

(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

7. Juli 2016 (07.07.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2016/107722 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 15/14 (2006.01) G02B 21/10 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01) G06T 7/00 (2006.01)

H04N 9/04 (2006.01)

(72) Erfinder: DAHLQVIST, Mathis; Sdr Vang 30, 7100 Vejle (DK). SCHMIDT, Christian; Am Rethwarder 17, 23669 Niendorf /Ostsee (DE). HØJRIS, Bo; Fenstenvej 21, Fensten, 8300 Odder (DK).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/079153

(74) Anwalt: VOLLMANN & HEMMER; Wallstraße 33a, 23560 Lübeck (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

9. Dezember 2015 (09.12.2015)

(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, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

14200634.5 30. Dezember 2014 (30.12.2014) EP

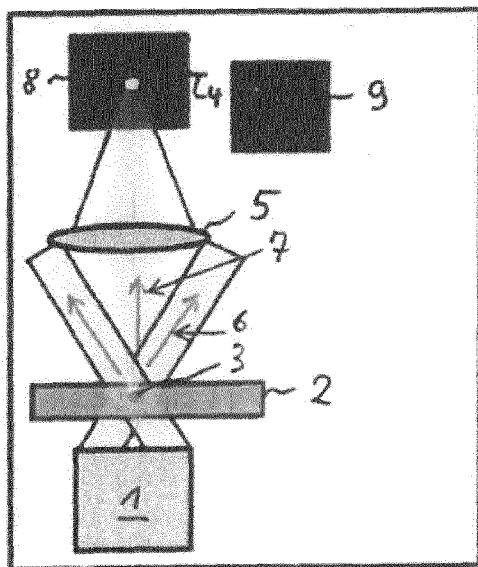
(71) Anmelder: GRUNDFOS HOLDING A/S [DK/DK]; Poul Due Jensens Vej 7-11, 8850 Bjerringbro (DK).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING PARTICLES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUM BESTIMMEN VON PARTIKELN

Fig. 1



(57) Abstract: The method serves to determine particles (3), more particularly bacteria in liquid, and operates using an imaging optical device comprising a light source (1), comprising an optical sensor (4) with a field of light-sensitive pixels and comprising a liquid sample to be examined which is arranged between light source (1) and sensor (4). Characteristics of at least one particle (3) detected in the image are compared with characteristics of a collection of characteristics for determining the detected particle (3), with the image detection taking place using dark-field technology and a light-sensitive pixel having a plurality of sub-pixels which are used for the image detection.

(57) Zusammenfassung: Das Verfahren dient zum Bestimmen von Partikeln (3), insbesondere Bakterien in Flüssigkeit, und arbeitet unter Verwendung einer bildgebenden optischen Vorrichtung mit einer Lichtquelle (1), mit einem optischen Sensor (4) mit einem Feld von lichtempfindlichen Pixeln und mit einer zwischen Lichtquelle (1) und Sensor (4) angeordneten zu untersuchenden Flüssigkeitsprobe. Es werden Kennzeichen von mindestens einem bildmäßig erfassten Partikel (3) mit Kennzeichen einer Kennzeichensammlung zur Bestimmung des erfassten Partikels (3) verglichen, wobei die Bilderfassung in Dunkelfeldtechnik erfolgt und ein lichtempfindliches Pixel mehrere Subpixel aufweist, die zur Bilderfassung genutzt werden.

WO 2016/107722 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

Titel: Verfahren zum Bestimmen von Partikeln

Beschreibung

[01] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen von Partikeln in einer Flüssigkeit, insbesondere von Bakterien in Wasser mit den im Oberbegriff des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

[02] Derartige Verfahren zum optischen Erfassen von Partikeln in einer Flüssigkeit, insbesondere zum Bestimmen oder zumindest zum Klassifizieren von Partikeln, zählen zum Stand der Technik. Es wird in diesem Zusammenhang auf EP 2 469 264 A1, WO 2010/063293 A1 und WO 2014/094790 A1 verwiesen. Dort sind Verfahren beschrieben, bei denen die Erfassung von Partikeln in Flüssigkeit mittels einer optischen Vorrichtung erfolgt, welche eine Lichtquelle und einen optischen Sensor mit einem Feld von lichtempfindlichen Pixeln aufweist, wobei zwischen der Lichtquelle und dem Sensor eine zu untersuchende Flüssigkeitsprobe angeordnet ist und bei welchen zum Bestimmen von Partikeln Kennzeichen von mindestens einem bildmäßig erfassten Partikel mit Kennzeichen einer Kennzeichensammlung zur Bestimmung oder zumindest zur Klassifizierung des erfassten Partikels verwendet, insbesondere verglichen werden. Die optische Erfassung der Flüssigkeitsprobe erfolgt dabei vorzugsweise in quasi stationärem Zustand, also dann, wenn sich die Partikel innerhalb der Flüssigkeit soweit beruhigt haben, dass sie entweder gravitationsbedingt abgesunken, aufgeschwommen oder in einem stationären Schwebezustand befindlich sind, also ihre Position zwischen Lichtquelle und Sensor im Wesentlichen nicht ändern. Dieses Verfahren ist zum Bestimmen von größeren Partikeln, beispielsweise Schwebeteilchen, feinstem Sand oder dergleichen, wie sie gelegentlich im Wasser mitgeführt werden, gut geeignet. Insbesondere jedoch für

die Untersuchung von Trinkwasser, bei welchem es um die Bestimmung von Art und Anzahl von Bakterien, beispielsweise E.coli-Bakterien (Escherichia coli) ankommt, stößt dieses Verfahren an seine Grenzen, da diese kleinen Partikel oft schwer oder gar nicht im Bild auszumachen
5 sind.

[03] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein gattungsgemäßes Verfahren dahingehend zu verbessern, dass insbesondere kleine Partikel, in der Größenordnung von Bakterien mit technisch möglichst geringem Aufwand zuverlässig bestimmt werden
10 können. Dabei soll die bevorzugte Anwendung zur Bestimmung von Bakterien im Trinkwasser sein.

[04] Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch ein Verfahren mit den in Anspruch 1 aufgeführten Merkmalen gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen, der nach-
15 folgenden Beschreibung und der Zeichnung angegeben. Hierbei können die in den Unteransprüchen und der Beschreibung angegebenen Merkmale jeweils für sich aber auch in geeigneter Kombination die erfindungsgemäße Lösung gemäß Anspruch 1 weiter ausgestalten.

[05] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zum Bestimmen von Partikeln oder zumindest zum Klassifizieren in Flüssigkeit, insbesondere von Bakterien in Wasser, beispielsweise bei der regelmäßigen Überprüfung des Trinkwassers im Hinblick auf Keime, und wird unter Verwendung einer bildgebenden optischen Vorrichtung durchgeführt, die eine Licht-
20 quelle aufweist und einen optischen Sensor mit einem Feld von lichtempfindlichen Pixeln. Zwischen Lichtquelle und Sensor ist die zu untersuchende Flüssigkeitsprobe angeordnet. Bei dem Verfahren werden Kennzeichen von mindestens einem bildmäßig mit der optischen Vorrichtung erfassten Partikel mit Kennzeichen einer Kennzeichensammlung zur Bestimmung oder Klassifizierung des erfassten Partikels verwen-
25

det. Die Kennzeichen werden insbesondere verglichen, um den erfassten Partikel zu bestimmen, insbesondere um zu bestimmen, ob es sich hierbei um ein Bakterium oder um ein Nichtbakterium handelt bzw. im weiteren das Bakterium zu bestimmen. Um insbesondere diese kleinen

5 Partikel mit technisch einfachen Mitteln mit ausreichender Genauigkeit zu erfassen, ist gemäß der Erfindung vorgesehen, dass die Bilderfassung zum einen in Dunkelfeldtechnik, d. h. unter Dunkelfeldbeleuchtung, erfolgt und zum anderen lichtempfindliche Pixel des Sensors mehrere Subpixel aufweisen, die zur Bilderfassung genutzt werden. Es versteht

10 sich, dass vorteilhaft alle oder zumindest ein Großteil der lichtempfindlichen Pixel Subpixel aufweist, die zur Bilderfassung genutzt werden, um einerseits eine hohe Auflösung und andererseits eine hohe Dynamik zu gewährleisten. Dies ist insbesondere mit der Dunkelfeldtechnik von Vorteil, bei welcher eine Dunkelfeldbeleuchtung erfolgt, d. h. bei der die zu

15 untersuchende Flüssigkeitsprobe nicht im direkten Strahlengang zwischen Lichtquelle und Sensor liegt, wie dies bei der Hellfeldtechnik üblich ist, sondern vom Sensor nur das Licht, nämlich Streulicht, empfangen wird, welches von den Partikeln in der Flüssigkeitsprobe abgelenkt wird. Die Bilderfassung in der Dunkelfeldtechnik erfolgt also gemäß der

20 Erfindung in der Weise, wie dies beispielsweise von der Dunkelfeldbeleuchtung in der Durchlichtmikroskopie bekannt ist. Hierbei entstehen auf dem Sensorbild die Partikel in heller Farbe vor dunklem Hintergrund. Dies ist insbesondere bei den hier zu bestimmenden sehr kleinen Partikeln von Vorteil, da das aus der Hellfeldtechnik bekannte Überstrahlen

25 wesentlich weniger auftritt und im Übrigen der Sensor auch nicht von direktem Licht der Lichtquelle beaufschlagt ist, weshalb insbesondere in Verbindung mit Nutzung der Subpixel eine wesentlich bessere Erfassung von kleinen Partikeln, wie beispielsweise Bakterien, möglich ist, ohne dass die technischen Voraussetzungen, wie beispielsweise die Auflösung des Sensors, die Qualität der verwendeten optischen Bauteile und

30 dergleichen signifikant erhöht werden müssen.

[06] Dabei ist es gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders vorteilhaft, wenn die Bilderfassung anhand von zweidimensionalen Schwarzweißbildern in unterschiedlichen Ebenen der Flüssigkeitsprobe erfolgt. Da es auf die Farbinformation nicht an-
5 kommt, können vielmehr die Subpixel des Sensors, die hierfür sonst zur Verfügung stehen, dafür genutzt werden, die Auflösung des Sensors zu erhöhen bzw. dessen Dynamik zu erhöhen, wie dies gemäß einer Weiterbildung der Erfindung vorteilhaft vorgesehen sein kann.

[07] So wird die Dynamik der Bilderfassung gemäß einer Weiterbildung der Erfindung z. B. dadurch erhöht, dass mindestens ein Pixel des Sensors, vorzugsweise jedoch ein Großteil oder alle Pixel solche Subpixel aufweisen und von diesen Subpixeln jeweils mindestens eines hochverstärkt und mindestens ein weiteres niedrigverstärkt werden. Unter niedrigverstärkt im Sinne der vorliegenden Erfindung kann auch eine Abschwächung verstanden werden, je nachdem welchen Empfindlichkeitsbereich der Sensor aufweisen soll. Bei den heutzutage vielfach verwendeten CCD-Sensoren, deren Pixel z. B. vier Subpixel aufweisen, werden gemäß der vorliegenden Erfindung vorteilhaft zwei dieser Subpixel hochverstärkt (high gained) und die zwei anderen niedrigverstärkt
15 (low gained) bzw. abgeschwächt. Die Zahl der Subpixel ist jedoch grundsätzlich frei wählbar bzw. sensorabhängig und wird den Verfahrensanforderungen entsprechend ausgewählt.

[08] Die Bestimmung mindestens eines Partikels anhand von beispielsweise zweidimensionalen Schwarzweißbildern in unterschiedlichen Ebenen der Flüssigkeitsprobe erfolgt vorteilhaft durch digitale Bildauswertung. Derartige Auswertverfahren zählen grundsätzlich zum Stand der Technik, müssen jedoch für das vorliegende Verfahren entsprechend angepasst werden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn mindestens drei, vorzugsweise mindestens vier unterschiedliche Kennzeichen zur
25 Bestimmung oder Klassifizierung eines Partikels verwendet werden. Da-

bei muss die Bestimmung des Partikels im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht notwendigerweise die konkrete Identifizierung des Partikels bedeuten, es kann auch eine Klassifizierung, wie beispielsweise die Feststellung, ob es sich bei dem Partikel um ein Bakterium oder um ein Nichtbakterium handelt, ob es sich um lebendes oder totes Bakterium handelt, um welche Art von Bakterium es sich handelt oder dergleichen, erfolgen.

[09] Ein besonders gut zu erfassendes Kennzeichen eines Partikels ist seine flächenmäßige Erstreckung, die gemäß der Erfindung in einem Bild ermittelt und weiter verwendet wird, in welchem das Partikel im Fokus ist. Dabei gibt nicht nur die größenmäßige Erfassung der Fläche ein Kennzeichen, sondern es kann auch die Form der Fläche ein Kennzeichen bilden oder eine Kombination dieser Merkmale.

[10] Zur Erfassung der flächenmäßigen Erstreckung eines Partikels ist gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, dass in dem mittels des Sensors erfassten Bild des Partikels ein Pixelgrenzwert festgesetzt wird, wobei alle Pixel, deren Pixelwert größer oder gleich dem festgesetzten Pixelwert ist, zu 1 und alle Pixel, deren Pixelwert kleiner als der festgesetzte Pixelwert ist, zu 0 gesetzt werden, wonach die flächenmäßige Erstreckung des Partikels erfasst wird. Es erfolgt also eine Digitalisierung des Bildes in schwarze und weiße Pixel, wobei dann beispielsweise die weißen Pixel, also die, deren Pixelwert größer oder gleich dem festgesetzten Pixelgrenzwert ist, die Fläche des Partikels im Bild repräsentieren, sodass durch geeignete Auswertung dieses Schwarzweißbildes sowohl die flächenmäßige Erstreckung als auch die Form der Fläche ermittelt werden kann.

[11] Dabei hat sich in der praktischen Erprobung des Verfahrens herausgestellt, dass es vorteilhaft ist, hier nicht einen absoluten Pixelgrenzwert festzusetzen, sondern die flächenmäßige Erstreckung des Partikels

vorteilhaft unter Zugrundelegung mehrere unterschiedlicher festgesetzter Pixelgrenzwerte zu bestimmen. Nur hierdurch ist es bei einigen Partikeln möglich, deren Form zu bestimmen und eine ausreichende Differenzierung von anderen Partikeln herbeizuführen. Es ist von besonderem
5 Vorteil wenn sich die Pixelgrenzwerte automatisch, d. h. selbstanpassend einstellen.

[12] Vorteilhaft wird als ein Kennzeichen eines Partikels dessen Rotation um seine eigene Achse bestimmt. Dieses Kennzeichen ist insbesondere bei der Bestimmung von Bakterien zweckmäßig. Mit diesem Kennzeichen ist es häufig schon möglich, Bakterien von Nichtbakterien bzw.
10 toten Bakterien zu unterscheiden, da die Rotation eines Partikels um die eigene Achse ein typisches Merkmal von lebenden Bakterien allerdings auch von einigen anderen Partikeln ist. Im Weiteren kann die Rotation selbst auch als weiteres Kennzeichen bei der Bestimmung des Partikels,
15 insbesondere eines Bakteriums herangezogen werden.

[13] Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ein Kennzeichen eines Partikels durch Auswertung einer Reihe von Bildern des Partikels in unterschiedlichen Ebenen erfolgen, die so gewählt sind, dass das Partikel in einigen Bildern im Fokus und in einigen Bildern außerhalb des
20 Fokus, also davor und dahinter liegt, wobei die Anzahl der das Partikel repräsentierenden Pixelwerte bildweise erfasst und die Verteilung der erfassten Anzahlen über die Zahl der Bilder das Kennzeichen bildet. Dies ist eine Art zu erfassen, ob sich das Partikel, wie beispielsweise ein lebendes Bakterium bewegt oder wie beispielsweise ein Staubkorn unverändert in seiner Position in der Flüssigkeit verharrt. Dabei wird vorteilhaft
25 nicht nur die Verteilung der erfassten Anzahlen über die Zahl der Bilder erfasst, sondern gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Standardabweichung der erfassten Anzahlen zu dem Mittelwert der erfassten Anzahlen ins Verhältnis gesetzt, um so ein
30 Kennzeichen zu bilden.

[14] Wie eingangs erläutert, wird vorteilhaft nicht nur die flächenmäßige Erstreckung eines Partikels im Fokus erfasst, sondern darüber hinaus auch seine Form, um ein Kennzeichen zu bilden. Die Form eines Partikels kann durch seine Momente bestimmt werden. Dies zählt bei Bildauswertungsverfahren zum Stand der Technik. Momente einer Verteilung sind in der Bildverarbeitung bestimmte gewichtete Mittelwerte aus den Helligkeitswerten der einzelnen Pixel eines Bildes. Sie werden so gewählt, dass sie eine gewisse geometrische Aussage besitzen, wie dies an sich bei der digitalen Bildauswertung zum Stand der Technik zählt, auf die insoweit verwiesen wird.

[15] Alternativ oder zusätzlich kann die Form eines Partikels durch seine inversen Momente bestimmt werden. Gemäß einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann zur Erfassung der inversen Momente eines Partikels eine Auswertung einer Reihe von Bildern des Partikels in unterschiedlichen Ebenen erfolgen, wobei das Partikel in mindestens einem Bild im Fokus liegt und in einer Anzahl von Bildern davor und dahinter. Dabei werden die Pixelwerte des Bildes einer Fouriertransformation unterzogen, wonach die DC-Anteile, also die nichtfrequenten Anteile des Signals, entfernt oder zumindest verringert, der Rauschanteil der Signale eliminiert und dann eine Momentenbestimmung gemacht wird, wie sie an sich zum Stand der Technik zählt. Hierdurch wird ein Kennzeichen gewonnen, das sich in der Praxis als sehr aussagekräftig erwiesen hat.

[16] Um insbesondere bei der Untersuchung über einen längeren Zeitraum, wie dies bei der Überwachung des Trinkwassers z. B. der Fall ist, sicherzustellen, dass vergleichbare Ergebnisse auch über einen langen Zeitraum erzielt werden, ist gemäß einer Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, die Beleuchtungsstärke der Lichtquelle konstant zu halten und hierfür eine Regelung vorzusehen, welche die Ist-Beleuchtungsstärke erfasst, mit einer Soll-Beleuchtungsstärke vergleicht

und gegebenenfalls die Lichtquelle entsprechend ansteuert. Dies ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von besonderer Bedeutung, da der Bildsensor aufgrund der Dunkelfeldbeleuchtung nie direktes Licht von der Lichtquelle erfasst und somit beispielsweise eine Verringerung
5 der Hintergrundhelligkeit nicht notwendigerweise auf eine abfallende Beleuchtungsstärke der Lichtquelle zurückzuführen ist, sondern auch durch Anwachsen von Ablagerungen im Fenster für die Flüssigkeitsprobe liegen kann. Es ist also vorteilhaft ein gesonderter Sensor vorgesehen, mit welchem die Ist-Beleuchtungsstärke der Lichtquelle erfasst
10 werden kann, sodass mittels der Regelung bei nachlassender Lichtstärke dies durch beispielsweise Ansteuerung mit einer höheren Spannung ausgeglichen werden kann.

[17] Die Klassifizierung oder Bestimmung eines mittels der optischen Vorrichtung erfassten Partikels erfolgt typischerweise durch Vergleich
15 von Kennzeichen dieses Partikels mit Kennzeichen einer Kennzeichensammlung, anhand der dann eine Kategorisierung, Klassifizierung oder im Idealfall eine konkrete Bestimmung des Partikels erfolgen kann. Die Bestimmung erfolgt vorteilhaft mit einem nichtlinearen System, vorzugsweise mittels eines neuronalen Netzwerkes, hierdurch kann in der Regel
20 auch ein Ergebnis erzielt werden, wenn die ermittelten Kennzeichen keinen unmittelbaren Rückschluss auf die Art des Partikels zulassen. Die Verwendung eines neuronalen Netzwerkes ist insbesondere dann von Vorteil, wenn, was sich in der Praxis bewährt hat, nicht nur Bilder im Fokus sondern auch unmittelbar davor- und dahinterliegende Bilder ausgewertet werden, da damit die Sicherheit der Klassifizierung oder Be-
25 stimmung erhöht werden kann, auch wenn die damit ermittelten Kennzeichen eine gewisse Unschärfe aufweisen.

[18] Alternativ kann die Bestimmung eines Partikels durch Vergleich von erfassten Kennzeichen mit Kennzeichen der Kennzeichensammlung
30 mittels eines linearen Systems erfolgen. Beide Verfahren haben ihre Vor-

und Nachteile, wobei im Einzelfall sorgfältig abgewogen werden sollte, in welcher Weise die Auswertung erfolgt.

[19] Um das erfindungsgemäße Verfahren kostengünstig durchführen zu können, ist es einerseits erforderlich, den vorrichtungsmäßigen Aufwand einfach zu halten, andererseits den Rechenaufwand möglichst klein zu halten. Allerdings soll das erfindungsgemäße Verfahren die erforderliche Genauigkeit aufweisen, um mit hoher Zuverlässigkeit zumindest zwischen Bakterien und Nichtbakterien unterscheiden zu können. Hierzu ist gemäß einer Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die dem Sensor vorgeschaltete Linse, die erforderlich ist, um auf der Pixelebene des Sensors ein Bild zu erzeugen, eine numerische Apertur zwischen 0,05 und 0,4 aufweist. Eine solche numerische Apertur hat einerseits den Vorteil, dass Linsen einfacher Qualität verwendet werden können, die kostengünstig sind, andererseits die Anzahl der auszuwertenden Bilder nicht zu groß wird, wie dies bei zunehmender Apertur der Fall wäre.

[20] Um weitere Differenzierungsmöglichkeiten bei der Erfassung der Partikel zu geben, ist gemäß der Erfindung vorgesehen, dass Bilder von derselben Flüssigkeitsprobe unter Beleuchtung mit unterschiedlichem Beleuchtungswinkel ausgewertet werden. Hierdurch können die beispielsweise vorbeschriebenen Kennzeichen weiter differenziert werden. Auch kann gegebenenfalls zusätzlich oder alternativ bei der Erstellung dieser Bilder mit Beleuchtung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge gearbeitet werden. Dies stellt eine weitere Differenzierungsmöglichkeit von Kennzeichen dar, die insbesondere für kleine Partikel in Größe von Bakterien von Vorteil sein können.

[21] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren muss nicht notwendigerweise eine konkrete Partikelbestimmung erfolgen, es erfolgt jedoch zweckmäßigerweise eine Klassifikation der Partikel, und zwar in Bakte-

rien, Nichtbakterien und andere Partikel. Eine solche Klassifikation ist insbesondere bei der Trinkwasserüberwachung zweckmäßig.

[22] Dabei kann es insbesondere bei der Trinkwasserüberwachung erforderlich sein, nicht nur die Anzahl der Bakterien im Wasser zu erfassen, sondern auch die Art. So sind beispielsweise E.coli-Bakterien ein Indiz für Fäkalien, also ein Fäkalienindikator. Zu deren Erfassung kann beispielsweise im erfindungsgemäßen Verfahren zunächst einmal eine Klassifikation der ermittelten Partikel in Bakterien und Nichtbakterien erfolgen, wonach in der Flüssigkeitsprobe gezielt eine Keimtötung, beispielsweise durch UV-Licht, Wärme oder dergleichen, herbeigeführt wird. Es wird dann nach einer gewissen Wartezeit, beispielsweise einer halben Stunde nochmals eine Partikelbestimmung derselben Probe durchgeführt und dabei beispielsweise über die Bestimmung der Rotation der Partikel ermittelt, wie sich das Verhältnis zwischen lebenden und toten Bakterien nach der Keimtötung einstellt. Hierdurch kann indirekt z. B. auf den Anteil der E.coli-Bakterien geschlossen werden.

[23] Das erfindungsgemäße Verfahren wird grundsätzlich unter Zugrundelegung einer Kennzeichensammlung angewendet. Eine solche Kennzeichensammlung muss jedoch nicht vollständig vorhanden sein. Diese kann gegebenenfalls mit Inbetriebnahme der Vorrichtung selbstlernend erzeugt oder ergänzt werden. So kann beispielsweise in den ersten Tagen nach Inbetriebnahme der Untersuchungsvorrichtung zunächst nur Wasser untersucht werden, von dem bekannt ist, dass es eine zulässige Partikelbelastung aufweist. Mit den bei diesen Untersuchungen gewonnen Kennzeichen über die im Wasser erfassten Partikel kann eine Kennzeichensammlung angelegt werden, die wiederum Grundlage für weitere Untersuchungen ist, bei denen allerdings dann nicht die Bestimmung der Partikel im Vordergrund stehen, sondern die Übereinstimmung oder Nichtübereinstimmung der Partikelstruktur mit der vorermittelten, welche Basis für die Kennzeichensammlung bildet.

[24] Teile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind nachfolgend anhand von zeichnerischen Darstellungen näher erläutert, es zeigen:

- 5 Fig. 1 in stark vereinfachter schematischer Darstellung eine optische Vorrichtung zur Untersuchung einer Flüssigkeitsprobe in Dunkelfeldtechnik,
- Fig. 2 eine optische Vorrichtung nach dem Stand der Technik in Hellfeldtechnik,
- Fig. 3 den Aufbau eines optischen Sensors der optischen Vorrichtung,
- 10 Fig. 4 die Auswertung des Sensorsignals unter Einbeziehung der Subpixel jeweils in Bild- und Signaldarstellung,
- Fig. 5 eine Reihe von Bildern, welche dasselbe Partikel in unterschiedlichen Ebenen zeigt,
- 15 Fig. 6 elf aufeinanderfolgende Bilder desselben Partikels in unterschiedlichen Ebenen,
- Fig. 7 drei digitalisierte Partikeldarstellungen desselben Partikels unter Anwendung unterschiedlicher Grenzwerte jeweils mit einer Grauwertdarstellung zum Vergleich,
- 20 Fig. 8 zwei Kurven, welche die durch die Partikeldarstellungen gemäß Fig. 7b bzw. 7c dargestellten Flächen einschließen und bestimmen,

- Fig. 9 fünfundzwanzig Bilder eines Partikels in aufeinanderfolgenden Ebenen in- und außerhalb des Fokus,
- Fig. 10 die Bildung zweier Häufigkeitsverteilungskurven aufgrund der Bilder gemäß Fig. 9,
- 5 Fig. 11 die aus den Kurven gemäß Fig. 10 gebildete Mittelwertkurve mit Abweichungen zur Bildung eines Kennzeichens,
- Fig. 12 drei Bilder im Zusammenhang mit der Auswertung des Trägheitsmoments als Kennzeichen und
- 10 Fig. 13 ein Amplituden-Frequenz-Diagramm eines fouriertransformierten Bildes ohne DC-Anteil.

[25] Anhand der Figuren 1 und 2 ist dargestellt, wie sich die Dunkelfeldtechnik, wie sie bei der optischen Vorrichtung nach der Erfindung gemäß Fig. 1 angewendet wird, von der klassischen Hellfeldtechnik, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist, unterscheidet. In beiden Figuren ist eine Lichtquelle 1 dargestellt, welche eine in einem Fenster 2 angeordnete Flüssigkeitsprobe zur Verdeutlichung nur mit einem darin befindlichen Partikel 3 anstrahlt. Die im Fenster 2 befindliche Flüssigkeitsprobe ist zwischen der optischen Lichtquelle 1 und einem CCD-Sensor 4 angeordnet, dem eine fokussierende Linse 5 vorgeschaltet ist, die hier eine bildgebende Optik symbolisiert. Die Lichtquelle 1 ist in Fig. 1 beispielsweise mittels einer Blende so ausgerichtet, dass direkte Strahlen 6 das Fenster 2 mit dem Partikel 3 beleuchten, jedoch weder die Linse 5 noch den dahinterliegenden CCD-Sensor 4 direkt treffen. Vom Partikel 3 gelangt lediglich Streulicht 7 zur fokussierenden Linse 5 zu dem dahinterliegenden CCD-Sensor 4. Hieraus ergibt sich ein Bild 8, bei dem das Partikel 3 weiß

vor schwarzem Hintergrund dargestellt ist. Das daneben dargestellte Bild 9 verdeutlicht, wie ein Bild von zwei Partikeln bei dieser Beleuchtung praktisch aussehen kann.

[26] Im Vergleich dazu ist in Fig. 2 die Lichtquelle 1 direkt auf das Fenster 2 und den in der Flüssigkeit befindlichen Partikel 3 sowie die Linse 5 und den Sensor 4 gerichtet. Mittels der Linse 5 wird das Partikel 3, welches das direkte Licht 6 abschattet, als schwarzer Punkt im Bild 8, also auf dem CCD-Sensor 4 erzeugt. In dem entsprechend daneben angeordneten Bild 9 sind drei Partikel zu sehen, deren schwarze Ränder sich vor grauem Hintergrund abheben.

[27] Mit der Dunkelfeldbeleuchtung, wie sie in Fig. 1 beispielhaft dargestellt ist, können insbesondere kleine Partikel wesentlich besser im 2D-Bild 8, 9 dargestellt werden als dies bei der Hellfeldbeleuchtung, wie sie anhand von Fig. 2 dargestellt ist, möglich ist. Dort wird der Rand des Partikels 3 im Bild 8 stark überstrahlt. Da die direkten Strahlen 6 auf den CCD-Sensor 4 auftreten, ist der Kontrast zwischen dem dargestellten Partikel und dem Hintergrund extrem hoch und die Auflösung innerhalb des abgebildeten Partikels somit schlecht. Bei dem Bild 9 der Fig. 1 ist deutlich erkennbar, welche nuancierten Abstufungen vor dem schwarzen Hintergrund schon mit bloßem Auge sichtbar sind. Die Dunkelfeldbeleuchtung, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist, ist nur beispielhaft zu verstehen. So können beispielsweise statt einer zentralen Lichtquelle 1 gesonderte Lichtquellen vorgesehen sein, welche das Fenster 2 ähnlich wie in Fig. 1 dargestellt schräg durchscheinen. Wesentlich ist jedoch, dass vom Partikel 3 nur Streulicht zur Linse 5 und dem dahinterliegenden Sensor 4 gelangt und keine direkte Strahlung von der Lichtquelle zum Sensor.

[28] Fig. 3 zeigt die Struktur eines CCD-Sensors 4, wie er heute marktüblich ist. Jeder Pixel 10 des Sensors 4 besteht aus vier Subpixeln 11, und zwar aus einem blauen Subpixel 11a, einem roten Subpixel 11b und

zwei grünen Subpixeln 11c und 11d. Die Farben dienen dazu, um jedem Pixel 10 neben der Helligkeitsinformation auch die Farbinformation zu geben, die benötigt wird, um ein Farbbild zu erzeugen.

[29] Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden 2D-Bilder in
5 schwarzweiß, d. h. mit Grauwerten erzeugt, die Farbinformation wird nicht benötigt. Die Subpixel 11 werden daher zum Erhöhen von Auflösung und Dynamik eingesetzt.

[30] Es handelt sich bei dem in Fig. 3 dargestellten CCD-Sensor 4 um
einen Bayer-Sensor mit einer Bayer-Matrix. Statt wie üblich die Subpixel
10 zum Erhalt der Farbinformation auszuwerten, werden diese hier einerseits zur Erhöhung der Auflösung verwendet, wie das entsprechende linke obere Bild der Figur 4 zeigt. Darüber hinaus werden die Subpixel 11 bzw. deren Signale unterschiedlich verarbeitet. So werden die Subpixel 11a und 11b niedrigverstärkt (low gained), wohingegen die Subpixel
15 11c und 11d hochverstärkt (high gained) werden. Hierdurch ergibt sich ein höherer Dynamikbereich, was ebenfalls anhand von Fig. 4 im linken unteren Bild ersichtlich ist. Wie das linke obere Bild, das nach dem vorbeschriebenen Verfahren erzeugt ist, zeigt, weist das mit dem vorbeschriebenen Verfahren erzeugte Bild nicht nur eine höhere Auflösung
20 sondern auch eine höhere Dynamik auf, wie insbesondere die dort erkennbaren Grauwerte verdeutlichen. Die Auflösung ist um den Faktor vier erhöht, die Dynamik ebenfalls erheblich. Wie sowohl in dem linken oberen Bild als auch in der darunter befindlichen Signalkurve ersichtlich ist, wird die erhöhte Auflösung durch die Verwendung der Subpixel 11
25 als Pixel erreicht, die höhere Dynamik dadurch, dass die Subpixel 11 jeweils paarweise niedrigverstärkt bzw. hochverstärkt werden. Durch Interpolieren der niedrigverstärkten Subpixel mit dem hochverstärkten Subpixel entsteht dann das in Fig. 4 rechts dargestellte Bild, welches eine höhere Auflösung und eine höhere Dynamik als ein bei konventioneller Auslesung des CCD-Sensors erstelltes Bild aufweist. Auch wenn
30

diese verbesserten Bildinformationen auf der in Fig. 4 rechten Bild- bzw. Signaldarstellung so nicht ohne weiteres erkennbar sind, so ist zu berücksichtigen, dass die dort sichtbaren Grauwerte eine andere Qualität aufweisen, als wenn diese unter üblicher Auswertung des CCD-Sensorsignals erfolgt wären.

[31] Um einen mit dem CCD-Sensor 4 erfassten Partikel zu bestimmen oder zumindest zu klassifizieren, ist es erforderlich, verschiedene Kennzeichen des Partikels zu ermitteln und diese dann mit einer vorhandenen Kennzeichensammlung zu vergleichen, um festzustellen, um welche Art von Partikel oder im Idealfall um welchen Partikel es sich handelt. Dabei können Kennzeichensammlungen individuell erstellt werden, beispielsweise für Trinkwasser, für Brauchwasser, für Abwasser, für Wasser aus Kläranlagen oder auch für andere Flüssigkeiten mit darin befindlichen Partikeln. Dabei ist die Kennzeichensammlung auf die Erfordernisse des Anwenders abzustellen. So ist beispielsweise für die Trinkwasseranalyse wesentlich zu erkennen, ob es sich um Bakterien oder Nichtbakterien handelt, im Weiteren, um welche Bakterien. Beispielsweise kann es das Ziel sein, E.coli-Bakterien zu bestimmen, um die Wasserqualität zu überwachen. Solche Kennzeichensammlungen können gegebenenfalls vor Ort selbstlernend erstellt werden, wenn in einer Anzahl von Voruntersuchungen Partikel bestimmt werden, die in ihrer Form und in ihrer Anzahl als zulässig und akzeptabel festgestellt worden sind. Dann können mit einer solchen selbsttätig erstellten Kennzeichensammlung Abweichungen von der zuvor erfassten Qualität festgestellt werden. Es versteht sich, dass eine Kennzeichensammlung beispielsweise für die Überwachung von Trinkwasser auch ortsabhängig, d. h. an verschiedenen Orten, unterschiedlich sein kann, da die Bakterienarten, die das Wasser belasten können, orts- und klimaabhängig variieren. Je mehr Kennzeichen eines bilderfassten Partikels mit einem Kennzeichen in der Kennzeichensammlung übereinstimmen, um so genauer ist die Bestimmung. Es können einige wenige sein, die zum Vergleich herange-

zogen werden oder einige hundert oder gar mehr. Die Auswertung erfolgt zweckmäßigerweise über ein neuronales Netzwerk, kann jedoch auch mittels eines linearen Gleichungssystems erfolgen. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass für die Frage, ob es sich um ein Bakterium
5 oder ein Nichtbakterium handelt, ein Vergleich von mindestens drei Kennzeichen, vorteilhaft mindestens vier Kennzeichen, genügt, um dies mit ausreichender Zuverlässigkeit zu bestimmen. In besonderen Fällen kann die Anzahl der Kennzeichen deutlich höher sein.

[32] Die Erfassung einer Flüssigkeitsprobe mit den darin befindlichen
10 quasi stationären Partikeln erfolgt durch eine Vielzahl von Bildern paralleler Ebenen. Es werden also bei der Bildauswertung nach einer ersten Objektprüfung, welche z. B. übergroße Objekte wie Luftblasen und dergleichen sowie offensichtlich nicht auswertbare Bereiche von der weiteren Auswertung ausschließt (Integritätsprüfung), für jeden bilderfass-
15 ten Partikel Gruppen von Bildern desselben Partikels erstellt, die diesen Partikel in unterschiedlichen Ebenen darstellen. Da bedingt durch die Apertur der bildgebenden Linse 5 der optischen Vorrichtung eine konturenscharfe Darstellung nur in der Fokusebene möglich ist, erscheinen diese Partikel in den Gruppen von Bildern typischerweise in mehreren
20 (unscharfen) Vorfokuspositionen, in einer oder mehreren Fokuspositionen und in mehreren (unscharfen) Nachfokuspositionen. Solche Bilder eines Partikels sind beispielsweise in Fig. 5 dargestellt, die 39 Bilder desselben Partikels im Fokus und außerhalb des Fokus zeigt. Zu diesen Bildern wird rechnerisch erfasst, in welchem Bild bzw. in welchen Bildern
25 das Partikel 3 im Fokus dargestellt ist. In Fig. 5 ist dieses Bild mit dem Partikel 3 im Fokus mit 12 gekennzeichnet. Die Berechnung erfolgt in an sich bekannter Weise mittels eines Sobel-Operators, also eines einfachen Kanten-Detektions-Filters, der dies ermittelt.

[33] Grundsätzlich erfolgt die Auswertung eines Kennzeichens eines
30 Partikels im fokussierten Bild, es sei denn, dass das Kennzeichen gerade

auf eine Eigenschaft zwischen fokussiertem und nichtfokussiertem Bild abzielt. Die Auswertung wird jedoch, wie Versuche ergeben haben, deutlich stabiler, wenn nicht nur das im Fokus befindliche Bild 12, sondern jeweils auch ein außerhalb des Fokus liegendes Bild im Vorfokusbereich 13 sowie im Nachfokusbereich 14 ausgewertet wird, wobei dann der Einsatz eines neuronalen Netzwerkes zweckmäßig ist, um auch diese „unscharfen“ Kennzeichen zuzuordnen (Fig. 6).

[34] Ein wesentliches Kennzeichen eines Partikels ist stets seine Fläche im Fokus, dabei ist die Größe der Fläche ein Kennzeichen, die Form der Fläche ein anderes Kennzeichen. Um diese Größen zu erfassen, ist eine Abgrenzung des Partikels im Bild festzulegen. Dies erfolgt typischerweise durch Festlegung eines Grenzwertes, also eines Grauwertes des Bildes, der einem bestimmten Pixelwertes entspricht. Mittels dieses Grenzwertes wird ein reines Schwarzweißbild erzeugt, d. h. alle Pixel, deren Pixelwerte gleich oder kleiner dieses Grenzwertes sind, werden schwarz, alle anderen weiß dargestellt. Anhand der Figuren 7a, 7b und 7c ist dargestellt, wie sich eine Veränderung dieses Grenzwertes auf das Bild auswirkt. Es sind in den Bildern nach Fig. 7 nur die weißen Flächen zu betrachten, die grauen, schattenartigen Flächen dienen hier nur der Verdeutlichung der unterschiedlichen Grenzwerte und wären normalerweise schwarz. Die grauen schattenartigen Flächen zeigen die wirkliche Form des Partikels. Deutlich sichtbar ist in Fig. 7a, dass der Grenzwert, der dort zu 47 % des maximalen Pixelwertes gesetzt worden ist, vergleichsweise hoch ist, da ein Großteils des Partikels in den Schwarzbereich fällt und hier vermutlich wesentliche Charakteristika, die ein Kennzeichen der Fläche sind, verloren gehen. In Fig. 7b ist der Grenzwert auf 30 % festgesetzt. Hier ergibt sich schon eine wesentlich abweichende Form des Partikels im Vergleich zu der Darstellung nach Fig. 7a. Wird jedoch der Grenzwert auf 20 % heruntersgesetzt, dann ergibt sich das Bild gemäß Fig. 7c, in dem die deutlich längliche Form des Partikels sichtbar wird, die gleichzeitig ein wesentliches Kennzeichen dieses Partikels ist. Das

erfindungsgemäße Verfahren sieht nun vor, den Grenzwert zu variieren und zu ermitteln, ob sich bei unterschiedlichen Grenzwerten insbesondere die Form des Partikels signifikant ändert, um dann den Grenzwert heranzuziehen, welcher dieser ausgeprägten Form Rechnung trägt.

- 5 [35] Nachdem durch Varianz des Grenzwertes das Schwarzweißbild erzeugt worden ist, welches Grundlage für die weitere Auswertung bildet, wird die Fläche des Partikel im Bild durch eine abschnittsweise um die weiße Fläche herumgelegte Hyperbelkurve bestimmt, welche die Fläche definiert, wie dies in Fig. 8 dargestellt ist. Durch Integrieren dieser
- 10 Kurve kann die eingeschlossene Fläche, also die zweidimensionale Größe des Partikels ermittelt werden. Die entsprechende Kurve ist mit 15 gekennzeichnet. Zum Vergleich ist in Fig. 8 eine Kurve 16 aufgezeichnet, die sich ergibt, wenn das Bild gemäß Fig. 7b zugrundegelegt wird. Es wird deutlich, dass gerade die Varianz des Grenzwertes dazu führt, ein
- 15 charakteristisches Kennzeichen hinsichtlich der Form zu schaffen.

- [36] Bei der Betrachtung eines Bildstapels ist es häufig zu beobachten, dass sich die Fläche und Form des erfassten Partikels innerhalb und außerhalb des Fokus ändert, wie dies bei den Bildern gemäß Fig. 5 und Fig. 6 sichtbar ist. Während sich bei Fig. 5 im Wesentlichen die Position
- 20 ändert, die übrigen Änderungen eher fokusbedingt sind, ändert sich bei dem anhand der Bilder in Fig. 6 erfassten Partikel offensichtlich auch die Form. Diese Änderung wird durch eine Bewegung des Partikels verursacht, d. h. eine Bewegung des Partikels von einem Bild zum nächsten. Wenn ein Partikel, der nicht kugelförmig ist, sich dreht, wird das Licht in
- 25 Abhängigkeit davon, wie schnell und um welche Achse er sich dreht, beeinflusst. Bei der Beobachtung mit dem Auge wird dies als Blinken wahrgenommen. Dies ist eine Eigenschaft, die häufig bei lebenden Bakterien zu beobachten ist, nicht jedoch bei toten Bakterien oder selten bei Partikeln, die keine Bakterien sind. Diese Eigenschaft ist daher
- 30 mit ein wichtiges Kennzeichen zur Bestimmung, ob es sich um ein Bakte-

rium oder um einen anderen Partikel handelt. Um dieses Kennzeichen zu ermitteln, wird zunächst ein Stapel von Bildern, wie er beispielsweise in Fig. 9 dargestellt ist, zur Auswertung herangezogen. Die vorliegenden 25 Bilder, die den hier zu bestimmenden Partikel in- und außerhalb des
5 Fokus zeigen, werden wie folgt ausgewertet:

[37] Nachdem der zu bestimmende Partikel und die dafür in Frage kommenden Bilder gewählt worden sind, so wie diese in Fig. 9 dargestellt sind, wird zunächst eine Fokuskurve erstellt. Auf der horizontalen Achse wird die Anzahl der Bilder und auf der vertikalen Achse die Hel-
10 ligkeit der in jedem Bild ermittelten vier bis sieben hellsten Pixel, d. h. die Pixel, welche den höchsten Pixelwert haben, aufgeführt, und zwar jeweils unter Bildung des Mittelwertes dieser vier bis sieben Pixeln, sodass sich die aus Fig. 10 ersichtliche Kurve 16 ergibt, welche deutlich sichtbare Spitzen aufweist. Diese Kurve 16 wird gefiltert und so geglättet. Diese
15 geglättete Kurve ist in Fig. 10 mit 17 gekennzeichnet. Schließlich wird zu der Kurve 17 der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Diese Standardabweichung ist ein Kennzeichen für den erfassten Partikel. Je höher dieser Wert ist, um so größer ist dieser „Blink-Effekt“ des erfassten Partikels, was auf eine Bewegung des Partikels, insbesondere eine
20 Drehung um eine Achse hinweist. Diese Kurven 16 und 17 in Fig. 10 werden voneinander subtrahiert, sodass sich die in Fig. 11 dargestellte Kurve ergibt, welche den Mittelwert und die Abweichungen hiervon darstellen.

[38] Ein weiteres Kennzeichen zum Bestimmen oder Klassifizieren von
25 Partikeln ist die Momentenbildung, welche bei der Bildverarbeitung, insbesondere Auswertung und Klassifizierung, zum Stand der Technik zählt. Diese erfolgt regelmäßig anhand von Schwarzweißbildern, vorzugsweise nach deren Digitalisierung in schwarz- und weiß-Werte, wie dies einleitend bereits beschrieben worden ist.

[39] Ein weiteres Kennzeichen ist das Trägheitsmoment (auch inverses Moment genannt) eines Partikels, also auch ein Kennzeichen, welches die räumliche Erstreckung des Partikels erfasst. Ausgangspunkt dieses Kennzeichens sind beispielsweise sieben Bilder, von denen eins im Fokus und drei auf jeder Seite des Fokus angeordnet sind, so wie dies in Fig. 6
5 und drei auf jeder Seite des Fokus angeordnet sind, so wie dies in Fig. 6 durch das mittlere Bild 12 sowie ein Vorfokusbild 13 und die beiden zwischen den Bildern 12 und 13 liegenden Bilder sowie ein Nachfokusbild 14 und die beiden zwischen dem Fokusbild und dem Nachfokusbild liegenden Bildern gegeben ist. Von jedem dieser sieben Bilder, von denen
10 eines beispielhaft in Fig. 12a dargestellt ist, wird eine Fouriertransformation ausgeführt, sodass sich ein Bild wie in Fig. 12b dargestellt, ergibt. Die Fouriertransformation ergibt jeweils den in dem jeweiligen Bild abgebildeten Partikel im reziproken Raum (in Analogie zum reziproken Gitter der Kristallographie). Es werden dann die Gleichstromkomponenten (DC-Komponenten) entfernt oder zumindest verringert, so
15 dass sich ein Bild wie in Fig. 12c dargestellt ist, ergibt. Auch wird das Rauschen durch einen geeigneten Filter eliminiert, wonach das zentrale Moment jedes der Objekte der sieben Bilder berechnet wird. In Fig. 13 ist eine solche Kurve eines Bildes dargestellt, wobei die horizontale Achse die Frequenz und die vertikale Achse die Amplitude darstellt. Der
20 DC-Anteil ist bei dem in Fig. 13 dargestellten Diagramm bereits entfernt, die Rauschanteile 19 sind dort noch vorhanden. Der Maximal- und Minimalwert dieses zentralen Momentes bildet jeweils ein Kennzeichen des untersuchten Partikels. Die vorstehend beschriebenen Kennzeichen,
25 genügen in der Regel, um zu bestimmen, ob es sich bei dem untersuchten Partikel um ein Bakterium oder ein Nichtbakterium handelt.

[40] Eine weitere Varianz von Kennzeichen kann dadurch erzielt werden, dass die Reihen von Bildern in unterschiedlichen Ebenen von derselben Flüssigkeitsprobe mit Beleuchtung aus unterschiedlichen Beleuchtungswinkeln ausgewertet werden und/oder mit Beleuchtung mit
30 Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Welche Kennzeichen für welche

Partikel, insbesondere Bakterien, besonders geeignet sind, um diese zu klassifizieren oder gar zu bestimmen, bedarf empirischer Ermittlungen. Die vorstehend beschriebenen Kennzeichen sind jedoch besonders geeignet, um Bakterien von Nichtbakterien zu unterscheiden, und zwar

5 genügen dazu in der Regel drei oder vier dieser Kennzeichen, um diese Klassifizierung mit ausreichend hoher Sicherheit zu treffen. Eine solche Klassifizierung ist jedoch insbesondere bei der Trinkwasseruntersuchung von großer Bedeutung, da nach erfolgter Klassifizierung dann die Bestimmung im Einzelnen bzw. eine Unterklassifizierung erfolgen kann, und

10 zwar typischerweise der Bakterien und nicht der übrigen Partikel.

Bezugszeichenliste

	1	Lichtquelle
	2	Fenster
	3	Partikel
5	4	CCD-Sensor (Ebene des Sensors)
	5	fokussierende Linse
	6	direkte Strahlen
	7	Streulicht
	8	Sensorbild
10	9	Beispielbild
	10	Pixel
	11	Subpixel
	11a	blauer Subpixel
	11b	roter Subpixel
15	11c	grüner Subpixel
	11d	grüner Subpixel
	12	mittleres Bild im Fokus
	13	Vorfokusbild
	14	Nachfokusbild
20	16	ungeglättete Kurve
	17	geglättete Kurve
	18	Mittelwertkurve
	19	Rauschanteile

Ansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen von Partikeln, insbesondere Bakterien in Flüssigkeit, unter Verwendung einer bildgebenden optischen Vorrichtung mit einer Lichtquelle, mit einem optischen Sensor mit einem Feld von lichtempfindlichen Pixeln und mit einer zwischen
5 Lichtquelle und Sensor angeordneten zu untersuchenden Flüssigkeitsprobe, bei dem Kennzeichen von mindestens einem bildmäßig erfassten Partikel mit Kennzeichen einer Kennzeichensammlung zur Bestimmung des erfassten Partikels verglichen werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Bilderfassung in Dunkel-
10 feldtechnik erfolgt und dass ein lichtempfindliches Pixel mehrere Subpixel aufweist, die zur Bilderfassung genutzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Partikel anhand von zweidimensionalen schwarz-
15 weiß-Bildern in unterschiedlichen Ebenen der Flüssigkeitsprobe erfasst wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Subpixel zur Erhöhung der Auflösung und/oder der Empfindlichkeit des Sensors verwendet werden.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Pixel des Sensors mehrere Subpixel aufweist, von denen mindestens eines hochverstärkt und mindestens eines niedrig verstärkt werden.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens drei, vorzugsweise vier unter-

schiedliche Kennzeichen eines Partikels zu dessen Bestimmung verwendet werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Kennzeichen eines Partikels seine flächenmäßige Erstreckung in dem Bild, in welchem das Partikel im Fokus ist, verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erfassung der flächenmäßigen Erstreckung des Partikels ein Pixelgrenzwert festgesetzt wird, wobei alle Pixel, deren Pixelwert größer oder gleich dem festgesetzten Pixelgrenzwert ist, zu 1 und alle Pixel, deren Pixelwert kleiner als der festgesetzte Pixelgrenzwert ist, zu 0 gesetzt werden, wonach die flächenmäßige Erstreckung des Partikels erfasst wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die flächenmäßige Erstreckung des Partikels unter Zugrundelegung mehrerer unterschiedlicher festgesetzter Pixelgrenzwerte erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Kennzeichen eines Partikels dessen Rotation um seine eigene Achse bestimmt wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kennzeichen eines Partikels durch Auswertung einer Reihe von Bildern des Partikels in unterschiedlichen Ebenen erfolgt, bei denen das Partikel in einigen Bildern im Fokus und in einigen Bildern ausserhalb des Fokus liegt, wobei die Anzahl der das Partikel repräsentierenden Pixelwerte bildweise erfasst und

die Verteilung der erfassten Anzahlen über die Zahl der Bilder das Kennzeichen bildet.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Standardabweichung der erfassten Anzahlen zu dem Mittelwert der erfassten Anzahlen ein Kennzeichen bildet.
5
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Kennzeichen die Form eines Partikels verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Form eines Partikels durch seine Momente bestimmt wird.
10
14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Form eines Partikels durch seine inversen Momente bestimmt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erfassung der inversen Momente eines Partikels eine Auswertung einer Reihe von Bildern des Partikels in unterschiedlichen Ebenen erfolgt, wobei das Partikel in mindestens einem Bild im Fokus liegt, und in einer Anzahl von Bildern davor und dahinter, wobei die Pixelwerte jedes Bildes einer Fouriertransformation unterzogen werden wonach die DC-Anteile entfernt oder zumindest verringert werden, der Rauschanteil der Signale eliminiert und dann eine Momentenbestimmung erfolgt.
15
20
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsstärke der Lichtquelle konstant gehalten wird und dass eine Regelung vorgesehen ist, welche

die Beleuchtungsstärke vorzugsweise mittels des Sensors erfasst und die Lichtquelle entsprechend ansteuert.

- 5 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung eines Partikels durch Vergleich von erfassten Kennzeichen mit Kennzeichen der Kennzeichensammlung mittels eines nicht linearen Systems, vorzugsweise mittels eines neuronalen Netzwerkes, erfolgt.
- 10 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung eines Partikels durch Vergleich von erfassten Kennzeichen mit Kennzeichen der Kennzeichensammlung mittels eines linearen Systems erfolgt.
- 15 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine dem Sensor vorgeschaltete bilderzeugende Linse verwendet wird, die eine numerische Apertur zwischen 0,05 und 0,4 aufweist.
- 20 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Bilder von derselben Flüssigkeitsprobe mit Beleuchtung mit unterschiedlichem Beleuchtungswinkel ausgewertet werden.
- 20 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Bilder von derselben Flüssigkeitsprobe mit Beleuchtung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge nacheinander ausgewertet werden.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Klassifikation des Partikel in Bakterien, Nicht-Bakterien und andere Partikel erfolgt.

Fig. 2

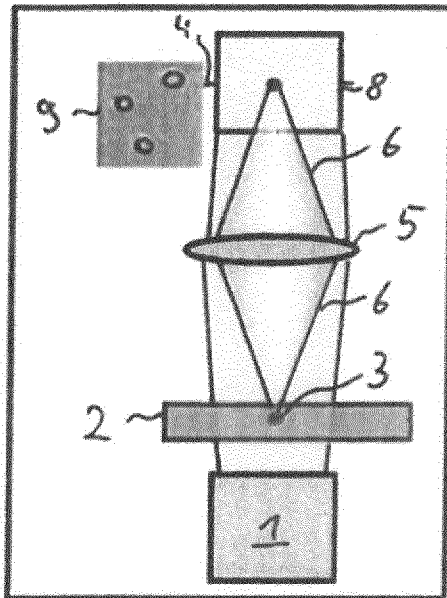


Fig. 1

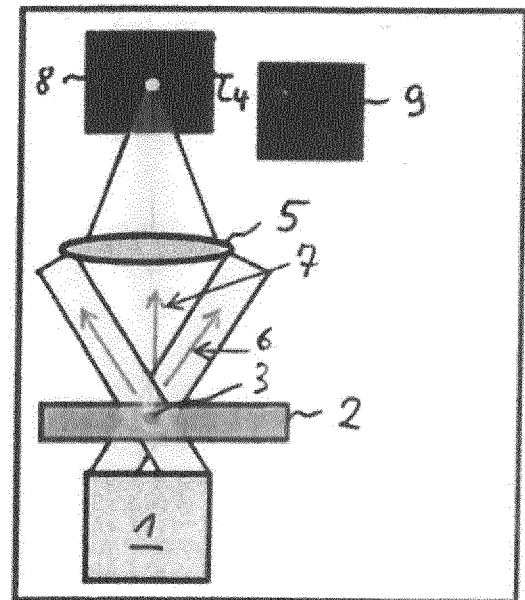


Fig. 3

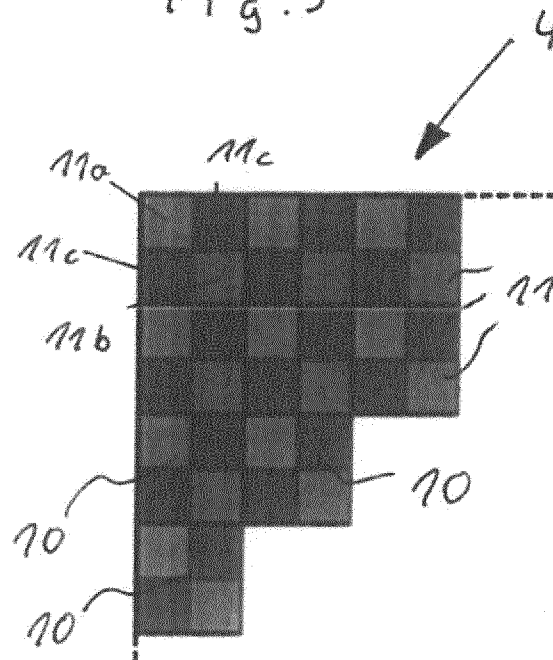


Fig. 4

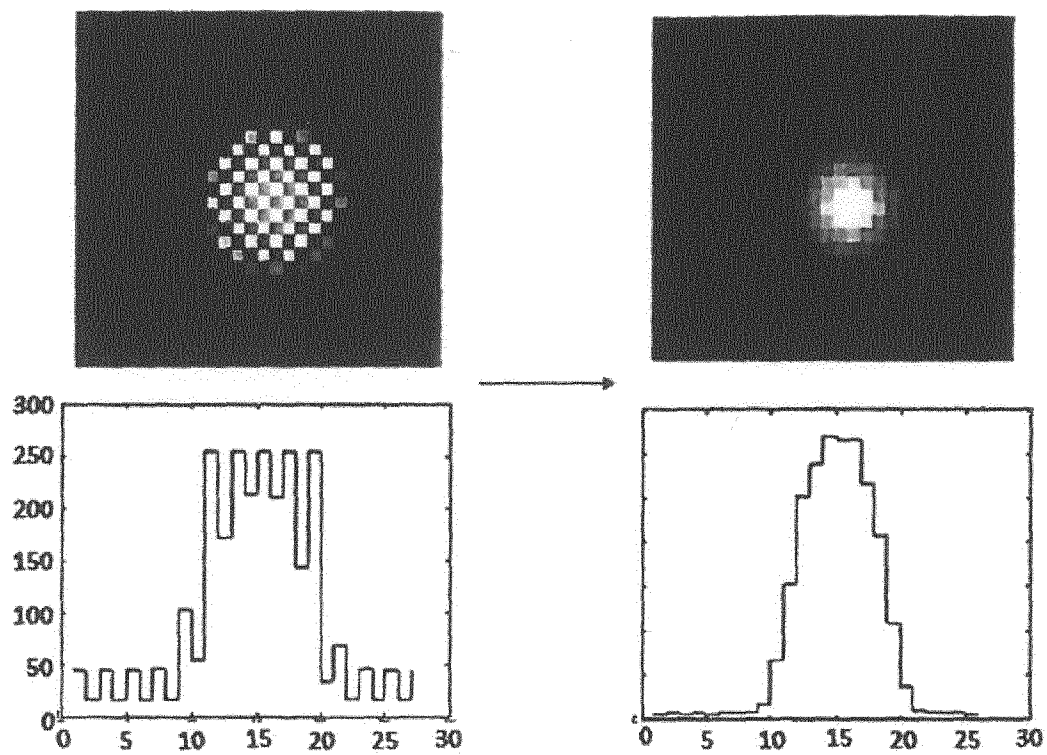


Fig. 13

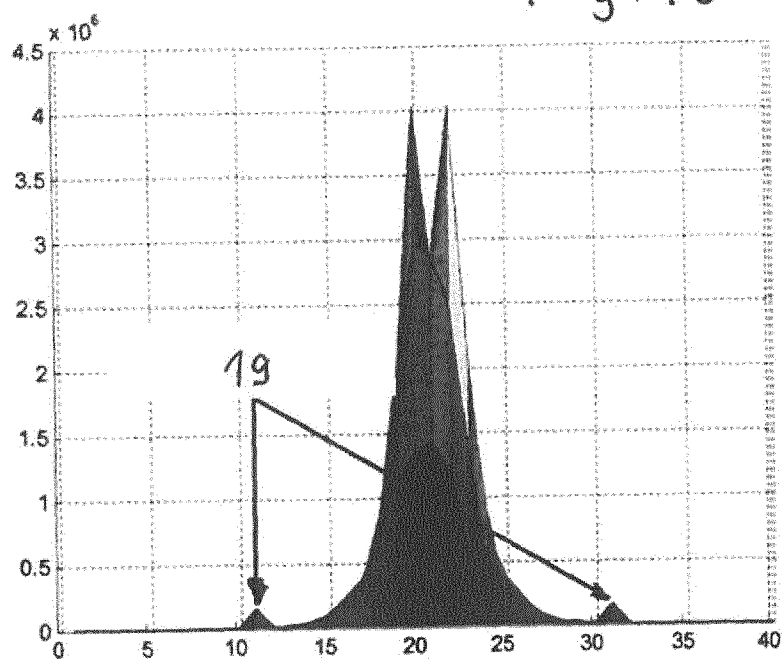


Fig. 5

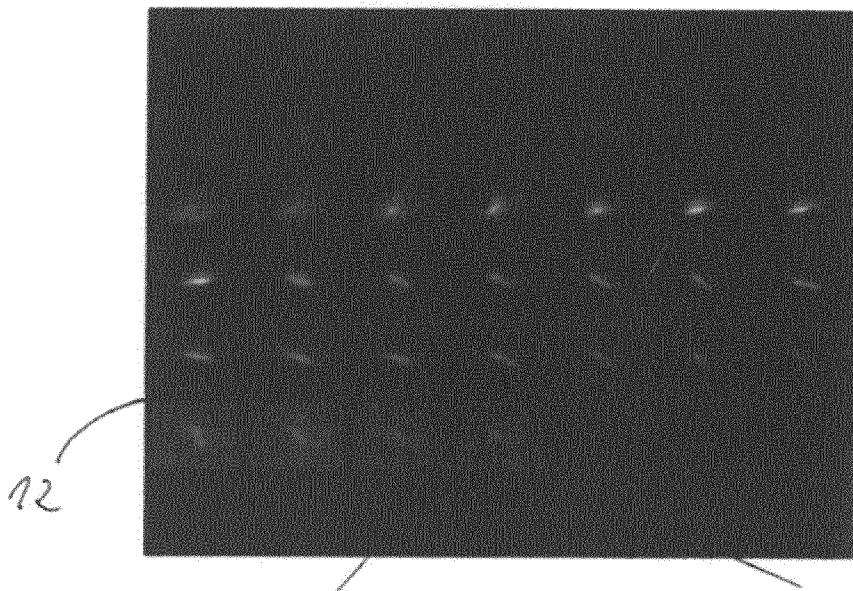


Fig. 6

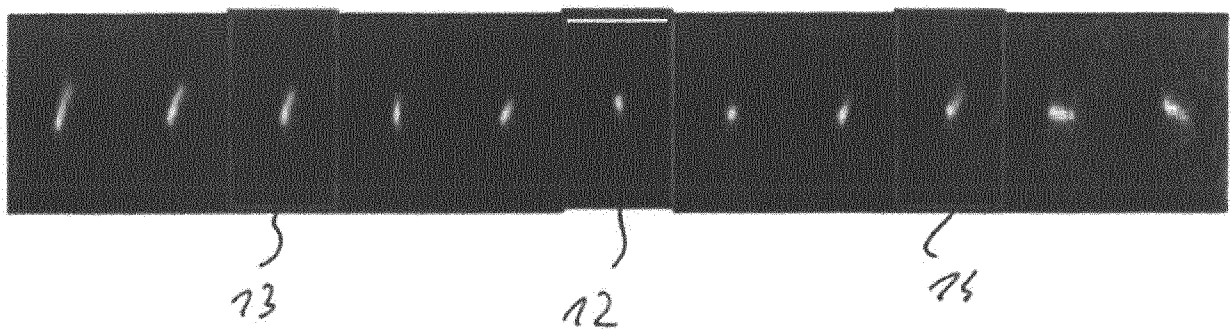


Fig. 7

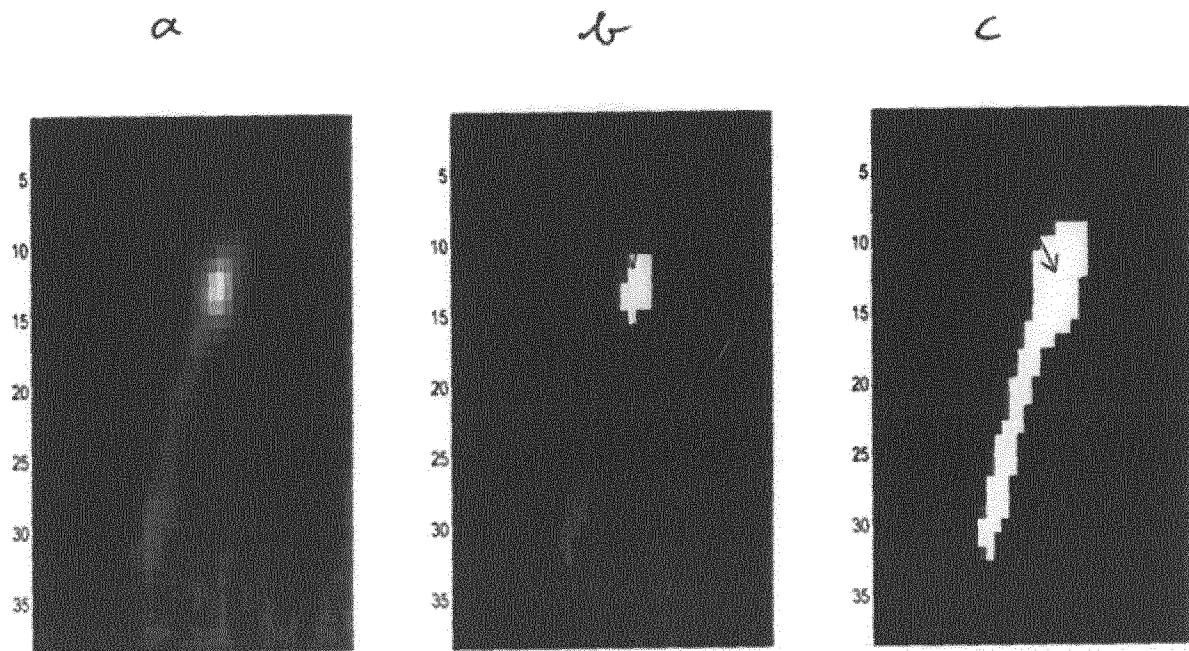


Fig. 8

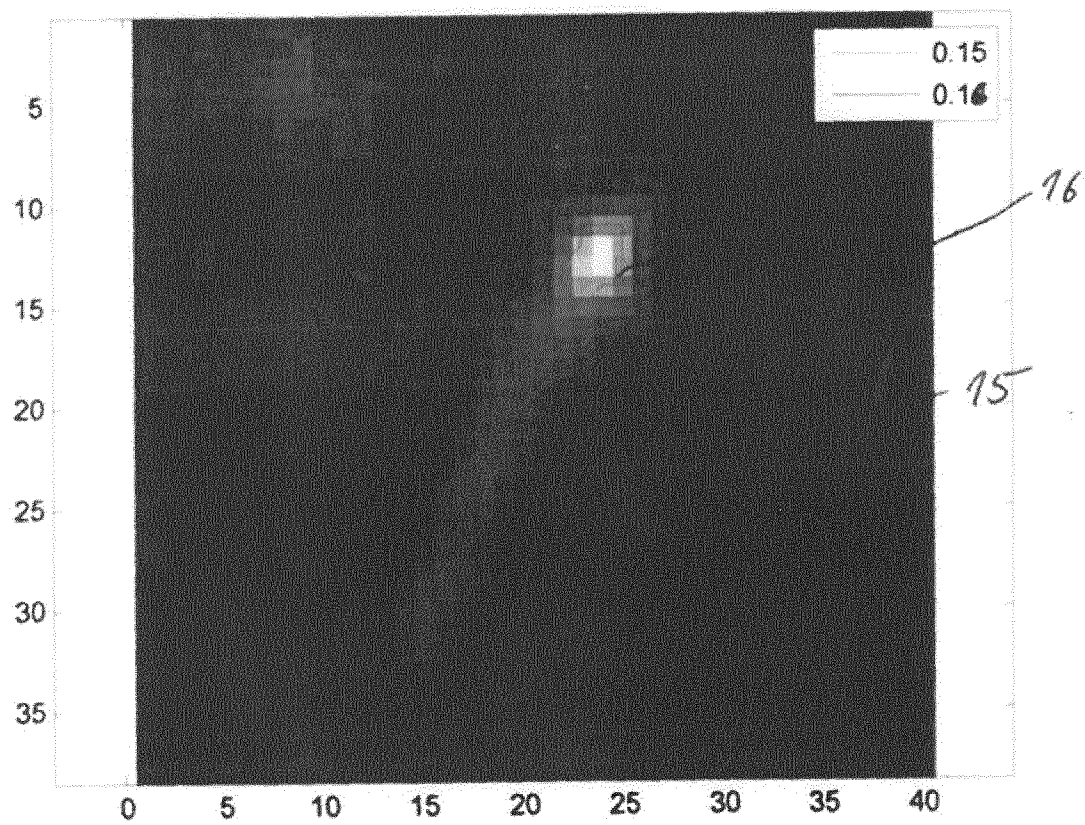


Fig. 9

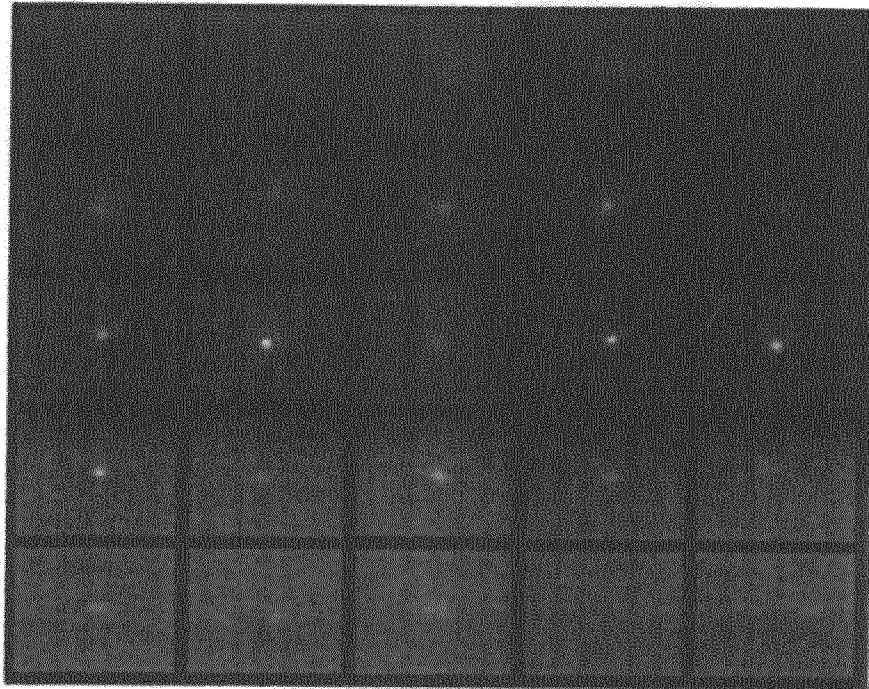


Fig. 10

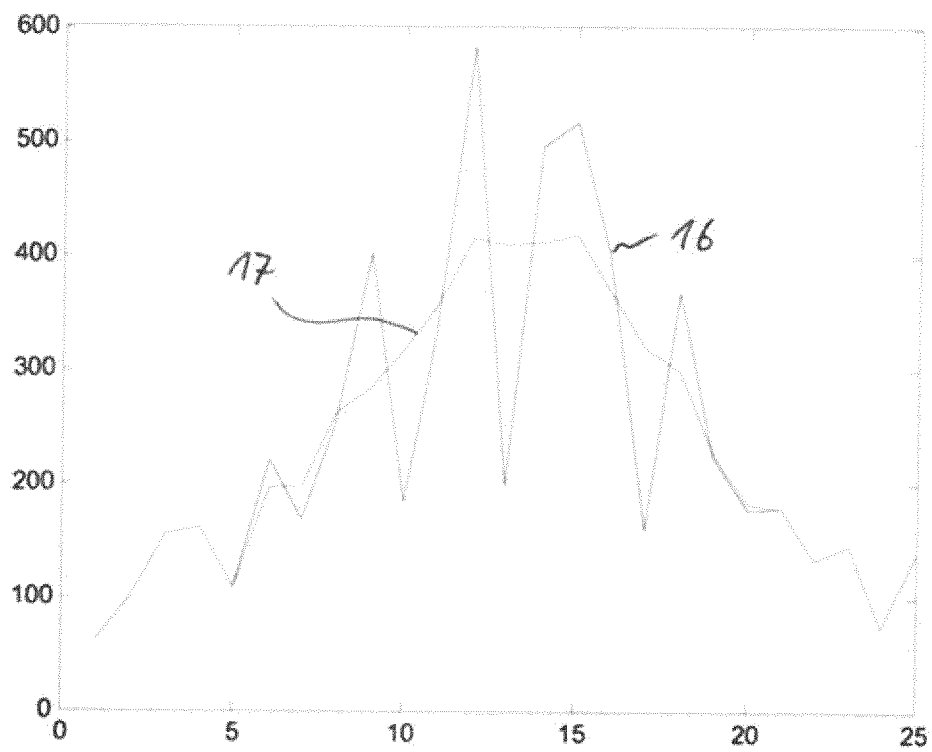
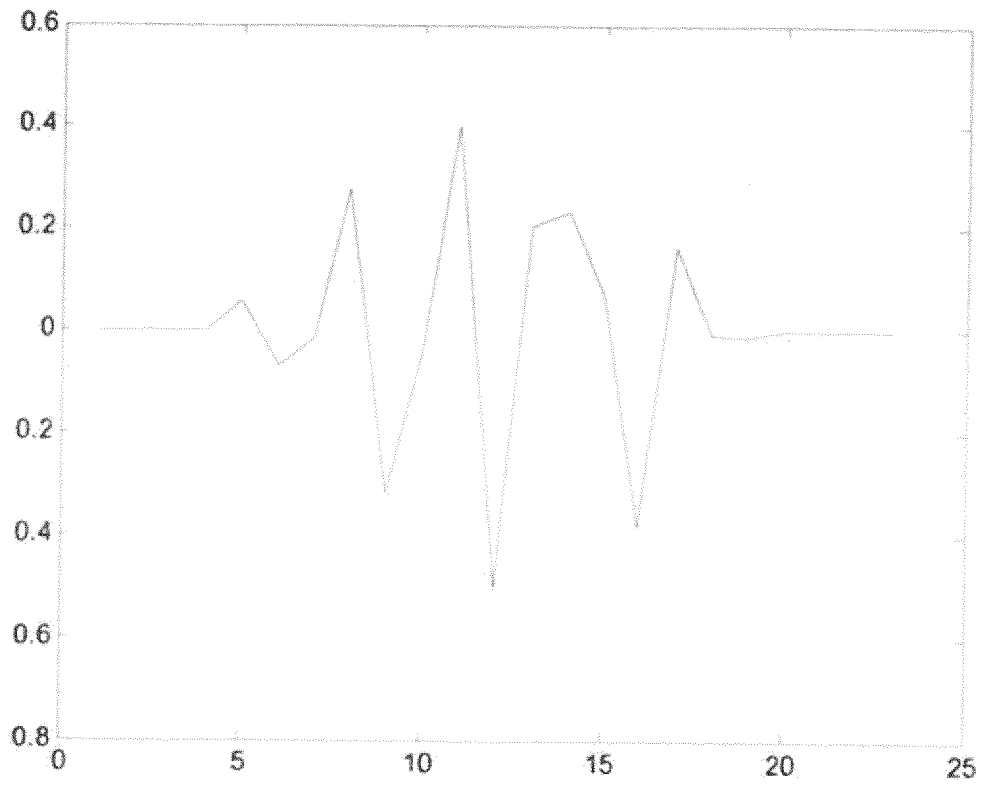


Fig. 11



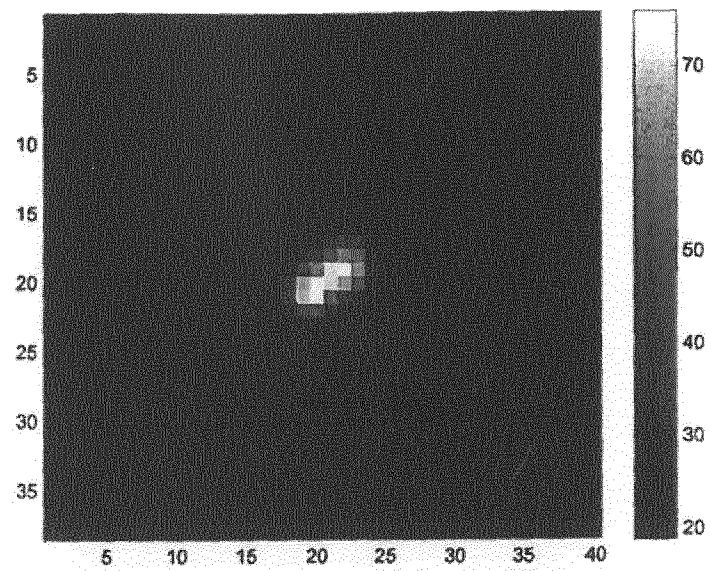
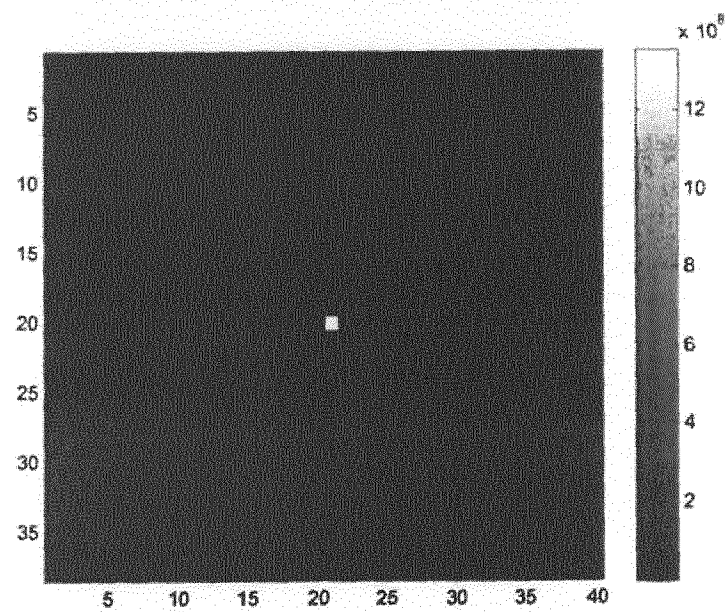
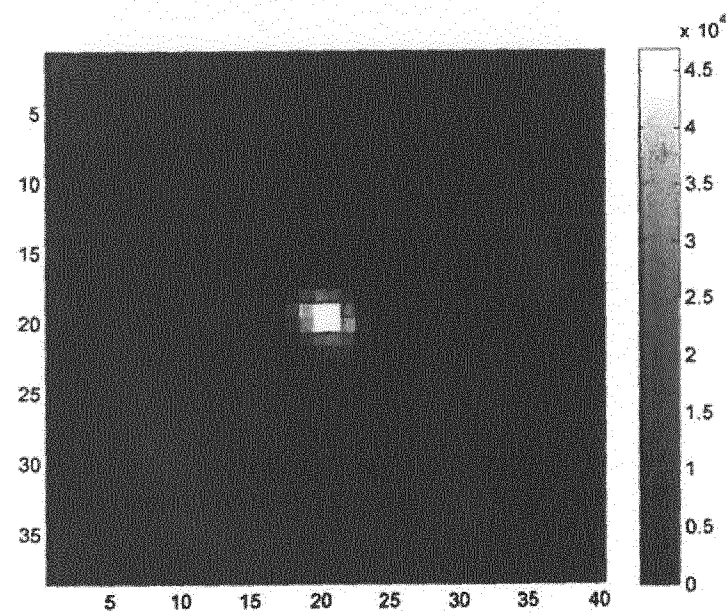


Fig. 12

a)



b)



c)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/079153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N15/14 G02B21/36 H04N9/04 G02B21/10 G06T7/00
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 G02B H04N G06T

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/088930 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; FLETCHER DANIEL [US]; HANSEN WENDY [US]; SWITZ N) 16 July 2009 (2009-07-16) paragraphs [0123], [0131] - [0132], [0152], [0260]; figures 2,3 -----	1-22
X	US 8 849 006 B2 (ARBUCKLE JOHN D [CA]) 30 September 2014 (2014-09-30) column 1, line 25 - line 32 column 2, line 21 - line 66 column 4, line 60 - column 5, line 5 column 5, line 31 - column 6, line 50 ----- -/--	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

3 March 2016

Date of mailing of the international search report

16/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, Alain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/079153

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/094790 A1 (UNISENSOR AS [DK]) 26 June 2014 (2014-06-26) cited in the application page 27, line 11 - line 32 page 31, line 27 - page 33, line 15 page 34, line 9 - line 26 -----	1-22
A	JP H02 189089 A (PFU LTD) 25 July 1990 (1990-07-25) the whole document -----	1-22
A	US 2013/076947 A1 (HIRAKAWA KEIGO [US]) 28 March 2013 (2013-03-28) paragraphs [0004], [0012], [0021] -----	3,4
A	WO 2012/050645 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US]; LOW PHILIP S [US]; WEI ALEXANDER [US]) 19 April 2012 (2012-04-19) page 28, line 29 page 96, line 20 - line 30; figures 50,51 page 97, line 11 - line 12 page 98, line 7 - line 13 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/079153

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009088930 A2	16-07-2009	CN 101952762 A	19-01-2011
		CN 103033922 A	10-04-2013
		EP 2227711 A2	15-09-2010
		US 2011009163 A1	13-01-2011
		US 2014120982 A1	01-05-2014
		US 2015005032 A1	01-01-2015
		US 2016054555 A1	25-02-2016
		WO 2009088930 A2	16-07-2009

US 8849006 B2	30-09-2014	US 2010246927 A1	30-09-2010
		US 2014369588 A1	18-12-2014

WO 2014094790 A1	26-06-2014	EP 2936116 A1	28-10-2015
		JP 2016505836 A	25-02-2016
		US 2015347817 A1	03-12-2015
		WO 2014094790 A1	26-06-2014

JP H02189089 A	25-07-1990	NONE	

US 2013076947 A1	28-03-2013	NONE	

WO 2012050645 A2	19-04-2012	AU 2011314335 A1	31-01-2013
		CA 2803348 A1	19-04-2012
		EP 2585610 A2	01-05-2013
		US 2013196872 A1	01-08-2013
		WO 2012050645 A2	19-04-2012

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N15/14 G02B21/36 H04N9/04 G02B21/10 G06T7/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N G02B H04N G06T		
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		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2009/088930 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; FLETCHER DANIEL [US]; HANSEN WENDY [US]; SWITZ N) 16. Juli 2009 (2009-07-16) Absätze [0123], [0131] - [0132], [0152], [0260]; Abbildungen 2,3 -----	1-22
X	US 8 849 006 B2 (ARBUCKLE JOHN D [CA]) 30. September 2014 (2014-09-30) Spalte 1, Zeile 25 - Zeile 32 Spalte 2, Zeile 21 - Zeile 66 Spalte 4, Zeile 60 - Spalte 5, Zeile 5 Spalte 5, Zeile 31 - Spalte 6, Zeile 50 ----- -/--	1-22
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ 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
3. März 2016		16/03/2016
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Hocquet, Alain

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2014/094790 A1 (UNISENSOR AS [DK]) 26. Juni 2014 (2014-06-26) in der Anmeldung erwähnt Seite 27, Zeile 11 - Zeile 32 Seite 31, Zeile 27 - Seite 33, Zeile 15 Seite 34, Zeile 9 - Zeile 26 -----	1-22
A	JP H02 189089 A (PFU LTD) 25. Juli 1990 (1990-07-25) das ganze Dokument -----	1-22
A	US 2013/076947 A1 (HIRAKAWA KEIGO [US]) 28. März 2013 (2013-03-28) Absätze [0004], [0012], [0021] -----	3,4
A	WO 2012/050645 A2 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US]; LOW PHILIP S [US]; WEI ALEXANDER [US]) 19. April 2012 (2012-04-19) Seite 28, Zeile 29 Seite 96, Zeile 20 - Zeile 30; Abbildungen 50,51 Seite 97, Zeile 11 - Zeile 12 Seite 98, Zeile 7 - Zeile 13 -----	1-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/079153

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2009088930	A2	16-07-2009	CN	101952762	A		19-01-2011	
			CN	103033922	A		10-04-2013	
			EP	2227711	A2		15-09-2010	
			US	2011009163	A1		13-01-2011	
			US	2014120982	A1		01-05-2014	
			US	2015005032	A1		01-01-2015	
			US	2016054555	A1		25-02-2016	
			WO	2009088930	A2		16-07-2009	

US 8849006	B2	30-09-2014	US	2010246927	A1		30-09-2010	
			US	2014369588	A1		18-12-2014	

WO 2014094790	A1	26-06-2014	EP	2936116	A1		28-10-2015	
			JP	2016505836	A		25-02-2016	
			US	2015347817	A1		03-12-2015	
			WO	2014094790	A1		26-06-2014	

JP H02189089	A	25-07-1990	KEINE					

US 2013076947	A1	28-03-2013	KEINE					

WO 2012050645	A2	19-04-2012	AU	2011314335	A1		31-01-2013	
			CA	2803348	A1		19-04-2012	
			EP	2585610	A2		01-05-2013	
			US	2013196872	A1		01-08-2013	
			WO	2012050645	A2		19-04-2012	
