener Segmentierungsmethoden. Die Verwendung von Adaptive Thresholding führt zu einer deutlichen Zunahme der Ergebnisstreuung, s. a. Abbildung 47.**

	Prozentuale Streuung der Ergebnisse ohne Adaptive Thresholding				Prozentuale Streuung der Ergebnisse inkl. Adaptive Thresholding			
	Fläche	Umfang	Breite	Höhe	Fläche	Umfang	Breite	Höhe
<b>Durchschnitt</b>	1,26 %	0,41 %	0,40 %	1,12 %	10,24 %	4,18 %	2,47 %	6,65 %
<b>Minimum</b>	0,70 %	0,07 %	0,06 %	0,59 %	6,55 %	2,03 %	1,37 %	4,08 %
<b>1. Quartil</b>	1,07 %	0,26 %	0,20 %	0,91 %	8,95 %	3,58 %	2,07 %	5,77 %
<b>Median</b>	1,23 %	0,36 %	0,36 %	1,13 %	10,16 %	4,21 %	2,42 %	6,46 %
<b>2. Quartil</b>	1,42 %	0,54 %	0,51 %	1,30 %	11,61 %	4,77 %	2,85 %	7,67 %
<b>Maximum</b>	2,21 %	0,99 %	1,01 %	1,74 %	15,03 %	6,48 %	4,34 %	10,68 %

\*) gemittelt über 78 unterschiedliche Valven, welche auf Basis jedes der fünf Segmentierungsverfahren eindeutig und defektfrei zu identifizieren waren



**Abbildung 47: Boxplots der prozentualen Streuungen der Ergebnisse der Konturanalyse entsprechend Tabelle 9. Werte für alle Segmentierungsverfahren inkl. Adaptive Thresholding sind grün, Werte ohne Adaptive Thresholding sind blau eingefärbt. Die zusätzliche Verwendung von Adaptive Thresholding bewirkt eine deutlich größere Streuung der Ergebnisse.**

Die Verwendung von Adaptive Thresholding führte für die in dieser Arbeit untersuchten Datensätze zu einer geringfügig höheren Ergebnisausbeute bei der Konturidentifikation (siehe Kapitel 5.2), jedoch auch zu einer deutlichen Zunahme der Streuung der Ergebnisse der Konturanalyse. Von einer Verwendung des Adaptive Thresholding wird daher abgeraten, zumindest sollte die Abwägung des

Nutzens in Abhängigkeit der zu untersuchenden Bilddaten und der gewünschten Ergebnisgenauigkeit getroffen werden.

## 5.4 Empfohlene Parameter

Auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Datensätze haben sich folgende Parameter für Segmentierung, Validierung und Klassifikation bewährt:

**Tabelle 10: Empfohlene Parameter für das Massenscreening lichtmikroskopischer Aufnahmen von Valven der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis*, basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Datensätzen**

<b>Segmentierungsverfahren Otsu's Thresholding, Anwendung empfohlen</b>	
Rauschminderung Filtertyp	Gauß
Rauschminderung Filterdurchmesser	5 Pixel
Segmentierungsparameter	keine
Anwendung morphologisches Closing	nein

<b>Segmentierungsverfahren Histogrammausgleich und Otsu's Thresholding, Anwendung empfohlen</b>	
Rauschminderung Filtertyp	Median
Rauschminderung Filterdurchmesser	5 Pixel
Segmentierungsparameter	keine
Anwendung morphologisches Closing	nein

<b>Segmentierungsverfahren Robust Automated Threshold Selector, Anwendung empfohlen wenn der Zeitbedarf unkritisch ist</b>	
Rauschminderung Filtertyp	Gauß
Rauschminderung Filterdurchmesser	5 Pixel
Sigma für die Gradientenberechnung	3,0
Exponent für den Gradienten	2,0
Anwendung morphologisches Closing	nein

<b>Segmentierungsverfahren Canny Edge Detector, Anwendung empfohlen</b>	
Rauschminderung Filtertyp	Gauß
Rauschminderung Filterdurchmesser	7 Pixel
Schwellwert für schwache Kanten	25
Schwellwert für starke Kanten	125
Durchmesser des Sobelfilters	3 Pixel
Anwendung morphologisches Closing	nein

<b>Segmentierungsverfahren Adaptive Thresholding, Anwendung nicht empfohlen</b>	
Rauschminderung Filtertyp	Gauß
Rauschminderung Filterdurchmesser	7 Pixel
Nachbarschaftsgröße	13 Pixel
Anwendung morphologisches Closing	nein

<b>Validierungsparameter für Konturen</b>	
Fläche	Größer als 75 $\mu\text{m}^2$ , kleiner als 100.000 $\mu\text{m}^2$
Umfang	Größer als 35 $\mu\text{m}$ , kleiner als 100.000 $\mu\text{m}^2$
Abstand zur Bildkante	Mindestens 3 Pixel
Beschränkung auf zentralen Bildbereich	70% (alternativ zu „Abstand zur Bildkante“)

<b>Parameter für die Qualitätsindikatoren</b>	
Matching mit Templates	Kleiner als 0,25

<b>CDF</b>	Kleiner als 1,05
<b>CHMDF</b>	Kleiner als 20,0
<b>PCAF</b>	Kleiner als 2,0
<b>Höhen-/Breitenverhältnis</b>	Zwischen 2,0 und 8,0
<b>Mindestzahl erfüllter Qualitätsindikatoren</b>	4

### 5.5 Verwendung von 2D-Focus-Stacking

Der Nutzen der Verwendung von 2D-Focus-Stacking für das Massenscreening wurde nicht untersucht, erscheint aufgrund einiger Überlegungen jedoch zweifelhaft:

- Durch das Stacking würde der Zeitaufwand für die Analyse deutlich zunehmen, was den Grundvoraussetzungen für ein Massenscreening widerspricht.
- Auch bei der Beschränkung auf die Untersuchung einer einzelnen, durch die Autofokus-Funktion der Metafer-Software ausgesuchten Bildebene werden Valvenanteile, die geringfügig außerhalb der Fokusebene liegen, bei Kombination mehrerer Segmentierungsverfahren gut erkannt. Der durch die Unschärfen bedingte Fehler bei der Berechnung geometrischer Grunddaten wie Fläche und Umfang erscheint gering. Die Untermauerung dieser Aussage würde jedoch einen weiterführenden Vergleich der Analyseergebnisse von einzelnen Ebenen und 2D-Focus-Stacks erfordern, der nicht Bestandteil dieser Arbeit war.
- Liegen zu große Anteile der Valven außerhalb der Fokusebene, können diese durch 2D-Focus-Stacking scharf dargestellt werden. Die 2D-Aufsicht dieser Bereiche unterliegt durch die starke Neigung zur Sichtachse jedoch so starken perspektivischen Verzerrungen, dass eine Auswertung deutlich fehlerbehaftet wäre. Eine mögliche Lösung dieses Problems wird in Kapitel 6.3 vorgeschlagen.

### 5.6 Beschränkungen des vorgeschlagenen Verfahrens

Die für die Identifikation relevanter Diatomeen entwickelte und als Software „DiatomorphoTo“ umgesetzten Verfahren sind auf die Analyse konvexer Valven beschränkt, da die Beurteilung der Segmentierungsqualität und die Klassifikation der Kontur anhand von Konvexitätskriterien nur möglich sind, wenn keine konkaven Konturanteile vorliegen. Für eine Vielzahl von Diatomeenarten ist diese Beschränkung aufgrund ihrer konvexen Valvenform unproblematisch.

Die taxonomische Klassifizierung erfordert zusätzlich zum Abgleich des Konturumrisses mit Template-Vorlagen die Untersuchung weiterer Merkmale, welche größtenteils durch die Analyse von Strukturdetails gewonnen werden können. Mögliche Herangehensweisen wurden in Kapitel 4 vorgestellt und werden im Folgenden diskutiert.

## **6 Ergebnisse und Diskussion - Analyse taxonomisch relevanter Strukturmerkmale**

Für die Betrachtung und Bewertung von Methoden zur dreidimensionalen Strukturanalyse auf Basis lichtmikroskopischer Daten wurde eine Reihe von Möglichkeiten exemplarisch untersucht.

### **6.1 Vergleich der lichtmikroskopischen Verfahren**

Die drei lichtmikroskopischen Verfahren Hellfeld, Differentieller Interferenzkontrast (DIK) und Phasenkontrast (PhaKo) wurden auf ihre Eignung für die Bewertung dreidimensionaler Strukturen untersucht. Abbildung 48 vergleicht 2D-Focus-Stacks von Bildstapeln der Valven unterschiedlicher Diatomeenarten, die mit den o.g. Verfahren aufgenommen wurden. Deutlich erkennbar ist der unterschiedliche Kontrastumfang: Die Hellfeldaufnahmen (a, d, g) erscheinen eher kontrastarm, feine Strukturen werden nur schwach dargestellt. DIK (b, e, h) und PhaKo (c, f, i) ergänzen den Amplitudenkontrast durch Informationen, welche auf dem Brechungsindex des Untersuchungsobjektes beruhen, und führen somit zu deutlich kontraststärkeren Darstellungen.

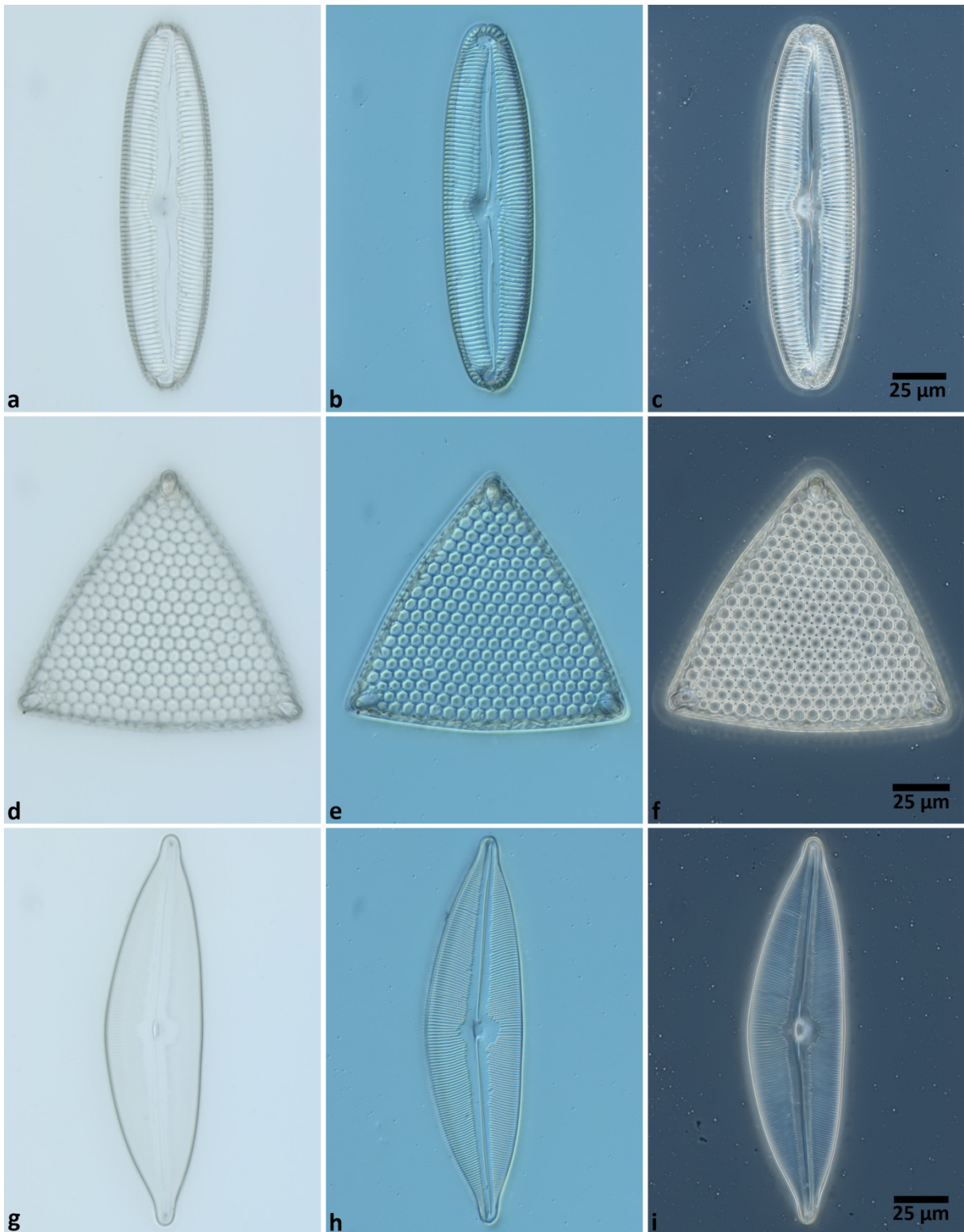


Abbildung 48: 2D-Stacks von Valven mit unterschiedlich feinen Strukturen, die mit verschiedenen lichtmikroskopischen Verfahren aufgenommen wurden. a-c) *Pinnularia viridis*, d-f) *Triceratium favus* Ehrenberg, g-h) *Cymbella ehrenbergii*, a) d) und g) im Hellfeld, b) e) und h) im DIK, c) f) und i) im Phasenkontrast als Bildstapel über den kompletten Fokusbereich aufgenommen und mit Helicon Focus zu 2D-Stacks verrechnet. Detailausschnitte in Abbildung 49 ermöglichen eine Beurteilung der Eignung der lichtmikroskopischen Verfahren für das 2D-Focus-Stacking für feine, in Abbildung 50 für größere Strukturen.

Wie in Abbildung 49 deutlich wird, profitiert besonders die Abbildung feiner Strukturen von der Kontrastverstärkung. Die Verwendung des DIK ermöglicht die klare Darstellung von Areolen, welche im PhaKo deutlich schlechter und im Hellfeld kaum noch identifiziert werden können. Abbildung 50 zeigt jedoch, dass die vom DIK verursachten reliefartigen Artefakte besonders bei größeren Strukturen zu



einer Fehlinterpretation als Höheninformation führen können. Die vom PhaKo gebildeten Lichthöfe stören zwar durch Überstrahlung teilweise das Kontrastverhalten feinerer Strukturen, dennoch werden diese deutlich klarer dargestellt als im Hellfeld.

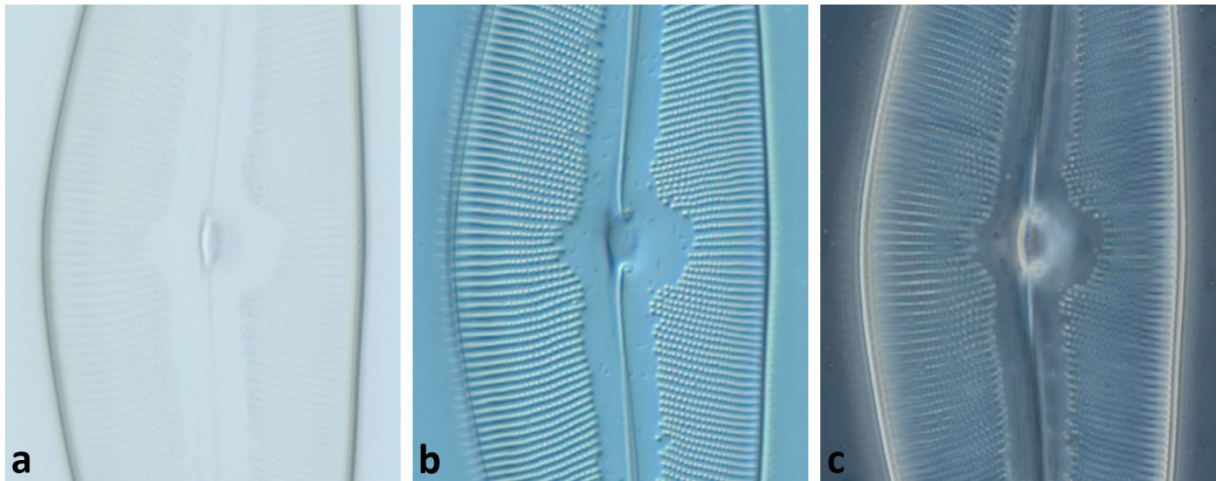


Abbildung 49: 2D-Stacks feiner Strukturen zur Verdeutlichung der Eignung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren für das 2D-Focus-Stacking, vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 48, unterste Reihe (Valve von *Cymbella ehrenbergii*). a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. Im Hellfeld werden feine Strukturen hoch aber kontrastarm, im DIK hoch und kontraststark aufgelöst. Die Verwendung von PhaKo-Aufnahmen führt zu einer kontraststarken, aber durch Artefakte teilweise schlecht aufgelösten Darstellung, s. auch Abbildung 57. Maßstab vergleiche Abbildung 48

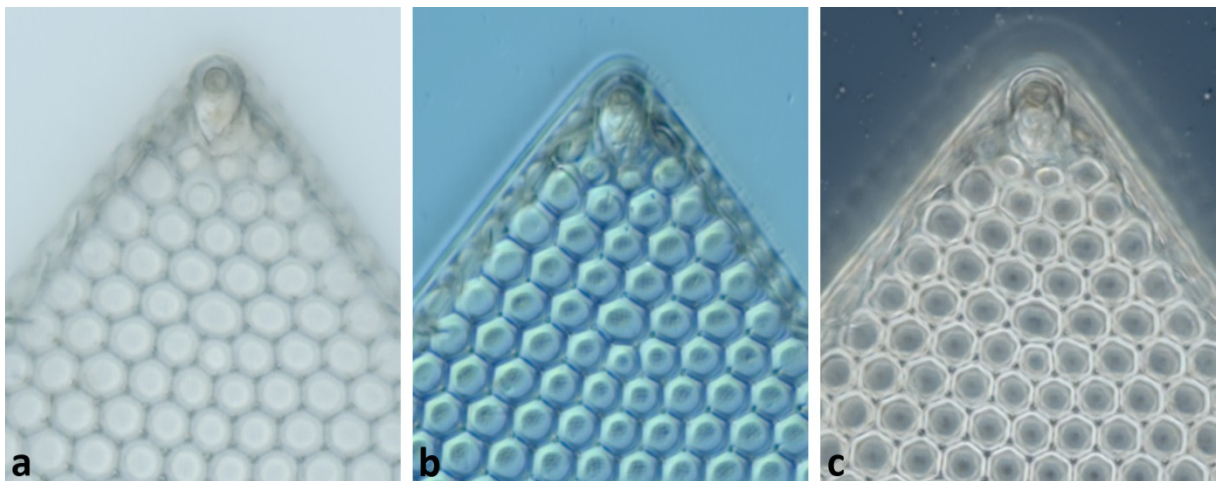


Abbildung 50: 2D-Stacks größerer Strukturen zur Verdeutlichung der Eignung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren für das 2D-Focus-Stacking, vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 48, mittlere Reihe (Valve von *Triceratium favus* Ehrenberg). a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. Im Hellfeld werden größere Strukturen hoch aufgelöst und mit brauchbarem Kontrast dargestellt, im DIK und PhaKo in hoher Auflösung und starkem Kontrast. Maßstab vergleiche Abbildung 48

Abbildung 51 zeigt die Visualisierung von 3D-Stacks analog zur Darstellung in Abbildung 48.

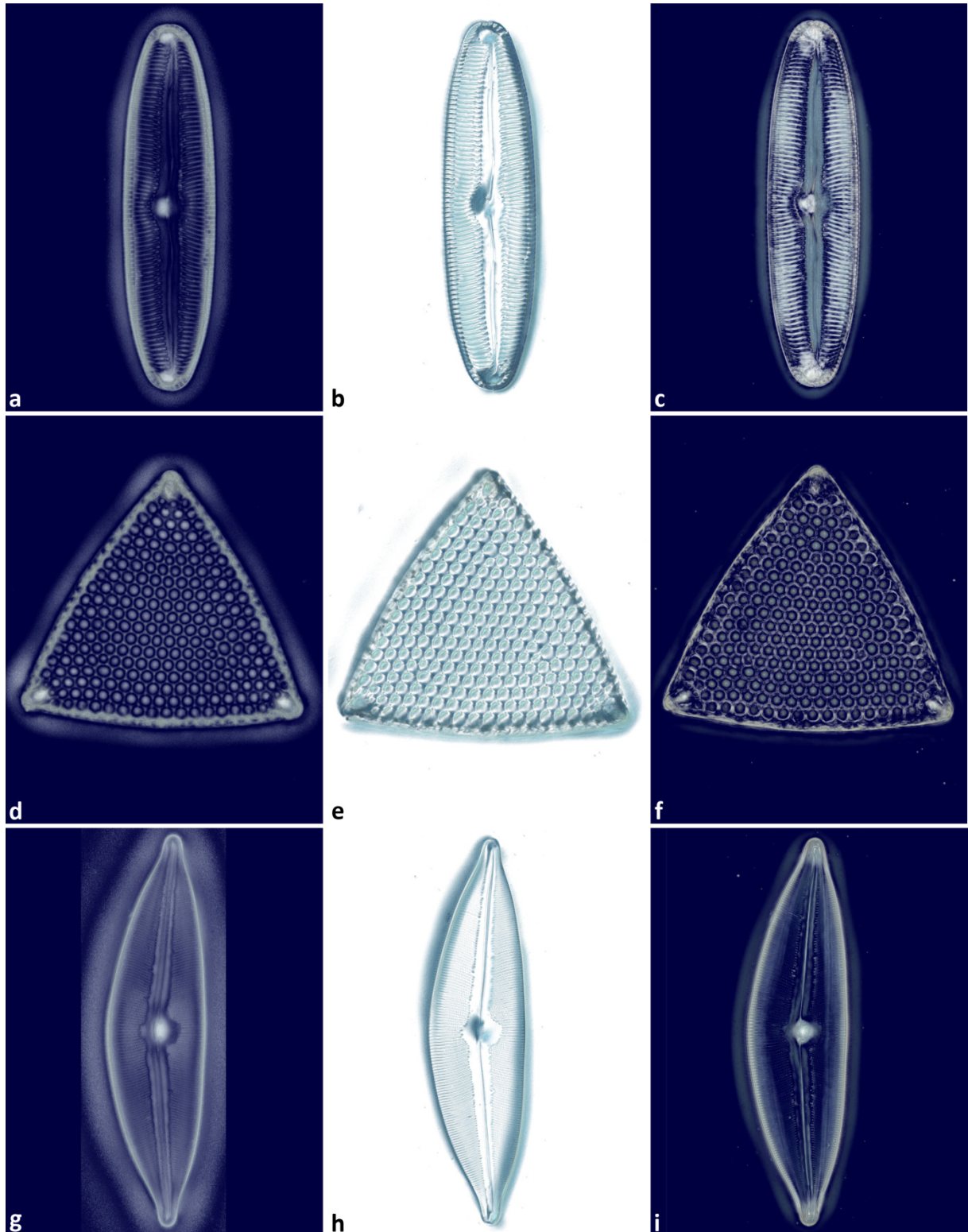


Abbildung 51: 3D-Stacks analog zu den 2D-Stacks aus Abbildung 51. a-c) *Pinnularia viridis*, d-f) *Triceratium favus* Ehrenberg, g-h) *Cymbella ehrenbergii*, a) d) und g) im Hellfeld, b) e) und h) im DIK, c) f) und i) im Phasenkontrast als Bildstapel über den kompletten Fokusbereich aufgenommen, mittels Hochpassfilter segmentiert und per Raycasting visualisiert, die Hintergrundfarben wurden zur Kontraststeigerung angepasst. In der hier abgebildeten Aufsicht senkrecht zur Fokusebene ermöglicht 3D-Stacking mit 2D-Stacks vergleichbare Ergebnisse, Detailausschnitte in Abbildung 52 ermöglichen eine Beurteilung der Eignung der lichtmikroskopischen Verfahren für das 3D-Stacking angewandt auf feine, in Abbildung 53 auf gröbere Strukturen. Maßstab vergleiche Abbildung 48

Auch beim 3D-Stacking ermöglichen die kontrastverstärkenden Mikroskopieverfahren die Auflösung feiner Strukturen, die aufgrund ihres geringen Eigenkontrastes im Hellfeld kaum sichtbar sind (Abbildung 52). Die Reliefartefakte des DIK führen jedoch bei größeren Strukturen z.T. zur deutlich fehlerhaften Darstellung und Einfärbung größerer Strukturen, da aufgrund des anisotropen Charakters der reliefartigen Artefakte die Segmentierung verfälscht wird. Die im PhaKo auftretenden Lichthöfe überstrahlen zwar z.T. kleinere Strukturen, führen jedoch meistens nicht zu Segmentierungsfehlern (s. Abbildung 53).

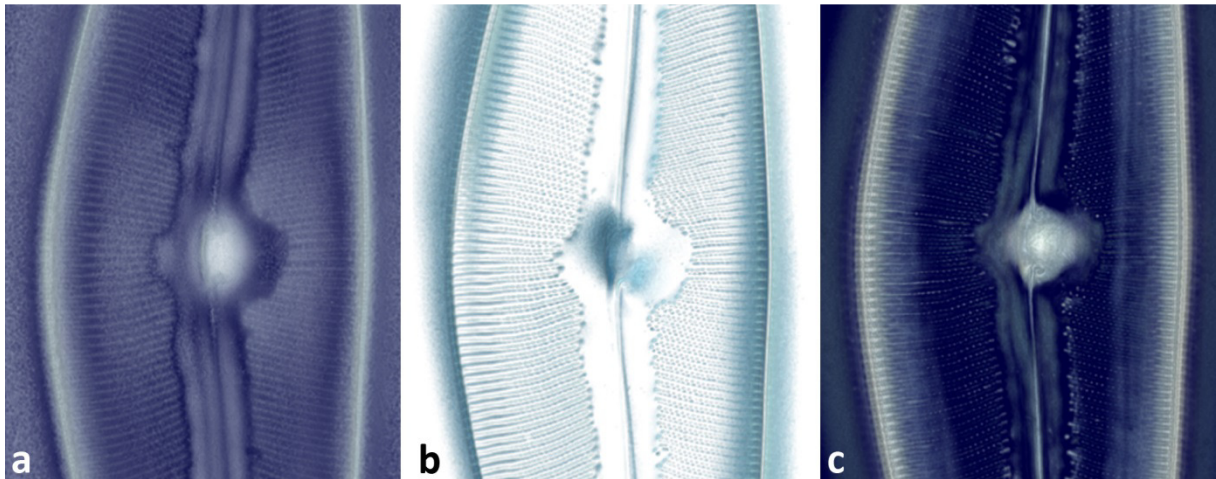


Abbildung 52: 3D-Stacks feiner Strukturen zur Verdeutlichung der Eignung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren für das 3D-Stacking, vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 51, unterste Reihe (Valve von *Cymbella ehrenbergii*). a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. Der schwache Kontrastumfang der Hellfeldaufnahmen führt bei einer auf die Darstellung feiner Strukturen optimierten Visualisierung zu einer durch Rauschen reduzierten Auflösung. Die DIK-Aufnahmen ermöglichen die sehr kontraststarke Visualisierung auch feiner Strukturen mit einer durch die Reliefartefakte leicht reduzierten Auflösung. Die Visualisierung der PhaKo-Daten ist gut aufgelöst aber weniger kontraststark als die der DIK-Daten. Maßstab vergleiche Abbildung 48

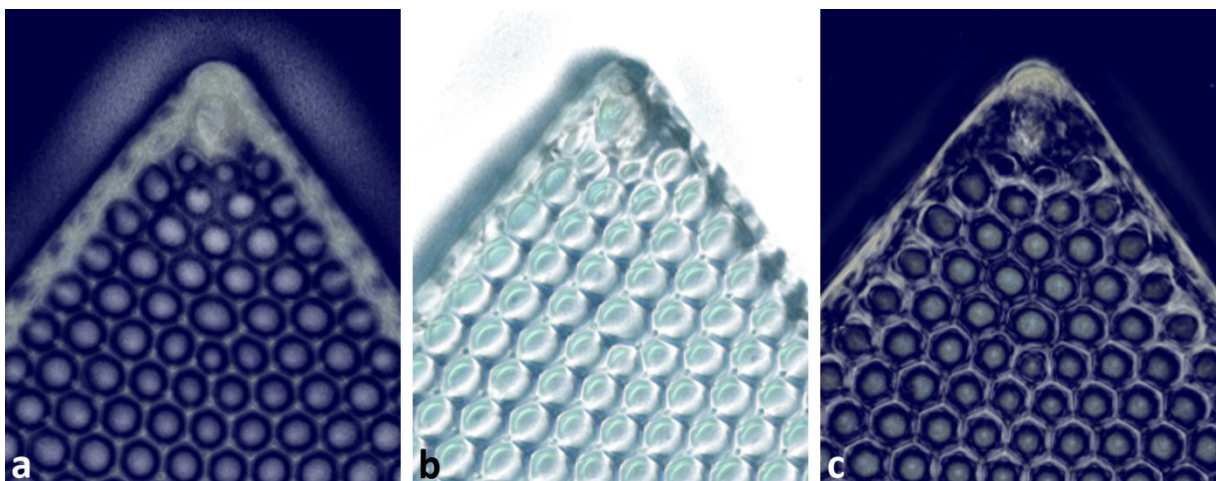
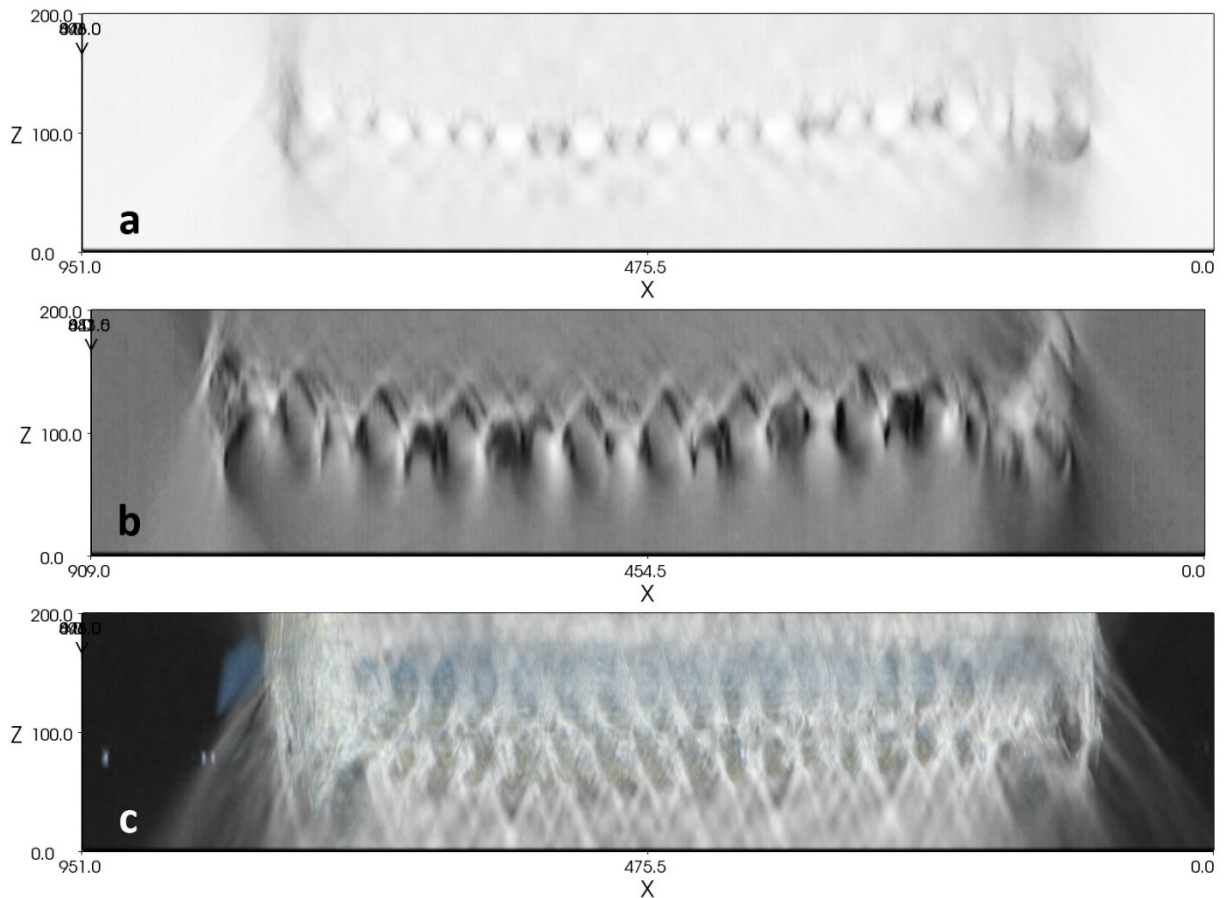


Abbildung 53: 3D-Stacks größerer Strukturen zur Verdeutlichung der Eignung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren für das 3D-Stacking, vergrößerte Ausschnitte aus Abbildung 51, mittlere Reihe (Valve von *Triceratium favus Ehrenberg*). a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. Die Visualisierung der Hellfeldaufnahmen ist ausreichend kontraststark und aufgelöst, die der DIK-Aufnahmen ist durch die Reliefartefakte schwer interpretierbar, die auf PhaKo-Daten basierende Darstellung wirkt durch zusätzlich erkennbare Details sehr deutlich, ist kontraststark und gut aufgelöst. Maßstab vergleiche Abbildung 48

Auf die Tiefendiskriminierung wirken sich DIK und PhaKo nachteilig aus, da die stark kontrastierten Strukturen auch außerhalb der Fokusebene deutlich zum Tragen kommen, während sie im Hellfeld schwächer wirken (s. Abbildung 54). Um feinere Strukturen darzustellen, müssen beim 3D-Stacking von Hellfeldaufnahmen jedoch auch schwach kontrastierte Objektanteile visualisiert werden, wodurch sich die Tiefenaufklärung wieder verringert. Die tatsächlich erreichbare Tiefendiskriminie-

rung ist nicht nur abhängig vom lichtmikroskopischen Verfahren, sondern auch vom Untersuchungsobjekt, daher kann keine abschließende Aussage über das am besten geeignete Verfahren getroffen werden.



**Abbildung 54:** Tiefendiskriminierung unterschiedlicher lichtmikroskopischer Verfahren am Beispiel einer Valve von *Tricratium favus* Ehrenberg, Bildstapel mit Ansicht quer zur Fokusebene in der X/Z-Ebene, Schnitt etwa auf halber Breite der Valve aus Abbildung 48, mittlere Reihe. a) Hellfeld, b) DIK, c) PhaKo. Die Tiefendiskriminierung erscheint im Hellfeld am besten (d.h. der Kontrast nimmt in Z-Richtung stark ab), der Kontrast ist jedoch schwächer als bei DIK und PhaKo und muß in der Visualisierung eventuell verstärkt werden, wobei die Tiefendiskriminierung wieder abnimmt. 1 Einheit  $\equiv$  0,1  $\mu$ m

Das anzuwendende lichtmikroskopische Verfahren sollte in Abhängigkeit von Größe und Kontrast der relevanten Objektstrukturen sowie der gewünschten Visualisierungstechnik gewählt werden. Tabelle 11 gibt hierfür Anhaltspunkte basierend auf den subjektiven Erfahrungen mit den in dieser Arbeit untersuchten Datensätzen, jedoch muss die Entscheidung im Einzelfall entschieden oder, wenn möglich, die Verwendung mehrerer Verfahren in Erwägung gezogen werden.

**Tabelle 11:** Eignung lichtmikroskopischer Verfahren in Abhängigkeit von Strukturgrößen und gewünschter Visualisierungstechnik. Für das 3D-Stacking erweist sich meistens das Hellfeld-Verfahren als besser geeignet, für das 2D-Focus-Stacking überwiegt die Eignung von DIK und PhaKo.

	Hellfeld	DIK	PhaKo
Kontrast grobe Strukturen	o	+	+
Artefakte grobe Strukturen	+	-	o
Kontrast feine Strukturen	-	+	o
Artefakte feine Strukturen	+	+	o
Tiefendiskriminierung	+	o	-
Eignung 2D-Focus-Stacking	o	+	+
Eignung 3D-Stacking	+	-/o	o

+ = gute, o = mittlere, - = schlechte Bewertung

## 6.2 Vergleich der Stackingverfahren

2D-Focus-Stacking mittels Helicon Focus und 3D-Stacking mit der selbst entwickelten Visualisierungstechnik erzeugen in der Aufsicht senkrecht zur Fokusebene vergleichbare Ergebnisse (s. Abbildung 55 a) und Abbildung 56 a).

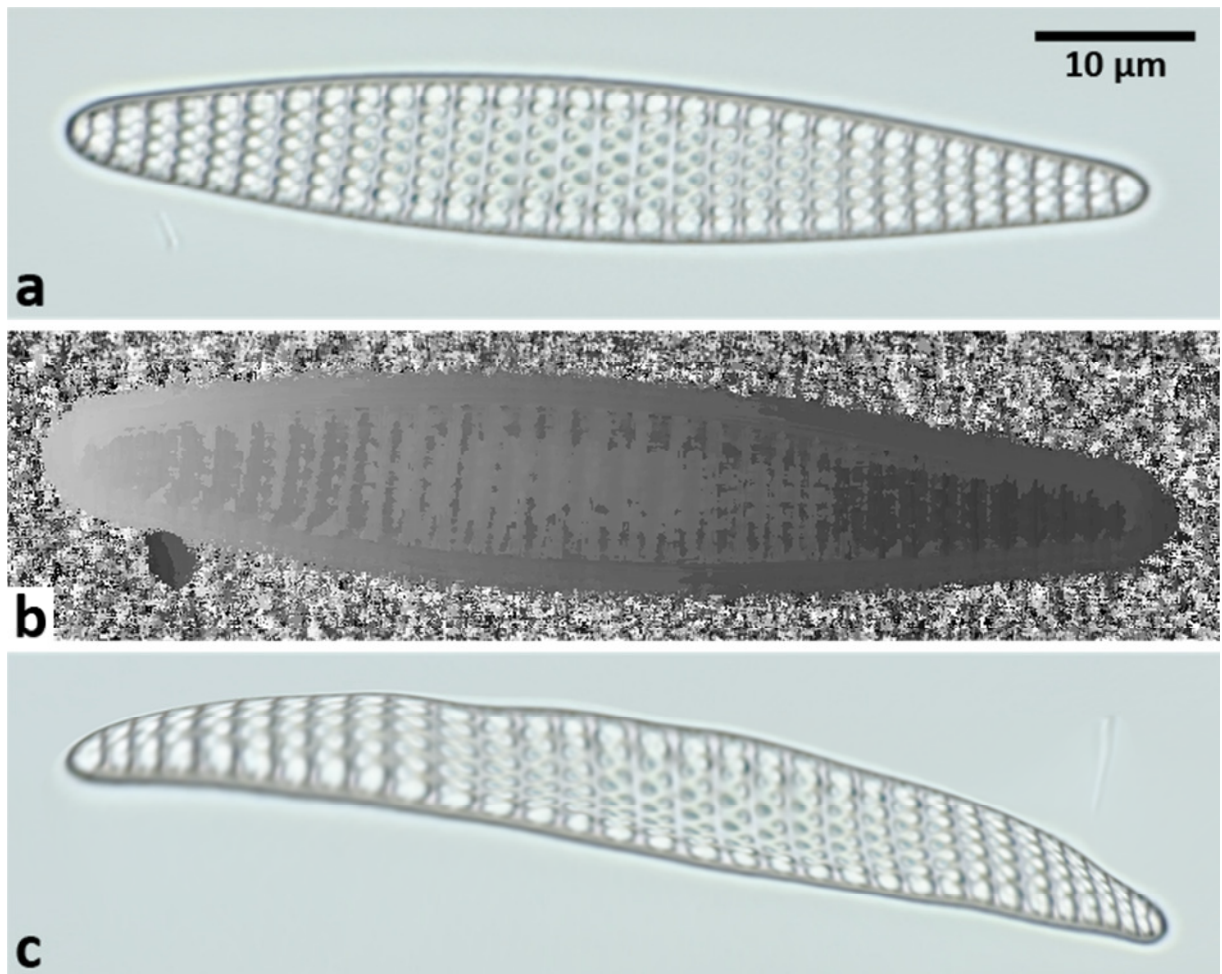
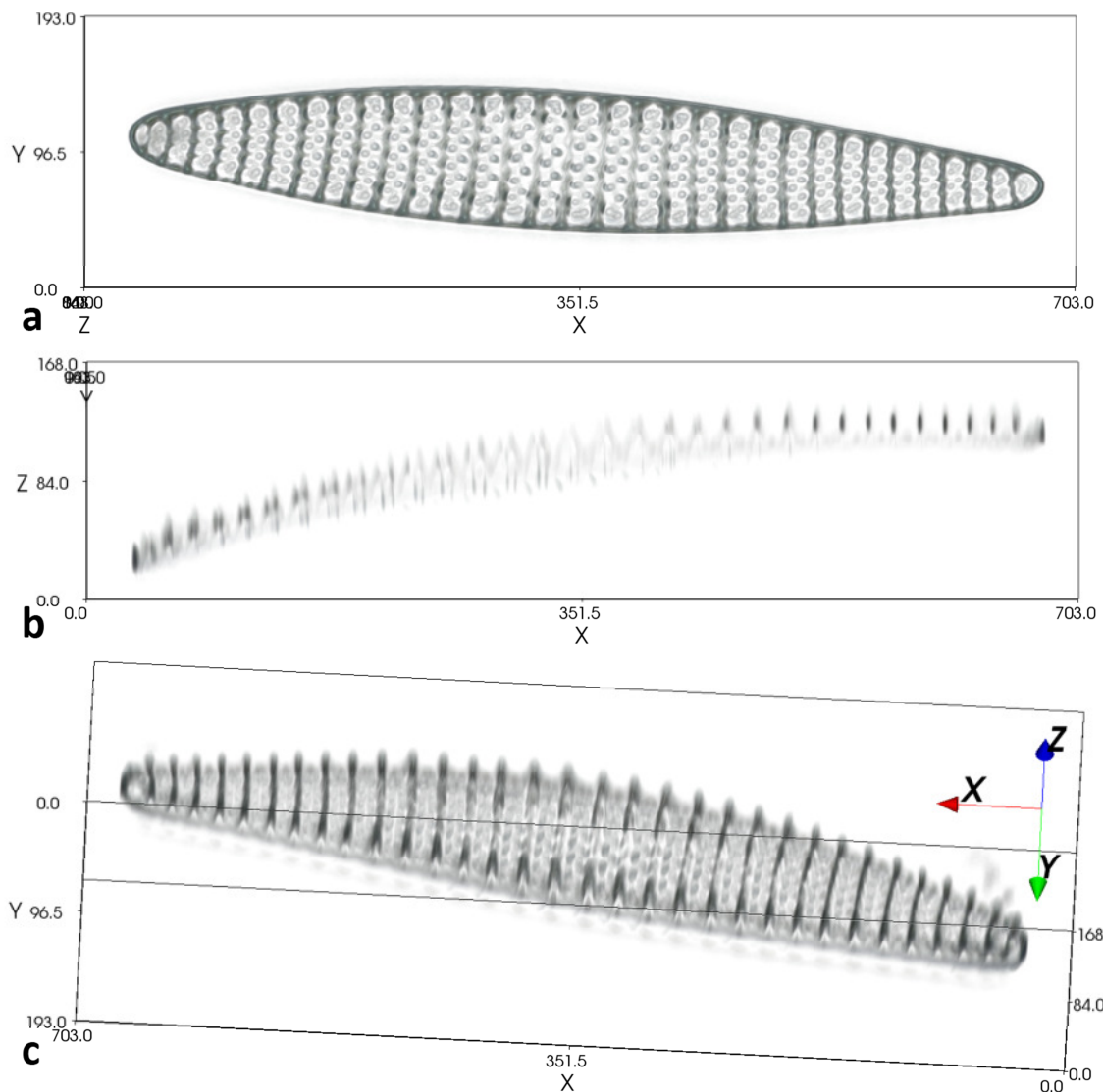


Abbildung 55: 2D-Focus-Stacking von Hellfeldaufnahmen einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*. a) 2D-Stack, b) Tiefenkarte, c) 2,5D-Visualisierung. Im 2D-Stack sind Beugungsartefakte im Zentralbereich der Valve zu erkennen, welche zu Fehlinterpretationen der Höheninformationen und damit zu einer fehlerhaften 2,5D-Darstellung führen (Vertiefung im Zentralbereich).

Die von Helicon Focus erzeugten Tiefenkarten und die daraus generierten 2,5D-Ansichten (s. Abbildung 55 b, c) sind wenig aussagekräftig, da nur eine einzelne Höheninformation pro Bildpunkt vorliegt. Diese beruht nicht auf der tatsächlichen Objektoberfläche, sondern entspricht der Ebene mit der stärksten lokalen Bildschärfe; diese Höheninformationen können fehlerhaft sein, wie Abbildung 55 c) anhand der Vertiefung des Zentralbereichs der Valve verdeutlicht.

Beim 3D-Stacking werden die Höheninformationen mit einer Schärfentiefe diskriminiert, die im Vergleich zur Auflösung innerhalb der Fokusebene deutlich reduziert ist (s. Abbildung 56 b). Die daraus abgeleiteten räumlichen Informationen sind jedoch verlässlicher als diejenigen aus der Tiefenkarte des 2D-Stacks und erlauben ein besseres Verständnis der dreidimensionalen Strukturen (s. Abbildung 56 c).



**Abbildung 56:** 3D-Stack von Hellfeldaufnahmen einer Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*. a) Aufsicht auf die Fokusebenen, b) Ansicht quer zur Fokusebene in der X/Z-Ebene, Tiefendiskriminierung durch Ausblenden kontrastschwacher Bereiche verbessert, c) Visualisierung mit vergleichbarem Ansichtswinkel wie Abbildung 55 c). In der Aufsicht auf die Fokusebene ergibt 3D-Stacking ähnliche Ergebnisse wie das 2D-Focus-Stacking, ermöglicht aufgrund der dreidimensionalen Informationen jedoch auch andere Perspektiven, wenn auch mit geringer Schärfentiefe. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

Die drei von Helicon Focus angebotenen Methoden zur Berechnung des 2D-Stacks verursachen unterschiedliche Artefakte vor allem bei feineren Strukturen im PhaKo. In Abbildung 57 wird ersichtlich, dass je nach verwendeter Berechnungsmethode unterschiedliche Bereiche der Areolenfelder unscharf bzw. durch Artefakte verfremdet abgebildet werden; zuverlässige Strukturanalysen sind auf dieser Grundlage nicht möglich. Die Visualisierung mittels 3D-Stacking (s. Abbildung 58) erzeugt einen anderen optischen Eindruck als das lichtmikroskopische Bild, zeigt jedoch keine deutlich auffallenden Unschärfe-Artefakte.

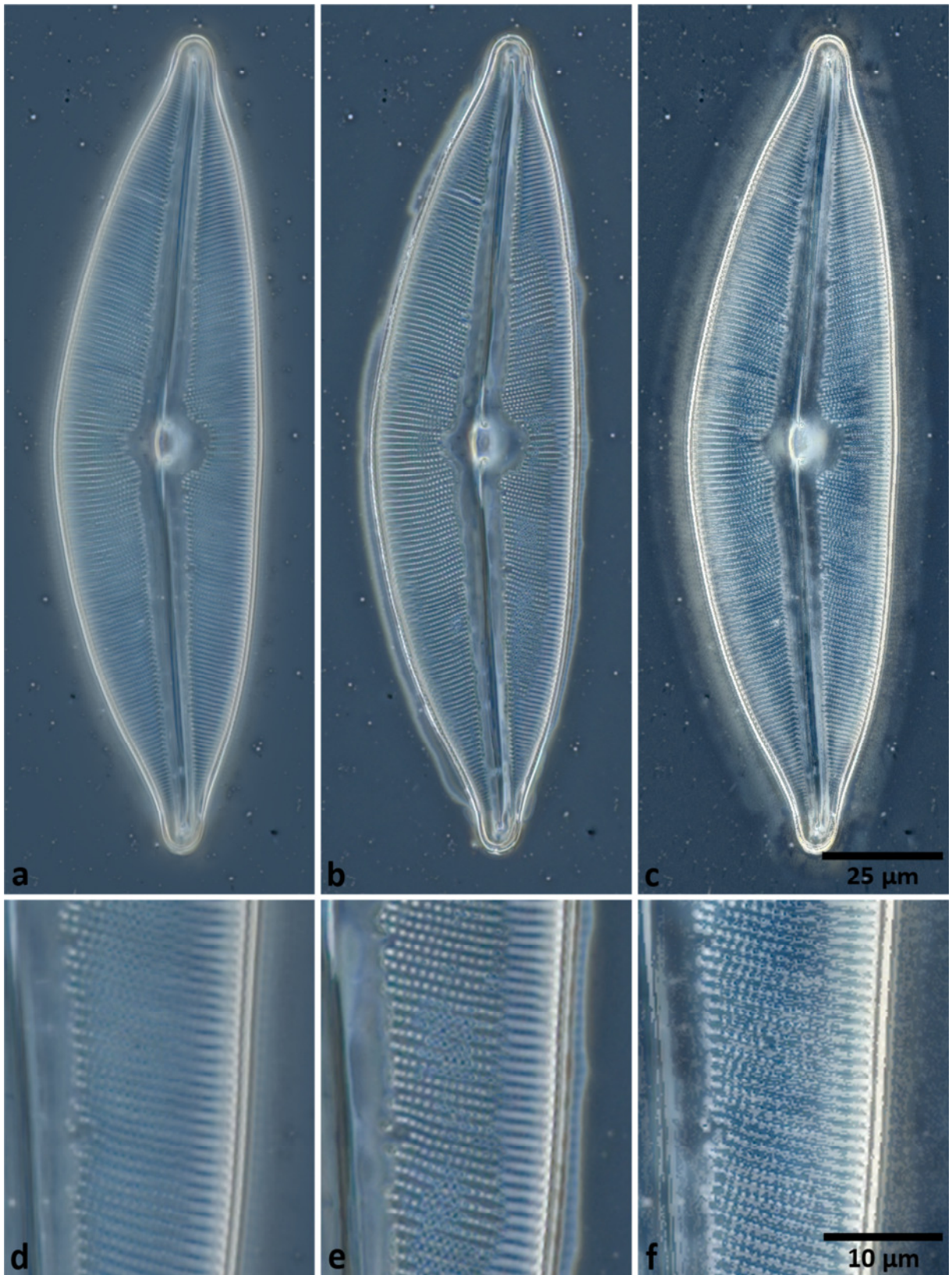


Abbildung 57: Artefaktbildung durch Verwendung unterschiedlicher Stackingmethoden bei Helicon Focus am Beispiel des 2D-Stacks einer Valve von *Cymbella ehrenbergii* im PhaKo. a) Methode A (g. Durchschnitt), b) Methode B (Tiefenkarte), c) Methode C (Pyramide), d-f) Ausschnittvergrößerungen aus a-c). Neben der unterschiedlich stark ausgeprägten Halo-Bildung rund um den Valvenrand erscheinen die Areolen und Striae in unterschiedlichen Bereichen unscharf bzw. durch Artefakte verfremdet.

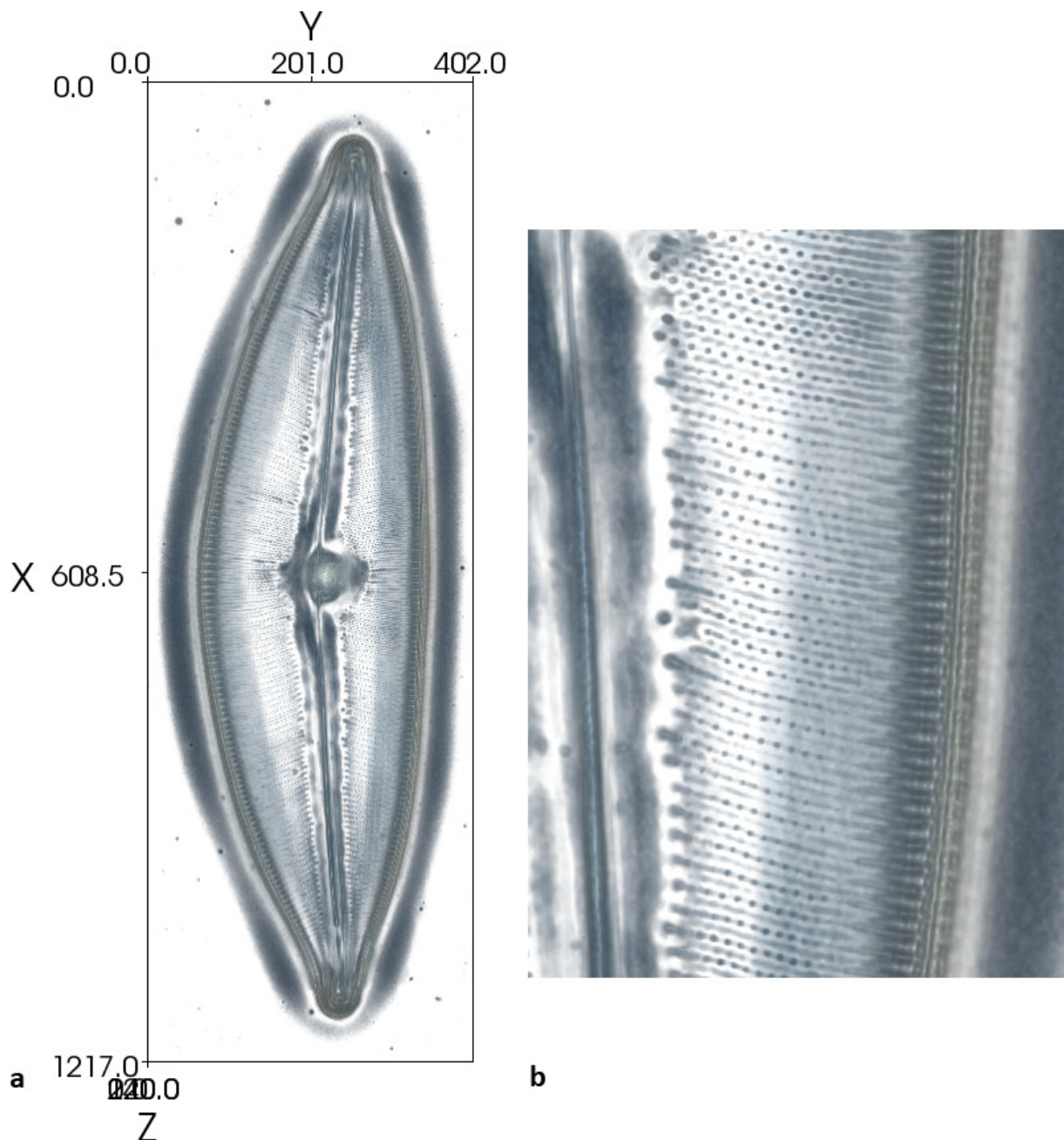
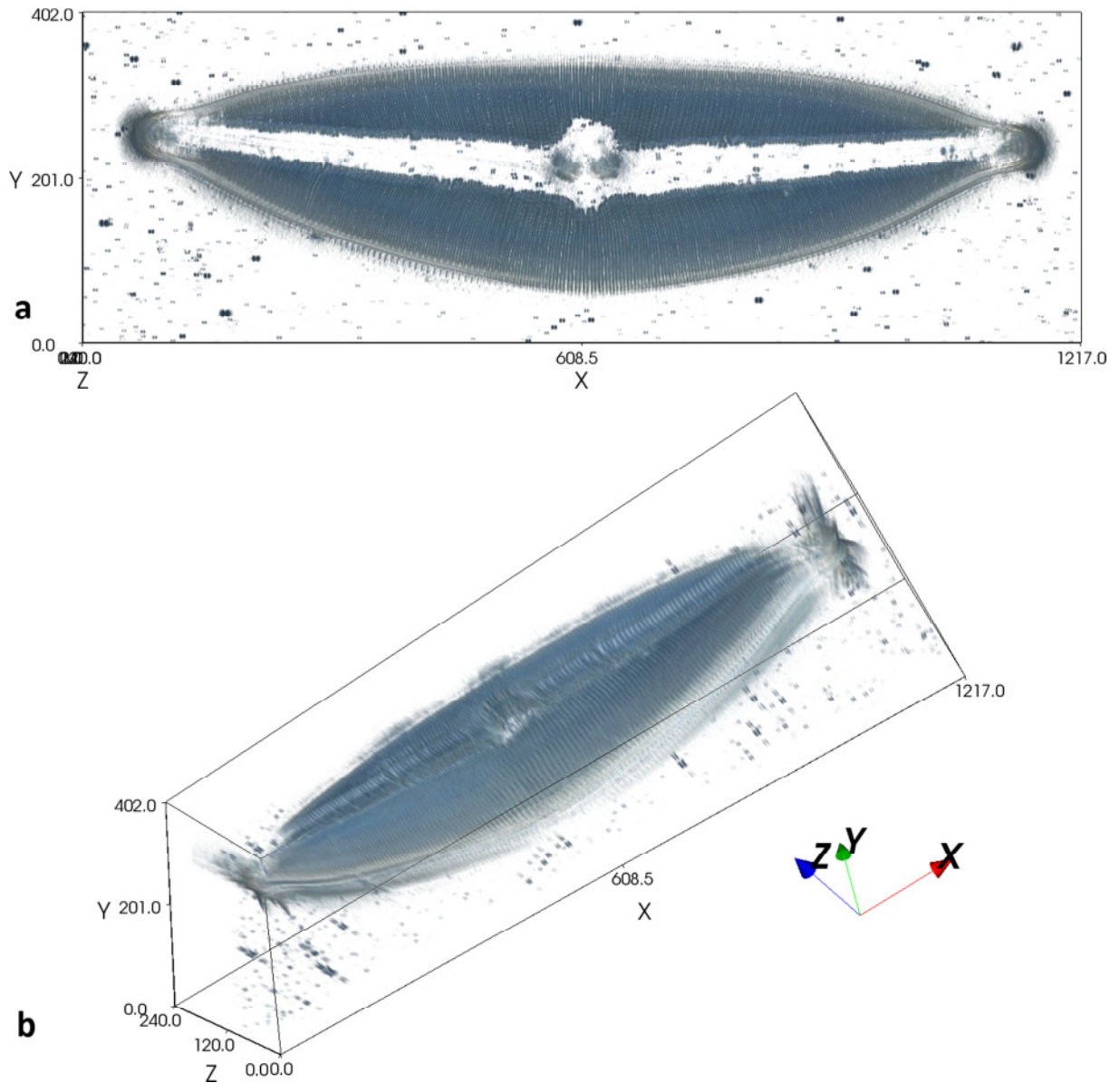


Abbildung 58: 3D-Stack einer Valve von *Cymbella ehrenbergii* im PhaKo, gleicher Datensatz wie in Abbildung 57. a) Aufsicht auf die Fokusebenen (X/Y-Ebene), b) Ausschnittvergrößerung. Es sind keine Artefakte erkennbar, welche zu einer deutlichen Strukturverfälschung führen würden, allerdings ist der optische Eindruck aufgrund der Visualisierungstechnik nicht mit dem lichtmikroskopischen Bild identisch. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

Die Verwendung des Sobel- statt des Hochpassfilters für die Segmentierung des 3D-Stackings (s. Abbildung 59) verstärkt den Kontrast erheblich und kann sogar zu stark übersteigerten Kontrasten führen, bei denen feine Strukturdetails nicht mehr erkennbar sind. Obwohl die Visualisierung mit Hilfe der Gradienten eine deutlich vom lichtmikroskopischen Bild abweichende Darstellung bietet, kann der räumliche Eindruck, besonders in der interaktiven, bewegten Ansicht, besser sein als im Vergleich zu Hochpass-gefilterten Daten, da Strukturen aufgrund des hohen Kontrastes klarer dargestellt werden.





**Abbildung 59:** 3D-Stack einer Valve von *Cymbella ehrenbergii* im PhaKo, gleicher Datensatz wie in Abbildung 57, Bildstapel mit Sobelfilter segmentiert. a) Aufsicht auf die Fokusebenen (X/Y-Ebene), b) perspektivische Ansicht. Die Anwendung des Sobelfilters ermöglicht eine deutlichere Darstellung, verfremdet jedoch das Erscheinungsbild feiner Strukturen. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

Auch die Visualisierung lebender Diatomeen, die nicht nur über eher flächig ausgeprägte Valvenstrukturen verfügen, sondern auch über großräumig dreidimensional ausgeformte Chromatophoren, gelingt mittels 3D-Stacking (s. Abbildung 61). Im Vergleich zum 2D-Stack (s. Abbildung 60) kann die räumliche Struktur der Chromatophoren gut nachempfunden werden, was jedoch am besten in der interaktiven Ansicht am Bildschirm gelingt.

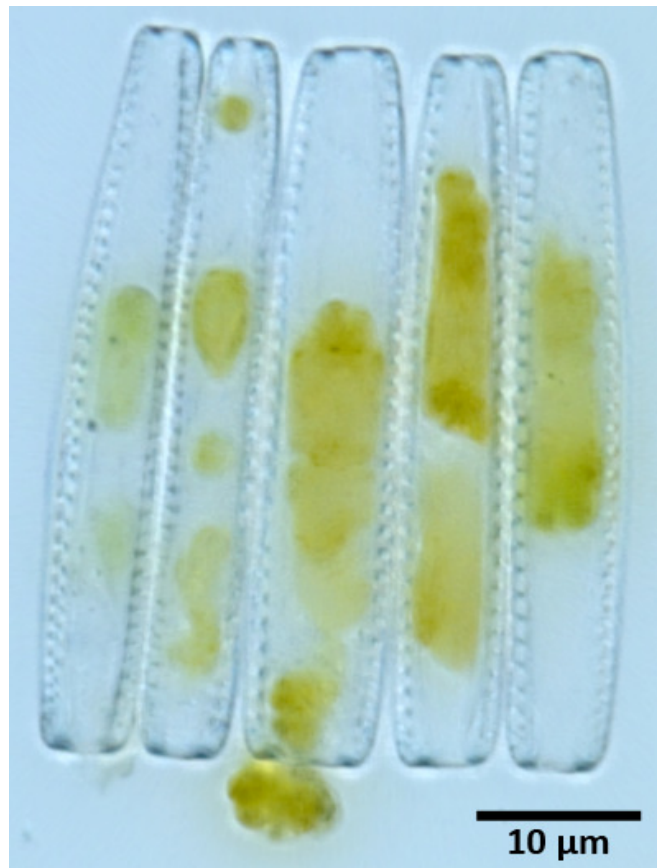


Abbildung 60: 2D-Stack von Hellfeldaufnahmen einer Kette von *Fragilariopsis kerguelensis*, der Kontrast wurde nachträglich verstärkt.

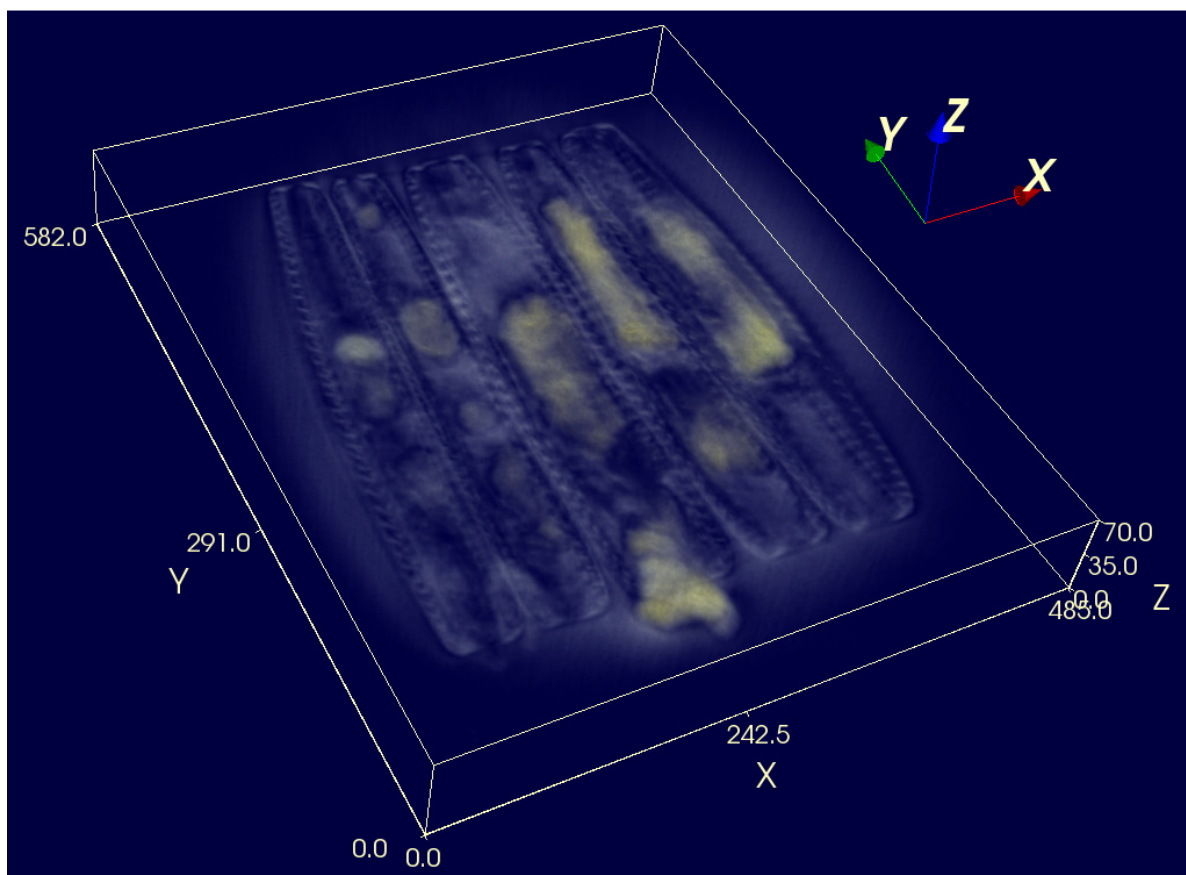


Abbildung 61: 3D-Stack von Hellfeldaufnahmen einer Kette von *Fragilariopsis kerguelensis*, gleicher Datensatz wie in Abbildung 60. Trotz schwachen Kontrastes ist die räumliche Struktur von Valven und Chromatophoren erkennbar. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

2D-Focus-Stacking erlaubt eine Darstellungsweise, die mit der lichtmikroskopischen Ansicht identisch ist, jedoch über eine deutlich erweiterte Schärfentiefe verfügt. Das zweidimensionale Ergebnis eignet sich besonders für statische Präsentationen. Die Visualisierung mittels 3D-Stacking vermittelt einen anderen optischen Eindruck als das gewohnte lichtmikroskopische Bild, da sie auf gefilterte Bildinhalte zurückgreift. Sie bietet in der Aufsicht senkrecht zur Fokusebene eine zum 2D-Focus-Stacking vergleichbare Auflösung und Detailfülle. Der volle Informationsgehalt eines 3D-Stacks wird jedoch erst in der interaktiven Darstellung erfassbar, da die Beobachtung aus unterschiedlichen Betrachtungswinkeln ermöglicht, räumliche Strukturen begreifbar zu machen. Mittels moderner Grafikkarten ist diese Art der Visualisierung in Echtzeit und stereoskopisch auf handelsüblichen PCs möglich, so dass sich mit dem 3D-Stacking eine neue Herangehensweise für die Datenanalyse bietet.

Die Entscheidung, ob 2D-Focus-Stacking oder 3D-Stacking verwendet werden soll, ist in Abhängigkeit von der vorgesehenen Verwendung der Darstellung zu fällen. Beide Verfahren verwenden dieselben lichtmikroskopischen Bildstapel als Ausgangsmaterial, daher können beide Visualisierungsarten angewendet werden, ohne das Untersuchungsobjekt erneut zu mikroskopieren.

### 6.3 Perspektivische Korrektur anhand von 3D-Stacks

Valven können aufgrund ihrer räumlichen Ausrichtung und ihres dreidimensionalen Aufbaus oft nicht so abgebildet werden, dass im 2D-Stack eine Aufsicht senkrecht zu den relevanten Strukturen möglich ist. Die durchgängige Bildschärfe des 2D-Stacks suggeriert zwar flache und senkrecht zur Objektivachse ausgerichtete Strukturen auch bei Objekten, die nur zu geringen Teilen innerhalb der einzelnen Fokusebenen liegen (s. Abbildung 62). Aufgrund der perspektivischen Verzerrung ist eine korrekte Analyse jedoch nicht möglich.

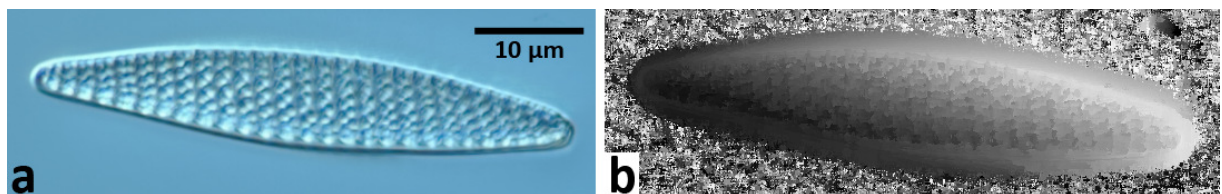


Abbildung 62: 2D-Focus-Stacking einer schräg zur Fokusebene liegenden Valve von *Fragilariopsis kerguelensis*. a) 2D-Stack, b) Tiefenbild. Die Valvenstrukturen sind deutlich perspektivisch verzerrt.

Auf Basis von 3D-Stacking hingegen kann die korrekte räumliche Lage der Valve ermittelt (s. Abbildung 63) und ein senkrecht zur Valvenoberfläche stehender Ansichtswinkel (s. Abbildung 64) gewählt werden.

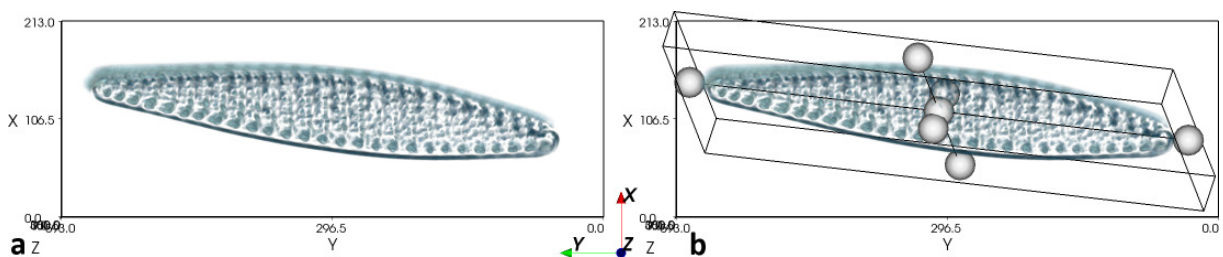
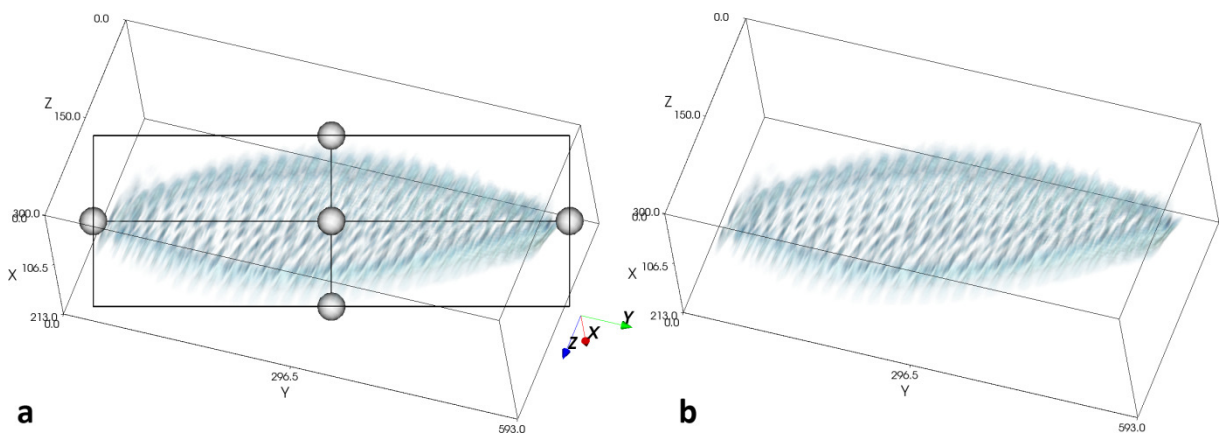


Abbildung 63: 3D-Stack derselben Valve wie in Abbildung 62. a) Aufsicht senkrecht zur Fokusebene, b) dieselbe Ansicht; die räumliche Lage der Valve ist durch Umfassung mit einem Quader verdeutlicht, die Enden der Valvenachsen sind durch Kugeln symbolisiert. Die Strukturen erscheinen in dieser Ansicht im Vergleich zu Abbildung 64 deutlich perspektivisch verzerrt. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu$ m

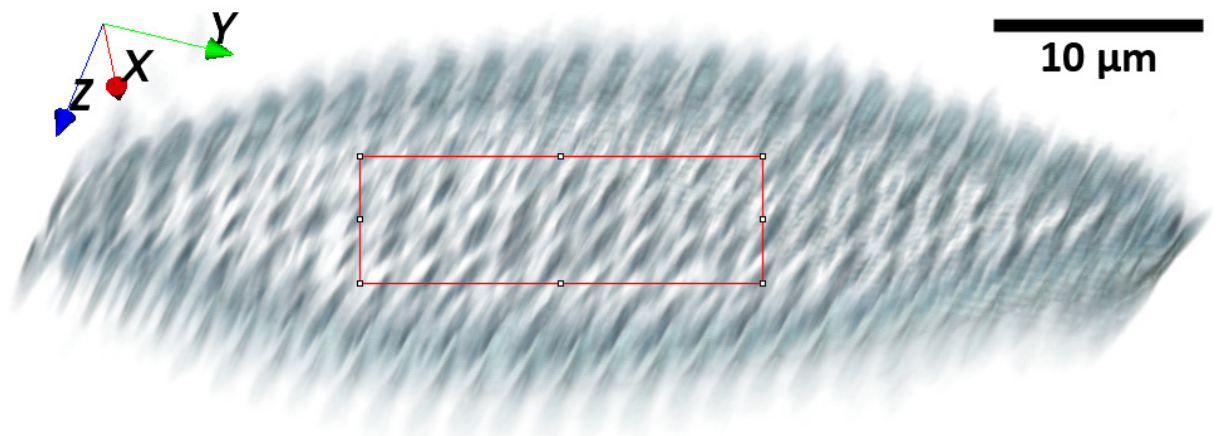


**Abbildung 64:** Derselbe 3D-Stack wie in Abbildung 63, perspektivisch als Aufsicht senkrecht zur Valvenoberfläche korrigiert. a) Die räumliche Lage der Valve ist durch Umfassung mit einem Quader verdeutlicht, die Enden der Valvenachsen sind durch Kugeln symbolisiert, b) die Grenzen und Ausrichtung des Bildstapels sind durch einen Quader verdeutlicht. Im Vergleich zur Aufsicht senkrecht zur Fokusebene in Abbildung 63 ergeben sich deutlich unterschiedliche Dimensionen der Strukturen. 1 Einheit  $\cong$  0,1  $\mu\text{m}$

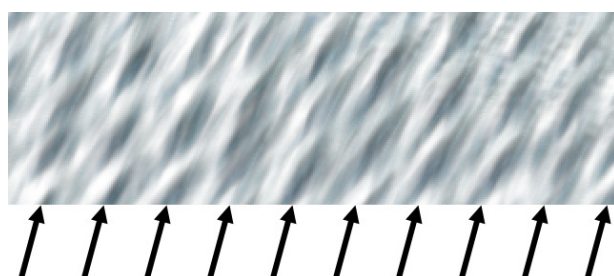
Strukturen werden in dieser korrigierten Ansicht unschärfer dargestellt, da Bildanteile auf die Abbildungsfläche projiziert werden, die aufgrund der geringen Tiefendiskriminierung schlecht aufgelöst sind. Für genügend große und kontraststarke Strukturen können nun jedoch Analysen ohne durch perspektivische Verzerrungen erzeugte Fehler erfolgen.

#### 6.4 Analyse repetitiver Valvenstrukturen in der Frequenzdomäne auf Basis von perspektivisch korrigierten 3D-Stacks

Auf Basis der perspektivisch senkrecht zur Valvenoberfläche projizierten Daten können repetitive Strukturen durch Untersuchungen in der Frequenzdomäne, d.h. im Powerspektrum der Fast-Fourier-transformierten, analysiert werden (s. Kapitel 4.3). Für die schräg innerhalb des Bildstapels liegende Valve aus Abbildung 64 wurde ein Ausschnitt mit einem deutlichen Striae-/Costae-Muster (s. Abbildung 65) in der Frequenzdomäne untersucht (s. Abbildung 67).



**Abbildung 65:** 3D-Stack einer Valve, die auf allen Achsen schräg in der Fokusebene liegt, in perspektivisch korrigierter Aufsicht senkrecht zur Valvenoberfläche. Der Bereich, der auf repetitive Strukturen untersucht werden soll, ist rot umrandet.



**Abbildung 66:** Darstellung des rot umrandeten Ausschnitts aus Abbildung 65. Die schwarzen Pfeile verdeutlichen repetitive Strukturen mit einem Abstand von 33 Pixeln.

Die repetitiven Strukturen erscheinen aufgrund der geringen Tiefendiskriminierung im 3D-Stack unscharf, können jedoch ausgewertet werden. Entsprechend Formel (50) konnte das Auftreten eines repetitiven Musters mit einer Breite von 33 Pixeln (s. Abbildung 66) ermittelt werden, was im Maßstab der Visualisierung ca. 2  $\mu\text{m}$  entspricht.

$$d = \frac{512 \text{ Pixel}}{\sqrt{15^2 + 3^2}} \cong 33 \text{ Pixel} \cong 2 \mu\text{m} \quad (51)$$

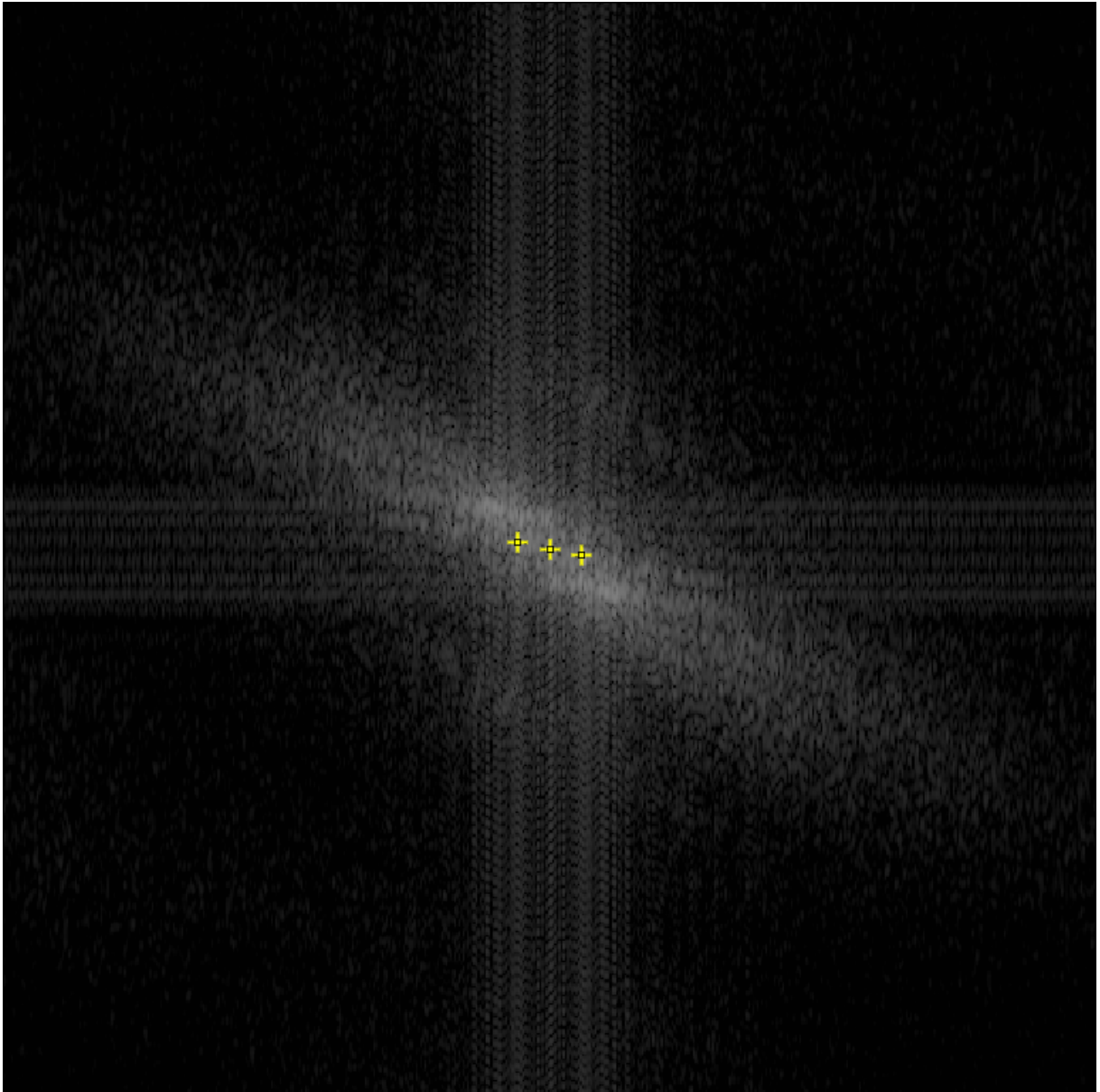


Abbildung 67: Powerspektrum der Fast-Fouriertransformierten des rot umrandeten Bildbereichs aus Abbildung 65. Die Positionen der drei stärksten Maxima sind gelb markiert, die beiden äußeren Maxima entsprechen der Wiederholungsfrequenz der repetitiven Muster aus Abbildung 66.

## 6.5 Vermessung von 3D-Strukturen für die taxonomische Analyse

Die dreidimensionale Vermessung von Strukturen ist, soweit bekannt, aufgrund des hohen Aufwands bisher kein übliches Verfahren für taxonomische oder morphometrische Klassifizierungen von Diatomeen. Innerhalb der durch die Tiefendiskriminierung lichtmikroskopischer Aufnahmen vorgegebenen Grenzen sind Ansätze denkbar, welche die Verfolgung dreidimensionaler Hüllen und die

Bestimmung von Volumina ermöglichen, die Entwicklung entsprechender Methoden war jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

## 6.6 Vergleich Chromophore – Schale

Die beobachtete Chlorophyll-Fluoreszenz blieb deutlich aus innerhalb des Zeitraums, der für die Erfassung eines kompletten Bildstapels notwendig war, und war für die Analyse mittels 3D-Stacking zu kontrastschwach. Einige Diatomeen wiesen darüber hinaus einen bakteriellen Aufwuchs auf, der die Kieselalgen aktiv so stark bewegte, dass trotz Andickung des Mediums keine für das 3D-Stacking brauchbaren Stapelaufnahmen möglich waren. Die Auswertung mittels 2D-Focus-Stacking war möglich, jedoch musste der Kontrast der Auflichtfluoreszenzaufnahmen deutlich verstärkt werden. Abbildung 68 zeigt das Ergebnis einer Fluoreszenzanalyse als 2D-Stack.

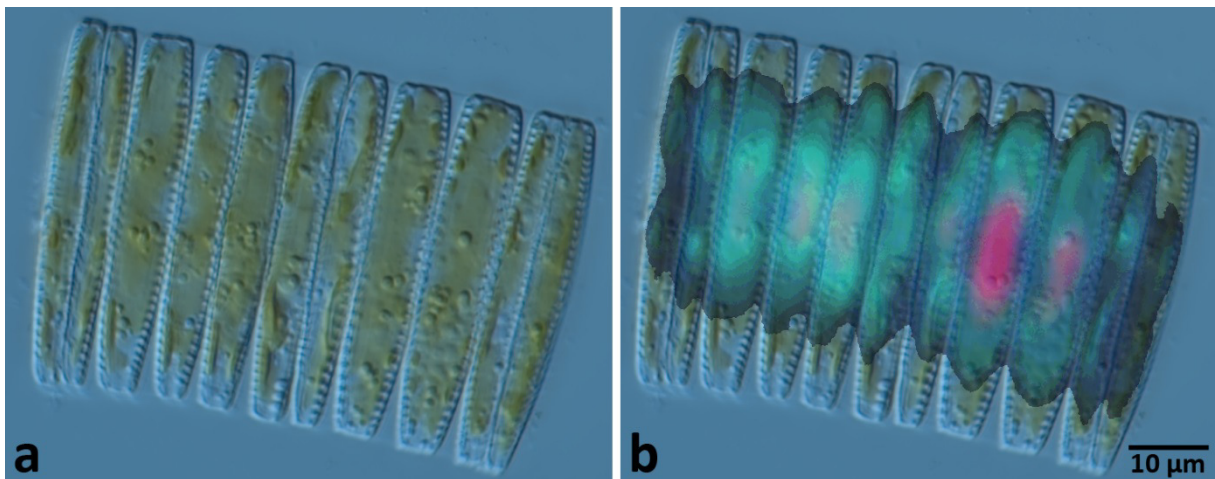


Abbildung 68: 2D-Focus-Stacking von Aufnahmen einer Kette von *Fragilariopsis kerguelensis*. a) DIK, b) DIK kombiniert mit dem kontrastverstärkten 2D-Stack von Auflichtfluoreszenzaufnahmen. Trotz schnellen Ausbleichens ist die Verteilung der Chromophore gut erkennbar.

## 7 Ausblick

Es wurde ein praxistaugliches ausbaufähiges System für die automatische Detektion und Vermessung von Valven der Diatomee *Fragilariopsis kerguelensis* und morphologisch ähnlicher Arten entwickelt. Darüber hinaus wurden Möglichkeiten zur weitergehenden Analyse taxonomisch und morphometrisch relevanter Strukturen untersucht. Die erzielten Ergebnisse und gesammelten Erfahrungen erlauben den Ausblick auf mögliche Weiterentwicklungen der Methodik.

### 7.1 Massenscreening

Das Programm „DiatoMorphoTo“ ist bereits in der praktischen Anwendung. Es bietet eine Reihe grundlegender Funktionen, ist jedoch auf Valven beschränkt, deren Umrisskontur keine konkaven Anteile enthält, da die Konturkonvexität als Beurteilungskriterium für die Klassifikation der Segmentierungsergebnisse verwendet wird. Da vorrangig Valven von *Fragilariopsis kerguelensis* und morphologisch ähnlicher Arten untersucht werden sollten, stellt diese Vorgehensweise keine Einschränkung dar, für eine Erweiterung des Erkennungsspektrums wäre jedoch die Entwicklung weiterer Qualitätsindikatoren erforderlich.

Die Verwendung des Adaptive Thresholding führt, wie in Kapitel 5.3 diskutiert, in der vorliegenden Umsetzung zu einer deutlichen Verfälschung der Ergebnisse, da um die segmentierten Valven herum ein Saum entsteht, welcher irrtümlich als Objekt klassifiziert wird. Würde dieser Saum auf den kompletten Bildhintergrund erweitert und das Ergebnis invertiert, würden hieraus deutlich genauere Ergebnisse resultieren. Das Adaptive Thresholding ergäbe dann ein brauchbares Segmentierungsverfahren. Alternativ könnten auch Konturen der zweiten Verschachtelungsebene analysiert werden, also diejenigen, die direkt innerhalb von Konturen liegen, welche ihrerseits im Bildhintergrund liegen.

Die Zuordnung der Valven zu passenden Templates, und damit ihre grobe morphologische Einteilung, geschieht durch das Matching der Hu-Invarianten von Valvenkontur und Templates. Diese Vorgehensweise könnte ergänzt werden um den Vergleich von Fourier-Deskriptoren bzw. Curvature Scale Spaces. Hierdurch würde die Zuordnung vermutlich deutlich verbessert; beide Verfahren sind für die Objektklassifikation in der Bildverarbeitung etabliert [44].

Durch Texturanalysen ließen sich Informationen nicht nur des Valvenumrisses, sondern auch der Struktur der Valvenfläche auswerten, was zu einer Verbesserung der Erkennungsrate und zu einer differenzierteren Klassifikation der Ergebnisse führen könnte.

Über die Vermessung von Länge, Fläche, Höhe und Breite der Valvenkontur hinaus könnten auf Basis der Textur weitere taxonomisch und morphometrisch relevante Merkmale wie z.B. die Abstände von Striae und Costae ermittelt werden.

Im Bereich der dreidimensionalen Strukturanalyse wurden Techniken für das 2D-Focus-Stacking und die perspektivisch korrekte Entzerrung von Strukturen auf Basis von 3D-Stacking vorgestellt. Diese könnten zur weiteren Verbesserung einer möglichen texturbasierten Merkmalsanalyse, zu einer höheren Ergebnisausbeute bei der Segmentierung und zu einer korrekteren Vermessung der Valven führen.

Die Verarbeitungsgeschwindigkeit von DiatoMorphoTo ließe sich deutlich steigern, wenn die in der aktuellen Version nur in einem einzelnen Thread ablaufende Segmentierung, Merkmalsextraktion und Konturanalyse parallelisiert würde. Die direkte Einbindung des Robust Automated Threshold Selectors über eine DLL statt des Aufrufs eines externen Executables könnte die Segmentierung be-

schleunigen. Da die Auswertung mehrerer Bilder problemlos parallelisiert werden kann und die Implementierung von RATS für eine der nächsten Versionen von SimpleITK vorgesehen ist, zeichnet sich ein deutliches Potential für die Beschleunigung ab.

Durch Verwendung mehrerer Parametersätze für jedes Segmentierungsverfahren könnte die Segmentierungsqualität verbessert und somit die Ergebnisausbeute gesteigert werden. Da die Entfernung von Ergebnisdoubletten bereits umgesetzt wurde, wäre diese Herangehensweise recht einfach umzusetzen.

Über die in dieser Arbeit untersuchten Segmentierungsverfahren hinaus bietet das ITK eine Reihe weiterer Methoden, die z.B. im Bereich der medizinischen Bildverarbeitung etabliert sind. Neue Segmentierungsverfahren können mit geringem Aufwand in DiatoMorphoTo integriert werden, was gleichfalls die Ergebnisausbeute verbessern könnte.

Die Umsetzung einiger der hier aufgeführten Ideen ist bereits innerhalb eines Folgeprojektes vorgesehen.

## **7.2 Strukturanalyse**

Möglichkeiten zur Analyse taxonomisch und morphometrisch relevanter Strukturen wurden besonders in Hinblick auf ihre dreidimensionale Ausprägung hin untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden jedoch nicht in Form fertig nutzbarer Verfahren umgesetzt, hierfür muss auf Folgeprojekte verwiesen werden. Die perspektivisch korrekte Entzerrung zweidimensionaler Projektionen von dreidimensionalen Valvenstrukturen erscheint als ein vielversprechender Ansatz. Für die dreidimensionale Vermessung wäre eine Verbesserung der Tiefendiskriminierung notwendig, wie sie durch Hellfeld-Dekonvolution erreichbar ist [45], [46]. Die für das 3D-Stacking notwendige Datenverarbeitung und Visualisierung existiert als fertig einsetzbare Software und kann als Ausgangspunkt für die Entwicklung entsprechender Verfahren genutzt werden.



## 8 Anhang

### 8.1 Anleitung DiatoMorphoTo

Das „Diatomeen Morphometrie Tool“ (DiatoMorphoTo) dient zur Analyse von Aufnahmen konvex geformter Diatomeenvalven. Hierbei werden Valven über sogenannte „Templates“ identifiziert, die als Vorlage für die Formerkennung dienen. Darüber hinaus werden eine Reihe morphometrischer Standardmaße wie Umfang, Fläche, Länge und Breite sowie mehrere Maßzahlen für die Konvexität des Valvenumrisses ermittelt.

Durch Bewertung dieser Faktoren wird abgeschätzt, wie zuverlässig die Erkennung der Valve funktioniert hat, und durch den Abgleich der Umrisskontur mit der Vorlage kann, innerhalb gewisser Grenzen, eine grobe, aber nicht taxonomisch verlässliche Zuordnung zu Morphotypen und Arten erfolgen.

Die Benutzeroberfläche des DiatoMorphoTo ist in drei Hauptbereiche gegliedert:

- „Templates“, hier erfolgt die Verwaltung der Vorlagen für die Valvenerkennung.
- „Images“, in diesem Bereich werden die Bilddateien zusammengestellt, die auf Valven untersucht werden sollen.
- „Contours“, hier werden die Einstellungen für die Konturanalyse vorgenommen und die Analyseergebnisse dargestellt.

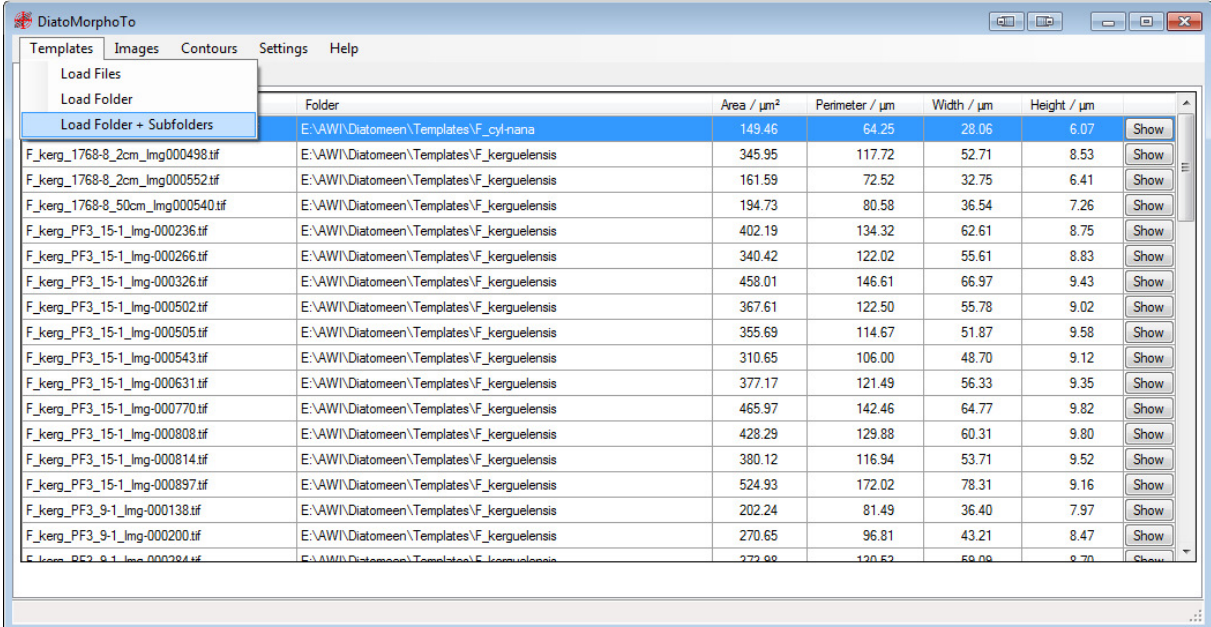
Darüber hinaus gibt es Funktionen zur Anzeige von Rohdaten, Zwischenschritten und Ergebnissen, die Einstellung von Parametern für die Bildverarbeitung, die manuelle Nachbearbeitung von Konturen und den Datenexport.

Die drei Hauptbereiche und weitere Funktionen werden im Folgenden beschrieben.

### 8.1.1 Templates

Als Vorlagen für die Konturerkennung dienen Template-Dateien. Dies sind Bilddateien der Formate TIFF, BMP oder JPEG, in denen auf schwarzem Hintergrund der Umriss der Valve weiß ausgefüllt dargestellt wird.

Unter dem Menüpunkt „Templates“ können einzelne Dateien, komplette Ordner oder komplette Verzeichnisbäume inkl. Unterordnern geladen werden. Eine geeignete Grundauswahl wird im Ordner „Templates“ mitgeliefert, dieser kann inkl. seiner Unterordner komplett geladen werden.



Folder	Area / $\mu\text{m}^2$	Perimeter / $\mu\text{m}$	Width / $\mu\text{m}$	Height / $\mu\text{m}$	
E:\AWI\Diatomeen\Templates\F_cyl-nana	149.46	64.25	28.06	6.07	Show
F_kerg_1768-8_2cm_img000498.tif	345.95	117.72	52.71	8.53	Show
F_kerg_1768-8_2cm_img000552.tif	161.59	72.52	32.75	6.41	Show
F_kerg_1768-8_50cm_img000540.tif	194.73	80.58	36.54	7.26	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000236.tif	402.19	134.32	62.61	8.75	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000266.tif	340.42	122.02	55.61	8.83	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000326.tif	458.01	146.61	66.97	9.43	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000502.tif	367.61	122.50	55.78	9.02	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000505.tif	355.69	114.67	51.87	9.58	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000543.tif	310.65	106.00	48.70	9.12	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000631.tif	377.17	121.49	56.33	9.35	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000770.tif	465.97	142.46	64.77	9.82	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000808.tif	428.29	129.88	60.31	9.80	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000814.tif	380.12	116.94	53.71	9.52	Show
F_kerg_PF3_15-1_img-000897.tif	524.93	172.02	78.31	9.16	Show
F_kerg_PF3_9-1_img-000138.tif	202.24	81.49	36.40	7.97	Show
F_kerg_PF3_9-1_img-000200.tif	270.65	96.81	43.21	8.47	Show
F_kerg_PF3_9-1_img-000284.tif	272.88	120.52	50.88	8.70	Show

Abbildung 69: Bereich „Templates“ mit geladenen Vorlagen und daraus generierten Konturdaten

Nach dem Laden werden Grundinformationen zu einigen morphometrischen Daten, die aus der Kontur abgeleitet werden können, in Listenform angezeigt. Diese Daten können, wie auch in den anderen Listendarstellungen, durch Anklicken der Spaltenköpfe sortiert werden.

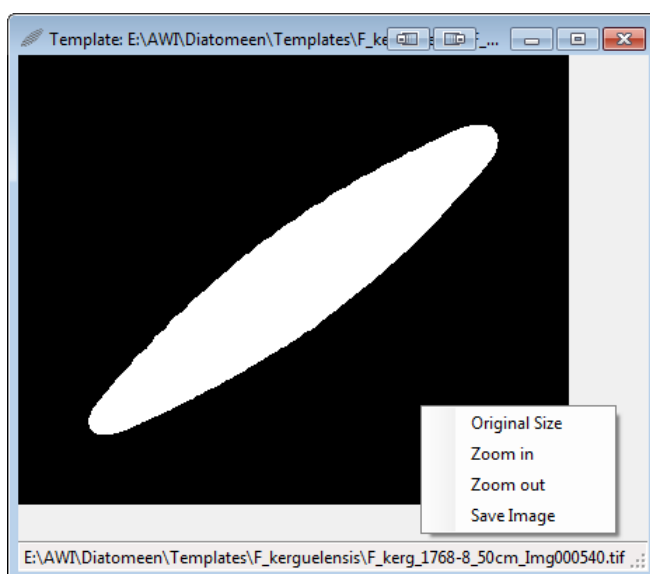


Abbildung 70: Anzeige eines Templates

Die Templates werden nach Anklicken des Buttons „Show“ graphisch dargestellt. Hierbei kann, wie bei fast allen Bilddarstellungen im DiatoMorphoTo, über das Mausrad gezoomt werden. Alternativ gelingt dies auch über das Markieren eines Bereichs durch Ziehen mit der linken Maustaste, sowie die Tasten „+“ und „-“. Über die Cursortasten und Scrollbalken kann der angezeigte Bildausschnitt verschoben werden. Ein Rechtsklick auf das Bild öffnet ein Kontextmenü, welches ebenfalls Funktionen zum Zoomen sowie zum Abspeichern der Bilddaten anbietet. Dieses Menü steht, außer beim manuellen Nachbearbeiten von Konturen, bei der Anzeige graphischer Daten grundsätzlich zur Verfügung.

## 8.1.2 Bilddaten

Analog zu den Templates können die zu untersuchenden Bilddateien als RGB- oder Graustufenbilder geladen werden. Beim Laden kompletter Ordner kann zusätzlich ein Filter für die Dateinamen angegeben werden, der mit den Wildcard-Zeichen „\*“ und „?“ arbeitet.

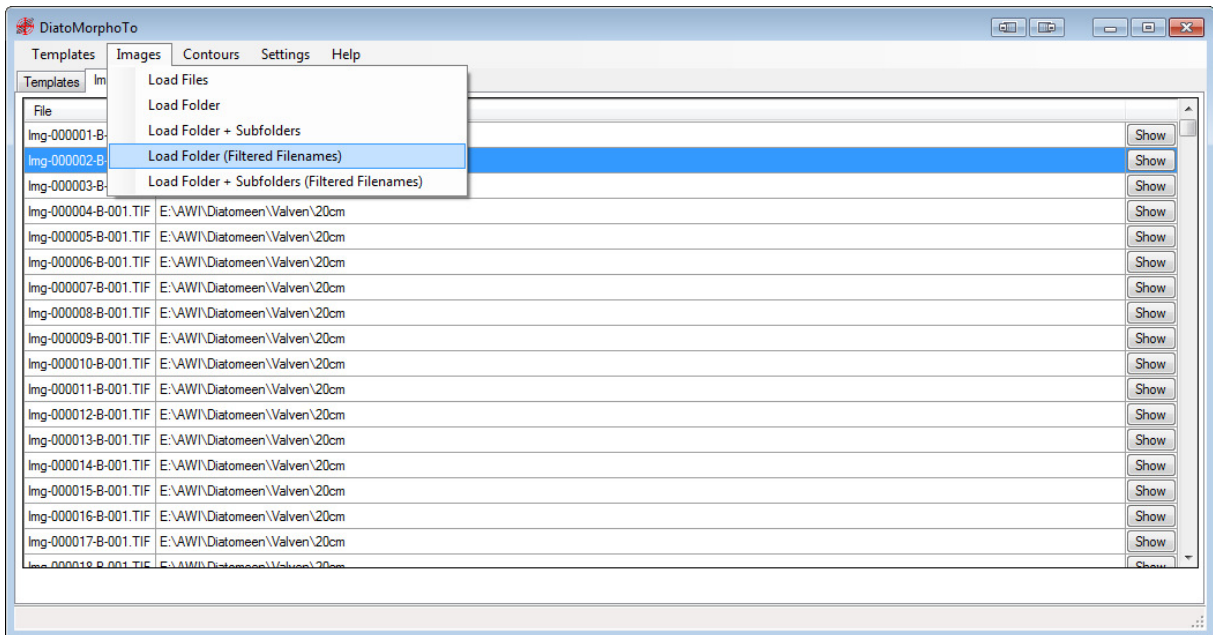


Abbildung 71: Bereich „Images“ mit geladenen Bilddateien

Nach Anzeige der Bilddaten durch Anklicken des Buttons „Show“ können verschiedene Segmentierungsverfahren ausprobiert und deren Grundeinstellungen für die spätere Konturanalyse festgelegt werden.

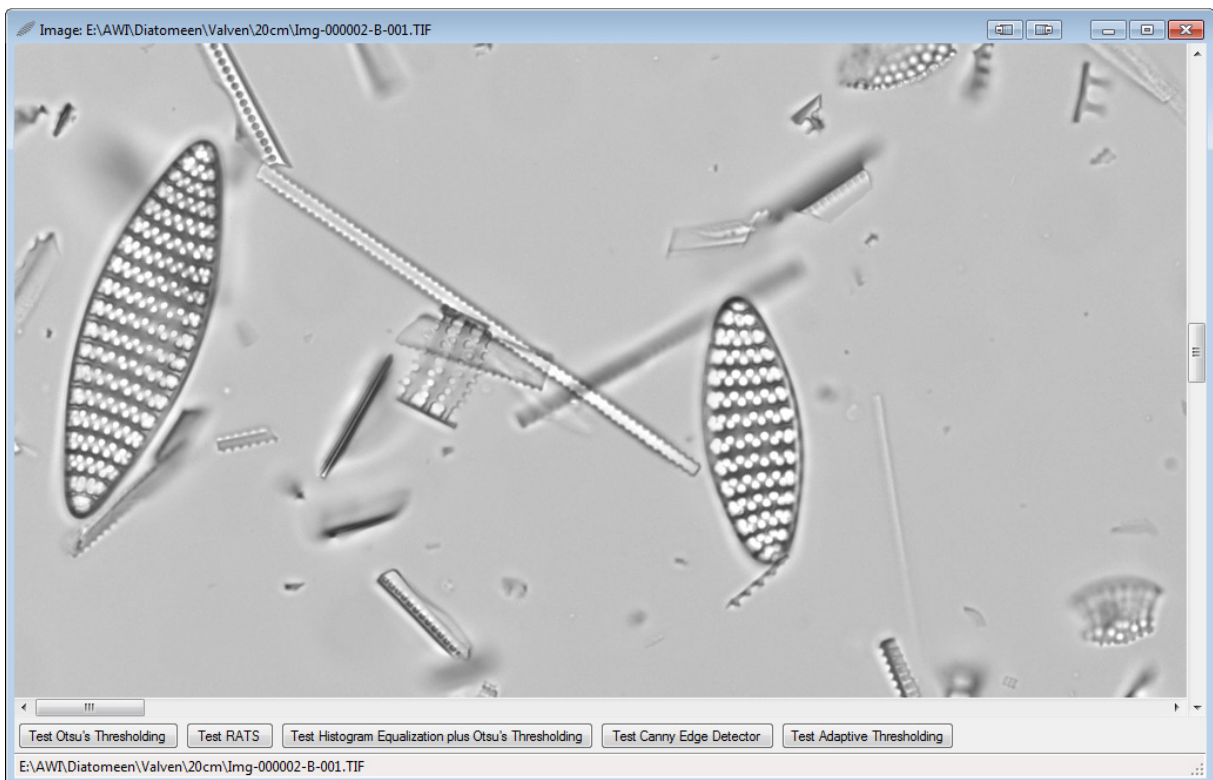


Abbildung 72: Anzeige von Bilddaten und Aufruf der verschiedenen Segmentierungsverfahren

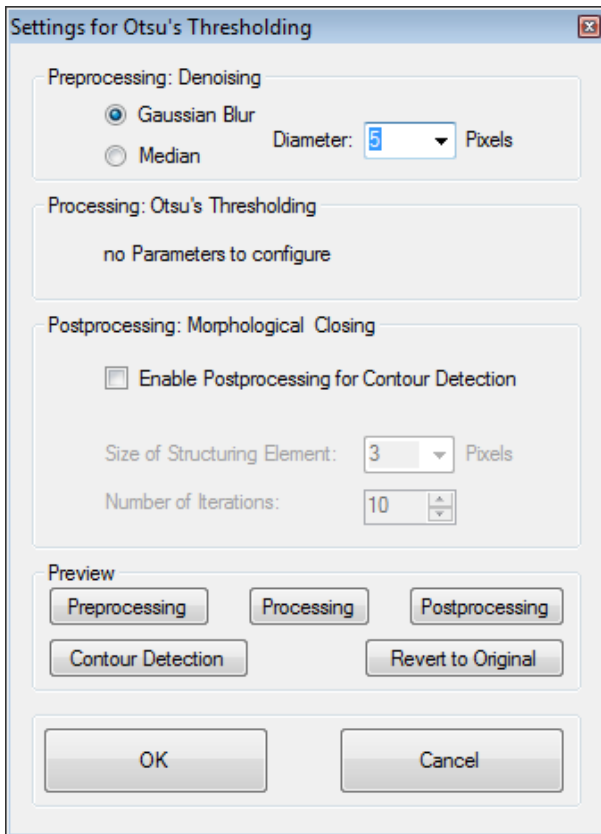


Abbildung 73: Einstellungen für die Segmentierung durch Otsu's Thresholding

Die Einstellungen für jedes der fünf Segmentierungsverfahren „Otsu's Thresholding“, „RATS“, „Histogram Equalization plus Otsu's Thresholding“, „Canny Edge Detector“ und „Adaptive Thresholding“ umfassen Parameter für das Preprocessing (Rauschreduktion durch Gauß- oder Medianfilterung) und das Postprocessing (Schließen von Konturlücken über ein optional anwendbares morphologisches Closing, um Defekte in den ermittelten Konturen auszugleichen).

Die Parameter für das jeweilige Segmentierungsverfahren werden im Bereich „Processing“ verwaltet, für „Otsu's Thresholding“ und „Histogram Equalization plus Otsu's Thresholding“ sind hier keine weiteren Einstellungen vorzunehmen.

Für den „Robust Automatic Threshold Selector“ (RATS) können das Sigma für die Gradientenberechnung und der Exponent, mit dem die Gradientenmagnituden in die Schwellwertberechnung eingehen, eingestellt werden.

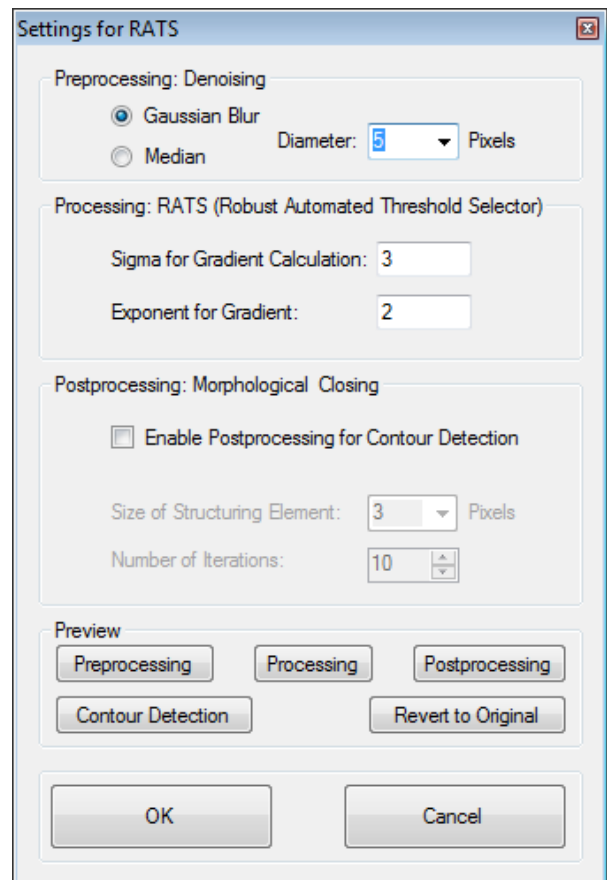


Abbildung 74: Einstellungen für die Segmentierung mittels RATS

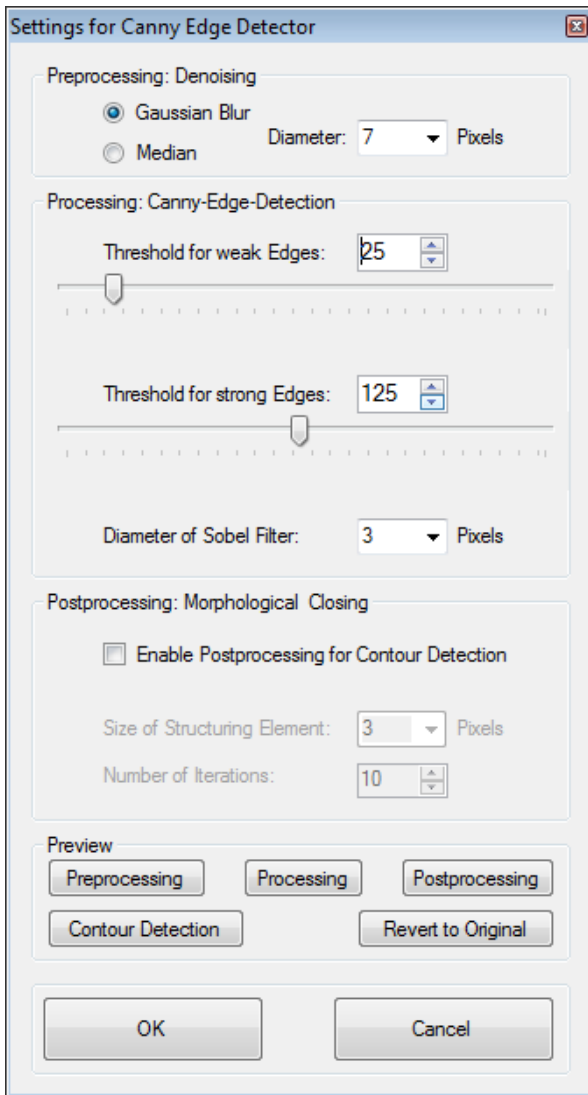


Abbildung 75: Einstellungen für die Segmentierung mit dem Canny Edge Detector

Für das „Adaptive Thresholding“ kann die Blockgröße, d.h. der Durchmesser der Nachbarschaft, die lokal für die Schwellwertbildung untersucht wird, angegeben werden.

Für den „Canny Edge Detector“ können die Schwellwerte für schwache und starke Kanten sowie der Durchmesser des Sobelfilters eingestellt werden.

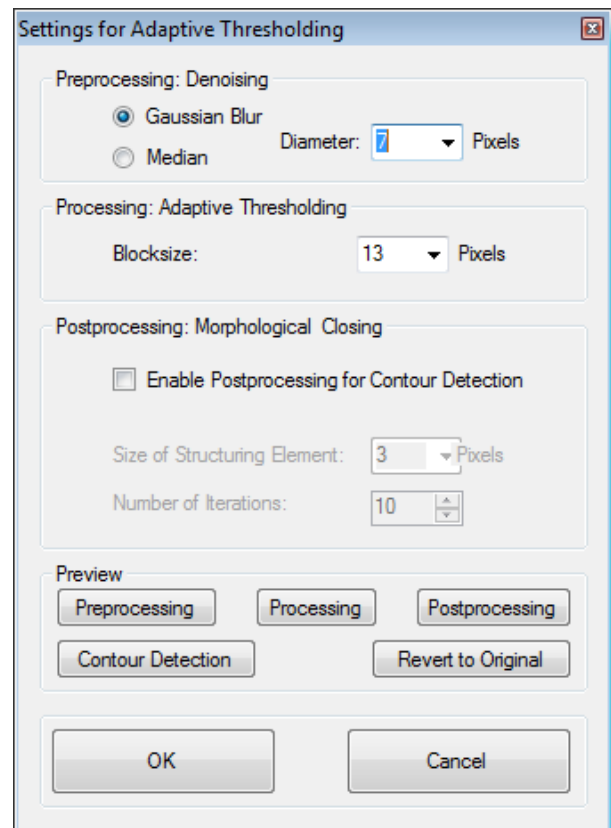


Abbildung 76: Einstellungen für die Segmentierung durch Adaptive Thresholding

Nach Einstellen der Parameter können die Ergebnisse des jeweiligen Segmentierungsverfahrens schrittweise unter „Preview“ nachvollzogen werden. „Preprocessing“ zeigt hierbei das per Gauß- oder Medianfilter rauschreduzierte Bild an.

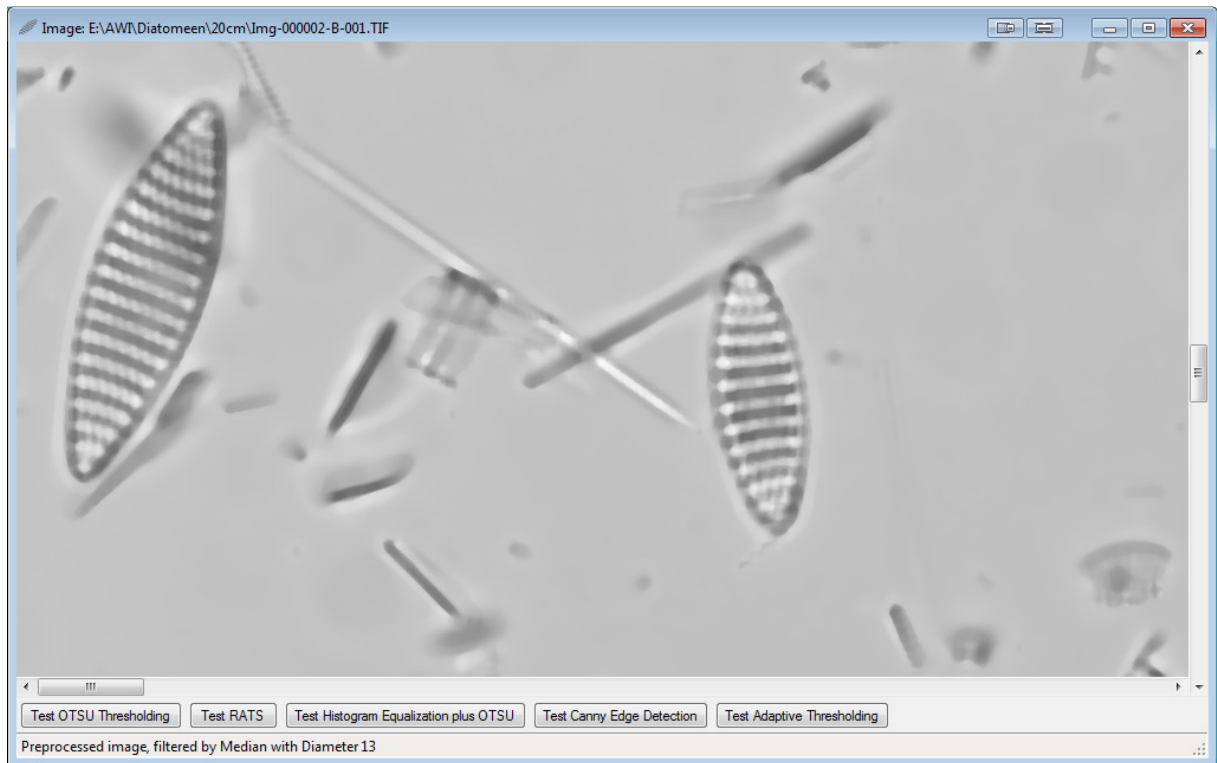


Abbildung 77: Vorschau des Ergebnisses der Rauschminderung (Preview → Preprocessing)

„Processing“ zeigt das Ergebnis der Segmentierung, welche auf die Rauschminderung folgt, entsprechend der gewählten Einstellungen.

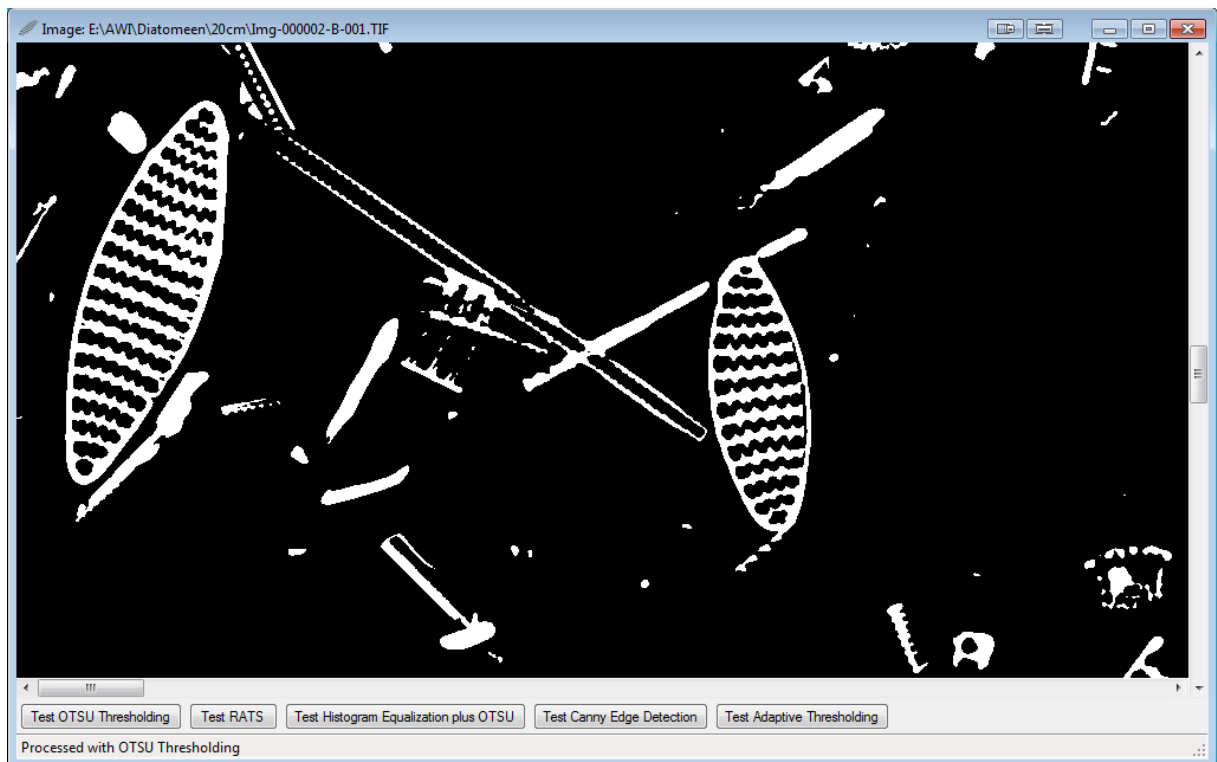


Abbildung 78: Vorschau des Segmentierungsergebnisses (Preview → Processing)

„Postprocessing“ zeigt das Ergebnis der Segmentierung nach Anwendung eines morphologischen Closings, auch dieses deaktiviert wurde. Das Closing dient zum Schließen kleinerer Lücken in der gefundenen Kontur, führt aber auch zum Verschmelzen nahe beieinanderliegender aber eigentlich getrennter Strukturen, so dass von der Anwendung im Regelfall abgeraten wird.

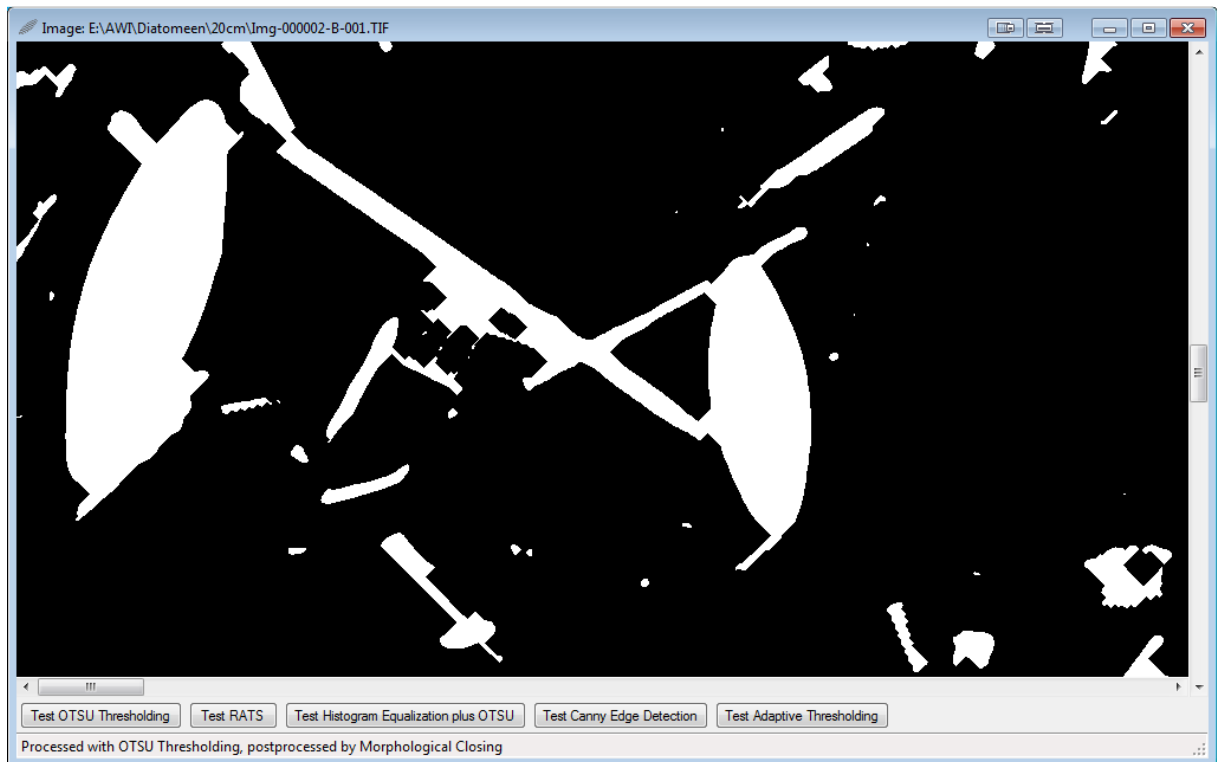


Abbildung 79: Vorschau für das Ergebnis des morphologischen Closings (Preview → Postprocessing)

„Contour Detection“ zeigt die ermittelten Konturen an, diese werden verschiedenfarbig hinterlegt.

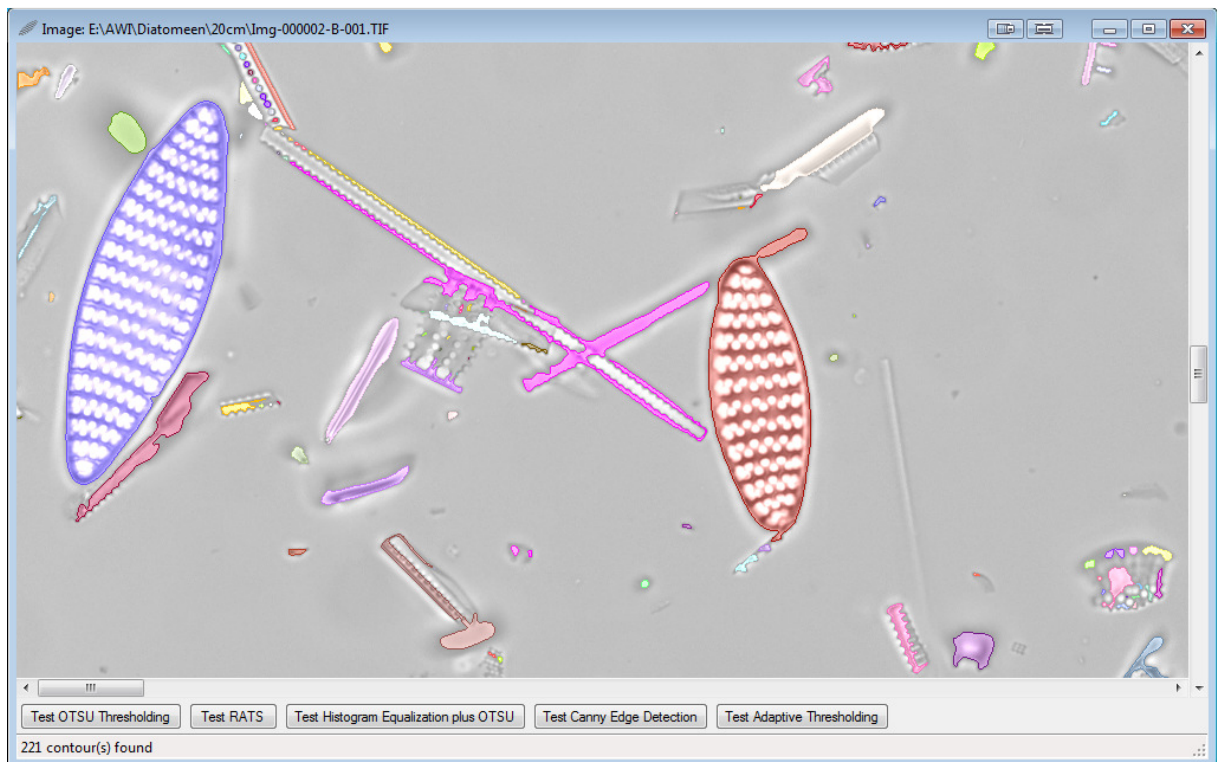


Abbildung 80: Vorschau Konturdetektion (Preview → Contour Detection)

„Revert to Original“ zeigt die originalen, ungefilterten Bilddaten an. Durch Anklicken des Buttons „OK“ werden die Einstellungen als Parameter des jeweiligen Segmentierungsverfahrens für die spätere Konturanalyse gespeichert. „Cancel“ verwirft die Einstellungen und behält die ursprünglichen Parameter bei.

### 8.1.3 Konturanalyse

Unter dem Menüpunkt „Contours“ → „Choose Segmentation Methods“ werden die zu verwendenden Segmentierungsverfahren ausgewählt, hier haben sich „Otsu’s Thresholding“, „Histogram Equalization plus Otsu’s Thresholding“, „Canny Edge Detector“ sowie „RATS“ bewährt. Da die Berechnung von RATS deutlich mehr Zeit benötigt als die anderen Verfahren, kann die Konturanalyse durch Verzicht auf dieses Verfahren deutlich beschleunigt werden, dies führt jedoch zu einer geringeren Ergebnisausbeute.

Die Verwendung von „Adaptive Thresholding“ liefert i.d.R. keine zusätzlichen brauchbaren Ergebnisse, da dieses Verfahren deutlich größere Konturen ermittelt als die anderen, die Tauglichkeit ist im Einzelfall abzuwägen.

#### 8.1.3.1 Validierung von Konturen mit „Must-Fit Parametern“

Konturen müssen, um weitergehend analysiert zu werden, die im roten Bereich angegebenen Bedingungen hinsichtlich Größe und Abstand zur Bildkante erfüllen. Hierbei sollten die Mindestgrößen für Konturen ausreichend groß gewählt werden, um auf Segmentierungsartefakten beruhende, sehr kleine Konturen auszuschließen. Mindestgrößen von  $75 \mu\text{m}^2$  für die Fläche und  $35 \mu\text{m}$  für den Umfang haben sich für *Fragilariopsis* bewährt. Die Maximalgröße sollte ausreichend groß für die Erkennung aller relevanten Konturen gewählt werden, und kann auf einen hohen Wert, z.B. 100.000, gesetzt werden.

Der Abstand zur Bildkante dient dazu, die Analyse von durch den Bildrand angeschnittenen Konturen zu vermeiden, ein Wert von 3 Pixeln hat sich bewährt. Alternativ können zur Vermeidung von Mehrfacherkennungen bei überlappenden Bildern auch Konturen außerhalb eines prozentual festgelegten Innenbereichs ignoriert werden.

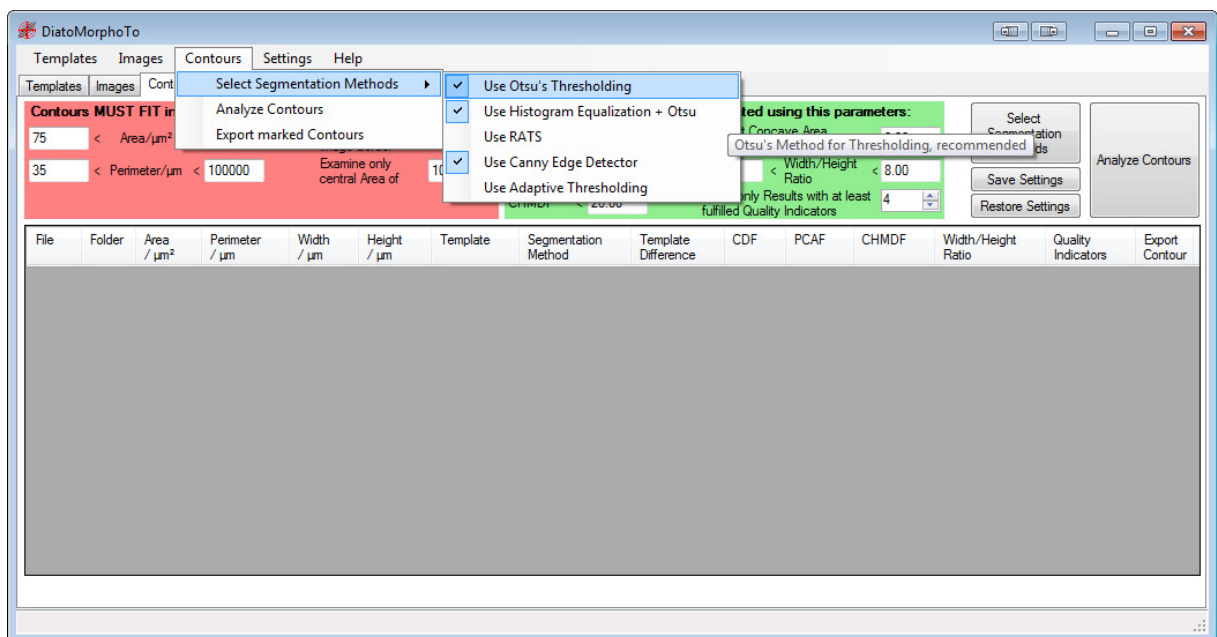


Abbildung 81: Bereich „Contours“ mit geöffnetem Menü für die Auswahl der Segmentierungsverfahren



### 8.1.3.2 Bewertung von Konturen mit Qualitätsindikatoren

Im grünen Bereich werden Einstellungen für fünf Qualitätsindikatoren (s.u.) vorgenommen. Diese ordnen die Kontur einem Template zu und bewerten die Güte der ermittelten Konturen. Somit geben sie ein Maß für die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Kontur in das gewünschte Suchmuster und zu einer korrekt segmentierten unbeschädigten Valve gehört.

Die „Template Difference“ ergibt sich aus einem Vergleich der Hu-Invarianten des Templates mit denen der zu analysierenden Kontur, hierbei wird der Wert für das am besten passende Template ermittelt. Je kleiner der Wert ist, desto besser stimmen Template und gefundene Kontur überein, ein Maximum von ca. 0,25 hat sich als geeignet erwiesen.

Der „Convexity Defection Factor“ CDF beschreibt die Unterschiede zwischen der gefundenen Kontur und der sie umschließenden konvexen Hülle. Hierzu werden die prozentualen Differenzen von Konturfläche und –umfang gemittelt. Bei Werten kleiner als ca. 1,05 sind die Konturen fehlerfrei oder mit nur minimalen Defekten versehen.

Die „Percent Concave Area Fraction“ PCAF gibt ein Maß für den konkaven Flächenanteil, das mit zunehmenden Konturdefekten ansteigt. Ein Wert von ca. 2,0 hat sich als geeignet erwiesen.

Der „Convex Hull Maximum Distance Factor“ gibt ein Maß für die Anzahl und Tiefe der Konvexitätsdefekte an. Hierzu wird über alle Konvexitätsdefekte der jeweilige maximale Abstand zwischen der Kontur und ihrer konvexen Hülle ermittelt und, falls der Wert über  $\sqrt{2}$  Pixel liegt, im Quadrat aufsummiert. Bei größeren Defekten steigt dieser Wert sehr steil an, der empfohlene Wert liegt bei ca. 20.

Über die „Width/Height-Ratio“ wird der akzeptable Bereich für das Breiten-/Höhenverhältnis auf Basis des kleinsten die Kontur umschließenden Rechtecks festgelegt. Für *Fragilariopsis* hat sich ein Bereich zwischen 2,0 und 8,0 bewährt.

Die Einstellungen für die Wahl der Segmentierungsmethoden, die „Must-Fit Parameter“ und die Qualitätsindikatoren werden mit „Save Settings“ permanent gespeichert, durch „Restore Settings“ werden die zuletzt gespeicherten Einstellungen wieder hergestellt.

Änderungen im „roten Bereich“ erfordern bei der Analyse eine komplette Neuberechnung der Konturen, Änderungen im „grünen Bereich“ erfordern nur einen nachgeschalteten Analyseschritt, der deutlich schneller ausgeführt wird.

### 8.1.3.3 Ergebnisse der Konturanalyse

Ein Klick auf den Button „Analyze Contours“ startet die Konturanalyse, welche mit „Cancel“ jederzeit abgebrochen werden kann, die bis dahin ermittelten Ergebnisse werden dann angezeigt.

File	Folder	Area / $\mu\text{m}^2$	Perimeter / $\mu\text{m}$	Width / $\mu\text{m}$	Height / $\mu\text{m}$	Template	Segmentation Method	Template Difference	CDF	PCAF	CHMDF	Width/Height Ratio	Quality Indicators	Export Contour
Img-00013-B-001.TIF	E:\AW\I\	94.75	45.05	19.22	6.71	Template-Mask.Img-00007-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.00130	1.032	1.29	0.00	2.865	5	Show
Img-00015-B-001.TIF	E:\AW\I\	195.14	69.87	30.58	8.63	Template-Mask.Img-000043-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.00131	1.033	1.28	0.00	3.545	5	Show
Img-00016-B-001.TIF	E:\AW\I\	306.30	88.05	38.92	10.80	Template-Mask.Img-000043-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.00164	1.031	1.01	0.00	3.602	5	Show
Img-00014-B-001.TIF	E:\AW\I\	215.54	68.39	29.36	9.96	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.01937	1.031	1.07	0.00	2.949	5	Show
Img-00031-B-001.TIF	E:\AW\I\	241.52	72.99	31.36	10.33	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.06446	1.031	0.83	0.00	3.037	5	Show
Img-00019-B-001.TIF	E:\AW\I\	180.89	73.04	32.55	7.91	Template.Img-000592-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.07558	1.036	1.42	0.00	4.113	5	Show
Img-00025-B-001.TIF	E:\AW\I\	87.57	43.28	18.15	5.99	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.08064	1.035	1.65	0.00	3.031	5	Show
Img-00034-B-001.TIF	E:\AW\I\	224.16	73.52	32.18	9.52	Template-Mask.Img-000035-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.08154	1.032	0.95	0.00	3.379	5	Show
Img-00020-B-001.TIF	E:\AW\I\	209.05	64.37	26.96	10.52	Template-Mask.Img-000040-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.08256	1.034	1.17	0.00	2.564	5	Show
Img-00021-B-001.IIF	E:\AW\I\	149.65	64.50	28.57	7.26	Template-Mask.Img-000008-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.08299	1.036	1.53	0.00	3.937	5	Show
Img-00033-B-001.TIF	E:\AW\I\	179.37	65.15	28.35	8.60	Template-Mask.Img-000035-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.09692	1.033	1.29	0.00	3.295	5	Show
Img-00010-B-001.TIF	E:\AW\I\	127.59	54.74	23.85	7.56	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	RATS	0.16229	1.034	1.64	0.00	3.156	5	Show
Img-00022-B-001.TIF	E:\AW\I\	315.31	86.09	37.69	11.41	Template-Mask.Img-000035-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.18090	1.029	0.83	0.00	3.304	5	Show
Img-00002-B-001.TIF	E:\AW\I\	263.96	79.28	34.79	10.62	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.18605	1.032	1.19	0.00	3.277	5	Show
Img-00017-B-001.TIF	E:\AW\I\	187.89	75.04	33.14	7.73	Template-Mask.Img-00010-B-001.tif	RATS	0.15270	1.039	1.59	2.45	4.287	5	Show
Img-00037-B-001.TIF	E:\AW\I\	164.28	66.45	29.21	7.74	Template-Mask.Img-000008-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.01769	1.038	1.70	2.48	3.772	5	Show
Img-00023-B-001.TIF	E:\AW\I\	129.98	58.24	25.06	6.59	Template-Mask.Img-000008-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.02605	1.041	1.85	5.09	3.805	5	Show
Img-00009-B-001.TIF	E:\AW\I\	340.74	104.28	46.51	10.06	Template-Mask.Img-000004-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.10596	1.039	1.40	8.95	4.622	5	Show
Img-00007-B-001.TIF	E:\AW\I\	120.47	52.88	22.83	7.46	Template-Mask.Img-000007-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.11162	1.038	1.66	12.05	3.063	5	Show
Img-00035-B-001.TIF	E:\AW\I\	351.13	111.31	49.79	9.76	Template-Mask.Img-000392-B-001.tif	RATS	0.14970	1.042	1.64	16.18	5.104	5	Show
Img-00014-B-001.TIF	E:\AW\I\	87.67	54.20	23.74	4.04	Template-Mask.Img-000164-B-001.tif	Canny Edge Detection	0.23495	1.025	2.66	11.07	5.884	4	Show
Img-00004-B-001.TIF	E:\AW\I\	284.70	82.89	35.70	10.77	Template-Mask.Img-000035-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.13386	1.039	1.58	26.96	3.315	4	Show
Img-00003-B-001.TIF	E:\AW\I\	251.99	79.45	34.08	9.80	Template-Mask.Img-000043-B-001.tif	RATS	0.06915	1.036	1.64	27.97	3.479	4	Show
Img-00011-B-001.TIF	E:\AW\I\	320.02	87.41	37.54	11.42	Template-Mask.Img-000035-B-001.tif	Histogram Equalization + Otsu	0.14036	1.037	1.30	32.84	3.286	4	Show
Img-00032-B-001.TIF	E:\AW\I\	328.48	95.74	42.36	10.46	Template-Mask.Img-000546-B-001.tif	Otsu's Thresholding	0.12160	1.037	1.42	36.13	4.048	4	Show
Img-00029-B-001.TIF	E:\AW\I\	379.33	104.79	46.06	11.54	Template-Mask.Img-000008-B-001.tif	RATS	0.12735	1.042	1.65	50.41	3.952	4	Show

Abbildung 82: Bereich „Contours“ nach erfolgter Konturanalyse

Zu den ermittelten Konturen werden Grunddaten wie das am besten passende Template, Fläche, Umfang, Höhe und Breite angezeigt. Letztere werden ermittelt auf Grundlage des kleinsten die Kontur umschließenden Rechteckes, das bei leichten Konturdefekten nicht immer orthogonal zur tatsächlichen Konturachse liegt. Der daraus resultierende Fehler ist jedoch gering.

Erfüllte Qualitätsindikatoren werden grün hinterlegt. Sind alle fünf Indikatoren erfüllt, wird das entsprechende Feld dunkelgrün hinterlegt. Standardgemäß werden die Ergebnisse nach der Anzahl der erfüllten Qualitätsindikatoren, dem „Convex Hull Maximum Distance Factor“, sowie der Güte der Template-Differenz sortiert. Durch Anklicken der Spaltenköpfe können jedoch auch andere Sortierkriterien festgelegt werden, wie z.B. die Segmentierungsmethode oder das am besten passende Template.

Gelegentlich kommt es vor, dass zu einer gefundenen Kontur kein passendes Template existiert. Dies zeigt sich dadurch, dass zwar die Indikatoren für CDF, PCAF, CHMDF und das Breiten-/Höhenverhältnis erfüllt werden, der Wert für die Template-Differenz jedoch leicht oberhalb des Grenzwertes liegt. Sollte die Kontur trotz fehlendem Template zu den gewünschten Ergebnissen gehören, empfiehlt es sich, für zukünftige Analysen ein zusätzliches Template anzulegen. Dies kann einfach über die Anzeige der Kontur erfolgen (s.u.).

Nach Anklicken von „Show“ wird die ausgewählte Kontur angezeigt. Die Konturfläche ist hierbei rot/lila, die konvexe Hülle blau eingefärbt, und das kleinste umschließende Rechteck grün eingezeichnet. In der Fußzeile kann ausgewählt werden, welche Anteile der Konturanalyse dargestellt werden sollen. Über einen Rechtsklick kann die Kontur direkt als Template-Datei abgespeichert wer-

den, wobei es sich empfiehlt, diese Datei in einem Bildverarbeitungsprogramm zu überprüfen und kleine Defekte in der Kontur auszubessern.

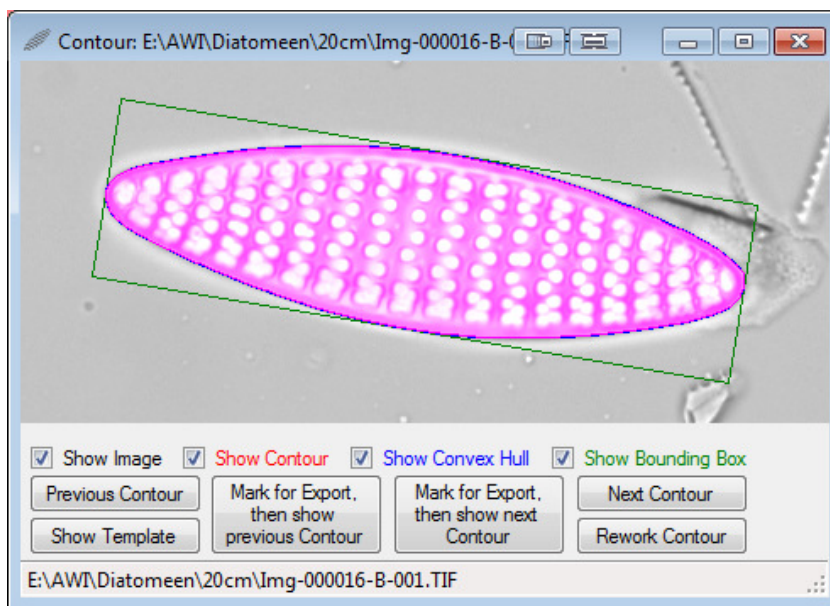


Abbildung 83: Anzeige einer Kontur

Über die Buttons „Previous Contour“ und „Next Contour“ kann schrittweise durch die Liste der analysierten Konturen geblättert werden, der jeweils selektierte Eintrag wird dabei im Hauptfenster angezeigt. Die Buttons „Mark for Export then show previous/next Contour“ wählen die Kontur beim Blättern gleichzeitig für den Export aus, ebenso das Drücken der „Shift“-Taste, während auf die Buttons „Previous/Next Contour“ geklickt wird.

Ein Rechtsklick auf das Bild ruft das Kontextmenü zum Zoomen und Abspeichern der Bilddaten auf, wobei die Kontur in diesem Fall über „Save as Template“ als Vorlage für zukünftige Konturanalysen abgespeichert werden kann.

#### 8.1.3.4 Manuelle Nachbearbeitung von Konturen

Der Button „Rework Contour“ im Fenster für die Konturdarstellung ermöglicht die manuelle Korrektur von Konturdefekten. Hierbei kann die Kontur mit der linken Maustaste erweitert, mit der rechten Maustaste reduziert werden, der Cursor funktioniert dabei als „Pinsel“. Da an dieser Stelle das durch einen Rechtsklick auf das Bild aufrufbare Kontextmenü fehlt, wird das Zoomen über das Mausrad bzw. die „+“ und „-“-Taste empfohlen, die Cursortasten dienen zum Scrollen. Bei gedrückter Leertaste wird die Kontur ausgeblendet, um die originalen Bilddaten überprüfen zu können. Drücken der Taste „c“ blendet die Bilddaten aus und zeigt nur die Kontur an. Nach dem Überarbeiten werden die Konturdaten in der Liste im Hauptfenster aktualisiert, dort die Segmentierungsmethode auf „Manually Reworked“ gesetzt.

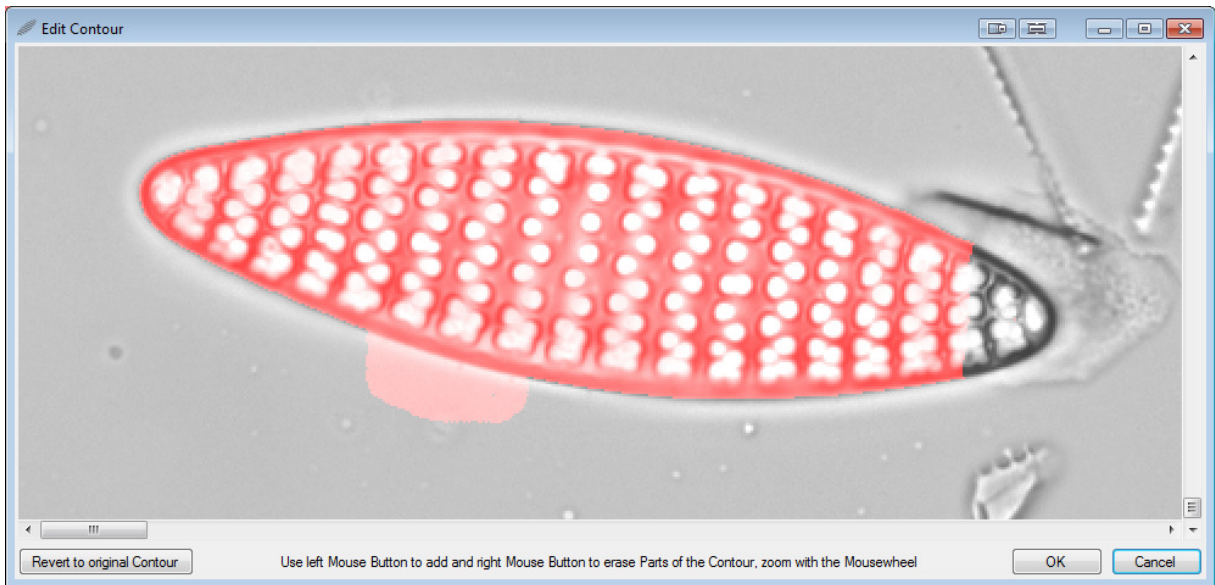


Abbildung 84: Manuelles Nachbearbeiten von Konturen

#### 8.1.3.5 Export der Konturdaten

Nach erfolgreicher Konturanalyse können die zum Export vorgesehenen Daten durch Markieren der Checkbox „Export Contour“ in der Konturliste bzw. während der Anzeige der Kontur über die Buttons „Mark for Export then show previous/next Contour“ ausgewählt werden. Ein Rechtsklick auf die Checkbox öffnet darüber hinaus ein Kontextmenü, mit dem alle angezeigten Konturen selektiert/deselektiert werden können. Der Menüpunkt „Contours → Export marked Contours“ startet die Exportfunktion, hierbei werden die Bereiche der Konturen aus den Bilddateien „ausgestanzt“ und im ausgewählten Verzeichnis abgespeichert. Die Daten der Konturanalyse werden in einer CSV-Datei gesichert, die direkt mit Excel geöffnet werden kann, dabei werden die Punktkoordinaten der Konturen in separaten CSV-Dateien abgespeichert.

#### 8.1.4 Settings

Über den Menüpunkt „Settings“ können der Faktor für die Umrechnung von Pixeln in Mikrometer angegeben sowie die Standard-Voreinstellungen für alle Parameter wiederhergestellt werden.

## 8.2 Literaturverzeichnis

- [1] E. Strasburger, Lehrbuch der Botanik, A. Bresinsky, Hrsg., Heidelberg: Spektrum, akademischer Verlag, 2008.
- [2] Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, „Botanik online: Algen - Chrysophyta“, [Online]. Available: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d44/44d.htm#baci>. [Zugriff am 12 05 2013].
- [3] K. Esser, Kryptogamen, Bd. 1. Cyanobakterien Algen Pilze Flechten, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer, 2000.
- [4] W. Yang, P. J. Lopez und G. Rosengarten, „Diatoms: Self assembled silica nanostructures, and templates for bio/chemical sensors and biomimetic membranes“, *Analyst*, pp. 42-53, 01 1022.
- [5] W. K. Purves, D. Sadava, G. H. Orians und H. C. Heller, Biologie, München: Elsevier GmbH, 7. Auflage 2006.
- [6] H. du Buf und M. M. Mayer, Automatic Diatom Identification, New Jersey, London, Singapore, Hong Kong: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2002.
- [7] C. Klaas und P. Assmy, „Fragilariopsis kerguelensis - eine Schlüsselart für den globalen Silikatkreislauf“, *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 63 (8), pp. 2-3, 2010.
- [8] G. Kauer, „Kieselgur - Eine reichhaltige Quelle fossiler Diatomeenschalen. Teil 1: Zur Biologie der Diatomeen“, *Mikrokosmos 95, Heft 1*, pp. 55-58, 2006.
- [9] F. Hinz und S. Jansen, *Flyer "Friedrich-Hustedt-Zentrum für Diatomeenforschung"*, Bremerhaven: Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in der Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren.
- [10] J. Fenner, H.-J. Schrader und H. Wienigk, „Diatom phytoplankton studies in the southern Pacific Ocean, composition and correlation to the Antarctic convergence and its paleoecological significance“, Texas A & M University, Ocean Drilling Program, College Station, TX, United States, 1976.
- [11] G. Kauer, „Kieselgur - Eine reichhaltige Quelle fossiler Diatomeenschalen. Teil 2: Kieselgur = Kieselerde = Diatomit“, *Mikrokosmos 95, Heft 2*, Bd. 95, pp. 87-95, 2006.
- [12] Cardiff University, Wales, and the Royal Botanical Garden Edinburgh, Scotland, „Diatom and Desmid Identification by Shape and Texture - the DIADIST Project“, [Online]. Available: <http://rbg-web2.rbge.org.uk/DIADIST/>. [Zugriff am 27 03 2013].

- [13] M. Kelly und R. Telford, „Common Freshwater Diatoms of Britain and Ireland. An interactive identification key“, the Environment Agency, UK, Bristol, 2007.
- [14] R. C. Gonzalez und R. E. Woods, Digital Image Processing, Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2008.
- [15] Eindhoven University of Technology, „ADIAC Identification Web Demo“, [Online]. Available: <http://www.win.tue.nl/~mwestenb/adiac/index.html>. [Zugriff am 27 03 2013].
- [16] Cardiff University, Wales, „DIADIST: Diatom and Desmid Identification by Shape and Texture“, [Online]. Available: <http://www.cs.cf.ac.uk/diadist/code.htm#>. [Zugriff am 27 03 2013].
- [17] Environment Agency UK, „River diatoms: a multiaccess key“, [Online]. Available: <http://craticula.ncl.ac.uk/EADiatomKey/html/Charactersets.html>. [Zugriff am 27 03 2013].
- [18] M. Kloster, „Bachelorarbeit: 3D-Visualisierung von Bildstapeln mikroskopischer Volumendaten“, Fachhochschule Emden/Leer, Emden, 2009.
- [19] M. Kloster, „Projektbericht: Erweitertes System für die 3D-Visualisierung lichtmikroskopischer Bildstapel“, Hochschule Emden/Leer, Emden, 2012.
- [20] G. Kauer, „Hochschule Emden/Leer: E.L.M.I.“, [Online]. Available: <http://www.hs-emden-leer.de/forschung-transfer/projekte/elmi.html>. [Zugriff am 18 05 2013].
- [21] H. Handels, Medizinische Bildverarbeitung: Bildanalyse, Mustererkennung und Visualisierung für die computergestützte Ärztliche Diagnostik und Therapie, Wiesbaden: Vieweg+Teubner, GWV Fachverlage GmbH, 2009.
- [22] C. Solomon und T. Breckon, Fundamentals of digital image processing: a practical approach with examples in Matlab, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011.
- [23] G. Bradski und A. Kaehler, Learning OpenCV, Sebastopol, USA: O'Reilly Media, Inc., 2008.
- [24] N. Otsu, „A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms“, *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, Volume 9, Issue 1*, pp. 62-66, January 1979.
- [25] J. Kittler und J. Illingworth, „Threshold Selection Based on a Simple Image Statistic“, *Computer Vision, Graphics, and Image Processing Vol. 30*, pp. 125-147, 1985.
- [26] J. Canny, „A Computational Approach to Edge Detection“, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Volume 8, No. 6*, pp. 679-698, November 1986.
- [27] G. Lehmann, „Robust Automatic Threshold Selection“, *Insight Journal*, pp. 1-4, Juli - December 2006.
- [28] L. Ibanez, W. Schroeder, L. Ng, J. Cates und andere, The ITK Software Guide Second Edition, Updated for ITK version 2.4, Clifton Park, New York: Kitware, Inc., 2005.

- [29] M. H. F. Wilkinson, „Optimizing Edge Detectors for Robust Automatic Threshold Selection: Coping with Edge Curvature and Noise“, *Graphical Models and Image Processing, Volume 60*, pp. 385-401, 1998.
- [30] N. Efford, *Digital Image Processing - A Practical Introduction Using JAVA*, Essex: Pearson Education Limited, 2000.
- [31] S. Suzuki, „Topological Structural Analysis of Digitized Binary Images by Border Following“, *Computer Vision, Graphics, and Image Processing 30*, pp. 32-46, 1985.
- [32] M.-K. Hu, „Visual Pattern Recognition by Moment Invariants“, *IRE Transactions on Information Theory*, pp. 179-187, 1962.
- [33] OpenCV, „Structural Analysis and Shape Descriptors - OpenCV 2.4.4.0 documentation“, [Online]. Available: [http://docs.opencv.org/modules/imgproc/doc/structural\\_analysis\\_and\\_shape\\_descriptors.html?highlight=moments#matchshapes](http://docs.opencv.org/modules/imgproc/doc/structural_analysis_and_shape_descriptors.html?highlight=moments#matchshapes). [Zugriff am 02 03 2013].
- [34] J. Sklansky, „Finding the Convex Hull of a Simple Polygon“, *Pattern Recognition Letters, Volume 1, Issue 2*, pp. 79-83, December 1982.
- [35] R. Nafe und W. Schlote, „Methods of Shape Analysis of two-dimensional closed Contours - A biologically important, but widely neglected Field in Histopathology“, *Electronic Journal of Pathology and Histology, Volume 8.2*, pp. 1-18, Juni 2002.
- [36] OpenCV.ORG, „OpenCV“, [Online]. Available: <http://opencv.org/>. [Zugriff am 05 03 2013].
- [37] „EmguCV“, [Online]. Available: [http://www.emgu.com/wiki/index.php/Main\\_Page](http://www.emgu.com/wiki/index.php/Main_Page). [Zugriff am 01 03 2013].
- [38] Xamarin (ehemals Novell), „Mono“, [Online]. Available: [http://www.mono-project.com/Main\\_Page](http://www.mono-project.com/Main_Page). [Zugriff am 21 04 2013].
- [39] „ITK - Segmentation & Registration Toolkit“, [Online]. Available: <http://www.itk.org/ITK/project/about.html>. [Zugriff am 01 03 2013].
- [40] Microsoft Corporation, „Download Microsoft Visual C++ 2010 Redistributable Package (x64) from Official Microsoft Download Center“, [Online]. Available: <http://www.microsoft.com/en-us/download/details.aspx?id=14632>. [Zugriff am 08 04 2013].
- [41] Helicon Soft Ltd., „Helicon Focus - extended depth of field, focus stacking, 3D visualization“, [Online]. Available: <http://www.heliconsoft.com/heliconfocus.html>. [Zugriff am 28 04 2014].
- [42] W. Schroeder, K. Martin und B. Lorensen, *The Visualization Toolkit. An Object-Oriented Approach To 3D Graphics*, 4th Edition, Kitware, Inc., 2006.
- [43] National Institutes of Health, „ImageJ“, [Online]. Available: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. [Zugriff am 02 05 2013].

- [44] D. Zhang und G. Lu, „A Comparative Study of Curvature Scale Space and Fourier Descriptors for Shape-based Image Retrieval“, *Journal of Visual Communication and Image Representation*, pp. 39-57, März 2003.
- [45] Scientific Volume Imaging B.V., „SVI|BrightFieldMicroscope“, [Online]. Available: <http://www.svi.nl/BrightFieldMicroscope>. [Zugriff am 13 05 2013].
- [46] P. Tadrous, „A method of PSF generation for 3D brightfield deconvolution“, *Journal of Microscopy*, Volume 237, No. 2, pp. 192-199, 2010.



### 8.3 Datenträger

Sourcecode und Kompilat des DiatoMorphoTo und Kompilate der Software für das 3D-Stacking, die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rohdaten und ein Großteil der Ergebnis-Visualisierungen sind auf den beigefügten Datenträgern gespeichert.

<b>Disk 1 (Daten und Programme für Massenscreening und 3D-Stacking)</b>	
Massenscreening	
Daten	
Aufnahmen Valven	Valvenaufnahmen zur Analyse
Templates	Templates für DiatoMorphoTo
Software	
DiatoMorphoTo	Programm „DiatoMorphoTo“
nachzurüstende DLLs	Microsoft Visual C++ 2010 Redistributable Package (x64), Datei „nvcuda.dll“ (s. Kapitel 3.6.4.1)
Sourcecode	
DiatoMorphoTo	Sourcecode „DiatoMorphoTo“
Libraries	EmguCV, ITK
RATS	ITK-basierter Sourcecode für die RATS-Segmentierung
3D-Stacking	
3D-Visualisierung	Software und Anleitung für die 3D-Visualisierung
Cymbella ehrenbergii	Valvenaufnahmen, Rohdaten und Bildstapel für 3D-Stacking, jeweils für Hellfeld, DIK und PhaKo

<b>Disk 2 (Daten und Programme für 3D-Stacking)</b>	
3D-Visualisierung	Software und Anleitung für die 3D-Visualisierung
Fragilariopsis kerguelensis	Valvenaufnahmen, Rohdaten und Bildstapel für 3D-Stacking, jeweils für Hellfeld, DIK und PhaKo
Triceratium favus Ehrenberg	Valvenaufnahmen, Rohdaten und Bildstapel für 3D-Stacking, jeweils für Hellfeld, DIK und PhaKo