(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Mai 2013 (23.05.2013)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/071902 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01) *G01J 3/44* (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01) *A01G 7/00* (2006.01)
G01N 21/84 (2006.01) *G01N 33/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2012/001023

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Oktober 2012 (24.10.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 118 619.4
16. November 2011 (16.11.2011) DE

(71) Anmelder: **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH** [DE/DE]; 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder: **MIELEWCZIK, Michael**; Frohburgstr. 303, CH-8057 Zürich (CH). **BLOSSFELD, Stephan**; Angersiefen 9, 51519 Odenthal (DE). **PFEIFER, Johannes**; Ezzostr. 13, 53359 Rheinbach (DE). **NAGEL, Kerstin**; Finkenweg 13, 52428 Jülich (DE). **SCHARR, Hanno**; Linnicher Str. 12, 52428 Jülich (DE). **WALTER, Achim**; Im Laubegg 25, CH-8045 Zürich (CH). **SCHURR, Ulrich**; Doktor-Halbsguth-Str. 3, 52428 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR NON-INVASIVE DETECTION OF GROWTH PROCESSES AND SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF CHEMICAL-PHYSICAL PARAMETERS

(54) Bezeichnung : VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR NICHT-INVASIVEN ERFASSUNG VON WACHSTUMSPROZESSEN UND SIMULTANEN MESSUNG VON CHEMISCH-PHYSIKALISCHEN PARAMETERN

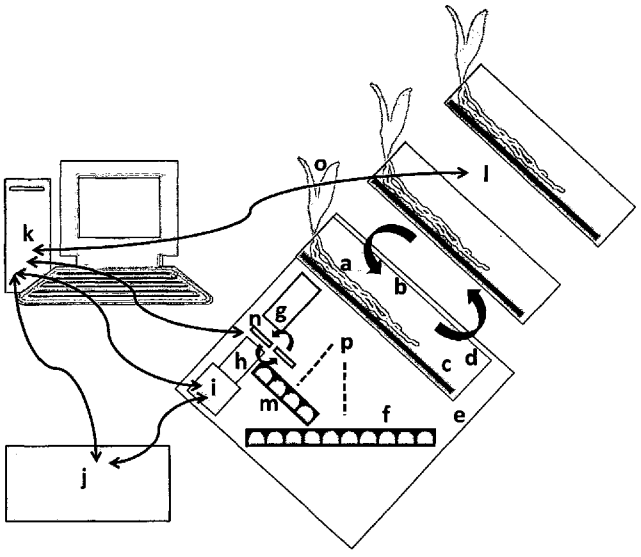


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a device for the non-invasive detection of growth processes and simultaneous measurement of chemical and/or physical parameters, comprising the following components: a) a lighting unit (f, m), b) an optical detection unit (i, h, n, g), c) at least one growth container (b, I) containing a growth medium (d), d) at least one transparent, planar optode (c), e) a control unit (j), and f) an electronic data acquisition and evaluating unit (k). The invention relates further to a method for the non-invasive detection of growth processes and simultaneous measurement of chemical and/or physical parameters, comprising the following method steps: a) detecting the growth processes by means of imaging methods; and b) detecting the chemical and/or physical parameters by using a planar, transparent optode (c), wherein the data from a) und b) is obtained simultaneously and in parallel.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur nicht-invasiven

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2013/071902 A1

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemisch und/oder physikalischer Parameter, umfassend folgende Komponenten: • a) Beleuchtungseinheit (f, m), • b) optische Erfassungseinheit (i, h, n, g), • c) mindestens einen Wachstumscontainer (b, I), mit Wachstumsmedium (d), • d) mindestens eine transparente, planare Optode (c), • e) Steuerungseinheit (j), • f) elektronische Datenerfassungs- und Auswerteeinheit (k). Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemisch und/oder physikalischer Parameter, umfassend folgende Verfahrensschritte: • a) Erfassung der Wachstumsprozesse mittels bildgebender Methoden, • b) Erfassung der chemisch und/oder physikalischen Parameter durch Verwendung einer planaren, transparenten Optode (c), wobei die Daten aus a) und b) simultan und parallel zueinander gewonnen werden.

Beschreibung

Vorrichtung und Verfahren zur Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung von chemisch-physikalischen Parametern

---

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung von chemisch-physikalischen Parametern.

Stand der Technik:

Technisch existiert eine Vielzahl verschiedener Methoden dynamische Wachstumsprozesse zu verfolgen und zu quantifizieren, wobei hierbei grundlegend zwischen invasiven und nicht-invasiven Methoden unterschieden werden kann. Ganz allgemein gilt, dass nicht-invasive Untersuchungen den Vorteil besitzen, dass Wachstumsprozesse (beispielsweise von Pflanzen) an denselben Messobjekten kontinuierlich im Zeitverlauf durchgeführt werden können und daher in vielen Fällen zu bevorzugen sind.

Invasive Wachstumsmessungen

Ein Beispiel invasiver Wachstumsmessungen an Wurzeln stellt die Verwendung der Software „WinRHIZO“ (Regent Instruments, Inc.) dar. Hierbei werden üblicherweise ausgewaschene Wurzeln untersucht, die nach dem invasiven Prozess des Grabens oder Probennahme mit Hilfe eines Probenzylinders, welcher in den Boden getrieben wird, schwimmend in einem transparenten Kunststoffcontainer gescannt werden. Die gewonnenen photographischen Aufnahmen können dann mit Hilfe der Software bildgebend ausgewertet werden, wobei Parameter der Wurzelmorphologie, wie Wurzellänge, Wurzeldurchmesser und weiteres mehr vermessen werden kann (morphometrische Auswertung). Es ist durchaus auch möglich, morphometrische Daten mittels der Software „WinRHIZO“ nicht-invasiv zu erheben, indem photographische Aufnahmen, beispielweise gewonnen aus Rhizotronexperimenten ohne den Umweg des Scannens ausgewaschener Wurzeln, zu vermessen.

Weitere konventionelle invasive Wachstumsmessungen von Wurzelparametern bestehen unter anderem im Wiegen der Frisch- und Trockenmasse. Sind die Wurzeln einmal ausgegraben, gehen viele Parameter der Wurzelarchitektur unwiederbringlich verloren. Dazu gehören beispielsweise Parameter wie die exakte Wurzellängendichte, die Gesamtbreite des Wurzelsystems, Verzweigungswinkel u. a.

Zudem ist es nicht möglich weitere Messungen am selben Versuchsobjekt durchzuführen. Dies kann nur über Vergleichspopulationen geschehen, wodurch sich die Anzahl der anzuziehenden Pflanzen im Vergleich zu nicht-invasiven Messungen deutlich erhöht.
Um beispielsweise Nährstoffgehalte, oder Gehalte anderer Analyte wie Kohlenhydrate, Proteine, Hormone etc. quantifizieren zu können, ist eine invasive Beprobung jedoch kaum zu umgehen und liefert in jedem Fall die genausten Ergebnisse.
Ganz analog werden invasive Methoden zur Bestimmung des Wachstums oberirdischer Pflanzenorgane vielfältig in der Literatur beschrieben. Darunter fällt beispielsweise das Wiegen von abgeschnittenen Blättern oder das Scannen/Abfotographieren derselben unter Einbeziehung morphometrischer, bildanalytischer Verfahren.

In den letzten Jahren wurden viele bildgebende und bildanalytische Verfahren entwickelt, um das Abschneiden der zu untersuchenden Pflanzenorgane wie beispielsweise von Blättern zu vermeiden. Vielfach kann daher heute auf invasive Messungen verzichtet werden.

Nicht-invasive Wachstumsmessungen
Im Rahmen pflanzenphysiologischer Untersuchungen stellen Messungen mit Hilfe von Linealen und Schieblehren die aller einfachste aber dennoch praktische, da z. B. transportable, nicht-invasive Messmethode dar. Derartige klassische Messmethoden werden beispielsweise seit geraumer Zeit für das kontinuierliche Erfassen von Wachstumsprozessen in Blättern (Avery 1933) und Wurzeln benutzt (Erickson und Sax, 1956). Vielfach werden Sie daher noch heute für wissenschaftliche Arbeiten verwendet (Walter 1997). Der größte Nachteil derartiger Erfassungen von Wachstumsprozessen stellt jedoch die Tatsache dar, dass sich diese nur in geringer zeitlicher und räumlicher Auflösung durchführen lassen und zudem mit einem hohen manuellen Aufwand verbunden sind. Sollen Wachstumsprozesse in hoher zeitlicher Auflösung erfasst werden, so stehen hierfür verschiedene alternative Methoden zur Verfügung.

Verschiedene Formen und Varianten von Auxanometer oder Resistance-Transducer werden beispielsweise seit Jahrzehnten eingesetzt, um das Wachstum von oberirdischen Sprossen oder Blättern unter verschiedenen Umweltbedingungen zu erfassen. Die räumliche Auflösung ist dabei jedoch ebenfalls begrenzt und beschränkt sich auf die einfache Erfassung des Längenwachstums. Im Rahmen pflanzenphysiologischer Untersuchungen dikotylen Blattwachs-

tums (Blattwachstum zweikeimblättriger Pflanzen) haben diese Untersuchungsmethoden darüber hinaus den Nachteil, dass nicht zwischen Längenwachstum der Petiole und Blattscheide (oder gar einzelnen Segmenten der Blattscheide) unterschieden werden kann. Im Rahmen von Untersuchungen des Wurzelwachstums können Transducer und Auxanometer technisch bedingt gar nicht eingesetzt werden. Grundsätzliche Anwendungen in Hydroponik- oder Aeroponik-Kulturen erscheinen hier kaum sinnvoll.

Auf Grund der Beschränkungen dieser beiden Messarten bei Wachstumsmessungen wurden in den letzten Jahren zunehmend Methoden entwickelt, Wachstum nicht-invasiv mit Hilfe bildgebender Methoden zu erfassen. Im Rahmen pflanzenphysiologischer Untersuchungen wurden hierbei verschiedene bildanalytische Ansätze verfolgt und genutzt, abhängig davon, welche Pflanzenorgane untersucht werden sollten, bzw. welche räumliche und zeitliche Auflösung durch die Messdaten bereitzustellen sind.
Grundsätzlich gilt, dass Wurzelwachstum und Sprosswachstum derselben Pflanze in Abhängigkeit zu einander nur bedingt untersucht werden können. Dies gilt insbesondere für Wachstumsanalysen, welche das Wachstum in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erfassen sollen. Hier liegt eine der gegenwärtigen Limitierungen des aktuellen Stands der Technik, welcher sich beispielsweise durch simultane, automatisierte Erfassungen von Wurzel-, Spross- und/oder Blattwachstum mit hochauflösenden Methoden lösen lassen.

Weitergehend beinhalten bislang alle Untersuchungen des Wachstums den Nachteil, dass eine Simultanerfassung von Umwelteinflüssen in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung typischerweise nicht möglich ist. Dieser Nachteil betrifft hierbei insbesondere die simultane Erfassung chemischer und/oder physikalischer Eigenschaften der Rhizosphäre bei Messungen des Wurzelwachstums in hoher räumlicher Auflösung.

Nachteile des Stands der Technik:

Der bisherige Stand der Technik ermöglichte es nicht, Veränderungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften des Wachstumsmediums und die Dynamik von Wachstumsparametern in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung simultan zu erfassen. Um das Wechselspiel zwischen Wachstum und Wachstumsmedium zu untersuchen, mussten diese Informationen bislang in separaten Messungen und in der Regel invasiv erfasst werden und konnten daher nicht am selben Objekt parallel und kontinuierlich durchgeführt werden.

Nach dem bisherigen Stand der Technik ist es lediglich möglich, quantitative Messungen von chemisch-physikalischen Größen einer Wachstumsumwelt von Lebewesen durchzuführen, indem miniaturisierte Messsonden, wie Mikroelektroden oder optische Messsysteme (Optoden), Verwendung finden, welche eine Simultanerfassung von Umwelteinflüssen in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung typischerweise bisher nicht zuließen (Strömberg 2008; Pijnenborg et al. 1990; Blossfeld & Gansert 2007). Mit Indikatoren für pH-Veränderungen wie z. B. Bromkresolpurpur, die bereits in Agarsystemen zur Untersuchung von Rhizosphären-Effekten eingesetzt wurden, sind quantitative pH-Messungen nicht für alle Wachstumsmedien und nur für begrenzte Bereiche der pH-Skala möglich. Eine quantitative Messung kann lediglich im Umschlagsbereich des Indikators erfolgen (Jaillard et al. 1996; Marschner et al. 1986). Außerhalb des Umschlagbereiches kann nur eine qualitative Messung erfolgen. (Marschner 1986). Weitere Indikatoren zur Detektion von beispielsweise Änderungen des Redoxpotentials sind bekannt, z. B. Methylenblau. Mikroelektroden zur spezifischen Messung der Konzentration von Ammonium, pH, Calcium, Chlorid, Natrium, Sauerstoff, Kohlendioxid u. v. m. sind bekannt (Microelectrodes Inc.).

Bei der Verwendung von Mikroelektroden wird die Konzentration des Messparameters bedingt durch das Messprinzip verändert bzw. verbraucht, was insbesondere bei Messungen über einen längeren Zeitraum zu Problemen führen kann, insbesondere, wenn wechselseitige Interaktionen Gegenstand der Untersuchung sind.

Die räumliche Auflösung wird unter Verwendung von Mikroelektroden durch deren Geometrie beschränkt. Die Abmessungen der Mikroelektroden begrenzen die zu erzielende räumliche Auflösung, die Reaktionszeit die erzielbare zeitliche Auflösung. Soll eine flächige Messung in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erfolgen, müssen mehrere Mikroelektroden eingesetzt werden, was mit vergleichsweise hohem Aufwand und hohen Kosten verbunden ist. Sollen simultan mehrere chemisch-physikalische Größen kontinuierlich gemessen werden, geht dies ebenfalls zu Lasten der räumlichen Auflösung.

Zur optischen Messung verschiedener chemischer und physikalischer Eigenschaften in den Fachgebieten der Medizin, Biotechnologie und der Biologie, hier insbesondere der Rhizosphärenanalytik, gilt die Verwendung von planaren Optoden (im Folgenden auch Optoden genannt) derzeit als Stand der Technik. Optoden sind beispielsweise zur spezifischen Messung der Konzentration von Ammonium, Sauerstoff, Kohlendioxid, pH und verschiedenen Ionen sowie organischen Verbindungen bekannt.

Die Messung basiert dabei auf der Verwendung von spezifischen, auf den zu messenden Parametern abgestimmten Fluoreszenzfarbstoffen, die kurzfristig mit Licht einer oder mehrerer spezieller Wellenlängen angeregt werden. Der Farbstoff fluoresziert dabei in Abhängigkeit der Quantität des zu messenden Parameters und Intensität des anregenden Lichts für wenige Millisekunden, bzw. Nanosekunden.

Von der Fluoreszenz abzugrenzen ist die Phosphoreszenz, bei der die Lichtemission wesentlich länger andauert, u. U. bis zu mehreren Stunden. Beide Begriffe (Fluoreszenz und Phosphoreszenz) sind dem allgemeinen Begriff der Lumineszenz unterzuordnen.

In der Regel wird der Farbstoff in oder auf einer Polymermatrix fixiert und in, bzw. auf das zu untersuchende Wachstumsmedium ein-, bzw. aufgebracht. Die optische Messung erfolgt mittels eines geeigneten optischen Aufbaus (z. B. CCD-Kamera) außerhalb des Wachstumsmediums. Durch diese Entkopplung von Sensor (z. B. der Optode) und Detektor (z. B. der CCD-Chip) ist eine nicht-invasive Erfassung des zu analysierenden Parameters möglich.

Eine weitere Möglichkeit der optischen Erfassung der Fluoreszenz stellt die Anwendung eines schrittmotorgebundenen Systems dar (Blossfeld & Gansert 2007, Blossfeld et al. 2010). Hierbei handelt es sich um ein kameraunabhängiges System, bei dem sowohl das Anregungslicht, als auch die Fluoreszenz über eine Glasfaser von der Lichtquelle zum Sensor, bzw. vom Sensor zum Detektor geleitet wird. Die Glasfaser wird dabei in einem definiertem Raster von außen über den Sensor gefahren.

Bislang haben sich zwei Fluoreszenzmessmethoden etabliert:

1. Fluoreszenzlebenszeitmessung eines Farbstoffes (z. B. Holst et al. 1998)

   Bei dieser Methode wird der Fluoreszenzfarbstoff mit Licht einer spezifischen Anregungswellenlänge angeregt und nach Erlöschen der Anregung, die Abklingzeit der Fluoreszenz gemessen (Fluoreszenzlebenszeit), welche abhängig von der Analytkonzentration ist. Einige Fluoreszenzfarbstoffe besitzen jedoch eine extrem kurze Fluoreszenzlebenszeit (wenige Nanosekunden), sodass es erforderlich sein kann, neben dem analytsensitiven Fluoreszenzfarbstoff einen analytsensitiven Referenzfarbstoff in die Optoden zu integrieren (Schröder 2006). Da dieser Referenzfarbstoff unabhängig von der Analytkonzentration im Millisekundenbereich fluoresziert und ebenfalls von der verwendeten Anregungswellenlänge angeregt wird, überlagern sich die beiden Fluoreszenzsignale (dual lifetime referencing). Dieses Mischsignal ist damit ebenfalls ab-

hängig von der Analytkonzentration und erlaubt so die Fluoreszenzlebenszeitmessung von Fluoreszenzfarbstoffen mit kurzlebiger Fluoreszenzlebenszeit.

2. Ratiometrische Fluoreszenzmessung eines Farbstoffes (z. B. Hakonen et al. 2010).Bei dieser Methode wird im lokalen Maximum des Emissionsspektrums gemessen und Verhältnisse der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffes berechnet. Dabei können ggf. unterschiedliche Anregungswellenlängen und ggf. variierende Emissionswellenlängen verwendet werden, welche spezifisch von der jeweiligen Analytkonzentration abhängig sind. In der konkreten Ausführung gibt es beispielsweise mehrere Varianten (Schröder 2006):

Verwendung von zwei Anregungswellenlängen und einer Emissionswellenlänge = (Dual Excitation/ single Emission).
Verwendung von zwei Anregungswellenlängen und zwei Emissionswellenlängen= (Dual Excitation/ dual Emission).
Verwendung von einer Anregungswellenlänge und zwei Emissionswellenlängen = (Single Excitation/ DualEmission).

Bei beiden Messmethoden (Fluoreszenzlebenszeitmessung, ratiometrische Fluoreszenzmessung) ist es möglich, mittels eines geeigneten optischen Aufbaus (in der Regel eine CCD-Kamera) eine räumliche quantitative Erfassung (Kartografie) des zu messenden Parameters zu realisieren. Eine dreidimensionale, semiquantitative Erfassung wird beispielsweise in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Eine Erfassung in zeitlich hoher Auflösung ist prinzipiell ebenfalls möglich, hängt im Einzelfall jedoch vom zu untersuchenden Messobjekt ab. Hierbei ist insbesondere der Einfluss des verwendeten Lichts auf das Messobjekt zu berücksichtigen. Die gebräuchlichsten gemessenen Rhizosphärenparameter sind beispielsweise Sauerstoff-, bzw. Kohlendioxidkonzentration ($[O_2]$, $[CO_2]$) und pH-Wert (pH), jedoch sind auch Fluoreszenzfarbstoffe für die Messung der Konzentration einer Vielzahl anderer Parameter verfügbar (z. B. Metallionen, Ammonium-Stickstoff).

Tabelle 1: Beispiele von Fluoreszenzfarbstoffen und den entsprechend möglichen Parametern, die analysiert werden können

Parameter/ Analyt	Farbstoff	Fluoreszenzmessung	Referenzen
pH	HPTS	Ratiometrisch	Hakonen & Hulth 2008 Hulth et al. 2002
	DHFAE	Dual lifetime referencing	Stahl et al. 2006 Schröder 2006
O_2	Ruthenium(II)diimin Complex	Lebenszeit	Glud et al. 1998 Holst et al. 1998 Holst & Grunwald 2001 Schröder 2006
	PtOEP	Lebenszeit	Oguri et al. 2006
	Pt-PFP	Lebenszeit	Precht et al. 2004
CO_2	HPTS + TOA^+	Ratiometrisch	Zhu et al. 2006
		Dual lifetime referencing	Schröder 2006

DHFAE: 2', 7'-dihexyl-5(6)-*N*octadecyl-carboxamidofluorescein ethyl ester und das phosphoreszente ruthenium(II)-Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin eingebettet in Nanopartikel, als inerter Referenzstandard
pH sensitiver Fluoreszenzfarbstoff für den pH Bereich 7.3 – 9.3

HPTS: 8 - Hydroxypyrene - 1,3,6 – trisulfonische Säure als Trinatrium salz
pH sensitiver Fluoreszenzfarbstoff für den pH Bereich 5.5 – 8.6 (Zhu et al. 2005) bzw. CO_2 sensitiver Fluoreszenzfarbstoff 0 – 20 %

PtOEP: Platin(II) 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-21H,23H-porphyrin
pH sensitiver Fluoreszenzfarbstoff

Pt-PFP: Platin(II) mesotetra (pentafluorophenyl) porphyrin
O_2 sensitiver Fluoreszenzfarbstoff für den Bereich 0 % - >21 % O_2

Ruthenium(II)diimin Komplex: Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin, mit trimethylsilylpropanesulfonat als Gegenion
O_2 sensitiver Fluoreszenzfarbstoff für den Bereich 0 % - >21 % O_2

TOA^+: Tetraoctylammonium Kation
Verbessert die Sensitivität von HPTS gegenüber CO_2

Die räumliche Auflösung ist in der Regel von der Pixelauflösung der verwendeten Kamera und dem Kameraabstand abhängig (z. B. Gesamtfläche 101 cm² bei einer Pixelgröße von 277 µm x 277 µm, Hakonen et al. 2010). Im Falle des schrittmotorgebundenen Systems ist die räumliche Auflösung abhängig von der Schrittweite der Motoren und dem Durchmesser des Lichtkegels (z. B. Gesamtfläche 80 cm² bei einer Schrittweite von 1.5 bis 3.0 mm je Schritt, Blossfeld & Gansert 2007).

Die zeitliche Auflösung zwischen zwei Bildaufnahmen liegt bei der Verwendung von kameragestützten Systemen im Sekundenbereich, bzw. Millisekundenbereich und ist von den Kameraeigenschaften, sowie der angegliederten Datenverarbeitungsroutine abhängig (z. B. Ringpuffer, Echtzeitverarbeitung, etc.). Langzeitmessungen von mehreren Tagen bis Wochen sind dabei möglich, benötigen jedoch ggf. einen großen Datenspeicher von mehreren MB bis GB mit ausreichend schnellen Zugriffszeiten, Datentransferraten und Zwischenspeichern (Hakonen et al. 2010). Bei der Verwendung von schrittmotorgebundenen Systemen liegt die zeitliche Auflösung zwischen den Einzelschritten im Sekundenbereich (2-3 Sekunden), die zeitliche Auflösung zwischen zwei vollständigen Rasterzyklen ist dabei abhängig von der Schrittzahl und liegt in der Regel im Minutenbereich (Blossfeld & Gansert 2007). Langzeitmessungen von mehreren Tagen bis Wochen sind dabei ebenfalls möglich und benötigen einen vergleichsweise kleinen Datenspeicher von wenigen MB.

Bisher sind semitransparente Optoden bekannt, die z. B. bei der Untersuchung von Boden das Vorhandensein von Tiergängen (z. B. Wurmgängen) visuell (durch die Optode hindurch) erkennen lassen (Holst und Grundwald 2001, Frederiksen & Glud 2006).
Bei der Anwendung von Optoden im Rahmen von z. B. Boden oder Pflanzenwurzeluntersuchungen können diese durch eine transparente Glasscheibe von außen optisch ausgelesen werden. Eine Öffnung des Systems ist somit für die Messung nicht notwendig, und die genannten Veränderungen des Systems, z. B. hinsichtlich einer Störung des Gas- oder Feuchtehaushalts, werden ausgeschlossen.

Wie zuvor beschrieben ist die Verwendung von Optoden zur allgemeinen Erfassung von chemisch-physikalischen Parametern, wie beispielsweise dem pH-Wert oder der Bestimmung von Salzkonzentrationen bekannt.

Eine Messung von chemisch-physikalischen Parametern simultan zur bildgebenden Erfassung von Wachstumsprozessen in hoher räumlicher bzw. zeitlicher Auflösung unter Verwendung von Optoden ist bisher nicht möglich.

Bildgebende Verfahren wie DISP root, GROWMAP und GROWSCREEN root (Walter et al 2009, Nagel et al 2009) sind mit der Messung via Optoden aus verschiedenen Gründen bislang nicht kompatibel. Die bisher bekannten Optoden weisen in ihren physikalischen Eigenschaften nicht die benötigten optischen Charakteristiken auf, welche für eine solche Erfassung notwendig sind. Essentiell ist hierbei zunächst, dass planare Optoden eine geeignete Transmissivität, und ein möglichst hohes, nicht durch (kohärente und inkohärente) Streuungseffekte beeinträchtigtes Auflösungsvermögen besitzen müssen. Das zu untersuchende Wachstumsobjekt muss für bildgebende Wachstumsanalysen möglichst klar, kontrastreich und scharf durch eine Optode hindurch kontinuierlich erkennbar sein.

Aus diesem Grund sind nicht alle beschriebenen oder im Handel erhältlichen Optoden für die automatisierte simultane Erfassung von Wachstumsparametern und chemisch-physikalischen Parametern des Wachstumsmediums geeignet. Die Mehrzahl der erhältlichen Optoden besitzt den Nachteil, dass diese fast vollständig opak, d. h. undurchsichtig sind. Die derzeit in der Literatur (US 2006/0105174 A1) als transparent beschriebenen Optoden sind für die gleichzeitige kontinuierliche Simultanerfassung von Wachstumsprozessen und chemisch-physikalischen Parametern nicht für diesen Einsatzzweck getestet worden.

Im Rahmen von Wachstumsmessungen an Pflanzenorganen in einem Wachstumsmedium ist es beispielsweise essentiell, diese im Tagesverlauf zu beobachten, wenn die Erfassung in einer zeitlich hohen Auflösung erfolgen soll. Dies verlangt insbesondere einen Versuchsaufbau, bei dem das Licht so gewählt und appliziert wird, dass die Pflanze selbst möglichst wenig beeinträchtigt wird. Auf Wurzeloberflächen treffendes Licht kann von den Wurzeln wahrgenommen werden und das Wachstum der Wurzeln beeinflussen.

Gemeinsamer Nachteil der unterschiedlichen Fluoreszenzmessmethoden ist, dass der ermittelte Parameter nur indirekte Rückschlüsse auf das Vorhandensein, bzw. die Aktivität der Pflanzenwurzeln erlaubt (z. B. Wachstumsprozesse).

Aufgabe der Erfindung:

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung und ein Verfahren bereit zu stellen, mit der/dem es möglich ist, die nicht-invasive Erfassung und Analyse von Wachstumsprozessen, insbesondere biotischen und abiotischen Wachstumsprozessen, bei zeitgleicher, simultaner

Erfassung chemischer und/oder physikalischer Parameter in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu ermöglichen.

Unter der Bezeichnung „abiotische Wachstumsprozesse" sind beispielsweise physikalische Wachstumsprozesse, wie das Wachstum bodenphysikalischer Parameter, z.B. Bodenrisse oder Bodenporen, und deren Interaktion mit den anderen genannten Parametern Gegenstand des Interesses und mit dieser Apparatur und Verfahrensmethode analysierbar.

Unter „biotischen Wachstumsprozessen", auch als Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse bezeichnet, sind im Sinne dieser Erfindung auch diejenigen Prozesse zu verstehen, die bei Kulturen/Gewebekulturen von tierischen, pflanzlichen oder pilzlichen Organismen/Zellen oder Populationen von Mikroorganismen stattfinden. Abiotische/biotische Wachstumsprozesse können gemeinsam in einer Untersuchung oder getrennt in verschiedenen Untersuchungen erfasst und analysiert werden.

Weitergehend sind jedoch auch Einsatzzwecke bei der Untersuchung anderer biotischer/abiotischer Wachstumsprozesse möglich. Beispielsweise erlaubt die Erfindung unter anderem auch die Beobachtung des Wachstums und der Entwicklung von Pilzhyphen oder Lebewesen der marinen bzw. terrestrischen Bodenfauna im Allgemeinen bei simultaner Erfassung der chemisch-physikalischen Eigenschaften und Veränderung des umgebenden Mediums in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Im Folgenden werden unter der Bezeichnung „Wachstumsprozesse" sowohl biotische als auch abiotische Wachstumsprozesse verstanden.

Eine nicht-invasive bildgebende Erfassung von Wachstumsparametern wie z. B. die Erfassung von biotischen Differenzierungs-, Entwicklungs- und Wachstumsprozessen von Organismen, Organen, Geweben oder Zellen, welche im Rahmen dieser Erfindung von besonderem Interesse sind, umfassen beispielsweise die räumliche und zeitliche Auflösung des Wachstums. Unter der Bezeichnung „räumliche und zeitliche Auflösung des Wachstums" sind beispielsweise Tropismen, Wachstumsgeschwindigkeiten, relative Wachstumsgeschwindigkeiten, räumliche Verteilung von Wachstumsgeschwindigkeiten und die zeitliche Dynamik der Veränderung von Wachstumsgeschwindigkeiten pflanzlicher Wurzeln und Rhizome, sowie deren dynamische Veränderung der Wurzelarchitektur zu verstehen. Aufgabe der Erfindung ist es dabei, diese Wachstumsparameter bildgebend mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens innerhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer optischen Erfassungsein-

heit/ einem Kamerasystem automatisiert zu erfassen und mit bildanalytischen Verfahren zu analysieren.

Unter der Bezeichnung „Erfassen" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, das Sammeln und Auswerten der Daten zu verstehen, die mit der optischen Erfassungseinheit/ dem Kamerasystem ermittelt/bereitgestellt wurden. Diese Daten können mittels spezieller nach dem Stand der Technik bekannter Auswertprogramme, dazu verwendet werden, das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit der chemikalisch-physikalischen Parameter auszuwerten und Aussagen über die Abhängigkeit des Wachstums von beispielsweise pH-Wert, Ammoniumkonzentration und Lichtintensität treffen zu können.

Die Erfindung ermöglicht sowohl eine Erfassung und Analyse der biotischen/abiotischen Wachstumsprozesse, als auch mit Hilfe der planaren, transparenten Optoden eine Analyse und Erfassung von fluoreszenz-spektrometrisch detektierbaren, sich dynamisch verändernden chemisch-physikalischen Parametern und Prozessen innerhalb des Wachstums-Mediums bzw. -Substrats, sowie deren Interaktion mit den erfassten Wachstumsprozessen, die in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung bildgebend simultan erfasst und bildanalytisch ausgewertet werden können.

Die kontinuierliche Simultanerfassung von Wachstumsprozessen und chemisch-physikalischen Umweltparametern erfolgt erfindungsgemäß automatisiert und nicht invasiv, wobei sowohl eine qualitative, als auch eine quantitative Auswertung von Wachstumsprozessen und chemisch-physikalischen Parametern bzw. ihrer dynamischen Veränderung im Zeitverlauf möglich ist. Bei der Automatisierung in Hinsicht auf die Erfassung von Wachstumsparametern und chemisch-/physikalischen Parametern ist hierbei sowohl eine mechano-automatisierte Positionierung des Kamerasystems vor dem Untersuchungsobjekt, als auch vice versa eine mechanisch-automatisierte Positionierung des Untersuchungsobjekts vor der Kamera möglich.

Um eine hohe zeitliche Auflösung bei der Messung biotischer oder abiotischer Objekte zu erreichen, sollte die Erhebung der gemessenen Parameter in hinreichend kurzen Zeitabständen erfolgen, so dass die betreffende Wachstumsdynamik, d.h. die Veränderung im Laufe der Zeit, z. B. Wachstumsraten, dergestalt erfasst und beschrieben werden können, so dass eine kausalanalytische Interpretation ermöglicht wird.

Eine hohe zeitliche Auflösung bei der Messung chemisch-physikalischer Größen wird dadurch erreicht, dass eine Erhebung der gemessenen Parameter in hinreichend kurzen Zeitabständen erfolgt, so dass die betreffende Veränderung der Parameter, z. B. Konzentrationen eines Analyten im Laufe der Zeit in einen kausalanalytischen Zusammenhang mit der Messung der biotischen oder abiotischen Wachstumsprozesse gebracht werden kann. Handelt es sich beim Gegenstand der Untersuchung beispielsweise um eine Rhizosphäre, so sollte die zeitliche Auflösung zur Messung chemisch-physikalischer Größen normalerweise 1 Bild/Stunde (1 Image/h) betragen, da sich chemische Prozesse in der Rhizosphäre auch im Tagesverlauf ändern können. (Blossfeld et al. (2007))

Um eine hohe räumliche Auflösung bei der Messung biotischer oder abiotischer Objekte“ zu erreichen, sollte eine Erhebung der gemessenen Parameter in hinreichend hoher räumlicher Auflösung erfolgen, welche im Sinne der Erfindung vornehmlich zweidimensional ist, aber unter bestimmten Umständen auch dreidimensional zu verstehen sein kann, so dass spezielle morphologische Parameter wie z. B. Wurzellängen und Wurzeldurchmesser exakt vermessen werden können. Je nach verwendeter Methode muss die maximale Auflösung die Erkennung der zu vermessenden Strukturen ermöglichen. Bei der Verwendung der DISP-Methode beispielsweise, bei der räumliche Verteilungen der relativen Wachstumsraten innerhalb von wachsenden Wurzelspitzen im Zeitverlauf gemessen werden, sollte eine Auflösung von ca. 125 px (Pixeln)/mm erzielt werden. Bei Aufnahmen von in Boden wachsenden Wurzeln in Rhizotronsystemen ist normalerweise eine Auflösung von ca. 5 – 10 px/mm ausreichend.“

Für eine hohe räumliche Auflösung bei der Messung chemisch-physikalischer Größen sollte die Erhebung der gemessenen Parameter in hinreichend hoher räumlicher Auflösung erfolgen, welche im Sinne der Erfindung vornehmlich zweidimensional ist, aber unter bestimmten Umständen auch dreidimensional zu verstehen sein kann, so dass die betreffende Veränderung der Parameter, z.B. Konzentrationen eines Analyten im Laufe der Zeit in einen kausalanalytischen Zusammenhang mit der Messung der biotischen oder abiotischen Wachstumsprozesse gebracht werden kann.

Je nach verwendeter Methode muss die maximale Auflösung die Erkennung der zu vermessenden Strukturen ermöglichen. Handelt es sich beim Gegenstand der Untersuchung beispielsweise um eine Rhizosphäre, so sollte die räumliche Auflösung zur Messung chemisch-physikalischer Größen normalerweise mindestens 1 px (Pixel)/mm betragen.

Es kann zu jedem Messzeitpunkt eine zweidimensionale Karte beispielsweise der Konzentration des chemischen Analyten oder des physikalischen Parameters (z. B. Temperatur) erstellt/ermittelt werden. Die Reaktion der Fluorophore auf der Fläche der Optode wird je nach Konzentration des Analyten unterschiedlich stark sein. Dadurch ist eine Kartierung der jeweiligen Parameter möglich.

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren, mit deren Hilfe Messungen von **a)** optisch detektierbaren Wachstumsprozessen und **b)** fluoreszenz-spektrometrisch detektierbaren, sich dynamisch verändernden chemisch-physikalischen Parametern und Prozessen innerhalb eines Wachstums-Mediums bzw. -Substrats, sowie deren Interaktion mit den erfassten Wachstumsprozessen, in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung bildgebend, simultan erfasst und bildanalytisch ausgewertet werden können. Es ist weiterhin auch möglich, parallel oder alternativ chemisch-physikalische Parameter außerhalb des Wachstumsmediums/Substrats zu bestimmen, wie beispielsweise eine Gasanalyse des Sprosses in einem gasdicht abgeschlossenen Raum neben der Analyse der Wachstumsprozesse der Wurzeln und der chemisch-physikalischen Parameter im Wachstumsmedium.

<u>Simultane bildgebende Erfassung von Wachstumsprozessen und chemisch-physikalischen Parametern</u>

Zur optischen Messung und Erfassung verschiedener chemischer und physikalischer Eigenschaften des Wachstumsmediums können Optoden eingesetzt werden.
Die Messung mit Optoden basiert dabei beispielsweise auf der Verwendung von spezifischen, auf den zu messenden Parameter abgestimmten Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore), die kurzfristig mit Licht einer oder mehrerer spezieller Wellenlängen angeregt werden. Der Farbstoff fluoresziert dabei in Abhängigkeit der Quantität des zu messenden Parameters. In der Regel wird der Farbstoff in oder auf einer Polymermatrix, z. B. Polymerfolie fixiert und in/auf das zu untersuchende Medium ein/aufgebracht bzw. steht mit dem zu untersuchenden Objekt oder Medium in chemisch und/oder physikalischem Kontakt. Die optische Messung erfolgt mittels eines geeigneten optischen Aufbaus (z. B. CCD-Kamera) außerhalb des zu untersuchenden Mediums.

Die im Rahmen dieser Erfindung simultan detektierbaren und koregistrierbaren chemisch-physikalischen Parameter können dabei unterschiedlicher Natur sein. Gemessen werden kön-

nen beispielsweise Temperatur, pH-Werte, spezifische Stoffkonzentrationen (beispielsweise von Ammoniumionen, Sauerstoff, CO_2). Weitere Parameter und ihr jeweiliger Einfluss auf bestimmbare Wachstumsparameter sind in Tabelle 2 aufgeführt.
Grundsätzlich ist die Auswahl der zu beobachtenden Parameter sehr vielseitig, da prinzipiell eine Vielzahl von Fluorophoren und beschichteten Optoden genutzt werden können, bzw. beschrieben sind. Auch die gleichzeitige Messung verschiedener dieser Parameter ist möglich.

In Tabelle 2 sind beispielhaft verschiedene mögliche Parameter ausgewählt, wobei das vorgestellte System simultane Messungen der dynamischen Veränderung von Parametern aus beiden Spalten im Zeitverlauf ermöglicht. Die in Tabelle 2 aufgeführten Parameter sind nicht einschränkend zu sehen, sondern stellen nur eine mögliche Auswahl von Parametern dar. Es können daher auch andere Parameter durch den Einsatz von Optoden bestimmt werden. Durch Anpassung des Aufbaus ist es dabei auch möglich, mehrere Parameter aus einer oder beiden Spalte zu detektieren.

Durch konventionelle Anpassungen (z. B. Linsenwechsel, Arbeitsabstand etc.), bzw. Änderung des zeitlichen Intervalls zwischen den Einzelaufnahmen des optischen Aufbaus kann das System hierbei flexibel in seiner räumlichen und zeitlichen „Vergrößerung“ bzw. Auflösung an die jeweiligen Anforderungen des Versuchsaufbaus angepasst werden. So lassen sich beispielsweise sowohl das Wachstum der Wurzelspitze einer Pflanze, als auch Veränderungen des gesamten Wurzelsystems im Zeitverlauf charakterisieren.

Zudem kann der Aufbau innerhalb einer automatisierten Anlage genutzt werden. Diese Flexibilität ermöglicht beispielsweise ein Screening von Pflanzen im Hochdurchsatz mit einer hohen Zahl von Replikaten, die gleichzeitig untersucht werden können.

Tabelle 2: Beispiele von chemisch-physikalischen Parametern und Wachstumsparametern, die (unabhängig voneinander) im Rahmen dieser Erfindung gemessen werden können.

Chemische & physikalische Parameter des Wachstumsmediums	**Wachstumsparameter**
CO_2 Konzentration	Wachstumsgeschwindigkeit
O_2 Konzentration	Wurzelarchitektur, Wurzelsystemarchitektur
Temperatur	Wachstumsdynamik
pH-Wert	Substratstruktur, z. B. auch geschaffen durch die Bodenfauna
Ionen-Konzentrationen	Tropismen
Zucker- und Kohlenhydratanalyse	Lokalisation von Wachstumszonen (z. B. Wurzelwachstumszonen)
Stoffflussraten im Wachstumsmedium	Zell- und Organdifferenzierung
	Altersbestimmungen
	Bestimmungen von Entwicklungsstadien

Darüber hinaus ist der Einsatz der Erfindung mit einer Vielzahl von Wachstumsmedien bzw. Substraten möglich.

Unter Wachstumsmedien ist hierbei ganz allgemein der Raum zu verstehen, welcher das zu beobachtende Untersuchungsobjekt wie beispielsweise einen Organismus/ ein Lebewesen bzw. das Organ umgibt, und der dessen Wachstum zulässt und somit die Lebensumwelt darstellt. Das Wachstumsmedium kann bei der verwendeten Verfahrensmethode vielfältiger Natur sein, wobei es sich sowohl um ein natürliches Substrat (beispielsweise Boden, Erde, Sand) als auch um „halb"-synthetische Substrate (beispielsweise Agar, Hydrokulturen, Luftkulturen) handeln kann. Auch der Einsatz von anderen Wachstumsmedien, wie beispielsweise vollsynthetischen, quellfähigen Substitutionsmedien ist möglich. Bei der Betrachtung pflanz-

licher Wurzelsysteme wird das Wachstumsmedium beispielsweise als die Rhizosphäre bezeichnet. Die Rizosphäre kann definiert werden, als das Bodenvolumen welches lebende Pflanzenwurzeln umgibt und welches durch die Wurzelaktivität beeinflusst wird. Hinsinger et.al. (2005) New Phythologist, 168:293-303.

Unter der Bezeichnung Organismus/Lebewesen kann es sich beispielsweise um ein pflanzliches Wurzelsystem handeln, welches zusammen mit dem dieses umgebenden Wachstumsmedium bildgebend aufgenommen wird. Unter der Bezeichnung Organismus können allgemein pflanzliche, tierische Organismen oder auch Bakterien, Pilze verstanden werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst ein System, welches eine oder mehrere Kameras, eine optische Konfiguration, eine Lichtquelle zur Ausleuchtung des Untersuchungsobjekts, z. B. der Rhizosphäre, eine spezielle planare und dergestalt hinreichend transparente Optode, so dass Wachstumsmessungen gewährleistet sind, (wobei die Optode mindestens ein immobilisiertes Fluorophor besitzt) sowie eine digitale Computereinheit (bzw. ein Embedded Computer System) nutzt. Mit Hilfe dieser Anordnung ist es möglich, nicht-invasiv und nicht-destruktiv fotografische Aufnahmen bzw. Zeitrafferaufnahmen eines wachsenden Organismus, Organs oder Gewebes anzufertigen.

Damit die Anfertigung fotografischer Aufnahmen möglich ist, befinden sich das biologische Objekt und das Wachstumsmedium innerhalb eines transparenten Wachstumscontainers, der zumindest teilweise transparent ist. Basierend auf den erstellten Bildern und Bildserien ist es möglich, das Wachstum und spezielle Eigenschaften des Wachstums (z. B. Wurzelsystemarchitektur) aufzunehmen und zu analysieren. Gleichzeitig erlaubt eine zweite Gruppe von erstellten Bildern und Bildserien die Simultanerfassung einer oder mehrerer chemischer und/oder physikalischer Eigenschaften innerhalb des Wachstumsmediums, wobei die Aufnahmen aller Parameter in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erfolgen kann.

Die erfindungsgemäß eingesetzte planare, transparente Optode besitzt im Vergleich zu bekannten, im Handel erhältlichen planaren Optoden vorteilhafte optische Eigenschaften. Durch die erfindungsgemäße planare, transparente Optode ist erstmalig ein gleichzeitiges Hindurchschauen und Hindurchfotografieren durch eine Optode möglich.

Die erfindungsgemäße Optode ist somit transparent. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden unter „optischen Eigenschaften" die Parameter Auflösungsvermögen, Kontrast und Transmissivität verstanden.

Durch die vorteilhaften optischen Eigenschaften, insbesondere die Transparenz, sind erstmalig auch gleichzeitige andere Messungen in Form einer Bildanalyse und Bildgebung möglich.

Unter den vorteilhaften optischen Eigenschaften der Optode, die im Sinne der Erfindung gewünscht sind, und die bei Fotografie oder Schauen durch die Optode hindurch genutzt werden können, sind die folgenden Eigenschaften zu verstehen, die zusammen eine hohe Bildgüte und objekttreue Abbildung gewährleisten:

a) die erzielbare Transmissivität (also geringe Absorption von Licht verschiedener Wellenlängen),
b) der erzielbare Grauwert-Kontrast (fotometrischer Kontrast; Unterschiede hinsichtlich der Helligkeit zwischen hellen und dunklen Bereichen beim aufgenommenen Objekt bleiben bei hohem Erhalt des Grauwert-Kontrasts erhalten) und
c) das erzielbare Auflösungsvermögens (bei hohem Auflösungsvermögen geringe Verbreiterung der Punktantwort (in Pixel) in fotografischen Aufnahmen durch die Optode hindurch; Erhalt einer hohen Trennschärfe).

Die vorteilhaften Eigenschaften der Optode sind insbesondere deshalb so bedeutsam, da erfindungsgemäß fotographische Aufnahmen von den zu untersuchenden Objekten bzw. Organismen durch die Optode hindurch gemacht werden sollen, und sich die Objekte hinter der planaren Optode befinden.

Die genannten vorteilhaften optischen Eigenschaften bedeuten im Falle der hier eingesetzten Optode, dass nur minimale Veränderungen hinsichtlich der Abbildungsqualität bzw. der Bildgüte des durch die Optode hindurch fotografierten Objekts/Organismus verursacht werden. Die Veränderung ist so gering, dass Objekte/Organismen, die sich hinter der Optode befinden, durch die Optode hindurch objekttreu erkannt werden können, und bei Fotografie durch die Optode hindurch objekttreu und signifikant gleich zur Referenz wiedergegeben werden können.

Die genannten vorteilhaften Eigenschaften der erfindungsgemäß eingesetzten planaren, transparenten Optode haben bestimmte Entsprechungen bezüglich der Bildqualität, die im Folgenden genannt werden:

a) Die gewünschte hohe Transmissivität der Optode wird durch eine geringe Absorption von Licht verschiedener Wellenlängen bedingt. Eine geringe Absorption bewirkt, dass eine nur geringe Abschwächung der Lichtintensität resultiert. Die Lichtintensität, die hier als zu messendes Signal von Bedeutung ist, ist diejenige, die von der Lichtquelle ausgesandt wird, beziehungsweise die vom abzubildenden Objekt reflektiert wird. Die Lichtintensität ist das Signal, das dann z. B. durch den Sensor einer digitalen Foto-Kamera gemessen, und bildanalytisch ausgewertet werden kann. Ritzhaupt-Kleissl (2007) schreibt „Für Anwendungen in mikrooptischen Bauteilen ist es essenziell, dass die zum Einsatz kommenden Kompositmaterialien eine hohe optische Transparenz besitzen, um eine möglichst verlustarme Lichtleitung und damit Signalübertragung zu ermöglichen."

b) Der gewünschte hohe Grauwert-Kontrast wird durch eine geringe Lichtstreuung bewirkt. Streut die planare, transparente Optode das Licht wenig, bleibt ein hoher Grauwert-Kontrast erhalten. Bei hohem Kontrast besitzen helle und dunkle Bereiche in den fotografischen Aufnahmen nur wenig veränderte Grauwerte, wie sie erzielt würden, wenn sich kein Element im Strahlengang befindet, dass das Licht streut.

c) Die hohe Trennschärfe in der fotografischen Aufnahme bzw. das hohe Auflösungsvermögen in der fotografischen Aufnahme wird durch eine Punktantwort mit kleinem Durchmesser bewirkt. Die Punktantwort (Streuscheibchen, Greensche Funktion, Transmissionsfunktion) besagt, wie ein scharfer Lichtpunkt nach Durchgang durch das optische System, hier die Optode, aussieht. Ist der Lichtpunkt breit, wird das durch die Optode gesehene Bild unscharf. Die beobachtete Verbreiterung kann durch Lichtstreuung bewirkt werden.

Grundsätzlich werden diese optischen Eigenschaften dann als vorteilhaft betrachtet, wenn durch ein Objekt hindurchgeschaut werden soll, wie z.B. bei Sichtscheiben (Fensterglasschei-

ben). Die Absorption muss in diesem Fall möglichst gering, der Grauwert-Kontrast möglichst hoch, und das Auflösungsvermögen möglichst hoch sein.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemischer und/oder physikalischer Parameter setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

a) Beleuchtungseinheit

Diese kann mindestens eine Lichtquelle umfassen sowie eine Steuereinheit, die diese Lichtquelle ein und ausschaltet. Die Lichtquelle sollte Licht mit einem Wellenlängespektrum emittieren, welches sowohl für die eine Beleuchtung/Anregung der eingesetzten Optoden mit dem/den jeweiligen Fluorophor(en) geeignet ist als auch das Wellenlängenspektrum/die Wellenlängen emittieren, welche/s für die bildgebende, fotographische Messung der Wachstumsprozesse benötigt wird. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass eine Lichtquelle zur Beleuchtung /Anregung der Optode dient und eine weitere Lichtquelle zur Emission des Wellenlängenspektrums/der Wellenlänge dient, die für die Erfassung und Analyse der Wachstumsprozesse benötigt werden.

Die benötigten Wellenlängen sind hierbei jeweils in Abhängigkeit von dem auf der planaren Optode immobilisierten Fluorophor und dessen Anregungsmaxima auszuwählen. Im Falle von HPTS sind dies beispielsweise die Wellenlängen 405 und 450 nm. Für die Aufnahme von Bildern und Bildsequenzen zur Wachstumsanalyse wird ein dritter Wellenlängenbereich benötigt. Die Lichtquelle/n sollte/n daher Licht einer Wellenlänge im Bereich von beispielsweise 200 bis 2500 nm emittieren. Die Anzahl der benötigten Lichtquellen hängt von dem jeweiligen Wellenlängenspektrum ab, das die Lichtquelle emittieren kann und den jeweils benötigten Wellenlängen.

Diese Wellenlängen sind von drei Faktoren abhängig zu wählen:

i. Vom Absorptionsspektrum der verwendeten hinreichend transparenten planaren Optode, (die die simultanen Wachstumsmessungen, z. B. mit der Software GROWSCREEN-Root und/oder der GROWMap-Root gewährleistet).

ii. Die gewählte Wellenlänge sollte sowohl das biologische Objekt, als auch das Wachstumsmedium wenig beeinflussen (→Wurzeln zeigen beispielsweise keine Beeinflussung durch Beleuchtung im nahen Infrarot (NIR) und kurzwelligen Infrarotlicht (SWIR= short wavelength infrared) Spektrum.

iii. Die Wellenlänge darf nicht mit den Anregungs- und Emmisionsbereichen des jeweils verwendeten Flurophors überlappen.

Eine mögliche Lichtquelle kann neben anderen Wellenlängen eine (monochromatische) Infrarotbeleuchtung sein, die im Wellenlängenbereich zwischen 700 nm und 2500 nm emittiert. Soweit eine herkömmliche CCD Kamera als optische Erfassungseinheit zum Einsatz kommt, ist der Wellenlängenbereich der Lichtquelle auf den Bereich bis etwa 1100 nm begrenzt, da die Sensoren der CCD Kameras dort ihre obere Wellenlängensensitivitätsgrenze erreichen.
Die Lichtquelle kann vorzugsweise zusätzliche monochromatische Wellenlängen im Bereich des Anregungsmaximums bzw. der Anregungsmaxima des/ der verwendeten immobilisierten Fluorophoren auf der Optode bereitstellen. Diesbezüglich kann die Wellenlänge des Anregungsmaximums in Abhängigkeit vom verwendeten Fluorophor variieren. Die Auswahl der gewünschten/erforderlichen Fluoreszenzmessung bestimmt darüber hinaus ebenfalls die Anzahl der monochromatischen Wellenlängen (z. B. Dual excitation – single emission, bzw. Dual lifetime referencing, siehe Absatz zur Ratiometrischen Fluoreszenzmessung) Im Falle von HPTS und dem Dual excitation – single emission Fluoreszenzmessverfahren betragen die erforderlichen Anregungswellenlängen beispielsweise 405 nm und 450 nm, wobei 405 nm der unprotonierten Form und 450 nm der protonierten Form von HPTS entspricht.

Als Lichtquelle ist beispielsweise eine Kaltlichtquelle geeignet. Weiterhin kann die Lichtquellen eine oder mehrere monochromatische LEDs oder ein LED Cluster sein bei denen die Emission der LEDs für Anregungen der einzelnen Anregungswellenlängen der Fluorophore ein nicht überlappendes Spektrum aufweisen. Die „Full Half Width" (Halbwertsbreite) der LEDs muss idealerweise also möglichst schmal gewählt werden.
Die **Lichtquelle** kann weiterhin aus einer oder mehreren Schichten transparenter, selbstilluminierender monochromatischer OLEDs für jede der für die Fluorophore benötigten Wellenlängen bestehen. Die Emission der OLEDs für Anregungen der einzelnen Anregungswellenlängen der Fluorophore sollte ebenfalls ein nicht überlappendes Spektrum aufweisen. Die „Full Half Width"der OLEDs muss idealerweise also möglichst schmal gewählt werden.
Vor der Lichtquelle kann ein Filterrad oder ein Filterwechsler angeordnet sein, der einen Wechsel zwischen mindestens zwei Filtern ermöglicht. Als Filter kann beispielsweise ein „Narrowband"-Filter mit einer geringen „small half width" von beispielsweise 15 nm für die Anregungswellenlänge, bzw. –wellenlängen, die aus der Auswahl der immobilisierten Fluorophoren und der jeweiligen Fluoreszenzmessmethode resultieren, eingesetzt werden. Für

HPTS und das Dual-Excitation/Single-Emission-Verfahren ist beispielsweise der Einsatz von zwei Filtern im Bereich von 405 nm bzw. 450 nm erforderlich. In Abhängigkeit vom eingesetzten Fluorophor und dessen erforderlichen Anregungswellenlänge kann auch eine Infrarot-Durchlassfilter, der nur Infrarotes Licht oberhalb von 700 nm, aber kein Licht aus dem Bereich des sichtbaren und UV-Lichtbereichs, durchlässt, eingesetzt werden. Weiterhin kann es vorteilhaft sein, die Lichtquelle zusammen mit einem Diffusor zu versehen, mit dessen Hilfe eine homogene Beleuchtung erreicht wird.

b) Optische Erfassungseinheit

bestehend aus beispielsweise mindestens einer analogen oder digitalen Kamera. Die optische Erfassungseinheit dient zum einen der Erfassung der Bilddaten/Bildsignale, die von dem zu untersuchenden Organismus/Wachstumssystems abgegeben werden und die zur Erfassung des Wachstumsprozesse benötigt werden und zum anderen der Erfassung des von den Fluorophoren emittierte Fluoreszenzlichts.

Als Kamera kann beispielsweise ein CCD Kamera verwendet werden. Die Kamera kann mit einem Filter/Sperrfilter versehen sein, der nur den Durchtritt von Licht einer bestimmten Wellenlänge ermöglicht. Dies kann beispielsweise das Licht der Wellenlänge sein, das der Anregungswellenlänge des Fluorophors auf der Optode entspricht oder im Falle der Erfassung von Bilddaten des Wachstumsprozesses das Licht der Wellenlänge sein, welches für die Aufnahme und Analyse des Wachstums des zu untersuchenden Organismus erforderlich ist. Für die Erfassung von Wachstumsprozessen ist beispielsweise Licht im nahen Infrarotlichtspektrum geeignet. Der Filter kann vor der Linse der Kamera angeordnet sein. Er kann alternativ hinter der Linse angeordnet sein mit einer optionalen Tubusverlängerung vor dem Sensor der Kamera. Die optische Erfassungseinheit kann mindestens auch zwei Kameras aufweisen. Die erste Kamera dient dann der Detektion und Erfassung der chemisch-physikalischen Parameter (z. B. pH-Wert) in dem die Emission des Fluoreszenzlichts gemessen wird. Diese Kamera sollte einen „Narrow-Band-Filter“ (engbandigen Filter) mit einer geringen „Full Half Width“ (= Halbwertsbreite: Breite des insgesamt emittierten Wellenlängenspektrums bei halber Höhe des Emissionsmaximums) aufweisen. Die zweite Kamera wird dann für die Aufnahme der Wachstumsdaten verwendet. Für diese Anwendung kann beispielsweise ein Infrarot Passthrough Filter an der Kamera angeordnet sein, der nur Infrarotlicht durch den Filter passieren lässt. Es wird somit von dieser Kamera

nur das infrarote Licht erfasst, dass zur Erfassung des Untersuchungsobjekts zur Beleuchtung desselben eingesetzt wurde.

c) Mindestens einen **Wachstumscontainer, der** mindestens teilweise eine transparente Wandfläche aufweist. Der Wachstumscontainer kann jedoch auch zwei oder mehr transparente Wandflächen aufweisen. Die transparente Wandfläche sollte so groß gewählt werden, dass die Optode mit Licht ausreichend angeregt und das Signal der Optode entsprechen ausgewertet werden kann und der Organismus der untersucht werden soll, ebenfalls ausreichend durch die optische Erfassungseinheit belichtet und die Bilddaten erfasst werden können. Die transparente Wandfläche sollte mindestens für Licht der Wellenlänge durchlässig sein, die von der Beleuchtungseinheit emittiert wird. Dies kann beispielsweise Licht im Infrarotlichtspektrum und sichtbaren Lichtspektrum sein. In einer vorteilhaften Ausführung des Wachstumscontainers ist die Wandfläche, die sich hinter der transparenten Wandfläche befindet, mit einem dunklen, nicht reflektierenden und stark absorbierenden Material abgedeckt. Dies kann beispielsweise schwarzer Samt oder ein ähnliches Material sein. Dieses Material dient zur Vermeidung von rückstreuendem Licht und anderen optischen Effekten. Der Wachstumscontainer sollte eine dreidimensionale Ausgestaltung aufweisen und kann beispielsweise die Form eines Würfels, Quaders oder eines Zylinders haben. Petrischalen sind ebenfalls als Wachstumscontainer geeignet. Der Wachstumscontainer ist mit Wachstumsmedium gefüllt. Unter Wachstumsmedium ist hierbei ganz allgemein der Raum zu verstehen, welcher den zu beobachtenden Organismus bzw. das Organ umgibt, dessen Wachstum zulässt und somit die Lebensumwelt darstellt. Das Wachstumsmedium kann vielfältiger Natur sein, wobei es sich sowohl um ein natürliches Substrat (beispielsweise Boden, Erde, Sand) als auch um „halb"-synthetische Substrate (beispielsweise Agar, Hydrokulturen, Luftkulturen) handeln kann. Auch der Einsatz von anderen Wachstumsmedien, wie beispielsweise vollsynthetischen, quellfähigen Substitutionsmedien ist möglich. Bei der Betrachtung pflanzlicher Wurzelsysteme wird das Wachstumsmedium typischerweise als die Rhizosphäre bezeichnet. Der Wachstumscontainer wird in diesem Fall dann als Rhizotron bezeichnet. Ist das Wachstumsmedium beispielsweise Agar so sollte dieses mit der entsprechend an den zu untersuchenden Organismus angepassten Nährlösung angereichert sein. Dazu kann beispielsweise eine Hoaglandlösung in verschiedenen Abwandlungen oder jede andere für Pflanzenanzuchten geeignete Nährlösung verwendet werden. Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung können auch mehrere Wachstumscontainer untersucht wer-

den, die dann beispielsweise automatisiert jeweils ausgetauscht und gemessen werden können. So kann beispielsweise ein Petrischalenrad vermessen werden, bei dem die Petrischalen durch einen gesteuerten Motor jeweils immer ausgetauscht und in die erforderliche Richtung/Position für die Beleuchtungseinheit und optische Erfassungseinheit gebracht werden. (s. a. Figur 1)

Die Beleuchtungseinheit kann in einer vorteilhaften Ausführung der Vorrichtung direkt planar auf der Frontseite des transparenten Wachstumscontainers aufgebracht sein. Die Beleuchtungseinheit kann hierbei sowohl kameraseitig als auch auf der entgegengesetzten Seite angebracht werden.

Die Beleuchtungseinheit ist bei dieser Ausgestaltung derart zu positionieren, dass die transparente Seite des Containers so homogen wie möglich ausgeleuchtet wird. Bei der Positionierung ist darauf zu achten, dass Totalreflektionen und andere Lichteffekte möglichst vermieden werden. Dies kann beispielsweise durch eine Anordnung der Beleuchtungseinheit in einem Winkel von unter 90° (Winkel zwischen Kamera und Strahlengang der Beleuchtungseinheit, wobei entweder die Kamera oder die Beleuchtungseinheit orthogonal auf die Fläche des transparenten Wachstumscontainers sowie die Fläche der transparenten Optode ausgerichtet ist) erfolgen. Beispielhaft kann die Lichtquelle in einem 30^{O} Gradwinkel angebracht werden. Abweichende Winkel in einem Bereich von 0 bis 90° Grad sind bei der Messung bei Bedarf aber ebenfalls möglich. Der Wachstumscontainer kann ebenfalls in einem Winkel von unter 90° horizontal geneigt zur Beleuchtungseinheit und zur optischen Erfassungseinheit angeordnet sein, so dass zum einen Totalreflektionen vermieden werden und zum anderen das Wachstum in Richtung der Optode erfolgt, so dass die transparente planare Optode mit dem Wachstumsmedium kontaktieren kann.

d) eine planare, **transparente Optode**

Eine im Rahmen der Erfindung geeignete planare, transparente Optode zur Messung der chemisch und/oder physikalischen Parameter, beispielsweise des pH-Wertes, die sich, wenn sie mit einem Film flüssigen Wassers benetzt ist, durch eine Transparenz auszeichnet, die beispielsweise alle in Walter et al. (2009) genannten Verfahren zur Messung von Wachstumsprozessen von Wurzeln ermöglicht (wie z. B. DISP und GROWSCREEN root), und den Fluoreszenzfarbstoff immobilisiert, kann kann wie folgt hergestellt werden:

Eine Celluloseacetat–Folie (z. B. von Clarifoil®) wird mit einem Ethylcellulose-Polymer beschichtet, in welches der Fluoreszenzfarbstoff HPTS (8-Hydroxy-1,3,6-Trisulfonsäure) immobilisiert wird.

Zur Herstellung der Lösung, mit welcher die Folie beschichtet wird, müssen zunächst zwei Lösungen bereitgestellt werden.
Hier als Lösung 1 und Lösung 2 bezeichnet, welche danach gemischt werden. Die resultierende Lösung, welche hier als Lösung 3 bezeichnet wird, kann z. B. per Tauchbeschichtungsverfahren auf die Trägerfolie aufgebracht werden.

Die Reagenzien zur Herstellung der Lösung 1 können sein:

a.) Tetraoctylammoniumhydroxid-Lösung (TOA+; 10%ige Lösung in Methanol)
wird gemischt mit
b.) Ethanol (99.5 %-ige Lösung), wobei die Tetraoctylammoniumhydroxid-Lösung an der entstandenen Gesamtlösung aus a) und b) einen Volumenanteil von 20 % und die Ethanol-Lösung b) einen Volumentanteil von 80 % an der Gesamtlösung aus a) und b) hat.
In diese Gesamtlösung aus a) und b) wird der Fluorophor, z. B. HPTS (8-Hydroxy-1, 3, 6-Trisulfonsäure) gegeben und gelöst, wobei der Fluorophor dann einen Anteil von 0,1 bis 0,5 Gewichtsprozent an der Gesamtlösung aus a) und b) hat.

Die Reagenzien zur Herstellung der Lösung 2 können sein:
d) Ethanol (99.5 %-ig)
wird gemischt mit
e) Toluol (99.5%ig) zu einer Gesamtlösung aus d) und e) wobei Ethanol an der Gesamtlösung einen Volumenanteil von 40% und Toluol an der Gesamtlösung einen Volumenanteil von 60 % hat.
In diese Gesamtlösung aus d) und e) wird Ethyl-Zellulose (Ethoxyl Gehalt 48 %) gegeben und gelöst, wobei der Anteil von Ethyl-Zellulose dann einen Anteil von 0,59 Gewichtsprozent an der Gesamtlösung von d) und e) hat.

Zur Herstellung der Lösung 3 werden die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1 zu 2,125 gemischt. Nach dem Tauchbeschichtungsverfahren (Dip-Coating) wird die Optode getrocknet, in Milli-Q-Wasser gespült und kann getrocknet aufbewahrt werden.

Für das Tauchbeschichtungsverfahren können alle nach dem Stand der Technik bekannten Bedingungen gewählt werden. Als besonders geeignet hat sich ein 1- bis 3-faches ca. 10-sekündiges Eintauchen des Trägermaterials in die fluoreszenzfarbstoffhaltige Lösung erwiesen, wobei nachfolgend das Trägermaterial mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 cm/Sekunde aus der Lösung herausgezogen wurde.

Als Fluorophore und Polymere sind grundsätzlich auch alle nach dem Stand der Technik bekannten Verbindungen geeignet, die in den jeweils bekannten Lösungsmitteln gelöst werden können.

Die verwendeten Optoden sollen im Sinne der Erfindung über den sichtbaren Bereich des Spektrums sowie über den Nahinfraroten Bereich des Spektrums 1.) eine maximale Transmissivität, 2.) ein maximales Auflösungsvermögen sowie 3.) einen maximalen Grauwert-Kontrast besitzen, um die Messung von Wachstumsparametern (vgl. Walter et al., 2009) möglichst nicht zu beeinträchtigen.

Je nachdem ob mehrere Fluorophore und/oder Ionophor- Schichten (ionenselektive Schichten, um gezielt nur einen Analyten an den Fluorophor gelangen zu lassen) in die Optode eingebracht werden ist ggf. sogar eine gleichzeitige Messung mehrerer chemischer Analyte und/oder physikalischer Parameter möglich.

Weitere Vorteile der Optode sind

a) die gleichzeitige hohe Abriebfestigkeit der Polymerschicht, die auf den Träger aufgebracht ist und den Fluorophor enthält (Polymerschicht kann unter fließendes Wasser gehalten werden, ohne sich abzulösen),
b) die starke Immobilisierung des Fluorophors (beispielweise HPTS diffundiert nicht aus der Polymerschicht), sowie
c) die hohe Sensitivität (Zhu et al. 2005) der Optode.

Zhu et al. (2005) schreiben, dass HPTS als einer der besten Indikatoren zur fluoreszenzspktrometrischen pH-Messung gilt, da HPTS eine exzellente Fotostabilität, eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute, und weitere vorteilhafte Eigenschaften aufweist.
Diese Eigenschaften sind insbesondere bei Immobilisierung des Fluorophors HPTS festzustellen. HPTS ist im Vergleich zu anderen Fluorophoren besonders gut erforscht (Zhu et al. 2005), stabil gegenüber fotolytischem Abbau des Moleküls durch Lichteinstrahlung (Zhu et al. 2005). In vielen Fällen können beispielsweise auch Ionophore in oder auf die Optode ein- oder aufgebracht werden.
Die Optode ist so angeordnet, dass die Seite, die mit dem Fluorophor beschichtet ist, mit dem Wachstumsmedium kontaktiert.
Es beispielsweise auch möglich, dass zwei bis mehrere Optoden innerhalb des Wachstumscontainers gleichzeitig eingesetzt werden, mit denen dann beispielsweise die Parameter pH-Wert, Ammoniumkonzentration oder andere Salzkonzentrationen erfasst werden können.

e) Ein **Steuerungseinheit.** Dies kann zur Steuerung der Vorrichtungskomponenten wie beispielsweise der Beleuchtungseinheit und der optischen Erfassungseinheit eingesetzt werden.
f) Eine **elektronische Datenerfassungs- und Auswerteeinheit** (oder Embedded Computer). Hier können die ermittelten Daten/Bilddaten gespeichert und mittels spezieller Auswerteverfahren und Auswerteprogramme ausgewertet werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung weist die Vorrichtung

g) als elektronische Datenerfassungs-/Auswerteeinheit einen Computer mit einem **mathematischen Auswerteprogramm, wie beispielsweise** MATLAB, The MathWORKS Inc. auf.
h) Eine **Dunkelbox** zur Abschirmung des zu untersuchenden Organismus/Wachstumscontainers vor störenden Außenlichteinflüssen und /oder insbesondere zur Abschirmung der optischen Erfassungseinheit , wie z. B der Kamera, der Optik, des Wachstumscontainers, der Beleuchtungseinheit wie z. B. der Lichtquelle, der Optoden und Filter vor Außeneinflüssen (wie beispielsweise externes Licht, Temperaturschwankungen). Eine optionale Zugangsklappe kann dabei optionale Wartungsarbeiten erleichtern.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemischer und/oder physikalischer Parameter,

umfassend folgende Verfahrensschritte:

a) Erfassung der Wachstumsprozesse mittels bildgebender Methoden.

b) Erfassung der chemisch und/oder physikalischen Parameter durch Verwendung einer planaren, transparenten Optode, wobei die Daten aus a) und b) simultan und parallel zueinander gewonnen werden.

Eine vorteilhaften Ausführung des Verfahrens ist gekennzeichnet durch

a) Einbringen eines Wachstumsmediums in einen Wachstumscontainer.

b) Einbringen einer transparenten, planaren Optode in den Wachstumscontainer, so dass die Seite der Optode, die mit dem Fluorophor beschichtet ist, mit dem Wachstumsmedium kontaktiert.

c) Einbringen des Untersuchungsobjekts in das Wachstumsmedium des Wachstumscontainers und Kultivieren unter Kulturbedingungen.

d) Belichten des Wachstumscontainers durch eine Beleuchtungseinheit mit Licht einer Wellenlänge, das im Anregungswellenlängenbereich des jeweiligen Fluorophors der Optode liegt.

e) Belichten des Untersuchungsobjekts im Wachstumscontainer:

f) Aufnahme von Bilddaten aus e) und des emittierten Fluoreszenzlichts aus d) mit einer optischen Erfassungseinheit:

g) Auswerten der Daten aus f).

Die Erfindung bietet neuartige Lösungen und Anwendungen für mehrere wirtschaftliche und wissenschaftliche Zwecke. Dabei ist beispielsweise vor allem die Nutzpflanzenwissenschaft zu nennen, der die erfindungsgemäßen Verfahren und Methoden die Möglichkeit eröffnen, auf den Gebieten der Pflanzenzuchtwissenschaft sowie der Pflanzenschutzwissenschaft Screenings durchzuführen. Diese Screenings können beispielsweise der Untersuchung des Potentials verschiedenen Pflanzentypen (beispielsweise Sorten, Biotypen, Ökotypen, Mutanten, Arten, Transgenen, Hybriden u. a.) dienen, mit ihrer Umwelt im gewünschten Sinne auf chemisch-physikalische Weise zu interagieren.

Anwendungen finden sich demnach in der kombinierten, simultanen Messung von chemisch-physikalischen Wechselwirkungen, welche von Lebewesen, Geweben oder Zellkolonien auf das Wachstumssubstrat oder Wachstumsmedium ausgehen, oder umgekehrt vom Wachstumssubstrat oder Wachstumsmedium auf Lebewesen, Geweben oder Zellkolonien ausgehen,

sowie der räumlichen und zeitlichen Auswirkungen und Verteilungen von Schadstoffen, Xenobiotika, Nährstoffen oder anderen biologischen, chemischen und physikalischen Stimuli und gleichzeitiger bildgebender und bildanalytischer Erfassung von Wachstumsparametern, mit dem Ziel z. B. eines Sorten/Ökotypen-Screenings, Stoffwechsel-Monitorings, Toleranz- und/oder Resistenz-Screenings und/oder –Monitorings, in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Dabei kann eine Anwendung beispielsweise auch in der Untersuchung des Nährstoffaufnahmevermögens einer Pflanze bestehen, oder in der Untersuchung eines Herbizideffekts auf Stoffwechselprozesse der Rhizosphäre, oder Toleranzen von Pflanzen gegenüber Umweltgiften im Fokus stehen. Von besonderem Interesse sind in wirtschaftlicher Hinsicht unter letztgenannten Pflanzen insbesondere Nutzpflanzen sowie Ruderalpflanzen/Unkräuter zu verstehen.

Ein weiteres beispielhaftes Anwendungsfeld besteht somit auch in den Umweltwissenschaften und der Umwelttoxikologie. Eine denkbare Anwendung könnte z. B. darin bestehen, den Einfluss von Umweltgiften (z. B. Schwermetalle) auf die Wechselwirkungen zwischen Wurzel und Boden in der Rhizosphäre aufzuzeigen und zu quantifizieren. Die Deposition und Konzentration von Schwermetallen in Ökosystemen nimmt gegenwärtig weltweit zu und stellt seit Jahren einen Schwerpunkt der umwelttoxikologischen Forschung dar.

Im Weiteren wird die Erfindung an Hand von Ausführungsbeispielen und den beigefügten Figuren näher erläutert.

Es zeigen:

Figur 1: Schematische Gesamtübersicht der Vorrichtung:

Figur 2: Wachstumscontainer in Form einer Petrischale:

Figur 3: Wachstumscontainer in Form eines Rhizotrons:

Figur 4: Wachstumscontainer in Form einer Hydrokultur:

Figur 5: Anordnung der Vorrichtung mit schematischer Darstellung des Verfahrensablaufs:

Figur 6: Relative Transmissivität (%) einer Optode nach Stand der Technik (a) im Vergleich zur Transmissivität der erfindungsgemäßen, transparenten, planaren Optode (b) für Licht im Wellenlängenbereich zwischen 180 bis 900 nm; Abszisse X: Wellenlänge (nm); Ordinate Y: relative Transmissivität (%).

Figur 7: Absorptionsspektren und beispielhaftes Emissionsspektrum (E) der transparenten, planaren Optode mit HPTS in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte (pH 5,3; pH 9,7).

Es zeigt Figur 1 beispielhaft eine schematische Gesamtübersicht der Vorrichtung mit:

a: Wurzel eines Pflanzensprosses,
b: Wachstumscontainer (z. B. Rhizotron, Petrischale),
c: planare, transparente Optode.
d: Wachstumsmedium bzw. Substrat,
e: Dunkelkammer,
f: Lichtquelle, z. B. zur Anregung der Fluorophore,
g: optionaler Vergrößerungstubus,
h: Kameraobjektiv,
i: Kamera,
j: Steuerungseinheit,
k: Computer als elektronische Auswerteeinheit,
l: weitere Wachstumscontainer in automatisierter Anlage (z. B. Petrischalenrad)
m: weitere Lichtquelle zur Beleuchtung des zu untersuchenden Organismus (z. B. Nahinfrarot-LEDs zur Wurzelbeleuchtung.
n: Filter bzw. Filterrad,
o: Sproß der Pflanze,
p: Winkel der Lichtquellen/Beleuchtungseinheit, variabel einstellbar,

Es zeigt Figur 2 die Seitenansicht eines Querschnitts durch eine mögliche Ausgestaltung des Wachstumscontainers als Petrischalensystem mit
a: Agarosegel,
b: Spross der Pflanze,
c: Wurzel,
d: Petrischale aus transparentem Polystyrol,
e: Bohrung in Petrischale als Sprossdurchlass,
f: planare Optode.

Es zeigt Figur 3 die Seitenansicht eines Querschnitts durch eine mögliche Ausgestaltung des Wachstumscontainers als Rhizotronsystem mit

a: Boden/Substratoberfläche,
b: Spross der Pflanze,
c: Wurzel,
d: Rahmen des Rhizotrons,
e: Sichtscheibe des Rhizotrons,
f: planare Optode,
g: Verschraubung der Sichtscheibe mit dem Rahmen des Rhizotrons.

Es zeigt Figur 4 die Seitenansicht eines Querschnitts durch eine mögliche Ausgestaltung des Wachstumscontainers als Hydrokultursystem mit
a: Nährlösungsoberfläche,
b: Spross der Pflanze,
c: Wurzel,
d: Rahmen des Containers (wasserdicht abgedichtet),
e: Sichtscheibe des Containers,
f: planare Optode,
g: Verschraubung der Sichtscheibe mit dem Rahmen des Containers,
h: Lufteinspeisung für Belüftung.

Es zeigt Figur 5 schematisch die Verknüpfung der einzelnen Vorrichtungskomponenten, mit deren Hilfe sich Wachstumsprozesse und sich dynamisch verändernde chemisch-physikalische Eigenschaften des Wachstumsmediums simultan erfassen lassen. Dargestellt werden folgende Vorrichtungskomponenten:

1. Steuerungseinheit, welche die abwechselnde Beleuchtung des Untersuchungsobjektes durch einzelne monochromatische Lichtquellen in Intervallen, sowie die Auslösung der Kamera steuert. Das Intervall zwischen den jeweiligen Einzelbildaufnahmen, bzw. einzelnen ausgelösten Lichtblitzen, wird durch eine vorhandene vordefinierte Konfigurationsdatei und durch das Laufzeitprogramm der Steuerungseinheit bestimmt.

2. LED 2: Lichtquelle für die Aufnahme von Wachstumsprozessen (beispielsweise 880 oder 920 nm).

3. LED 3: Lichtquelle, welche mit dem zweiten Absorptionsmaximum des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophores korrespondiert. Bei der Lichtquelle kann es sich beispielsweise um eine LED mit einem schmalbandigen

Emissionsmaximum handeln. (Im Falle von HPTS ist dies beispielsweise die Wellenlänge 450 nm).

4. LED 4: Lichtquelle, welche mit dem ersten Absorptionsmaximum des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophores korrespondiert. Bei der Lichtquelle kann es sich beispielsweise um eine LED mit einem schmalbandigen Emissionsmaximum (Narrowband) handeln. (Im Falle von HPTS ist dies beispielsweise die Wellenlänge 405 nm).

5. Intensität der Lichtquelle LED4:

   a. Status aktiviert und integrierte Intensität der Lichtquelle, welche mit dem ersten Anregungsmaximums des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert, über die Zeit der Auslösung der Lichtquelle LED 4. Die Steuerungseinheit aktiviert LED 4 als Voraussetzung für Aufnahmen entsprechend 18 (Emission bei Anregung im ersten Absorptionsmaximum des verwendeten Fluorophores).
   b. Status inaktiviert,
   c. Status inaktiviert.

6. Transparente, planare Optode.

7. Intensität der Lichtquelle LED2

   d. Status inaktiviert,
   e. Status inaktiviert,
   f. Status aktiviert und integrierte Intensität der Lichtquelle LED2 über die Zeit der Auslösung der Lichtquelle LED 2 . Die Steuerungseinheit aktiviert LED2 als Voraussetzung für Aufnahmen entsprechend 25 (Wachstumsaufnahmen in einem Spektralbereich, welcher nicht durch die Emission des Fluorophores beeinträchtigt wird).

8. Intensität der Lichtquelle LED3

   g. Status inaktiviert,
   h. Status aktiviert und integrierte Intensität der Lichtquelle LED3, welche mit dem zweiten Anregungsmaximums des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert, über die Zeit der Auslösung der Lichtquelle LED 3. Die Steuerungseinheit aktiviert LED3 als Vorausset-

zung für Aufnahmen entsprechend 22 (Emission bei Anregung im zweiten Absorptionsmaximum des verwendeten Fluorophores).

i. Status inaktiviert.

9. Auf die Optode treffendes monochromatisches Licht der Wellenlänge von LED4, welche mit der Wellenlänge des ersten Absorptionsmaximums des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert.
10. Auf die Optode treffendes monochromatisches Licht der Wellenlänge von LED3, welche mit der Wellenlänge des zweiten Absorptionsmaximums des Absorptionsspektrums des auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert.
11. Auf die Probe (durch die transparente Optode hindurch) treffendes Licht von LED2.
12. Kameraverschluss (Shutter).
13. Sperrfilter
    j. engbandiger Sperrfilter, welcher lediglich das Licht einer Wellenlänge durchlässt, welches mit dem Emissionsmaximum des verwendeten und auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert (bei HPTS beispielsweise 515 nm, bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge des ersten Absorptionsmaximums).
    k. Engbandiger Sperrfilter, welcher lediglich das Licht einer Wellenlänge durchlässt, welches mit dem Emissionsmaximum des verwendeten und auf der Optode aufgetragenen Fluorophors korrespondiert (bei HPTS beispielsweise 515 nm, bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge des zweiten Absorptionsmaximums).
    l. Breitbandiger Sperrfilter (für Wachstumsmessungen) beispielweise im Bereich des infraroten Spektrums. Der gewählte Spektralbereich des Filters kann dabei beliebig breit gewählt werden, umfasst jedoch idealerweise einen Bereich, in welchem gewünschte Strukturdiskriminierungen optimal und ohne Beeinflussung der zu untersuchenden Strukturen (z. B. Wurzelwachstum) gewährleistet sind.
14. Von der Optode/Probe emittiertes/reflektiertes Licht
    m. Emission nach Anregung im ersten Absorptionsmaximum des Fluorophores.
    n. Emission nach Anregung im zweiten Absorptionsmaximum des Fluorophores.
    o. Von der Probe reflextiertes Licht im Infrarotbereich.
15. Schließen des Kameraverschlusses

16. Bildaufnahme.
17. Kamera.
18. Photographische Aufnahme (Bild) der Emission des auf der Optode aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffes (2-D) bei Anregung entsprechend dem ersten Absorptionsmaximums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes.
19. Sequenzielle Nummer n der in 18. erstellten Aufnahme innerhalb einer als Datei erstellten Bildsequenz.
20. Belichtungszeit der photographischen Aufnahme 18.
21. Intervall zwischen den Aufnahmen 18. und 22. (die Länge des Intervalls wird durch die programmierte Steuerungseinheit bestimmt).
22. Photographische Aufnahme (Bild) der Emission des auf der Optode aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffes (2-D) bei Anregung entsprechend dem zweiten Absorptionsmaximums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes.
23. Sequentielle Nummer n der in 22. erstellten Aufnahme innerhalb einer als Datei erstellten Bildsequenz.
24. Belichtungszeit der photographischen Aufnahme 22.
25. Photographische Aufnahme (Bild) für die Erfassung von Wachstumsprozessen.
26. Sequenzielle Nummer n der in 25. erstellten Aufnahme innerhalb einer als Datei erstellten Bildsequenz.
27. Belichtungszeit der photographischen Aufnahme 25.
28. Intervall zwischen den Aufnahmen 25. und derjenigen Aufnahme, mit welcher der jeweilige Messaufnahmenzyklus entsprechend analog 18. wieder beginnt.
29. Ausgabe eines sekundengenauen bzw. millisekundengenauen Zeitstempels für jedes Einzelbild n der in 18., 22. und 25. erstellten sequentiellen Aufnahmen innerhalb der entsprechend 30. erstellten Protokolldatei oder in Form von Metadaten innerhalb der erstellten Bilddateien.
30. Protokolldatei oder Metadatei innerhalb der erstellten Bilddatei.
31. Hochzählen der Sequenznummer n mit n + 3 für die Gesamtanzahl der Zyklen entsprechend 18. bis 30.
33. Multi-TIFF Datei zur Speicherung von:
    p. Bildaufnahme aus 25.
    q. Bildaufnahme aus 45.

34. Intervall zwischen den Aufnahmen 22. und 25. (die Länge des Intervalls wird durch die programmierte Steuerungseinheit bestimmt).
35. Ablage der Bilder aus 25. In der Multi-TIFF Datei 33p.
36. Auswertung von 33p mit Hilfe der Bildauswertungssoftware 37.
37. Bildauswertungssoftware (z. B. DISP).
38. Entrauschen der Bildaufnahmen 18./22./25. durch 10-fache Wiederholung der jeweiligen Bildaufnahmen und anschließender Mittelung der Bildaufnahmen.
39. Erzeugung eines Dunkelbildes, ohne Einschalten einer Beleuchtung
40. Auswertung der Fluoreszenzbilder.
41. Bildung eines ratiometrischen Bildes aus 18. Und 22.
42. Verrechnung von 39. Und 41, zu Dunkelkorrektur.
43. Dunkel korrigiertes ratiometrisches Bild.
44. Pixel für Pixel Korrektur von 43.
45. Fertiges ratiometrisches Bild.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemisch und/oder physikalischer Parameter ist wie folgt zu beschreiben:

Eine Steuerungseinheit (1) steuert die Aktivitäten verschiedener Lichtquellen (2, 3, 4) und einer Optischen Erfassungseinheit/Kamera (12, 17). Die Lichtquellen LED 3, 4 dienen dabei zur Anregung einer planaren, transparenten Optode (6) und LED 2 dient zur Erfassung von Wachstumsprozessen. Beginnend mit 5a wird die LED 4 aktiviert, während LED 2 und 3 inaktiv bleiben (7d & 8g). Das monochromatische Licht aus LED 4 (Schritt 9) regt die planare Optode (6) an und das dadurch emittierte Fluoreszenzlicht der Optode (Schritt 14 m) passiert einen engbandigen Sperrfilter (13j) und trifft auf die Optischen Erfassungseinheit/Kamera (12, 17). Während einer definierten Aufnahme-/Belichtungszeit (20) wird eine zwei dimensionale Aufnahme der Fluoreszenz entsprechend dem ersten Absorptionsmaximum des verwendeten Fluorophores erstellt (18). Zum Entrauschen (Schritt 38) werden insgesamt 10 solcher Aufnahmen nacheinander erstellt (Schritt 38) und anschließend nach gängigen Verfahren als gemitteltes Bild mit einer sequenziellen Nummer (19) versehen und ein Zeitstempel (29) für jedes Einzelbild wird in einer Protokolldatei (30) abgelegt.

Nach einem durch die Steuerungseinheit bestimmten Intervall (21) wird die nachfolgende Fluoreszenzaufnahme entsprechend dem zweiten Absorptionsmaximum des verwendeten

Fluorophores erstellt. Dazu wird die LED 3 aktiviert (8h), während LED 4 und 2 inaktiv bleiben (7e & 5b). Das monochromatische Licht aus LED 3 (10) regt die planare Optode (6) an und das dadurch emittierte Fluoreszenzlicht (Schritt 14n) passiert einen engbandigen Sperrfilter (13k) und trifft auf die Optischen Erfassungseinheit/Kamera (12, 17). Während einer definierten Aufnahme-/Belichtungszeit (24) wird eine zweidimensionale Aufnahme der Fluoreszenz entsprechend dem zweiten Absorptionsmaximum des verwendeten Fluorophores erstellt (22). Zum Entrauschen (38) werden insgesamt 10 solcher Aufnahmen nacheinander erstellt (38) und anschließend nach gängigen Verfahren als gemitteltes Bild mit einer sequenziellen Nummer (23) versehen und ein Zeitstempel (29) für jedes Einzelbild wird in einer Protokolldatei (30) abgelegt.

Nach einem durch die Steuerungseinheit bestimmten Intervall (34) wird die nachfolgende Aufnahme der Wachstumsprozesse und Strukturen erstellt. Dazu wird die LED 2 aktiviert (7f), während LED 3 & 4 inaktiv bleiben (8i & 5c). Das monochromatische Licht aus LED 2 (Schritt 11) passiert die transparente planare Optode (6) und trifft auf die dahinter befindliche Probe. Das anschließend von der Probe reflektierte Licht (14o) passiert einen breitbandigen Sperrfilter (13l) und trifft auf die Optischen Erfassungseinheit/Kamera (12, 17). Während einer definierten Aufnahme-/Belichtungszeit (27) wird eine zwei dimensionale Aufnahme der Wachstumsprozesse und Strukturen erstellt (25). Zum Entrauschen (38) werden insgesamt 10 solcher Aufnahmen nacheinander erstellt (38) und anschließend nach gängigen Verfahren als gemitteltes Bild mit einer sequenziellen Nummer (26) versehen und ein Zeitstempel (29) für jedes Einzelbild wird in einer Protokolldatei (30) abgelegt.

Nach einem durch die Steuerungseinheit bestimmten Intervall (28) beginnt die nächste Messreihe, wobei die sequenzielle Nummer der folgenden Aufnahme entsprechend der Gesamtzahl der abgeschlossenen Zyklen hoch gezählt wird (31). Die erstellten Aufnahmen (18./22./25.) werden anschließend wie folgt weiterverarbeitet: Die Bildverarbeitung der Fluoreszenzaufnahmen (40) beginnt mit der Bildung eines ratiometrischen Bildes aus 18. und 22. (41). Dieses Bild wird dann mit einem Dunkelbild (39) verrechnet um das Schwarzrauschen herauszufiltern. Das so entstandene korrigierte Bild (43) wird anschließend einer Pixel-Für-Pixel Korrektur gemäß einschlägiger Literatur unterzogen (44). Das daraus entstandene vollständig korrigierte Bild (45) wird in einem sogenannten Multi-TIFF Format abgelegt (33q) und kann von dort beliebig ausgelesen und weiterverarbeitet werden. Die Wachstums- oder Strukturaufnahmen (25) werden direkt in einem sogenannten Multi-TIFF Format abgelegt (33p).

Dieses Bild wird dann während der weiteren Bildanalyse (36) mit einschlägiger Software (37) weiterverarbeitet.

Es zeigt Figur 6 sowie einige exemplarische Messwerte in Tabelle 3 die relative Transmissivität in % einer Optode nach dem Stand der Technik (a) im Vergleich mit der neuen erfindungsgemäßen Optode (b) in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Eine höchstmögliche optimale Lichtdurchlässigkeit und damit Durchsichtigkeit im gesamten Spektrum wäre bei einer 100 %-igen Transmission des Lichts (Transmissivität) bei allen Wellenlängen gegeben. Wie der Vergleich der Optoden zeigt, weist die erfindungsgemäße Optode ab einer Wellenlänge von ca. 280 nm eine Transmission von mehr als 90 % auf, während die Optode des Stands der Technik bei 280 nm nur eine relative Transmission von ca. 14,66 % aufweist bis maximal 62 % bei 852 nm.

Es zeigt Figur 7 relative Absorptionsspektren in % und beispielhaft ein relatives Emissionsspektrum in % der erfindungsgemäßen Optode, die den Fluorophor HPTS enthält, bei unterschiedlichen pH-Werten. Ordinate X: Wellenlänge (nm); Abszisse Y: Relative Absorption bzw. Emission in % bezogen auf die eingestrahlte Lichtmenge. Die Optode weist zwei Absorptionsmaxima im Bereich von 1.) 405 nm auf und ein zweites Absorptionsmaximum bei 450 nm. Weiterhin weist sie ein Emissionsmaximum bei 515 nm auf. Damit zeigt sich, dass die erfindungsgemäße Optode für ratiometrische Fluoreszenzmessungen, wie schon zuvor beschrieben, geeignet ist. Es können zwei Anregungswellenlängen von 405 nm und 450 nm verwendet werden und eine Emissionswellenlänge von 515 nm.

Tabelle 3: Relative Transmissivität der erfindungsgemäßen Optode und einer Optode nach dem Stand der Technik bei unterschiedlichen Wellenlängen

Wellenlänge (nm)	**Relative Transmissivität (%) Erfindungsgemäße Optode**	**Relative Transmissivität (%) Optode nach Stand der Technik**
280	90,13	14,66
286	91,23	30,95
343	93,81	45,75
481	96,19	54,21
696	98,92	58,42
725	99,09	59,03
852	99,91	61,94
900	99,97	59,33

Tabelle 4: Relativer Grauwert-Kontrast (Differenz der Grauwerte) in % in Bezug auf die Referenz (Ohne Optode) bei fotographischen schwarz-weiß Aufnahmen von Punkten des Schrifttyps Times New Roman mit einer Punktgröße 128 mit einer Belichtung mit Licht der Wellenlänge von 880 nm.

	Ohne Optode	**Neue Optode**	**Optode nach Stand der Technik**
Relativer Grauwertkontrast (Mittelwert)	100 %	94 %	11 %

Tabelle 4 zeigt den relativen Grauwert-Kontrast (Differenz der Grauwerte) in Bezug auf die Referenz (Ohne Optode) bei fotographischen schwarz-weiß Aufnahmen von Punkten des Schrifttyps Times New Roman mit einer Punktgröße 128. (Siehe auch Tabelle 8) mit einer Belichtung mit Licht der Wellenlänge von 880 nm. Messort je in der Mitte des ganz rechten schwarzen Punktes (Schriftgröße 128) in der jeweiligen fotografischen Aufnahme unter Verwendung eines engbandigen Filters, welcher ausschließlich Licht mit der Wellenlänge 880 nm transmittieren lässt. Ein kleiner Wert zeigt einen geringen Grauwert-Kontrast zwischen weißen und schwarzen Bereichen in der fotografischen Aufnahme. Erwünscht ist ein Wert möglichst nahe am Wert ohne Optode (100 %). Die erfindungsgemäße Optode weist die gewünschte verbesserte Eigenschaft gegenüber der Optode des Stands der Technik deutlich auf.

Tabelle 5: Relativer Grauwert-Kontrast (Differenz der Grauwerte) in % in Bezug auf die Referenz (Ohne Optode) bei fotographischen schwarz-weiß Aufnahmen von Punkten des Schrifttyps Times New Roman mit einer Punktgröße 128 mit Belichtung mit sichtbarem Licht

	Ohne Optode	**Neue Optode**	**Optode nach Stand der Technik**
Relativer Grauwert-kontrast (Mittel-wert)	100 %	76 %	7 %

Es zeigt Tabelle 5 den Relativen Grauwert-Kontrast (Differenz der Grauwerte) in Bezug auf die Referenz (Ohne Optode) bei fotographischen schwarz-weiß Aufnahmen von Punkten des Schrifttyps Times New Roman mit einer Punktgröße 128. (Siehe auch Tabelle 8) mit Belichtung mit sichtbarem Licht. Messort: je in der Mitte des ganz rechten schwarzen Punktes (Schriftgröße 128) sowie im Punkt zwischen den beiden Punkten mit der Schriftgröße 128 und 64 in der jeweiligen fotografische Aufnahme ohne Verwendung eines Filters. Ein kleiner Wert zeigt einen geringen Grauwert-Kontrast zwischen weißen und schwarzen Bereichen in der fotografischen Aufnahme. Erwünscht ist ein Wert möglichst nahe am Wert ohne Optode (100 %). Die erfindungsgemäße Optode weist die gewünschte verbesserte Eigenschaft gegenüber der Optode des Stands der Technik deutlich auf.

Tabelle 6: Relativer Durchmesser in Prozent des ganz rechten Punktes in der fotografischen Aufnahme (Schriftgröße 128) bei einer Belichtung mit Licht der Wellenlänge 880 nm als Maß für das Auflösungsvermögen

	Ohne Optode	**Neue Optode**	**Optode nach Stand der Technik**
Relativer Durchmesser (Mittelwert)	100 %	101 %	124 %

Es zeigt Tabelle 6 den Relativen Durchmesser in Prozent des ganz rechten Punktes in der fotografischen Aufnahme (Schriftgröße 128) bei einer Belichtung mit Licht der Wellenlänge 880 nm als Maß für das Auflösungsvermögen. Ein Wert nahe an 100% zeigt eine geringe Unschärfe und damit hohe Trennschärfe an. Erwünscht ist ein Wert möglichst nahe am Wert ohne Optode. Die erfindungsgemäße Optode weist die gewünschte verbesserte Eigenschaft gegenüber der Optode des Stands der Technik deutlich auf.

Tabelle 7: Relativer Durchmesser in Prozent des ganz rechten Punktes in der fotografischen Aufnahme (Schriftgröße 128) bei einer Belichtung mit sichtbarem Licht als Maß für das Auflösungsvermögen

	Ohne Optode	**Neue Optode**	**Im Handel erhältliche Optode**
Relativer Durchmesser (Mittelwert)	100 %	104 %	127 %

Es zeigt Tabelle 7 den Relativen Durchmesser in Prozent des ganz rechten Punktes in der fotografischen Aufnahme (Schriftgröße 128) bei einer Belichtung mit sichtbarem Licht als Maß für das Auflösungsvermögen. Ein Wert nahe an 100% zeigt ein geringes Undeutlich werden und damit hohe Trennschärfe an. Erwünscht ist ein Wert möglichst nahe am Wert ohne Optode. Die erfindungsgemäße Optode weist die gewünschte verbesserte Eigenschaft gegenüber der Optode des Stands der Technik deutlich auf. (Normalisierte arithmetische Mittel der Pixel-Durchmesser, Messwiederholungen = 15, Versuchswiederholungen = 2).

1. Ausführungsbeispiel:

Kontinuierliche und simultane Erfassung des Wurzelwachstums sowie der Wurzelsystemarchitektur sowie der Wachstumsdynamik zum einen, und simultaner kontinuierlicher Erfassung des Rhizosphären-pH-Wertes von dikotylen Pflanzen, wie zum Beispiel *Nicotiana tabacum* oder *Arabidopsis thaliana*, die auf einem Agarosemedium als Kultursubstrat kultiviert werden, welches sich in Petrischalen als Kultivierungsgefäß befindet.

Die wie zuvor beschrieben hergestellten Optoden und in den folgenden Ausführungsbeispielen verwendeten Optode sind hinsichtlich ihrer Transparenz mit Sichtscheiben aus Glas oder Kunststoff vergleichbar, und ermöglicht eine Auswertung beispielsweise mit der Software GROWSCREEN-Root oder der Software GROW Map-Root ohne Einschränkungen.

Pflanzenanzucht:

Sterilisation des Saatguts:

Pflanzensamen der zu untersuchenden Spezies werden innerhalb einer Sterilbank äußerlich sterilisiert, indem die Samen zunächst in 70 %-igem Ethanol, in wässriger Lösung, für drei Minuten und danach in 0,5 %-igem Natrium-Hypochlorit (inklusive einem Tropfen Tween auf 10 ml), in wässriger Lösung, für zehn Minuten inkubiert und danach gründlich mit autoklaviertem Wasser gespült werden.

Bereitung des Kulturmediums:

In eine 33 %-ige Hoaglandlösung werden 10 g Agarose pro L gegeben und das Gemisch anschließend autoklaviert, gut homogenisiert und bis zur Weiterverarbeitung verschlossen gelagert.

Innerhalb einer Sterilbank wird das Medium in Petrischalen gegossen. Nach Aushärten der Agarose werden die Optoden auf das Agarosegel gelegt, so dass die mit dem Fluorophor beschichtete Seite möglichst ohne Lufteinschlüsse auf der Agarose aufliegt. Die Petrischalen werden mit Micropore-Band und Parafilm verschlossen.

Kultivierung der Pflanzen:

Die sterilisierten Samen werden innerhalb einer Sterilbank in Perforationen an der Schmalseite der Petrischale gesät und die Petrischale mit Parafilm verschlossen.

Die Pflanzen werden bei geeigneten Klimabedingungen angezogen, wobei die Petrischalen mit der Seite, der die Optode aufliegt, um z. B. 45° nach innen gekippt wird (siehe Fig. 2).

Erfassung der zu messenden Parameter, Kameraeigenschaften, siehe 2. Ausführungsbeispiel

2. Ausführungsbeispiel:

Kontinuierliche und simultane Erfassung des Wurzelwachstums sowie der Wurzelsystemarchitektur sowie der Wachstumsdynamik, und simultane kontinuierliche Erfassung des Rhizosphären-pH-Wertes von monokotylen oder dikotylen Pflanzen, wie zum Beispiel *Nicotiana tabacum* oder *Arabidopsis thaliana*, die auf Boden als Kultursubstrat kultiviert werden, welches sich in Rhizotronen als Kultivierungsgefäß mit mindestens einer transparenten Sichtscheibe befindet.

Die in diesem Beispiel verwendete Optode ist hinsichtlich ihrer Transparenz mit Sichtscheiben aus Glas oder Kunststoff vergleichbar, und ermöglicht eine Auswertung beispielsweise

mit der Software GROWSCREEN-Root oder der Software GROW Map-Root. Andere Auswerteverfahren sind jedoch ebenfalls möglich.

Pflanzenanzucht:

Bereitung des Kultursubstrats:

Die Rhizotrone werden z. B. mit konventioneller Anzuchterde gefüllt. Danach wird die Sichtscheibe entfernt und von anhaftendem Boden gesäubert. Auf die im Rhizotron freigelegte Bodenfläche wird die planare Optode mit der Seite, die mit dem Fluorophor beschichtet ist, auf den Boden gelegt. Danach wird die Sichtscheibe auf die Optode gelegt und wieder befestigt. Alternativ kann die planare Optode auch an die entsprechende Stelle der Sichtscheibe mit beispielsweise Silikonfett angeheftet werden bevor der Boden in das Rhizotron eingefüllt wird. Somit würde es vermieden werden, dass beim Öffnen eines bereits gefüllten Rhizotrons die Bodenstruktur verändert wird.

Die Rhizotrone werden in einem Winkel von z. B. 45° in Richtung der Sichtscheibe dauerhaft gelagert. Die Samen der zu untersuchenden Pflanzen werden in das Rhizotron gesät und bei geeigneten, artspezifischen Kultivierungsbedingungen kultiviert.(siehe Figur 3).

Erfassung der zu messenden Parameter, Kameraeigenschaften

Eine optischen Erfassungseinheit, beispielsweise eine CCD-Kamera oder ähnliches wird zur Sichtscheibe des Rhizotrons in einem definierten Abstand und Winkel arretiert, um reproduzierbare Aufnahmen zu erstellen. Die Beleuchtungseinheit, in der Regel monochromatische LEDs, werden analog zur optischen Erfassungseinheit ebenfalls arretiert. Beleuchtungs- und Erfassungseinheit werden über einen PC gesteuert ausgelöst, um in definierten Abständen Aufnahmen des Wurzelsystems und der Rhizosphären-pH-Dynamik zu erfassen.

Die Erfassung des Wachstums des Wurzelsystems erfolgt beispielsweise mit Hilfe der Software ROOTFIND und basiert in der Regel auf Bildern der optischen Erfassungseinheit im bitmap Format. Eine vorgelagerte Konvertierung der Bilder in schwarz/weiß Format etc. ist dabei möglich, sofern die nachgelagerte Auswertungssoftware dies erfordert. Dabei werden z.B. die Länge und die Anzahl der sichtbaren Wurzeln automatisch erfasst und in gesonderten Datenfiles abgelegt. Die Kalibrierung der Aufnahmen erfolgt über den Abgleich der gezählten Wurzelpixel mit der Anzahl der Pixel von Objekten deren Länge und Dicke bekannt ist, und die ebenfalls im Bild erfasst sind (z. B. Kapillaren, etc.).

Die Erfassung der Rhizospähren pH-Dynamik wird über den Abgleich der erzeugten Bilder (z. B. TIFF oder RAW Format) mit zuvor erstellten Kalibrationsdaten realisiert. Als konventionelle und kommerziell erhältliche Auswertungssoftware kann hier die „Image processing toolbox" von Matlab oder auch Photoshop dienen. Die Fehlerkorrektur der erzeugten Bilder kann beispielsweise analog zur Beschreibung von Strömberg & Hulth (2005) erfolgen:
Hierbei werden zu Beginn der Aufnahmen ein oder mehrere Dunkelbilder erzeugt, um das „Schwarz-Rauschen" aus der späteren Bildantwort herauszurechnen. Dazu wird ein Bild erzeugt, bei dem die Objektivkappe auf dem verwendeten Objektiv verbleibt. Um das systematische Rauschen durch Mehrfachaufnahmen zu reduzieren, wird das Schwarzrauschen von den Bildern jeder Wellenlänge abgezogen.

Kalibrierung der Optode

Entsprechend den Ausführungen von Hakonen & Hulth (2007) kann die pH -Optode z.B. wie folgt kalibriert werden (Abwandlungen hiervon sind ebenfalls möglich):
Das HPTS Fluoreszenz Ratio folgt einem sigmoiden Verlauf in Abhängigkeit des pH Wertes. Daher kann eine vier Parameter sigmoide logistische Funktion (Gleichung 1) verwendet werden. Um eine Drift über die Zeit (t) zu korrigieren, werden die Kalibrierdaten vor der Versuchsreihe (Cal1) mit denen nach der Versuchsreihe (Cal2) verknüpft. (Gleichung 1).

$$R_{F1,F2}(pH, t) = \alpha1(t) + (\alpha2(t) - \alpha1(t))/(1 + 10\exp(pH-\alpha3(t))\alpha4(t)) \quad \text{Gleichung 1}$$

Wobei jeder der vier zeitabhängigen Parameter gemäß Gleichung 2 variiert:

$$\alpha i(t) = \alpha i,Cal1 + ((\alpha i,Cal1 - \alpha i,Cal2)/\Delta t(Cal1,Cal2)) * t \quad \text{Gleichung 2}$$

α 1 und α 2 beschreiben das asymptotische Minimum und Maximum der sigmoiden Funktion. α 3 ist der apparente pKa4 von HPTS (d. h. der Wendepunkt der sigmoidalen Funktion), und α 4 ist eine Konstante, die die Steigung der Funktion zwischen α 1 und α 2 beschreibt.
Die ratiometrische pH Antwort ($R_{F1,F2}$) des Sensors wird aus dem Verhältnis zwischen F1 und F2 gebildet (i.e., $R_{F1,F2}$ = F1/F2). Hierzu werden z.B. *„dual excitation"*(ex) und *„dual emission"* (em) Eigenschaften von HPTS zunutze gemacht (z. B. F1, ex/em: 405/440nm und F2, ex/em: 465/510 nm). Darüber hinaus kann die sogenannte *„time correlated pixel-by-pixel"* (zeitbezogene Pixel-für-Pixel) Kalibrierung angewendet werden (ebenfalls beschrieben von Strömberg und Hulth 2005).

Zur Kalibration werden mehrere Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes (in der Regel vier) mit Hilfe von Mischungen aus zwei Phosphatpuffern von pH 6.00 und 8.50 hergestellt (Ionenstärke; ITot = 3.0mM und $[PO_4^{3-}]$Tot = 1.95 mM). Die zu kalibrierende Optode wird in ein Gefäß mit der jeweiligen Pufferlösung eingetaucht und die ratiometrische Antwort durch ein Sichtfenster oder durch das Glas des Becherglases, etc. mit der Erfassungseinheit erfasst. Das Ergebnis der Kalibrierung kann für jeden Pixel einzeln, oder aber als Summenantwort registriert und im späteren Verlauf weiter verarbeitet werden.

Die Wurzelbilder und pH-Bilder, die während des Experimentes erzeugt werden, können dann mit geeigneten Bildbearbeitungsprogrammen (z.B. Corel Draw, Photoshop, ImageJ, etc.) überlagert werden und so Zusammenhänge zwischen pH-Wert und Wurzelarchitektur aufgeklärt werden.

3. Ausführungsbeispiel:

Ermittlung der optischen Eigenschaften Transmissivität, Auflösungsvermögen (optische Trennschärfe) und Grauwert-Kontrast von zwei Optoden (zum Einen der erfindungsgemäßen transparenten Optode, im Vergleich mit einer handelsüblichen Optode), die quantifiziert und miteinander und mit einer Referenzmessung (ohne Optode) in relevanten Bereichen des Wellenlängenspektrums verglichen wurden.

Die Messprinzipien der hier erfolgten Quantifizierung der optischen Eigenschaften von Optoden bestehen

a) für die Quantifizierung der Transmissivität in der Messung der Absorption (Differenz aus einfallendem abzüglich ausfallendem Licht) und Berechnung der Transmissivität nach der Formel

Transmissivität der Optode = Eingangsintensität des Lichts – Absorption des Lichts;

und

b) für die Quantifizierung des Auflösungsvermögens, in der Messung des Durchmessers eines fotografierten Punktes, da eine diffuse (schlecht aufgelöste) fotografische Aufnahme zu größeren Durchmessern in den Aufnahmen führt; und

c) für die Quantifizierung des Grauwert-Kontrasts, im Vergleich von Grauwerten in schwarzen Bereichen des fotografierten Objektes (hier verwendeter Standard) mit weißen Bereichen des fotografierten Objekts (hier verwendeter Standard) durch Bildung der Differenz.

Bei der Untersuchung der gemäß Unterpunkt b) Quantifizierung des Aulösungsvermögens, wurde analog zur Methode der Punktantwort (engl.: point spread function) gearbeitet. Burger und Burge (2008) schreiben „... diese Methode wird zur Messung des Verhaltens optischer Systeme (wie z. B. Linsen) genutzt, wobei eine Punktlichtquelle als Impuls dient, und die resultierende Verteilung der Lichtenergie Punktantwort genannt wird." Die im Folgenden beschriebenen Versuche erfolgten in zwei Versuchswiederholungen an verschiedenen Optoden und mit je 15 Messwiederholungen an der jeweiligen Optode bzw. fotografischen Aufnahme.

Zur Erzielung eines geeigneten quantitativen Maßes für das Auflösungsvermögen sowie für den Grauwert-Kontrast wurden die Optoden in einen mit 20 ml deionisiertem Wasser (Milli-Q, Millipore Corporation) gefüllten Deckel einer Petrischale (120 * 120 * 17 mm, Greiner Petrischalen mit Nocken, quadratisch, Greiner Bio-One Artikel-Nr.: 688102) gelegt, und der Boden der Petrischale umgedreht so in den Deckel gelegt, so dass die Optoden planar fixiert waren. Der Deckel der Petrischale wurde danach auf einen Standard gestellt, welcher aus einem hochauflösenden Ausdruck auf Druckerpapier bestand, bei dem verschiedene Symbole (Punkte) der Schriftart „Times New Roman" der Software Microsoft Word in den Schriftgrößen 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 gedruckt waren. Derselbe Aufbau wurde auch für den Fall verwendet, in dem keine Optode in der Petrischale lag. Dieser Fall diente als Referenz. Die Optoden wurden durch das Wasser sowie die den Boden der Petrischale hindurch mit einer CMOS-Kamera (Flea BW by Point Grey Research Inc., Vancouver, Canada) in Graustufen fotografiert. Die verwendeten Einstellungen für die fotografischen Aufnahmen erfolgten analog zu üblichen Aufnahmen unter Verwendung der Methode DISP oder GROWSCREEN root. Die Aufnahmen bei 880 nm erfolgten ohne elektronische Signalverstärkung, einer Blende (engl. Shutter current) von 500 (von möglichen 0 bis 1210), einer Belichtungszeit (engl. Exposure current) von 1 (von möglichen 0 bis 1023). Eine digitale Bildmittelung erfolgte über 10 Bilder. Die Aufnahmen bei sichtbarem Licht erfolgten in derselben Weise, mit Ausnahme der Verwendung einer

Blende von 50. Es wurde eine Standard-Objektiv-Linse (25 mm; Cosmicar/Pentax; The Imaging Source, Bremen, Germany) ohne Filter beziehungsweise bei den Infrarot-Aufnahmen bei 880 nm ein Infrarot-Passtrough-Filter (880 nm; Edmund Optics, Karlsruhe, Germany) verwendet. Eine konstante Ausleuchtung erfolgte entweder mittels einer Halogenlampe (zur Messung der optischen Eigenschaften der Optoden im sichtbaren Licht bei ca. 400 – 800 nm) oder mittels Zuhilfenahme von Infrarot-LEDs (880 nm; Conrad Electronics, Hirschau, Germany). Die fotografischen Aufnahmen wurden mit der Software „Root leaf aquisition", (Schmundt et al. (1998) eingestellt und im Multi-TIFF-Format gespeichert. Danach wurden die fotografischen Aufnahmen mit der Software IrfanView (http://www.irfanview.com/) geöffnet und mit den Werkzeugen der Software IrfanView vermessen.

Zur Vermessung des Auflösungsvermögens wurde das Messwerkzeug „Measure tool" der Software IrfanView verwendet. Start- und Endpunkte der Messung der Durchmesser des Punktes der Schriftgröße 128 wurden dadurch festgelegt, dass ab einer Veränderung des Grauwertes von mehr als 3 Grauwertstufen im Vergleich zum Hintergrund der jeweilige Durchmesser gemessen wurde.

Zur Vermessung des Grauwert-Kontrasts wurde der Grauwert mit der Software IrfanView gemessen, wobei die Messpunkte entweder mittig im Punkt der Schriftgröße 128 oder mittig zwischen den Punkten der Schriftgröße 128 und 64 gewählt wurden. Danach wurde die Differenz der Grauwerte berechnet.

Zur Erzielung eines geeigneten quantitativen Maßes für die Transmissivität wurde jeweils ein Streifen der Optode in eine Kristallglasküvette planar eingebracht und die Küvette mit 1 ml deionisiertem Wasser (Milli-Q, Millipore Corporation) gefüllt. Als Referenz diente eine Kristallglasküvette, die mit 1 ml deionisiertem Wasser (Milli-Q, Millipore Corporation) gefüllt wurde. Die Messung erfolgte mit einem Zweistrahl-Spektralfotometer (UVIKON xl, Bio-Tek Instruments). Eine fotometrische Referenzmessung kann 100% gesetzt werden. Die Kurve, die dieser Messung entspricht, würde bei der in Figur 6 a)/b) gewählten Darstellungsweise (als relative Transmission bezogen auf die Referenz) über den gesamten Bereich des Spektrums einen Wert von 100% besitzen.

Ergebnisse:

In der folgenden Tabelle 8 sind die in den vorangehend beschriebenen Messverfahren ermittelten fotographischen Aufnahmen abgebildet. Die beiden zu vergleichenden Optoden sowie die Leermessung mit demselben Messaufbau kann zur Gewinnung eines ersten Eindrucks verglichen werden.

Tabelle 8: Fotographische schwarz-weiß Aufnahmen von Punkten des Schrifttyps Times New Roman bei verschiedenen Punktgrößen von Punktgröße 1 bis Punktgröße 128 a) der Leermessung (Referenz; Ohne Optode) mit Belichtung mit sichtbarem Licht, b) der neuen Optode (Gegenstand des Patentantrags) mit Belichtung mit sichtbarem Licht, sowie c) einer im Handel erhältlichen pH-Optode mit Belichtung mit sichtbarem Licht jeweils ohne Verwendung eines Filters. Darunter fotographische schwarz-weiß Aufnahmen d) der Leermessung (Referenz; Ohne Optode) mit Belichtung mit Licht der Wellenlänge 880 nm, e) der neuen Optode (Gegenstand des Patentantrags) mit Belichtung mit Licht der Wellenlänge 880 nm, sowie f) einer im Handel erhältlichen pH-Optode mit Belichtung mit Licht der Wellenlänge 880 nm jeweils unter Verwendung eines Infrarot-Passtrough-Filters.

„Siehe Tabelle im Anhang"

Die erfindungsgemäße Optode erreicht Transmissivitätswerte, die im (im Sinne der Erfindung relevanten) Spektrum zwischen 300 und 900 nm oberhalb von 90 % liegen. Im nahinfraroten Bereich des Spektrums (700 bis 900 nm) erreicht die neue Optode eine Transmissivität von 100 %. Der Bereich nahinfraroten Lichts ist im Sinne der Erfindung von besonderer Bedeu-

tung, da nahinfrarotes Licht (> 800 nm) das Pflanzenwachstum nicht beeinflusst (Schmundt et al. 1998). Die im Handel erhältliche Optode erzielt im Spektrum von 300 bis 900 nm Werte von maximal 65 %.

Da die Transmissivität für die Anwendung im Sinne der Erfindung nicht allein relevant ist, sondern auch die Parameter Auflösungsvermögen sowie Grauwert-Kontrast zur Erzielung einer maximalen Bildgüte von Bedeutung sind, wurden diese Parameter für eine im Handel erhältliche pH-Optode sowie die neue Optode bestimmt.

Die erzielte Trennschärfe (Auflösungsvermögen) der neuen Optode war sowohl unter Verwendung sichtbaren Lichts, als auch unter Verwendung nahinfraroten Lichts (880 nm), nur wenig und nicht signifikant schlechter, als die erzielte Auflösungsvermögen, welche erzielt wurde, wenn keine Optode in den Strahlengang (Petrischale) gelegt wurde (4 % Verschlechterung bei Belichtung mit Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums; 1 % Verschlechterung bei Belichtung mit Licht der Wellenlänge von 880 nm). Die im Handel erhältliche Optode verschlechterte die erzielten Auflösungsvermögen im Vergleich zur Referenz (Messung ohne Optode in der Sichtachse) unter Verwendung von Licht des sichtbaren Spektrums um 27 %, und bei Belichtung mit nahinfrarotem Licht der Wellenlänge 880 nm um 24 %.

Die Verschlechterung des Grauwert-Kontrasts im Vergleich zum erzielten Grauwert-Kontrast ohne Optode im Strahlengang beträgt bei Verwendung sichtbaren Lichts bei der neuen Optode 26 %, und 6 % bei Verwendung nahinfraroten Lichts (880 nm). Bei der im Handel erhältlichen Optode beträgt die Verschlechterung des Grauwert-Kontrasts 93 % bei Verwendung sichtbaren Lichts, und89 % bei Verwendung nahinfraroten Lichts (880 nm). Somit besitzt die neue Optode im Sinne der Erfindung deutlich und signifikant bessere, optische Eigenschaften als die im Handel erhältliche Optode. Im Gegensatz zur im Handel erhältlichen Optode ist die neue Optode nachweislich zur Anwendung in bildgebenden und bildanalytischen Verfahren wie beispielsweise DISP, WinRHIZO und GROWSCREEN root geeignet.

Die im Rahmen der Erfindung verwendeten Begriffe werden wie folgt definiert:

1. Auflösungsvermögen:

(Synonym: Bildschärfe, Trennschärfe). Fähigkeit eines optischen Gerätes, zwei eng benachbarte Objekteinzelheiten voneinander zu trennen, d.h. deutlich als zwei getrennte Gebilde wiederzugeben. Bei hoher Auflösung können feine Einzelheiten in den Objekten erkannt werden. Das Auflösungsvermögen ist objekt- und kontrastabhängig, daher sind Zahlenanga-

ben über das Auflösungsvermögen nur als ungefähre Anhaltspunkte zu werten (Mütze et al. 1972).

2. Bildanalyse:

Als Bildanalyse wird die systematische Analyse des Bildinhaltes durch visuelle Bildinterpretation bezeichnet.
(Geoinformatik-Service der Universität Rostock, 2008, Professur für Geodäsie und Geoinformatik (GG) Universität Rostock; www.geoinformatik.uni-rostock.de).

3. Bildgebung:

(Synonym: Bildgebendes Verfahren) Ein bildgebendes Verfahren erzeugt aus Messgrößen eines realen Objektes ein Abbild, wobei die Messgröße oder eine daraus abgeleitete Information ortsaufgelöst und über Helligkeitswerte oder Farben kodiert visualisiert wird. (www.wikipedia.org).

4. Bildgüte:

(Synonym: Bildqualität, Abbildungsqualität). Maß der objekttreuen Wiedergabe bei der optischen Abbildung. Meist subjektiv beurteilt, kann aber auch durch Abbildung einer geeigneten Vorlage (Test) beurteilt werden. Kriterien für die Bildgüte sind oftmals Auflösungsvermögen und Kontrastwiedergabe. (Mütze et al. 1972).

5. Bildverarbeitung:

Als Bildverarbeitung werden alle Verfahren bezeichnet, mit denen Bilder bearbeitet und verändert werden, d.h. die Aufbereitung und Analyse von Bild- bzw. Rasterdaten. Bezeichnet einen Satz digitaler Methoden, die verwendet werden zum Erstellen, Analysieren, Verbessern, Interpretieren oder Darstellen von Bilddaten oder Rasterdaten.
(Geoinformatik-Service der Universität Rostock, 2008, Professur für Geodäsie und Geoinformatik (GG) AUF Universität Rostock; www.geoinformatik.uni-rostock.de).

6. Diffuses Licht:

Gestreutes Licht (Mütze et al. 1972).

7. Grauwert:

Helligkeits- oder Intensitätswert in der Bildverarbeitung.

Unter Grauwert versteht man die einem Bildpunkt (Pixel) zugeordnete Zahl, z.B. in Rasterdaten oder in der digitalen Bildverarbeitung. Je nach Anzahl der Bits, die ein Grauwert einnehmen kann, unterscheidet man Binärbild (1 Bit, Zustände 0 und 1), Grauwertbild (8 Bit, Zustände zwischen 0 und 255) und Farbbild (3*8 Bit mit jeweils Zuständen zwischen 0 und 255). Diesen Werten sind zur Darstellung auf einem Bildschirm Einträge einer Farbtabelle (LUT) zugeordnet, d.h. die Werte werden als Indizes einer Farbtabelle interpretiert. (Geoinformatik-Service der Universität Rostock, 2008, Professur für Geodäsie und Geoinformatik (GG) AUF Universität Rostock; www.geoinformatik.uni-rostock.de).

8. Kontrast, fotometrischer:

Der fotometrische Kontrast kennzeichnet den Helligkeitsunterschied zwischen zwei leuchtenden Flächen: (Mütze et al. 1972).

9. Kontrast, optischer:

Sammelbezeichnung für den Helligkeitskontrast und den Farbkontrast. Siehe auch fotometrischer Kontrast (Mütze et al. 1972).

10. Monomer:

Einzelbaustein-Molekül eines Polymers. Monomere sind niedermolekulare, reaktionsfähige Moleküle, die sich zu molekularen Ketten oder Netzen, zu unverzweigten oder verzweigten Polymeren, zusammenschließen können (wikipedia).

11. Optode:

(Synonym: Optrode) Optochemischer Sensor (Kessler 2006).

12. Planar:

Flach, eben (Duden 1974).

13. Polymer:
Chemische Verbindung aus Ketten- oder verzweigten Molekülen (Makromolekülen), die wiederum aus gleichen oder gleichartigen Einheiten (den sogenannten Monomeren) bestehen (wikipedia).

14. Strahlengang:
Verlauf der Lichtstrahlen in irgendeiner optischen Anordnung (Mütze et al. 1972).

15. Streuung:
Ablenkung von Licht bzw. Strahlung von seiner ursprünglichen Richtung durch kleine Teilchen (Mütze et al. 1972).

16. Transmission:
Durchgang von Strahlung durch ein Medium ohne Änderung der Frequenz in den monochramtischen Strahlenanteilen. Bei allen glasklaren Stoffen ist gerichtete Transmission, d. h. ohne Streuung, gegeben. Im Gegensatz dazu gibt es auch gestreute Transmission, bei der der Körper die eintreffende Strahlung in verschiedenen Richtungen wieder austreten lässt (Streuung), und dabei die optischen Gesetze der Brechung jedoch nicht in Erscheinung treten (Mütze et al. 1972).

17. Transmissivität:
Eigenschaft der Durchlässigkeit von Medien. Eigenschaft in Bezug auf die physikalische Größe der Transmission (wikipedia).

18. Transparenz:
Durchlässigkeit für Licht (Duden 1974).

19. Trennschärfe:
(synonym: angulare Sehschärfe, Auflösungsvermögen) Das Vermögen Objekte so scharf zu sehen, dass Einzelheiten gut erkannt und aufgelöst werden können.
Messbar in Bogensekunden (synonym Winkelsekunde; Maßeinheit des Winkels). 60 Winkelsekunden entsprechen einer Winkelminute, 60 Winkelminuten entsprechen einem Grad. Die Auflösung von 1' (einer Winkelminute) entspricht einer Ortsauflösung von etwa 1,5 mm bei 5

m Abstand. Je kleiner die Winkel-Sehschärfe ist, desto besser ist die Sehschärfe (Mütze et al. 1972).

Literaturquellen:

Avery GS (1993) Structure and development of the tobacco leaf. Amer J Bot 20: 565-592

Blossfeld S, Gansert D (2007) A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. Plant Cell Environ 30:176-187

Blossfeld S, Perriguey J, Sterckeman T, Morel JL, Lösch R (2010) Rhizosphere pH dynamics in trace-metal-contaminated soils, monitored with planar pH optodes. Plant Soil 330:173-184

Erickson RO, Sax KB (1956) Elemental Growth Rate of the Primary Root of Zea mays. Proc Amer phil Soc 100: 487-498

Frederiksen SM, Glud RN (2006) Oxygen dynamics in the rhizosphere of Zostera marina: a twodimensional planar optode study. Limnol Oceanogr 51:1072–1083

Glud RN, Santegoeds CM, De Beer D, Kohls O, Ramsing NB (1998) Oxygen dynamics at the base of a biofilm studied with planar optodes. Aquat Microb Ecol 14:223-233

Hakonen A, Hulth S (2007) A high-precision ratiometric fluorosensor for pH: Implementing time-dependent non-linear calibration protocols for drift compensation. Anal Chim Acta 606:63-71

Hakonen A, Hulth S, Dufour S (2010) Analytical performance during ratiometric longterm imaging of pH in bioturbated sediments. Talanta 81:1393-1401

Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytol 168:293-303

Holst G, Kohls O, Klimant I, König B, Kühl M, Richter T (1998) A modular luminescence lifetime imaging system for mapping oxygen distribution in biological samples. Sens Actuators B: Chem 51:163-170

Holst G, Grunwald B (2001) Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes. Sens Actuators B: Chem 74:78-90

Hulth S, Aller RC, Engström P, Selander E (2002) A pH Plate fluorosensor (Optode) for early diagenetic studies of marine sediments. Limnol Oceanogr 47:212–220

Jaillard B, Ruiz L, Arvieu JC (1996) pH mapping in transparent gel using color indicator video densitometry. Plant Soil 183:85–95

Marschner H, Römheld V, Horst WJ, Martin P (1986) Root induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 149:441-446

Nagel KA, Kastenholz B, Jahnke S, van Dusschoten D, Aach T, Mühlich M, Truhn D, Scharr H, Terjung S, Walter A, Schurr U (2009) Temperature responses of roots: impact on growth, root system architecture and implications for phenotyping. Funct Plant Biol 36:947-959

Oguri K, Kitazato H, Glud RN (2006) Platinum octaetylporphyrin based planar optodes combined with an UV-LED excitation light source: an ideal tool for high-resolution O2 imaging in O_2 depleted environments. Mar Chem 100:95-107

Pijnenborg JWM, Lie TA, Zehnder AJB (1990) Simplified measurement of soil pH using an agar-contact technique. Plant Soil 126:155-160

Precht E, Franke U, Polerecky L, Huettel M (2004) Oxygen dynamics in permeable sediments with wave-driven pore water exchange. Limnol and Oceanogr 49:693–705

Schröder CR (2006) Luminescent planar single and dual optodes for time-resolved imaging of pH, pCO_2 and pO_2 in marine systems. Dissertation Universität Regensburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie

Stahl H, Glud A, Schröder CR, Klimant I, Tengberg A, Glud RN (2006) Time-resolved pH imaging in marine sediments with a luminescent planar optode. Limnol Oceanogr 4:336–345

Strömberg N, Hulth S (2005) Assessing an imaging ammonium sensor using time correlated pixel-by-pixel calibration. Anal Chim Acta 550:61-68

Walter A, Silk WK, Schurr U (2009) Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. Annu Rev Plant Biol 60:279-304

Zhu QZ, Aller RC, Fan YZ (2005) High-performance planar pH fluorosensor for two-dimensional pH measurements in marine sediment and water. Environ Sci Technol 39:8906-8911

Zhu QZ, Aller RC, and Fan YZ (2006) A new ratiometric, planar fluorosensor for measuring high resolution, two-dimensional pCO_2 distributions in marine sediments. Mar Chem 101:40-53

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemischer und/oder physikalischer Parameter, umfassend folgende Komponenten:
   a) Beleuchtungseinheit,
   b) optische Erfassungseinheit,
   c) mindestens einen Wachstumscontainer, mit Wachstumsmedium,
   d) mindestens eine transparente, planare Optode,
   e) Steuerungseinheit,
   f) elektronische Datenerfassungs- und Auswerteeinheit.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass die Beleuchtungseinheit mindestens eine Lichtquelle umfasst, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittiert.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass die Beleuchtungseinheit Licht mit einem Wellenlängenspektrum emittiert, welches sowohl für die eine Beleuchtung/Anregung der eingesetzten Optoden mit dem/den jeweiligen Fluorophor(en) geeignet ist als auch das Wellenlängenspektrum/die Wellenlängen emittiert, welche/s für die Bild gebende, fotographische Messung der Wachstumsprozesse benötigt wird.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass die Lichtquelle Licht im Bereich von Wellenlängen von 200 nm bis 2500 nm emittiert.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass die optische Erfassungseinheit mindestens eine analoge oder digitale Kamera ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Beleuchtungseinheit über die Steuerungseinheit gesteuert ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die optische Erfassungseinheit über die Steuerungseinheit gesteuert ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Beleuchtungseinheit als Lichtquelle LEDs und/oder OLEDs umfasst.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Wachstumscontainer wenigstens teilweise lichtdurch-lässig/transparent ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Optode mindestens einen immobilisierten Fluorophor aufweist, der in Abhängigkeit der Quantität der zu messenden chemischen und/oder physikalischen Parameter fluoresziert.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Optode auch nach Aufbringen des Fluorophors transparent ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Optode mit der Seite, die mit dem Fluorophor beschichtet ist, mit dem Wachstumsmedium kontaktiert.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Wachstumscontainer von Außenlicht abgeschirmt ist.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,

dass eine Dunkelbox den Wachstumscontainer und den Innenraum des Wachstumscontainers, die Beleuchtungseinheit und/oder die optische Erfassungseinheit vor Außenlicht abschirmt.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Wachstumscontainer, die Beleuchtungseinheit und die Kamera so zueinander positioniert sind, dass es zu keiner Reflektion an der Sichtscheibe des Wachstumscontainers kommt.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Wachstumscontainer in einem Winkel unter 90° geneigt zur Beleuchtungseinheit und zur optischen Erfassungseinheit ist.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die elektronische Datenerfassungs-/ Auswerte-Einheit ein Computer mit einem mathematischen Auswerteprogramm ist.

18. Verfahren zur nicht-invasiven Erfassung von Wachstumsprozessen und simultanen Messung chemischer und/oder physikalischer Parameter, umfassend folgende Verfahrensschritte:
    i) Erfassung der Wachstumsprozesse mittels bildgebender Methoden.
    ii) Erfassung der chemisch und/oder physikalischen Parameter durch Verwendung einer planaren, transparenten Optode, wobei die Daten aus i) und ii) simultan und parallel zueinander gewonnen werden.

19. Verfahren nach Anspruch 18,
gekennzeichnet durch
a) Einbringen eines Wachstumsmediums in einen Wachstumscontainer
b) Einbringen einer transparenten, planaren Optode in den Wachstums container, so dass die Seite der Optode, die mit dem Fluorophor beschichtet ist, mit dem Wachstumsmedium kontaktiert.
c) Einbringen des Untersuchungsobjekts in das Wachstumsmedium des Wachstumscontainers und Kultivieren unter Kulturbedingungen.
d) Belichten des Wachstumscontainers durch eine Beleuchtungseinheit mit Licht einer Wellenlänge, das im Anregungswellenlängenbereich des jeweiligen Fluorophors der Optode liegt.
e) Belichten des Untersuchungsobjekts im Wachstumscontainer mit einer Beleuchtungseinheit zur Erfassung der Wachstumsprozesse mittels Bild gebender Methoden durch die Optode hindurch.
f) Aufnahme des emittierten Fluoreszenzlichts aus d) und Aufnahme von Bilddaten aus e) und mit einer optischen Erfassungseinheit.
g) Auswerten der Daten aus f).

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Belichten des Untersuchungsobjekts gemäß e) mit Licht im nahinfraroten Bereich erfolgt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die optische Erfassungseinheit und die Beleuchtungseinheit so zur Sichtscheibe des Wachstumscontainers ausgerichtet werden, dass es zu keiner Reflektion des Lichts in der Sichtscheibe des Wachstumscontainers kommt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Beleuchtungseinheit in einem definierten Winkel und Abstand zur Sichtscheibe des Wachstumscontainers ausgerichtet wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Wachstumscontainer, die Beleuchtungseinheit und/oder die optische Erfassungseinheit durch eine Dunkelbox von Außenlicht abgeschirmt wird.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass optische Erfassungseinheit und Beleuchtungseinheit über eine Steuerungseinheit gesteuert ausgelöst werden.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Daten der Erfassungseinheit elektronisch ausgewertet werden.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Auswertung gemäß g) mit einem mathematischen Verfahren erfolgt.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Belichten der Optode und/oder die Aufnahme der Bilddaten des Untersuchungsobjekts in Zeitintervallen zwischen µ-Sekunden bis Millisekunden erfolgt.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Belichten der Optode und/oder die Aufnahme der Bilddaten über einem Zeitraum von Minuten bis Wochen erfolgt.

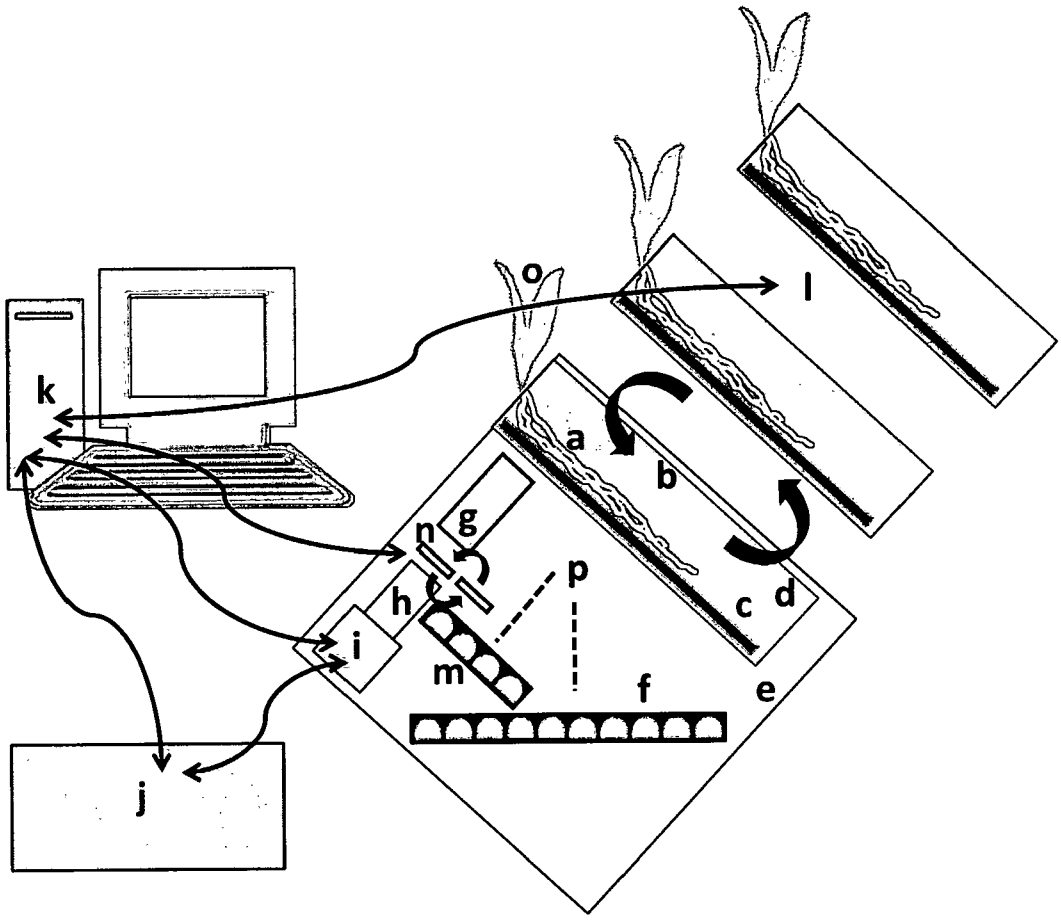


Fig. 1

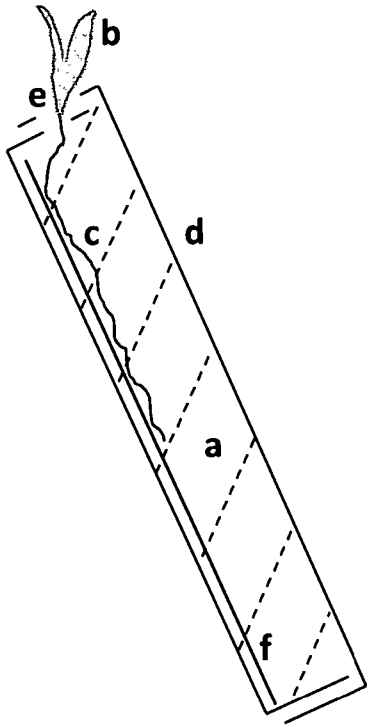


Fig. 2

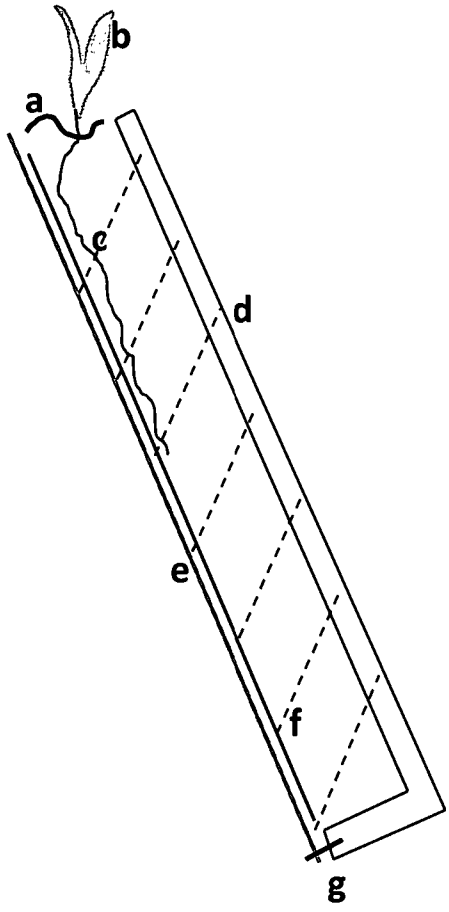


Fig. 3

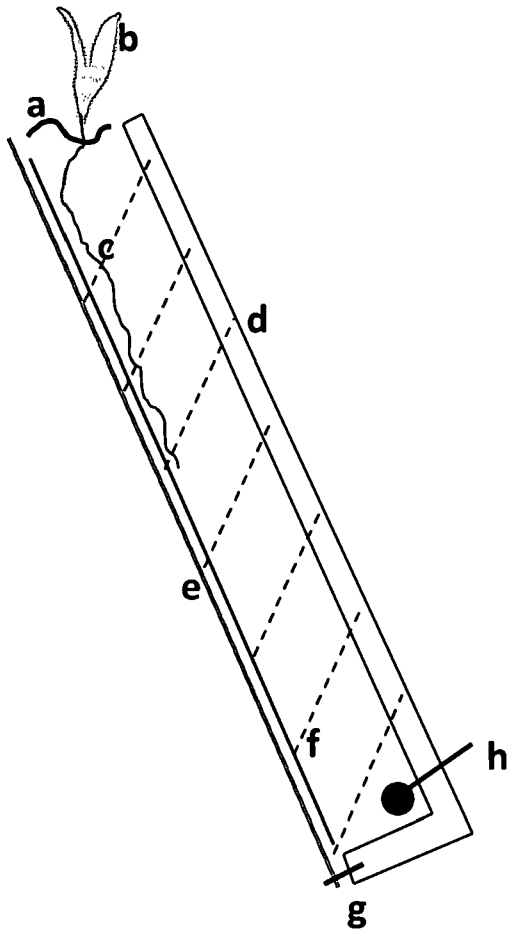


Fig. 4

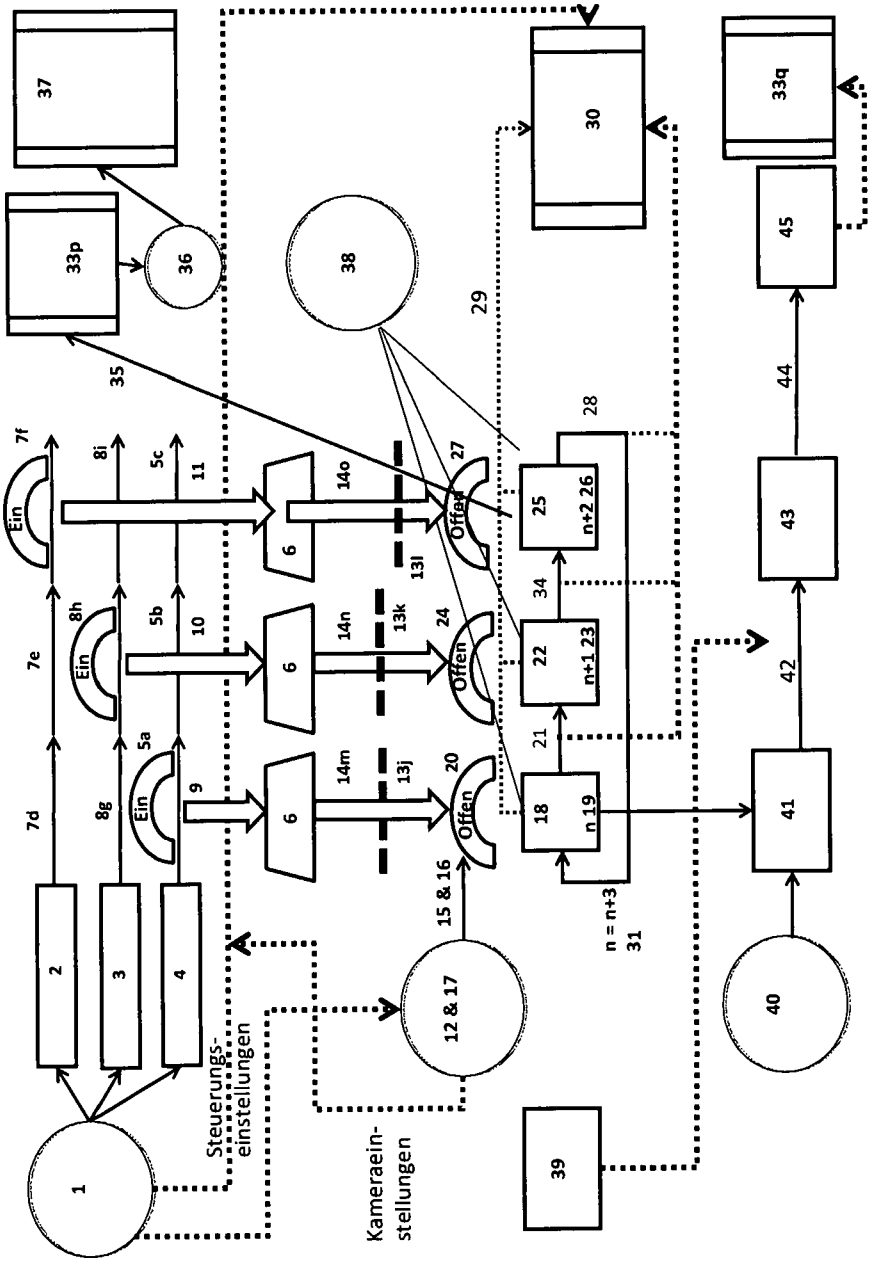

1
2
3
4
5a
5b
5c
6
7d
7e
7f
8g
8h
8i
9
10
11
12 & 17
13j
13k
13l
14m
14n
14o
15 & 16
18
n 19
20
21
22
n+1 23
24
25
n+2 26
27
28
29
30
31
n = n+3
33p
33q
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
Ein
Offen
Steuerungs-
einstellungen
Kameraein-
stellungen

Fig. 5

5/7

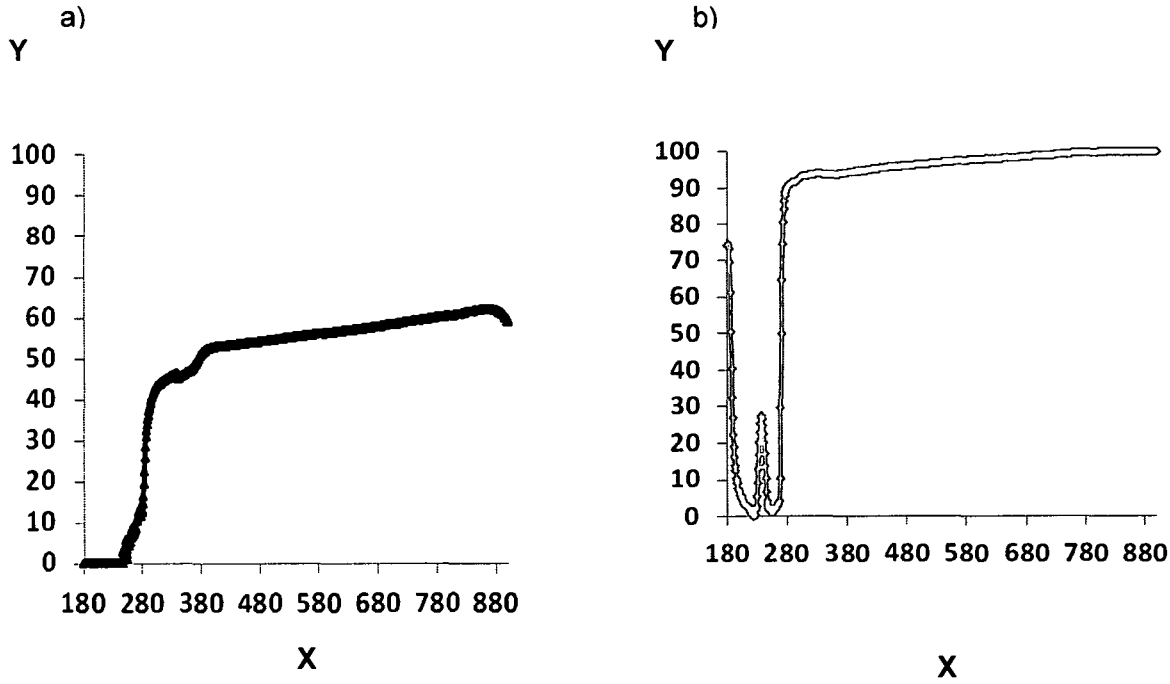

a)
Y
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
180 280 380 480 580 680 780 880
X
b)
Y
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
180 280 380 480 580 680 780 880
X

Fig. 6

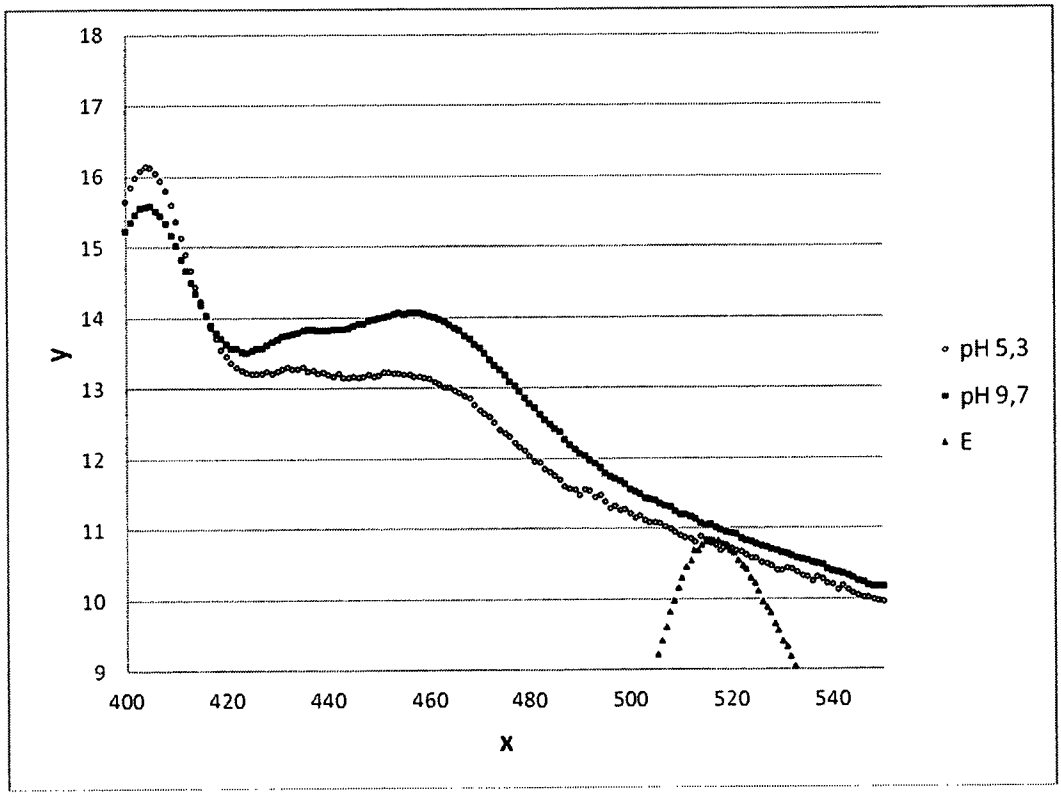
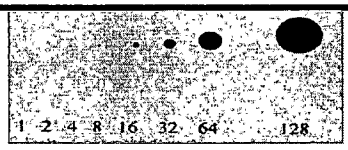
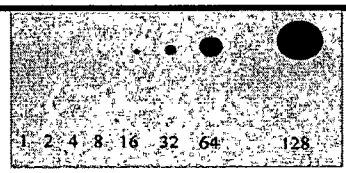
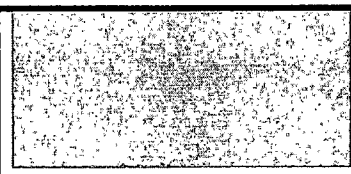
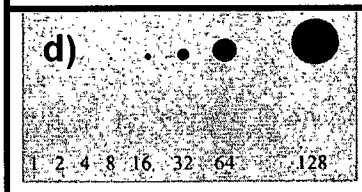
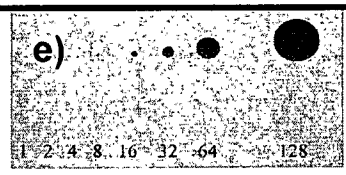
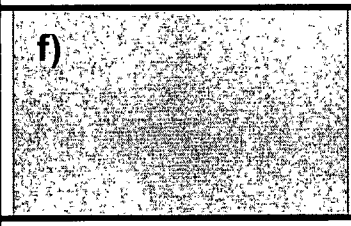

18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
y
400
420
440
460
480
500
520
540
x
pH 5,3
pH 9,7
E

Fig. 7

Ersatzblatt
„Anhang"

 a)	 b)	 c)
Ohne Optode im sichtbaren Licht (ca. 400 - 800 nm)	Erfindungsgemäße Optode im sichtbaren Licht (ca. 400 - 800 nm)	Optode nach Stand der Technik im sichtbaren Licht (ca. 400 - 800 nm)
		
Ohne Optode bei 880 nm	Erfindungsgemäße Optode bei 880 nm	Optode nach Stand der Technik bei 880 nm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2012/001023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/64 G01N21/77 G01N21/84 G01J3/44 A01G7/00
G01N33/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N G01J A01G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FREDERIKSEN MORTEN S ET AL: "Oxygen dynamics in the rhizosphere of Zostera marina: A two-dimensional planar optode study", LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY, vol. 51, no. 2, March 2006 (2006-03), pages 1072-1083, XP002691625, ISSN: 0024-3590 cited in the application page 1073 - page 1075; figures 1,3-8 ----- -/--	1-28

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 February 2013	18/02/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Duijs, Eric

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2012/001023

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOLST G ET AL: "Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes", SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL: INTERNATIONAL JOURNAL DEVOTED TO RESEARCH AND DEVELOPMENT OF PHYSICAL AND CHEMICAL TRANSDUCERS, ELSEVIER S.A, SWITZERLAND, vol. 74, no. 1-3, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 78-90, XP027370125, ISSN: 0925-4005 [retrieved on 2001-04-15] cited in the application the whole document -----	1-28
X	STAAL M ET AL: "Ultrabright planar optodes for luminescence life-time based microscopic imaging of Odynamics in biofilms", JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1, 18 January 2011 (2011-01-18), pages 67-74, XP028173564, ISSN: 0167-7012, DOI: 10.1016/J.MIMET.2011.01.021 [retrieved on 2011-01-26] the whole document -----	1-12, 17-20, 22,24-28
X	US 5 372 784 A (MORRIS ROGER J [US] ET AL) 13 December 1994 (1994-12-13) column 4, line 42 - column 7, line 50; figure 1 -----	1,2,4,6, 7,10-12, 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/DE2012/001023

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5372784 A	13-12-1994	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2012/001023

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N21/64 G01N21/77 G01N21/84 G01J3/44 A01G7/00
G01N33/00
ADD.
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N G01J A01G

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FREDERIKSEN MORTEN S ET AL: "Oxygen dynamics in the rhizosphere of Zostera marina: A two-dimensional planar optode study", LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY, Bd. 51, Nr. 2, März 2006 (2006-03), Seiten 1072-1083, XP002691625, ISSN: 0024-3590 in der Anmeldung erwähnt Seite 1073 - Seite 1075; Abbildungen 1,3-8 ----- -/--	1-28

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. Februar 2013	18/02/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Duijs, Eric

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2012/001023

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOLST G ET AL: "Luminescence lifetime imaging with transparent oxygen optodes", SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL: INTERNATIONAL JOURNAL DEVOTED TO RESEARCH AND DEVELOPMENT OF PHYSICAL AND CHEMICAL TRANSDUCERS, ELSEVIER S.A, SWITZERLAND, Bd. 74, Nr. 1-3, 15. April 2001 (2001-04-15), Seiten 78-90, XP027370125, ISSN: 0925-4005 [gefunden am 2001-04-15] in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- STAAL M ET AL: "Ultrabright planar optodes for luminescence life-time based microscopic imaging of Odynamics in biofilms", JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 85, Nr. 1, 18. Januar 2011 (2011-01-18), Seiten 67-74, XP028173564, ISSN: 0167-7012, DOI: 10.1016/J.MIMET.2011.01.021 [gefunden am 2011-01-26] das ganze Dokument --- US 5 372 784 A (MORRIS ROGER J [US] ET AL) 13. Dezember 1994 (1994-12-13) Spalte 4, Zeile 42 - Spalte 7, Zeile 50; Abbildung 1 ---	1-28 1-12, 17-20, 22,24-28 1,2,4,6, 7,10-12, 17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2012/001023

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5372784 A	13-12-1994	KEINE	