



Veterinärmedizinische Fakultät
Klinik für Vögel und Reptilien
Prof. Dr. Maria-E. Krautwald-Junghanns

„Entwicklung eines optischen Verfahrens zur Lagebestimmung der Keimscheibe sowie eines Verfahrens zur Blastodermzellentnahme in weiß- und braunschaligen Bruteiern“

Berichtszeitraum: 07/2013 bis 12/2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung.....	1
1.2	Zielsetzung.....	1
1.2.1	Positionsbestimmung der Keimscheibe im ungeöffneten Ei.	1
1.2.2	Realisation eines praxistauglichen Versuchsaufbaues.....	2
1.2.3	Entnahme von Blastodermzellen	2
2	Methoden für die Entfärbung von braunschaligen Bruteiern	2
2.1	Nass-chemische Methoden	3
2.1.1	nass-chemische Entfärbung (Essigsäure)	3
2.1.2	nass-chemische Entfärbung (Zitronensäure/Zitronensaftkonzentrat)	4
2.1.3	nass-chemische Entfärbung (Zitronensäure/chemisch)	5
2.2	Mechanische Methode - Sandstrahlen	8
2.3	Opto-mechanische Entfärbung – Laserstrahlung.....	9
2.4	Zusammenfassung der Entfärbemethoden.....	11
3	Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch	12
3.1	Algorithmus zur Positionsbestimmung der Keimscheibe im ungeöffneten Ei.....	12
3.2	Realisierung eines praxistauglichen Versuchsaufbaues	15
4	Entnahme von Blastodermzellen	18
5	Zusammenfassung und Diskussion	20

1 Einleitung

Negative Korrelationen zwischen Legeleistung und Muskelmasseansatz machen die wirtschaftliche Nutzung der männlichen Nachkommen aus Legehennenlinien schwierig, da eine Aufzucht unter anderem mit einer längeren Mastdauer, einer herabgesetzten Mastleistung und einem geringeren Anteil an dem bei Verbrauchern besonders beliebten Brustmuskelfleisch verbunden ist. Zurzeit werden daher allein in Deutschland jährlich ca. 40 Millionen männliche Nachkommen unmittelbar nach dem Schlupf aussortiert und anschließend gemäß der Tierschutz-Schlachtverordnung (TierSchIV) mittels CO₂-Begasung oder im Homogenisator getötet. Die Problematik des Tötens unerwünschter männlicher Eintagsküken betrifft dabei sämtliche Bereiche der Legehennenhaltung inklusive des Bio-Sektors, stößt jedoch zunehmend auf ethische und rechtliche Bedenken. Gegenwärtig wird die Tötung von Eintagsküken nur noch toleriert, wenn die Tierkörper für Futterzwecke Verwendung finden. Praxistaugliche Alternativen zur Merzung der männlichen Eintagsküken stehen in der Legehennenvermehrung bislang allerdings nicht zur Verfügung.

1.1 Stand der Forschung

Im Rahmen des BLE-Forschungsprojektes „Möglichkeiten der *in ovo*-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus gallus* f. dom.) als Alternative zur routinemäßigen Tötung männlicher Eintagsküken aus Legehennenlinien“ (FKZ: 511-06.01-28-1-33.010-07) wurden seitens der Antragsteller seit April 2008 unterschiedliche Verfahren getestet, die eine zuverlässige Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn bereits vor dem Schlupf ermöglichen sollen. Zusammenfassend lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt folgender Sachstand darstellen:

Bei **bebrüteten Eiern** lässt sich eine Geschlechtsbestimmung anhand des Östrogen-Gehalts in der Allantoisflüssigkeit ab dem 8. Bebrütungstag vornehmen. Als nachteilig ist zu werten, dass die aussortierten Eier keiner wirtschaftlichen Verwendung zugeführt werden können.

Ein zweiter Forschungsansatz befasste sich mit der Geschlechtsdiagnose an Keimscheiben **unbebrüteter Eier**. Es zeigte sich, dass eine Geschlechtsdiagnose mittels Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie vorgenommen werden kann. Mit dieser Methode konnten bereits an Keimscheiben unbebrüteter Hühnereier geschlechtsspezifische spektrale Unterschiede identifiziert werden, die eine eindeutige Geschlechtszuordnung erlauben.

In diesem Zusammenhang tauchten verschiedene offene Fragestellungen auf, die nicht im Rahmen des o. g. BLE-Projektes bearbeitet werden können und die daher in der vorliegenden Studie in Zusammenarbeit mit der Fa. Meissner Engineering (Dresden) bearbeitet wurden. Meissner Engineering ist ein Unternehmen, welches auf Forschung am Hühnerei spezialisiert ist. Als kleines Team entwickelt Meissner Engineering industrielle Sonderlösungen im Bereich Ei-Handling und Ei-Schieren, wobei der Fokus auf optischer Messtechnik und Bildverarbeitung sowie Prototypendesign und -bau liegt.

1.2 Zielsetzung

1.2.1 Positionsbestimmung der Keimscheibe im ungeöffneten Ei

Erste Vorversuche haben gezeigt, dass bei weißschaligen Eiern eine Durchleuchtung des Eies mit blauem Licht eine Detektion der Keimscheibe mit hinreichender Genauigkeit ermöglicht. Bei braunschaligen Eiern ist dies bislang nur bedingt möglich ist. Hauptproblem sind die optischen Eigenschaften des Protoporphyrins, welcher insbesondere das blaue und grüne Licht absorbiert. Ziel dieses Arbeitspunktes ist es, zu evaluieren, inwieweit der braune Farbstoff entfernt werden kann, um entsprechende Fenster zum Einkoppeln des Schierlichtes und zur Erfassung des Kamerabildes der Keimscheibe zu erhalten. Geprüft werden soll, ob durch mechanische Fensterung, chemische Fensterung oder optisch-thermische Fensterung an braun-

schaligen Bruteiern eine Lagebestimmung der Keimscheibe mittels Schieren ohne negative Auswirkung auf die Entwicklungsfähigkeit und Schlupfrate behandelter Eier erzielt werden kann. Die Überprüfung der Entwicklungsfähigkeit erfolgt durch Brutversuche.

1.2.2 Realisation eines praxistauglichen Versuchsaufbaues

Im Rahmen dieses Schwerpunktes wird ein Versuchsaufbau realisiert, welcher aus folgenden Komponenten besteht: einer Lichtquelle zum Blaulichtschieren; einem Kamerasystem; Software zur automatischen Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale (X- und Y-Koordinate); einem Lasertriangulationssensor für die Detektion der Eioberfläche (Z-Koordinate); einem CO₂ Laser zum Öffnen der Eier; einem Portalroboter sowie einer speziellen Eihaltevorrichtung.

Dieser Aufbau wird es erstmals erlauben, eine Detektion der Keimscheibe (X-, Y- und Z-Koordinate) und das Öffnen der Eier an einer Anlage ohne räumliche Trennung zu realisieren). Die Eier werden dabei in einen speziell entwickelten Eihalter gespannt. Der Eihalter ermöglicht das Applizieren des blauen Lichtes über die Polkappen des Eies. Zentral über dem horizontal gelagerten Ei wird eine Videokamera mit Auto Focus-Funktion installiert. Das erfasste Bild, auf dem die Keimscheibe aufgrund der blauen Beleuchtung durch die Kalkschale hindurch sichtbar ist, wird genutzt um die X- und Y-Koordinate mit Hilfe einer entsprechenden Bildverarbeitungssoftware zu bestimmen. Anschließend wird mit Hilfe des Lasertriangulationssensors die dazugehörige Z-Koordinate bestimmt. Mit Hilfe der drei Koordinaten kann dann zielgenau über der Keimscheibe mit Hilfe des CO₂-Lasers eine für weitere Analyse-schritte benötigte Perforation induziert werden.

1.2.3 Entnahme von Blastodermzellen

Es konnte bereits im Rahmen des o. g. BLE-Projektes gezeigt werden, dass eine Geschlechtsbestimmung anhand von embryonalem Zellmaterial mittels FTIR-Spektroskopie möglich ist. Für die FTIR-Untersuchung wird dabei eine kleine Anzahl von Zellen aus der Keimscheibe entnommen und spektrometrisch untersucht. Für die Entnahme muss eine Methode entwickelt werden, welche schnell und minimal-invasiv die Entnahme von Blastodermzellen ohne Schädigung der Eistruktur und Beeinträchtigung der Entwicklungsfähigkeit erlaubt. Für die Zellentnahme sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Entwicklung von Keimscheibendetektionssoftware. Für die Detektion der Keimscheibe (X- und Y-Koordinate) wird ein Kamerabild des Zielgebietes herangezogen. Das Bild zeigt die Keimscheibe durch das in der Eischale befindliche Loch ohne Eimembran.
- Bestimmung der Z-Koordinate der Oberfläche der Eisubstanz. Hierfür wird mit Hinblick einer zukünftigen großtechnischen Anwendung in der Brüterei eine kontaktfreie, optische und technisch einfache Methode genutzt.
- Evaluierung der für eine FTIR-Spektroskopie benötigten Zellanzahl. Die Bestimmung der Anzahl der entnommenen Zellen erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie.
- Überprüfung des Einflusses der Zellentnahme auf die Entwicklungsfähigkeit durch Brutversuche.

2 Methoden für die Entfärbung von braunschaligen Bruteiern

Im Bearbeitungszeitraum wurden verschiedene Methoden genutzt, um die Keimscheibe von braunschaligen Bruteiern im ungeöffneten Zustand des Eies sichtbar zu machen. Bei weißschaligen Eiern kann durch Schieren mit sehr hellen Lichtquellen die Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch lokalisiert werden. Bei braunschaligen Eiern war dies bis jetzt nicht mög-

lich. Aufgrund der hohen Absorption des braunen Farbstoffes ist diese Methode für braunschalige Eier nicht anwendbar, ohne den braunen Farbstoff zu entfernen. Für die Entfärbung braunschaliger Eier wurden im Rahmen des Projektes folgende Methoden evaluiert:

2.1 Nass-chemische Methoden

2.1.1 nass-chemische Entfärbung (Essigsäure)

Es konnte gezeigt werden, dass sich Essigsäure hervorragend eignet, um die braune Färbung der Eischale bei braunschaligen Bruteiern zu entfernen. Generell wird bei den hier beschriebenen nass-chemischen Methoden die Ätzwirkung der eingesetzten Substanzen ausgenutzt. Die Essigsäure löst während der Behandlung nicht nur die Kutikula, sondern auch die äußeren Schichten der Kalkschale auf, in denen der Farbstoff lokalisiert ist.

Um die Wirkung der Essigsäure zu demonstrieren, wurde folgender Versuch durchgeführt:

1. Lagerung braunschaliger Eier in 25-prozentiger Essigsäure in horizontaler Position (Abb. 1)
2. Applikationszeit 2 h und 4 h
3. Einlage der behandelten Eier in den Inkubator bei 100°F und 50 % rel. Luftfeuchte
4. Bebrütung bis zum Tag 8 der Entwicklung
5. Öffnen der Eier, Sichtkontrolle, Bestimmung der Entwicklungsrate Tag 8 (**STR**)

In diesem Versuch wurden ca. 50 % der gesamten Eioberfläche entfärbt. Abbildung 1 zeigt die Lagerung der Eier in der Essigsäure sowie das Ergebnis des Bleichens nach 2 h bzw. 4 h Behandlungszeit.



Abbildung 1: Die Bildersequenz zeigt links) braune Bruteier während der Säurebehandlung, mitte) mit Säure entfärbte Eier vergleichend mit unbehandelten Eiern und rechts) Detailansicht eines entfärbten Eies.

Auf den ersten Blick ähneln sich die Ergebnisse für die 2 h und für die 4 h behandelten. Betrachtet man jedoch die Eioberfläche nach der Essigsäurebehandlung genauer, kann man erkennen, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich des Zustandes der Kalkschale gibt. Es ist deutlich sichtbar, dass die Kalkschale nach 4 h Essigsäurebehandlung deutlich an Stärke verloren hat, das heißt bei den 4 h behandelten Eiern wurde im Vergleich zu den 2 h behandelten Eiern eine dickere Schicht der Kalkschale weggeätzt. Zum Teil ist die Kalkschale bei

den 4 h behandelten Eiern so dünn, dass bereits die Schalenmembran an die Oberfläche tritt. Bei den 2 h behandelten Eiern war dies nicht der Fall.

Generell, wie auch auf den Bildern zu erkennen ist, lässt sich mit dieser Methode die braune Färbung von braunschaligen Eiern entfernen. Es hat sich gezeigt, dass durch eine zweistündige Behandlung mit 25-prozentiger Essigsäure eine hinreichende Entfärbung der Kalkschale erreicht werden kann.

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Entfärbung mit Essigsäure möglich ist, wurde die Entwicklungsfähigkeit der behandelten Eier untersucht. Dazu wurden die entfärbten Eier für 8 Tage im Brutschrank gelagert. Eine äquivalente Kontrollgruppe wurde ebenfalls im Inkubator platziert. Dabei stellte sich heraus, dass makroskopisch keine Entwicklungsunterschiede zwischen den 2 h bzw. 4 h mit Essigsäure behandelten Eiern und der unbehandelten Kontrollgruppe feststellbar war.

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Essigsäurebehandlung offensichtlich im ersten Drittel der Bebrütungsdauer keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen hat. Besonders erstaunlich ist dabei, dass sogar die 4 h behandelte Eier keinen negativen Einfluss zeigen, obwohl teilweise die komplette Kalkschale nass-chemisch entfernt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Kalkschale nur ein untergeordneter Faktor bezüglich der Keimbarriere des Eies ist, sondern hauptsächlich als mechanischer Schutz dient. Die Überlebensraten am achten Bebrütungstag sahen im Detail wie folgt aus:

- 2 h Essigsäurebehandlung n = 6, **STR = 100 %**
- 4 h Essigsäurebehandlung n = 6, **STR = 83 %** (nach Bereinigung der Unbefruchteten 100 %)
- Kontrolle n = 7, **STR = 86 %**

Natürlich ist die hier genutzte Gruppengröße in keiner Weise statistisch belastbar, dennoch kann dieses Ergebnis durchaus positiv gewertet werden. Da es offensichtlich keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Eiern gibt, erscheint dieses Verfahren zur Entfärbung prinzipiell geeignet zu sein. Um diese Methode statistisch abzusichern, sind Versuche mit größeren Gruppenstärken notwendig. Weiterhin sollten die Versuche bis zum Schlupf ausgedehnt werden, um eventuelle Spätfolgen der Säurebehandlung ausschließen zu können.

2.1.2 nass-chemische Entfärbung (Zitronensäure/Zitronensaftkonzentrat)

Parallel zu den Versuchen mit Essigsäure ist eine weitere Säure getestet worden. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Wirksamkeit von Zitronensäure geprüft. Da die Lieferzeit von chemisch reiner Zitronensäure mehrere Wochen betrug, wurde entschieden, die initialen Versuche mit handelsüblichem Zitronensaftkonzentrat durchzuführen. Das Protokoll der Zitronensaftversuche war identisch mit dem der Essigsäureversuche. Die Eier wurden wiederum in der Säure gelagert. Allerdings wurde die Behandlungszeit auf 1 h begrenzt, da die Wirkung des Zitronensaftkonzentrates stärker war als die der 25-prozentigen Essigsäure. Nach der Behandlung wurden die Eier wieder bis zum Tag 8 bebrütet und anschließend geöffnet, um die Embryonen zu begutachten. Eine entsprechende Kontrollgruppe wurde im Inkubator platziert.

Die Entfärbung der Kalkschale nach 1 h Zitronensäurebehandlung war mit dem Resultat eines 2 h Essigsäurebades vergleichbar. Auch die acht Tage alten Embryonen aus behandelten Eiern wiesen keine morphologischen Abweichungen auf.

Auch bei diesem Versuch sind die Gruppengrößen nicht statistisch belastbar. Ähnlich wie die Essigsäurebehandlung scheint jedoch auch eine Entfärbung der Kalkschale mit Zitronensäure keine dramatischen Effekte auf die Frühentwicklung von Hühnerembryonen zu haben.

Im Detail sahen die Ergebnisse (ohne Bereinigung der nicht entwicklungsfähigen Eier) wie folgt aus:

- Kontrolle n = 13, **8TR = 69 %**
- Behandelt (Zitronensaftkonzentrat) n = 12, **8TR = 92 %**

2.1.3 nass-chemische Entfärbung (Zitronensäure/chemisch)

Nach den Vorversuchen wurde eine weitere Versuchsreihe mit chemisch hergestellter Zitronensäure durchgeführt. Es wurde aus Zitronensäuregranulat eine 25-prozentige Lösung hergestellt und zum Entfärben der Eier genutzt. Es wurden wiederum ca. 50 % der Eioberfläche entfärbt. Dazu wurde eine Behandlungszeit von 1,5 h gewählt. Die behandelten Eier wurden wiederum bis zum Tag 8 bebrütet und anschließend geöffnet.

Das Ergebnis hinsichtlich der Entfärbung war wiederum identisch mit den vorher durchgeführten Untersuchungen. Weiterhin wurden keine negativen Effekte auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen festgestellt werden. Die Ergebnisse sahen im Detail wie folgt aus:

- behandelte Gruppe n = 22, **8TR = 100 %**
- Kontrollgruppe n = 20, **8TR = 80 %**

Auch chemisch reine Zitronensäure scheint sich demnach zur Entfärbung braunschaliger Eier zu eignen, ohne die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen zu beeinträchtigen.

Nachdem die ersten Versuchsreihen gezeigt haben, dass ein Entfärben der Eier mit Hilfe von Säuren möglich ist, wurde noch eine stärkere Säure getestet, um zu evaluieren, ob der Prozess des Entfärbens durch eine stärkere Säure zeitlich noch beschleunigt werden kann. Als stärkere Säure wurde Salzsäure gewählt. Nach einer kurzen Vorversuchsreihe wurde eine größere Gruppe von Bruteiern mit Salzsäure behandelt. In der Vorversuchsreihe wurden die Eier horizontal für 20 min in 25-prozentiger Salzsäure gelagert. Abbildung 2 zeigt exemplarisch eines auf diese Weise behandelten Eies.

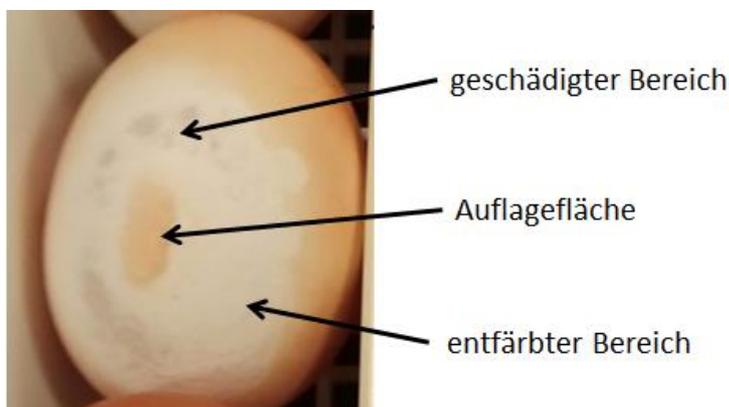


Abbildung 2: Braunschaliges Ei nach 20 min Salzsäurebehandlung (25 %). Es kann deutlich eine inhomogene Entfärbung erkannt werden.

Die Vorversuche haben gezeigt, dass eine Behandlung mit 20 min Einwirkzeit zu einer inhomogenen Entfärbung führt. Man kann deutlich in Abbildung 2 Areale erkennen, in denen die komplette Kalkschale durch die Säure gelöst wurde. Bei diesen Gebieten handelt es sich um die Areale, welche in Abbildung 2 dunkel erscheinen. An diesen Stellen ist die komplette Kalkschale bis auf die Schalenmembran aufgelöst worden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für einen etwas größeren Versuch eine Einwirkzeit von 15 min gewählt, um zu verhindern, dass es Gebiete gibt, in denen die komplette Kalkschale entfernt wird.

Der anschließende Versuch war in zwei Gruppen geteilt.

- Gruppe 1: halbseitig entfärbt (ca. 50 % der Oberfläche entfärbt)
- Gruppe 2: zweiseitig entfärbt (ca. 80 % der Oberfläche entfärbt)
- Kontrollgruppe

Die Ergebnisse der Entfärbung sind in Abbildung 3 zu sehen. Die Behandlung der braunschaligen Eier mit 25-prozentiger Salzsäure und einer Einwirkzeit von 15 min führt zu einer homogenen Entfärbung der Eischale.

Ein Problem ist allerdings dennoch offensichtlich. Die Areale, welche im direkten Kontakt mit dem Gefäß stehen, werden nicht entfärbt, da die Zugänglichkeit der Säure zur Eischale stark eingeschränkt ist. Alle Eier der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe wurden wiederum bis Tag 8 bebrütet und geöffnet, um den Zustand der Embryonen zu beurteilen.



Abbildung 3: Braunschaliges Eier nach 15 min Salzsäurebehandlung (25 %). Links ist eine zweiseitige Entfärbung und rechts die einseitige Entfärbung dargestellt.

Auch nach einer Behandlung mit 25-prozentiger Salzsäure konnten keine negativen Effekte hinsichtlich der Frühentwicklung der Embryonen festgestellt werden. Die Ergebnisse im Detail lauten:

- Einseitig entfärbt n = 12, **8TR = 92 %** (nach Bereinigung der Unbefruchteten 100 %)
- Zweiseitig entfärbt n = 11, **8TR = 100 %**
- Kontrolle n = 11, **8TR = 91 %** (nach Bereinigung der Unbefruchteten 100 %)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein partielles Entfärben braunschaliger Eier durch Säurebehandlung keinen negativen Effekt auf die 8TR hat, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Eier komplett entfärbt wurden. Für die Komplettentfärbung wurde chemische

Zitronensäure gewählt. Die Eier wurden für 1,5 h in 25-prozentiger Zitronensäure gelagert. Das Ergebnis kann in Abbildung 4 betrachtet werden.



Abbildung 4: Braune Bruteier oben) unbehandelt und unten) durch Zitronensäurebehandlung komplett entfärbte Eier.

Die Versuche bezüglich der Komplettentfärbung haben gezeigt, dass ein homogenes Entfärben der Eier möglich ist. Die Entfärbung funktioniert derart gut, dass es für einen Nichtfachmann kaum möglich ist, ein komplett entfärbtes braunes Ei von einem weißen Ei zu unterscheiden. Erst durch Berührung der Eioberfläche wird der Unterschied spürbar, da die entfärbten Eier eine deutlich rauere Oberfläche aufweisen. Außerdem wird durch die Behandlung die Kutikula komplett entfernt, wodurch die gewohnte Oberflächenbeschaffenheit eines Eies verloren geht. Nach der Behandlung wurden die Eier wiederum bis Tag 8 bebrütet und die 8TR bestimmt. Die Ergebnisse sahen wie folgt aus:

- Komplett entfärbt n = 26, **8TR = 58 %**
- Kontrollgruppe n = 12, **8TR = 42 %**

Auch eine komplette Entfärbung der Kalkschale scheint keine negativen Effekte auf die frühe Embryogenese auszuüben. Die generell schlechteren 8TR-Werte können durch die Qualität der Bruteier begründet werden, da auch die Kontrollgruppe einen überdurchschnittlich schlechten Wert aufweisen.

Mit Hilfe der hier durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass das Entfärben von braunschaligen Bruteiern mit Hilfe von Säuren offensichtlich keinen negativen Effekt auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen bis einschließlich Tag 8 der Bebrütung hat. Fasst man alle bisherigen Ergebnisse zusammen, kommt man zu folgendem Ergebnis:

Tabelle 1: Zusammenfassung der Versuche bezüglich Säureentfärbung

Gruppe	Anzahl [abs]	entwickelt Tag 8 [abs]	8TR [%]
Entfärbt durch Säureeinwirkung	95	81	85 %
Kontrolle	63	46	75 %

Auch wenn man alle Ergebnisse zusammenfasst, ist zu erkennen, dass es bezüglich 8TR keinen negativen Effekt gibt. Es deutet sich vielmehr an, dass die behandelten Eier möglicherweise eine etwas bessere 8TR aufweisen. So ist denkbar, dass durch die Säurebehandlung die Eier eine gewisse Oberflächensterilisierung erreicht werden kann und somit die Gefahr der Infizierung mit auf der Eioberfläche befindlichen Keimen minimiert wird. Dieser Effekt sollte

auf jeden Fall an größeren und damit aussagekräftigeren Probenzahlen weiter untersucht werden.

2.2 Mechanische Methode - Sandstrahlen

Die mechanische Entfärbung wurde mit Hilfe eines Sandstrahlgerätes durchgeführt. Beim sogenannten Sandstrahlen werden Sandpartikel, Glaskugeln oder Glasbruch auf sehr hohe Geschwindigkeiten beschleunigt und auf die zu behandelnde Oberfläche geschossen. Durch den Energieeintrag der kleinen Partikel werden Bestandteile der behandelten Oberfläche mechanisch abgelöst und entfernt. Mit Hilfe dieser Technik wird die äußere Schicht der Eischale von braunschalenigen Eiern entfernt. Die braunen Pigmente werden somit von der Eischale entfernt, da diese sich in der äußeren Schicht der Eischale befinden. Für die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Versuche wurden braunschalige Eier sandgestrahlt. Es wurde Glasbruch mit einer Partikelgröße von 50 µm bis 200 µm eingesetzt. Abbildung 5 zeigt braunschalige Eier nach der Sandstrahlbehandlung.

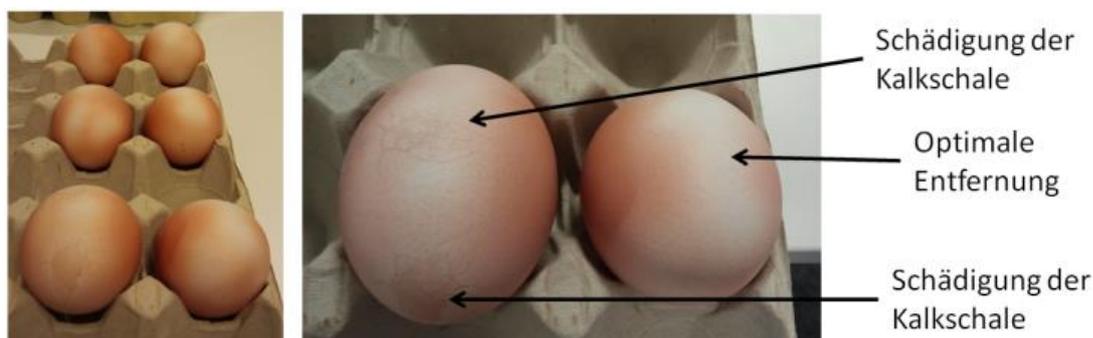


Abbildung 5: Links sind sandgestrahlte braune Bruteier dargestellt. Die Eier wurden entlang des langen Äquators entfärbt. Rechts wird eine Detailansicht der behandelten Eier gezeigt. Es kann erkannt werden, dass es prinzipiell möglich ist, braunschalige Bruteier mittels Sandstrahlung zu entfärben.

Die mechanische Entfärbung mittels Sandstrahltechnik ist prinzipiell möglich. Die Vorteile dieser Methode, bezogen auf eine nass-chemische Variante, bestehen lediglich in der Geschwindigkeit, mit der die Behandlung durchgeführt werden kann und der Tatsache, dass keine chemischen Substanzen zum Einsatz kommen. Seitlich kann eine Sandstrahlentfernung innerhalb weniger Sekunden durchgeführt werden.

Die Nachteile der mechanischen Behandlung überwiegen allerdings im Vergleich zu einer nass-chemischen Entfärbung. Die Behandlung erfolgt sehr inhomogen, sodass die äußere Schicht der Kalkschale in sehr unterschiedlichem Maße abgetragen wird. Diese Inhomogenität kann dazu führen, dass in einigen Bereichen die Kalkschale fast oder komplett abgetragen wird. In Abbildung 5 rechts kann dies sehr gut erkannt werden. In den markierten geschädigten Bereichen ist die Kalkschale nahezu komplett entfernt. Man erkennt das sehr gut durch die dunkle Verfärbung der Eischale. Diese Bereiche bieten nicht länger einen ausreichenden Schutz des Eiinneren vor Keimen. Die mechanische Entfärbung geht mit einer mechanischen Belastung der Kalkschale einher. Durch diese mechanische Belastung werden in der Kalkschale Mikrorisse induziert. Diese Mikrorisse können ebenfalls in Abbildung 5 rechts erkannt werden. Diese Mikrorisse stellen ebenfalls Eindringpunkte für Keime dar und sind dadurch nicht förderlich für einen zufriedenstellenden Bruterfolg.

Weitere Nachteile dieser Methode sind die hohen Kosten der Behandlung. Das Strahlsubstrat muss regelmäßig getaucht werden. Durch die Wiederverwendung der Strahlpartikel ist die Gefahr der Querkontamination der Eier immens hoch. Alternativ könnten die Strahlpartikel nach jedem Durchgang desinfiziert werden, was jedoch mit weiteren, nicht unerheblichen Kosten verbunden ist.

Die Eignung der mechanischen Entfärbung mittels Sandstrahltechnik wurde wiederum mit Hilfe von Brutversuchen, welche am Tag 8 abgebrochen wurden, untersucht. Hierfür wurden 17 braunschalige Eier sandgestrahlt und für 8 Tage im Inkubator platziert. Eine Kontrollgruppe wurde zeitgleich in den Inkubator eingelegt. Nach 8 Tagen wurden die Eier geöffnet und begutachtet. Die 8TR sah dabei im Detail wie folgt aus:

- Sandgestrahlte Gruppe n = 17, **8TR = 41 %**
- Kontrollgruppe n = 13, **8TR = 46 %**

Die Differenz der beiden Gruppen ist zwar offensichtlich nicht so schlecht, aber aufgrund der starken Beschädigungen der Kalkschale durch das Sandstrahlen ist mit einer größeren Differenz zu rechnen, wenn die Brutversuche bis zum Schlupftermin fortgesetzt werden. Weiterhin konnte durch diese Brutversuche festgestellt werden, dass durch die teils sehr dünne bzw. teilweise komplett abgetragene Kalkschale und durch die Mikrorisse die Verdunstung von Wasser aus dem Eiinneren deutlich höher ist als bei intakter Kalkschale. Dies wurde durch das offensichtlich geringere Gewicht der sandgestrahlten Eier nach 8 Tagen im Inkubator deutlich.

Zusammengefasst kann diese Methode nicht für einen großskaligen industriellen Einsatz favorisiert werden.

2.3 Opto-mechanische Entfärbung – Laserstrahlung

Ein weiterer Ansatz für das Entfärben ist der Einsatz von Laserstrahlung. Die Laserstrahlung wird auf die Eioberfläche fokussiert. Durch die eingebrachte Leistung wird die äußere Schicht der Kalkschale, die auch den braunen Farbstoff beinhaltet, abgetragen. Um diese Methode zu testen, wurde ein 1 x 1 cm großes Gebiet mit Hilfe der Laserstrahlung entfärbt. Abbildung 6 zeigt ein einseitig entfärbtes Ei.

Zum Einsatz kam ein 200 W-CO₂-Laser. Für die Behandlung wurden folgende Parameter gewählt:

- Behandeltes Areal 10 x 10 mm²
- Leistung 15 W
- mäanderförmiges Raster (180 µm Schrittweite)
- Zeitbedarf: 30 s pro Ei

Für die Untersuchung des Einflusses der Behandlung auf die Entwicklungsfähigkeit wurden zwei Gruppen untersucht. Eine Gruppe wurde von einer Seite behandelt und eine zweite Gruppe von beiden Seiten. Nach der Behandlung wurden die behandelten Eier und eine adäquate Kontrollgruppe bis zum Tag 8 bebrütet und anschließend geöffnet, um den Entwicklungszustand zu prüfen.



Abbildung 6: Dieses Bild zeigt ein mit Hilfe von Laserstrahlung entfärbtes Ei. Das $10 \times 10 \text{ mm}^2$ große behandelte Gebiet kann deutlich erkannt werden. Weiterhin ist der mäanderförmige Bearbeitungsweg sehr deutlich zu erkennen.

Die Entwicklungsfähigkeit der so behandelten Eier scheint nicht negativ beeinflusst zu sein. Die Entwicklungsrate nach 8 Tagen Bebrütung sieht im Detail wie folgt aus:

- Kontrolle n = 21, **8TR = 76 %**
- Gruppe einseitig behandelt n = 20, **8TR = 70 %**
- Gruppe zweiseitig behandelt n = 21, **8TR = 81 %**

Obwohl die Entfärbung per Lasertechnik offensichtlich zu guten Ergebnissen bezüglich der Entfernung der braunen Farbbestandteile und der Entwicklungsfähigkeit der Embryonen führt, ist sie eher ungeeignet, da eine verbesserte Detektion der Keimscheibe nicht möglich ist. Abbildung 7 zeigt sehr anschaulich das Problem. Durch den Laservorgang wird die Oberfläche sehr rau. Dies führt dazu, dass sich das für die Detektion genutzte Licht optisch an der rauen Oberfläche so bricht, dass es zu einem Verdunkeln des behandelten Areals kommt. Dies kann in Abbildung 7 sehr gut durch das dunkle Erscheinen des behandelten Areals erkannt werden.



Abbildung 7: Diese Abbildung zeigt ein mittels Laserstrahlung entfärbtes braunes Ei. Es kann sehr gut erkannt werden, dass durch diese Art des Entfärbens keine verbesserte Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch möglich ist.

Aufgrund der Ergebnisse ist es nicht vorstellbar, dass mittels einer derartigen Laserbehandlung die Grundlage für eine lichtgestützte Lokalisation der Keimscheibe ermöglicht werden kann.

Zusätzlich zu den im Antrag genannten Arbeiten wurden Schlupfversuche durchgeführt. Die Schlupfversuche erfolgten in Kooperation mit der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven. Für die Schlupfversuche wurden 150 braunschalige Bruteier nass-chemisch entfärbt. Für das Entfärben wurde Zitronensäure nach dem bereits dargestellten Protokoll eingesetzt. Es wurde ca. 50 % der Schalenoberfläche entfärbt. Eine gleichgroße Kontrollgruppe wurde parallel zu den behandelten Eiern im Brutschrank platziert und bis zum Schlupf bebrütet.

Die Ergebnisse sahen dabei im Detail wie folgt aus:

Kontrollgruppe: n = 148, Schlupfrate 75 %

Behandelte Gruppe: n = 147, Schlupfrate 80 %

Es ist somit offensichtlich, dass die nass-chemische Entfärbung keinen negativen Effekt auf die Schlupfrate hat.

2.4 Zusammenfassung der Entfärbemethoden

Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass nass-chemische, mechanische und auch opto-mechanische Methoden in der Lage sind, die Kalkschale von braunschaligen Eiern so zu behandeln, dass die braune Farbe komplett entfernt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass keine dieser Methoden einen negativen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit des Embryos bis zum Tag 8 der Bebrütung hat. Für die Entfärbung mittels Zitronensäure wurde die normale Entwicklungsfähigkeit der Embryonen in behandelten Eiern durch Schlupfversuche bestätigt. Die Entfärbung mittels Zitronensäure hatte keinen negativen Einfluss auf die Schlupfrate.

Inwieweit die nass-chemische Entfärbung braunschaliger Eier eine Detektion der Keimscheibe durch die entfärbten Bereiche der Kalkschale hindurch erlaubt, wird nachfolgend dargestellt. Abbildung 8 zeigt exemplarisch zwei Beispiele der Detektierbarkeit der Keimscheibe im intakten Ei. Es sind zwei einseitig entfärbte braune Bruteier gezeigt. Die dargestellten Eier wurden mit Zitronensäure als ätzende Substanz entfärbt. Die Durchleuchtung erfolgte mit high-Power LEDs im grünen Wellenlängenbereich. Das Licht wurde durch die entfärbte Seite eingekoppelt und das Bild durch die braune Seite des Eies aufgenommen. Die Keimscheiben können klar erkannt werden. Eine automatische Detektion bzw. Segmentierung der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch ist damit möglich. Die Keimscheiben sind in der Abbildung mit blauen Kreisen gekennzeichnet.

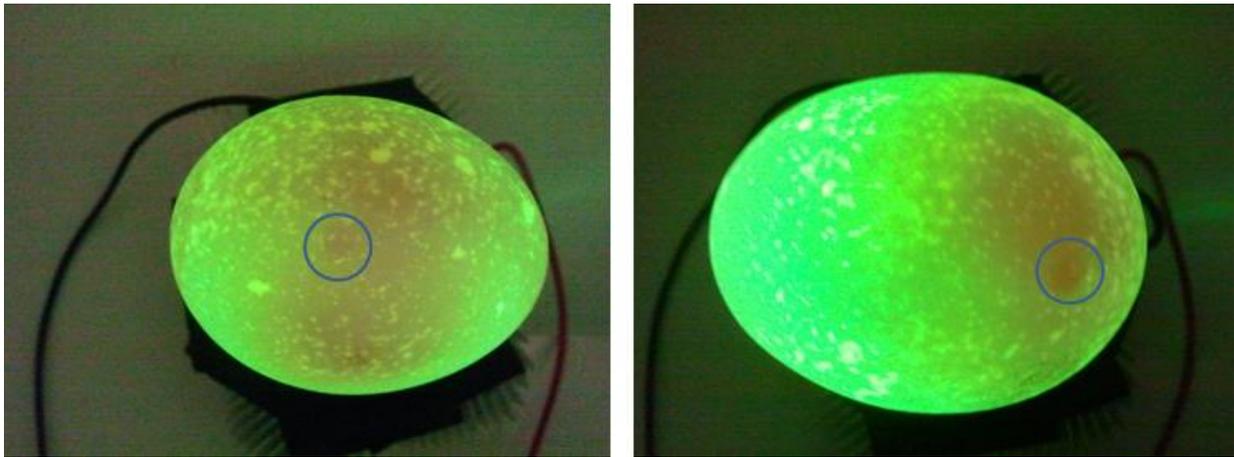


Abbildung 8: Zwei exemplarische Beispiele für einseitig entfärbte braunschalige Eier. Die Entfärbung erfolgte mit Zitronensäure. Die Keimscheiben (blaue Kreise) sind eindeutig durch die Kalkschale hindurch sichtbar.

Die mechanische Entfärbung und die opto-mechanische Entfärbung sind nicht geeignet, um eine Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch durchzuführen. Die Ursachen dafür liegen zum einen in der Änderung der optischen Eigenschaften der Kalkschale (Laserbehandlung) sowie in der generellen Ungeeignetheit der Methode (Sandstrahlen).

3 Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch

Dass die Keimscheibe mittels Licht bestimmter Wellenlängen durch die Kalkschale hindurch detektiert werden kann, konnte bereits im Rahmen vorangegangener Forschungsarbeiten belegt werden. Abbildung 9 zeigt ein Ei, welches mit Hilfe von lichtstarken blauen Leuchtdioden geschiert wird.

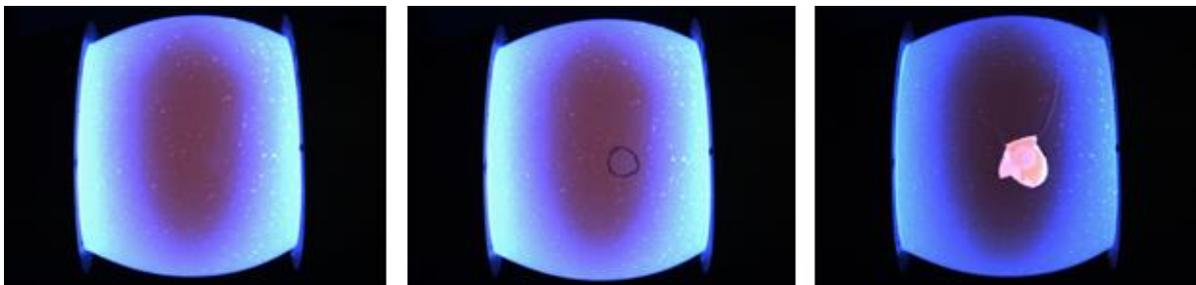


Abbildung 9: Diese Bildersequenz zeigt ein mit Hilfe von blauem Licht durchleuchtetes Ei. Links kann die Keimscheibe erahnt werden. Im mittleren Bild wurde sie mit Hilfe des menschlichen Auges detektiert und markiert. Rechts ist das Ei geöffnet dargestellt, die Keimscheibe ist sichtbar. (Bildmaterial von Prof. Koch, Universität Dresden, Medizinische Fakultät, Klinisches Sensoring und Monitoring)

Im Zuge dieses Projektes wurde ein Software-Algorithmus entwickelt, welcher eine automatisierte Detektion der Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch ermöglicht.

3.1 Algorithmus zur Positionsbestimmung der Keimscheibe im ungeöffneten Ei

Den Ausgangspunkt bildet ein befruchtetes, angebrütetes, weißes Ei, welches mittels einer sehr hellen, grünen Lichtquelle durchleuchtet wird. Im Rahmen des Projektes wurde dafür eine Rebel Tri-Star LED von LUXEON® STAR mit einer mittleren Wellenlänge von 530 nm und einer Helligkeit von 417 lm bei 700 mA verwendet. Das Ei wird in horizontaler Lage über der

Lichtquelle platziert. Darüber befindet sich eine Farbkamera, die ein RGB-Farbbild, wie in Abbildung 10 dargestellt, aufnimmt. Im Aufbau wird die 2 Megapixel Kamera SMX10MX von Sumix in Kombination mit einem Objektiv von Edmund Optics (Brennweite: 17,5 mm; Blende: 2,5 mm) verwendet. Während der Bildaufnahme ist der Einfluss von Fremdlichtquellen (z. B. Raumbelichtung, Bildschirmbeleuchtung) zu vermeiden, da dies zu Artefakten führen und die nachfolgende Bildverarbeitung beeinträchtigen kann.

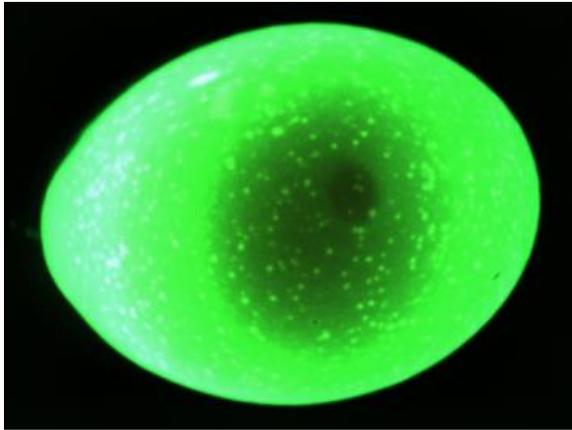


Abbildung 10: Aufgenommenes RGB-Bild, welches den Ausgangspunkt für den nachfolgenden Bildverarbeitungsalgorithmus bildet.

Zerlegt man das RGB-Bild in die einzelnen Farbkanäle Rot, Grün und Blau, lassen sich bereits einige Unterschiede erkennen, woraus sich die Ansätze für die weitere Verarbeitung ergeben. Im Rotkanal (Abbildung 11 links) zeigt sich kaum ein Helligkeitsunterschied zwischen Eigelb und Eiweiß, da beide Komponenten rotes Licht gleichermaßen durchlassen. Grünes Licht hingegen wird vom gelben Eidotter stark absorbiert, während es das Eiweiß passieren kann. Hierdurch entsteht ein hoher Kontrast im Grünkanal (Abbildung 11 mitte).

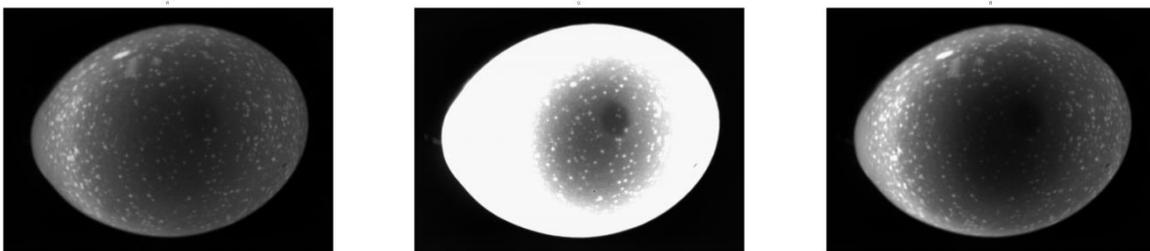


Abbildung 11: Rot-, Grün- und Blaukanal (von links nach rechts)

Schritt 1: Segmentierung des Eies (ROI)

Aufgrund der einheitlichen Helligkeit im Rotkanal eignet sich dieser gut, um das Ei als Objekt vom Hintergrund zu trennen. Dies erfolgt durch eine Schwellwertsegmentierung und morphologische Operationen. Bei der Schwellwertsegmentierung werden alle Bildpunkte im Rotkanal, deren Wert über einem vorgegebenen Schwellwert liegt, dem Objekt Ei zugeordnet, alle anderen dem Hintergrund. Da die Helligkeit von Ei zu Ei variiert, eignet sich kein statischer Schwellwert. Stattdessen wird individuell für jedes Ei ein Schwellwert ermittelt.

Hierfür wird zunächst das Maximum im Rotkanal R_{\max} bestimmt. Über einen vorgegebenen Faktor T (zwischen 0 und 1) berechnet sich der Schwellwert S wie folgt:

$$S = T * R_{\max}$$

Ein geeigneter Faktor kann anhand von bestehendem Bildmaterial empirisch ermittelt werden.

Nach der Segmentierung (Abbildung 12 links) trägt ein Bildpunkt, dessen Helligkeitswert R den Schwellwert S überschreitet und damit dem Objekt Ei zugeordnet wird, den Wert 1 (weiß), ein Bildpunkt des Hintergrundes den Wert 0 (schwarz). Es kann vorkommen, dass Bildpunkte in der Mitte des Eies (speziell im Bereich der Keimscheibe) zu dunkel sind und damit zunächst als Hintergrund eingestuft werden. Aus diesem Grund reicht eine Schwellwertsegmentierung allein nicht aus. Eine morphologische Operation zum Schließen der Löcher im Objekt muss nachgestellt werden. Abbildung 12 rechts zeigt das Ergebnis. Diese Region Of Interest (ROI) wird für die nachfolgenden Schritte benötigt.



Abbildung 12: links: Rotkanal nach der Schwellwertsegmentierung mit dem Schwellwert S; rechts: Ergebnisbild aus Schritt 1 (ROI) - Rotkanal nach der Schwellwertsegmentierung und morphologischer Operation zum Schließen der Löcher im Objekt

Schritt 2: Segmentierung der Keimscheibe

Ausgangspunkt für Schritt 2 bildet der Grünkanal, da sich hier der Eidotter am deutlichsten vom Eiklar abhebt. Um auch hier anhand des Maximums einen Schwellwert berechnen zu können, wird der Grünkanal zunächst invertiert (Abbildung 13 links). Da nun die ursprünglich dunklen Bildpunkte hell erscheinen, zeigt sich nun auch der Hintergrund als helle Fläche. Aus diesem Grund wird dieses Bild mit der ROI multipliziert (Ergebnis in Abbildung 13 mitte). Erkennbar ist auch die porige Struktur der Schale. Um einen negativen Einfluss bei der Segmentierung zu vermeiden, wird ein Medianfilter angewendet. Die optimale Größe der Filtermaske hängt von der Größe der Poren ab. Eine durchschnittlich gut geeignete Größe lässt sich empirisch ermitteln. Das Resultat ist in Abbildung 13 rechts zu erkennen.

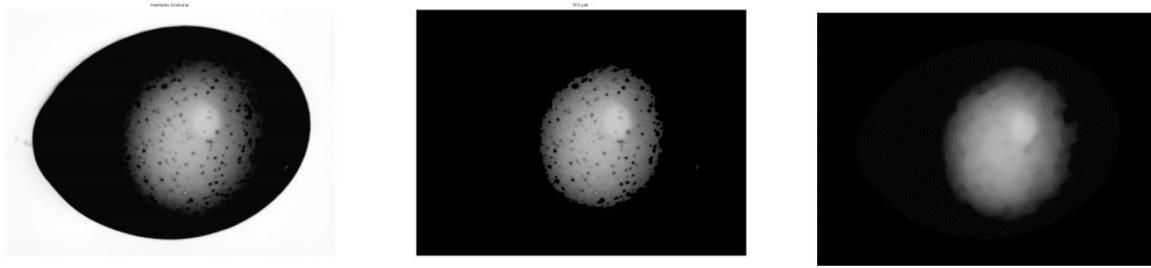


Abbildung 13: links: invertierter Grünkanal; mitte: invertierter Grünkanal multipliziert mit der ROI (Eidotter und Keimscheibe sind erkennbar); rechts: nach angewandter Medianfilterung

Auf dieses Bild wird dann das Schwellwertverfahren aus Schritt 1 angewendet, wodurch man alle Objekte segmentiert, die die Keimscheibe darstellen (Abbildung 14 links). In Abhängigkeit von der Größe und der Kreisähnlichkeit der segmentierten Objekte, wird dann entschieden, welches Objekt die Eigenschaften der Keimscheibe besitzt. Hierbei ist die Kreisähnlichkeit der zuverlässigere Parameter, da die Größe stark variieren kann. Die Kreisähnlichkeit trifft jedoch nicht zu, wenn die Keimscheibe sich seitlich am Dotter befindet. Im letzten Schritt wird dann noch der Masseschwerpunkt bestimmt.

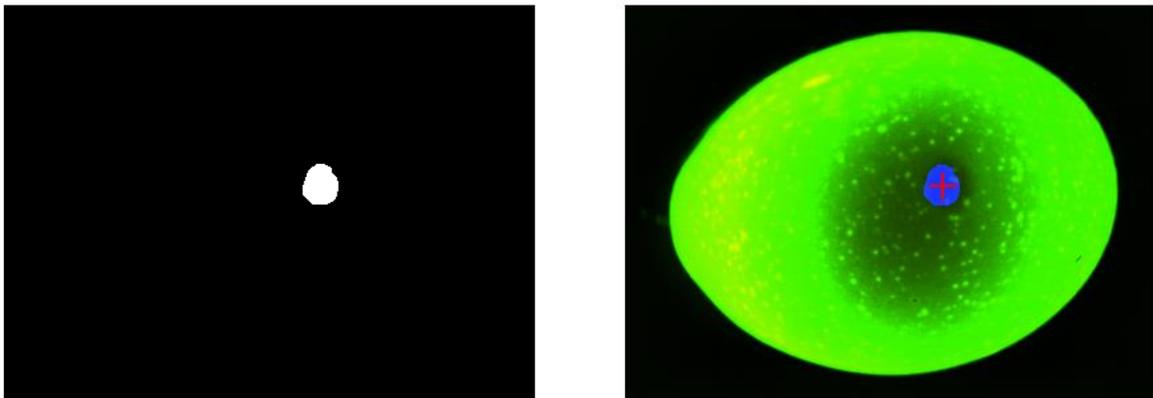


Abbildung 14: links: Resultat der Schwellwertsegmentierung - Objekte, die als Keimscheibe in Frage kommen; rechts: identifizierte Keimscheibe (blau) und der berechnete Schwerpunkt (rot)

Sonderfälle:

Keine Keimscheibe sichtbar: der gesamte Dotter wird segmentiert -> Größe und Kreisähnlichkeit liegen nicht in der zu erwartenden Größenordnung.

Keimscheibe liegt seitlich am Dotter: evtl. wird die Keimscheibe richtig segmentiert (wenn sie im Bild dunkler ist als der angrenzende Dotter), doch die Kreisähnlichkeit ist nicht vorhanden.

Evtl. wird der gesamte Dotter segmentiert, da die Keimscheibe zu weit seitlich liegt und durch die Lichtquelle überstrahlt wird (sie ist nicht dunkler als der angrenzende Dotter).

3.2 Realisierung eines praxistauglichen Versuchsaufbaues

Für die Realisierung eines praxistauglichen Öffnens von Bruteiern über der Keimscheibe wurde ein Versuchsaufbau realisiert. Dieser Versuchsaufbau vereinigt die Lokalisierung der

Keimscheibe durch die Kalkschale und das Laseröffnen. Der Versuchsaufbau ist sowohl für weißschalige als auch für braunschalige Bruteier geeignet. Der Versuchsaufbau beinhaltet alle Komponenten, welche notwendig sind, um folgende Arbeitsschritte durchzuführen:

1. Lagerung des Eies in horizontaler Position in der Anlage
2. Durchleuchten/Schieren der Eier mit high-Power Lichtquellen
3. Erfassen des Bildes mittels Videokamera
4. Bestimmung der Koordinaten der Keimscheibe
5. Übergabe der Koordinaten an den Laser
6. Laserschneiden zum Öffnen des Eies

Der Versuchsaufbau ist in folgender Abbildung 15 gezeigt:

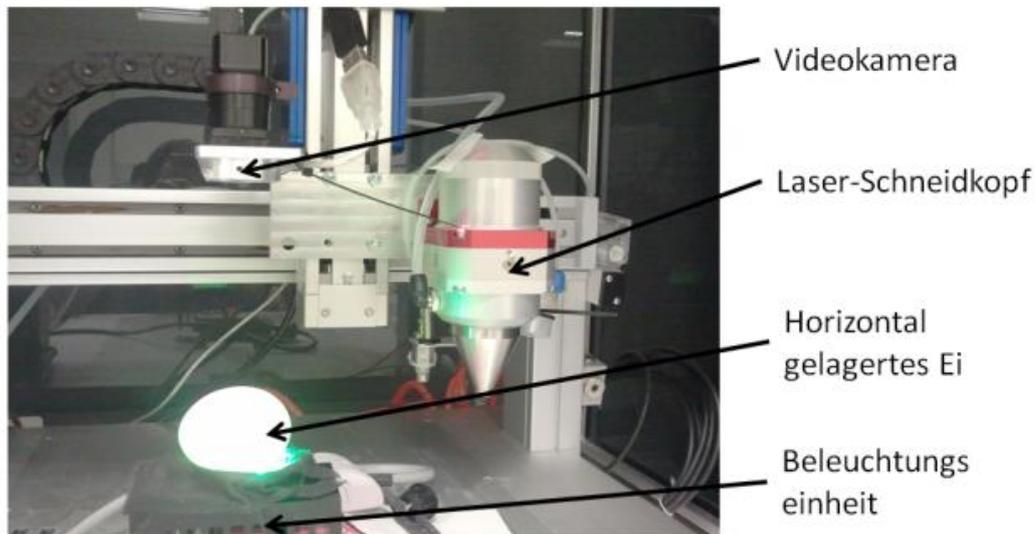


Abbildung 15: Versuchsaufbau zum gezielten Öffnen von Bruteiern. Das horizontal gelagerte Ei wird mittels high-Power Beleuchtungseinheit durchleuchtet. Das dabei entstehende Bild wird mit Hilfe einer Videokamera erfasst und digitalisiert. Das auf diese Weise erfasste Bild wird genutzt, um die x,y-Koordinaten der Keimscheibenposition zu bestimmen. Die Bestimmung der Koordinaten erfolgt durch die Kalkschale hindurch, ohne diese zu öffnen. Die benötigte z-Koordinate, das heißt die Höhe des Eies, wird mit Hilfe eines 2D-Lasertriangulationssensor bestimmt. Die derart bestimmten Koordinaten werden genutzt, um den Laserschneidkopf zu platzieren und gezielt ein Loch über der Keimscheibe zu induzieren.

Im ersten Schritt wird ein Triangulationssensor von μ -Epsilon genutzt, um die Position der Eier und deren Höhe bzw. die Entfernung zum Laserkopf zu bestimmen. Dies ist notwendig, um den Fokus des Laserstrahles, durch Verfahren des Laserkopfes auf die korrekte Höhe, auf die Eischale zu richten. Auch für die Bildaufnahme wird die gemessene Position und Entfernung genutzt, um die Kamera über das Ei zu fahren und ein scharfes Bild zu erhalten. Die Lichtquelle zum Durchleuchten der Eier wird angeschaltet und sobald sich die Kamera in Ruhe befindet, wird ein Bild aufgenommen und an den in 1. erläuterten Bildverarbeitungsalgorithmus übergeben. Nach erfolgter Verarbeitung liefert der Algorithmus bei Detektionserfolg den Mittelpunkt der Keimscheibe. Die Koordinaten im Bild werden dann aus dem Kamera-

koordinatensystem in das Roboterkoordinatensystem umgerechnet, so dass der Roboter die errechnete Position anfahren kann. Mit einem vorgegebenen Radius kann zudem der Bahnverlauf für den Roboter ermittelt werden, der benötigt wird, um die gewünschte Öffnung in die Eischale zu bringen. Liegen alle notwendigen Daten vor, beginnt der Roboter seine Bahn mehrmals abzufahren.

Befindet sich der Roboter in Bewegung, so kann auch der Laserstrahl angeschaltet werden, um die Eischale zu vaporisieren. Das Zuschalten des Lasers muss in der Bewegung erfolgen, da sich sonst der Strahl zu lange am Startpunkt befindet und damit die unter der Schale liegenden Zellen zerstören kann. Ziel ist jedoch, die Eischale zu durchstoßen, ohne die darunter befindliche Keimscheibe, durch einen zu großen Wärmeeintrag, zu schädigen.

Ist die Kalkschale aufgelöst, so kann der Deckel mit Hilfe eines Saugkopfes abgehoben werden.

Öffnen eines Hühnereies über der Keimscheibe

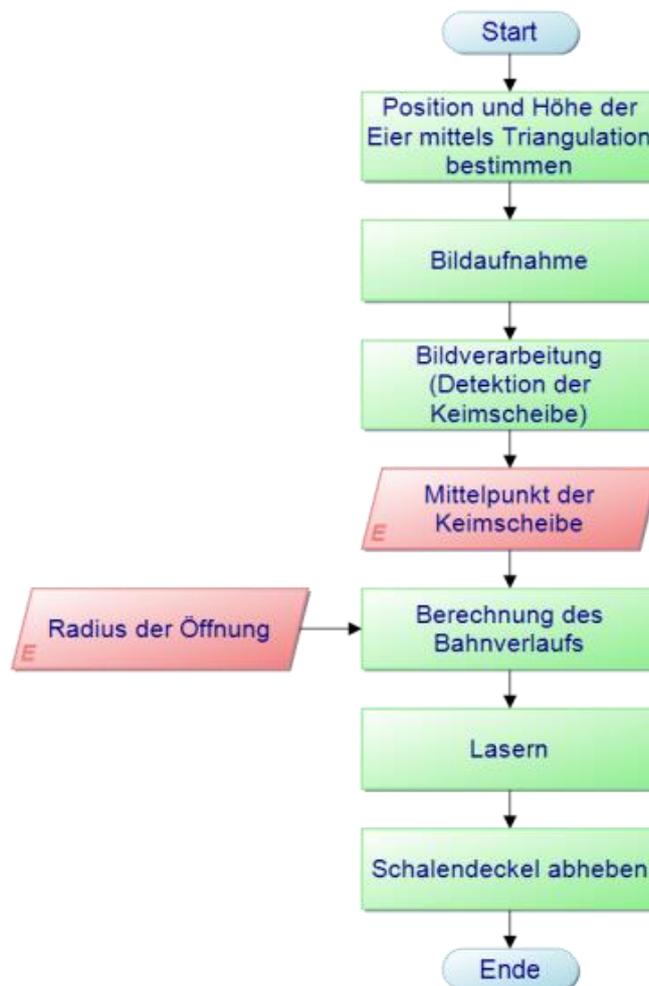


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Öffnungsprozesses

Brutversuche

Im Zuge des Projektes wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, wobei Öffnung in der Kalkschale nach der Lokalisierung der Keimscheibe erzeugt wurde. Durch die Lokalisierung der Keimscheibe vor dem Öffnungsprozess konnte sichergestellt werden, dass sich das Loch direkt über der Keimscheibe befindet und somit ein ungehinderter Zugang zur Keimscheibe gewährleistet ist.

Mit Hilfe dieses Versuches sollte untersucht werden, ob der Laservorgang direkt über der Keimscheibe eventuell keinen negativen Effekt auf die Entwicklungsfähigkeit hat. Für diesen Versuch wurden die Eier angebrütet. Die Anbrütungsphase ist notwendig, da sonst die Detektierbarkeit durch die Kalkschale hindurch nicht mit ausreichender Genauigkeit notwendig ist. Für die Versuche wurden weißschalige Eier gewählt. Nach der Anbrütungsphase wurde die Keimscheibe durch die Kalkschale hindurch detektiert und ihre Position markiert. An der markierten Stelle wurde dann ein kreisrundes Loch mit Hilfe des Lasers appliziert. Nach der Behandlung wurden die Eier verschlossen und bis zum Tag 8 bebrütet. Anschließend wurden die Eier geöffnet und der Entwicklungszustand der Embryonen geprüft. Eine unbehandelte Kontrollgruppe wurde ebenfalls im Inkubator platziert.

Die Ergebnisse nach 8 Tagen sahen im Detail wie folgt aus:

- Kontrollgruppe n = 89, **8TR = 88 %**
- Behandelte Gruppe n = 105, **8TR = 62 %**

In einem zweiten ähnlichen Versuch wurden braunschalige Eier genutzt. Die Eier wurden entfärbt und dann angebrütet. Dann wurde die Keimscheibe detektiert und das Loch mittels Lasertechnik unmittelbar über der Keimscheibe platziert. Anschließend wurden die Eier wieder verschlossen und bis zum Tag 8 bebrütet und dann geöffnet. Die Überlebensrate bis Tag 8 sah wie folgt aus:

- Kontrollgruppe n = 90, **8TR = 92 %**
- Behandelte Gruppe n = 101, **8TR = 51 %**

Im Rahmen des Projektes konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit der hier beschriebenen Technik ein Loch direkt über der Keimscheibe mit Hilfe von Lasertechnik zu applizieren. Jedoch musste festgestellt werden, dass die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen bzw. die 8TR drastisch sinkt. In beiden Versuchen zeigte sich eine deutlich schlechtere 8TR bei den mit Hilfe von Lasertechnik geöffneten Eiern. Die Differenzen lagen bei 26 % und 39 %. Da dies nur die 8TR ist, muss man davon ausgehen, dass die Brutverluste bis zum Schlupf noch deutlich größer gewesen wären. Es stellt sich nun die Frage, was der Grund für die schlechten 8TR ist. Am Entfärben kann es nicht liegen, da es sowohl die weißen als auch die entfärbten braunen Eier betrifft. Weiterhin sprechen die Ergebnisse des großskaligen Schlupfversuches dagegen. Es kann demnach nur durch den Laserprozess direkt über der Keimscheibe oder durch den Öffnungsprozess selbst begründet werden. Dies Phänomen sollte weiterführend untersucht werden.

4 Entnahme von Blastodermzellen

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein bestehender Versuchsaufbau so modifiziert, dass eine manuelle Entnahme von Blastodermzellen möglich ist. Manuell heißt hier, dass die benötigte Kanüle mit Hilfe von Schrittmotoren in das Zielgebiet geführt wird. Die Steuerung der Schrittmotoren erfolgt noch nicht automatisch, sondern über Tasten auf dem Computer-Keyboard. Die automatische Platzierung der Kanüle in der Keimscheibe ist noch in Bearbeitung. Abbildung 17 zeigt diesen Versuchsaufbau ausschnittsweise. Der Versuchsaufbau beinhaltet wiederum eine Videokamera, um einerseits die Keimscheibe zu erfassen und andererseits die Position der Kanüle zu kontrollieren.

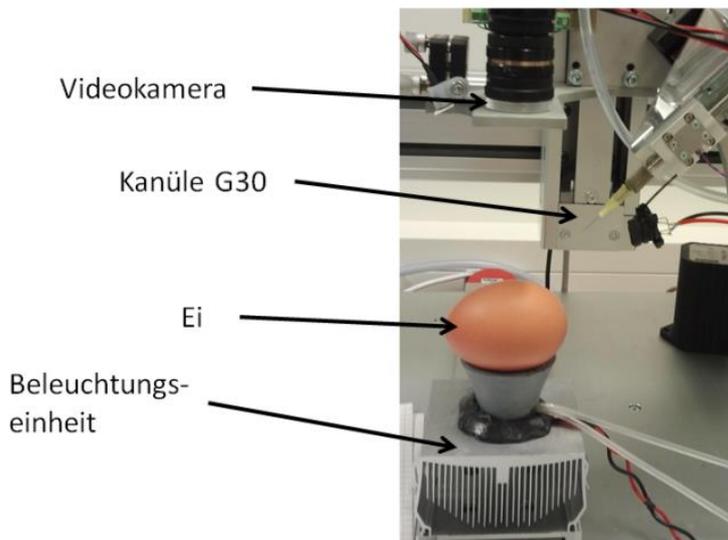


Abbildung 17: Versuchsaufbau zur Entnahme von Blastodermzellen

Es wurden bereits erste Versuche der manuellen Platzierung der Kanüle mit anschließender Probenentnahme durchgeführt. In dem durchgeführten Versuch wurde die Kanüle in die Keimscheibe eingeführt. Es wurde ein leichter Unterdruck an die Kanüle angelegt und etwas Keimscheibenmaterial in die Kanüle eingezogen. Es wurde eine G30 Standard Einwegkanüle eingesetzt. Die so gewonnenen Proben wurden auf einem Objektträger platziert und mikroskopisch untersucht. Für die mikroskopische Untersuchung wurden 54 Proben untersucht. In den Proben wurden die Zellkerne mit Hilfe von DAPI gefärbt, anschließend wurden die Zellen in jeder Probe gezählt. Es kam dabei zu folgendem Ergebnis:

- a) 45 Proben enthielten keine zufriedenstellende Anzahl an Zellen, das heißt, es waren weniger als 20 Zellen in den Proben vorhanden.
- b) 5 Proben enthielten ein oder mehrere Zellcluster (20 - 50 Zellen), wobei ein Cluster nicht genügend Zellmaterial für eine Untersuchung enthielt.
- c) 4 Proben enthielten ausreichend Zellen, um eine Geschlechtsbestimmung anhand der Probe durchzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Entnahme einen negativen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen hat. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Keimscheibe lediglich punktiert, das heißt die Kanüle wurde in die Keimscheibe eingeführt und ohne Probenentnahme wieder entfernt. Für diese Studie wurden 15 unbebrütete Eier punktiert, verschlossen und im Brutschrank platziert. Eine gleichgroße Kontrollgruppe, ohne jegliche Behandlung, wurde ebenfalls im Brutschrank platziert. Nach 6 Tagen wurde die Entwicklung der Embryonen kontrolliert. Es wurde dabei festgestellt, dass sich in nur 2 von 15 punktierten Eiern ein Embryo entwickelt hat. Das entspricht einer Quote von 13 %. Die Kontrollgruppe wies eine Quote von 80 % auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Quote mit Probenentnahme nochmal schlechter wird.

Da sich unter 2.2 ein Trend andeutet, dass das bloße Öffnen und Verschließen ohne Manipulation der Keimscheibe einen negativen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen hat, wurde ein Versuch durchgeführt, um dies zu testen. In diesem Versuch wurden folgende Gruppen definiert:

1. Kontrolle (keine Behandlung, kein Öffnen, kein Verschließen)
2. Öffnen der Eier (17 h angebrütet), Verschließen der Eier
3. Öffnen der Eier (17 h angebrütet), Punktion der Keimscheibe, Verschließen der Eier

Die Eier wurden nach der Behandlung bis Tag 8 bebrütet und anschließend geschickt, um zu überprüfen, ob sich ein Embryo im Ei entwickelt hat. Die Ergebnisse sahen wie folgt aus:

- Kontrollgruppe n = 31, **STR = 94 %**
- Nur Öffnen und Verschließen n = 25, **STR = 48 %**
- Öffnen, Punktion der Keimscheibe, Verschließen, n = 30, **STR = 20 %**

Die Ergebnisse dieses Versuches deuten darauf hin, dass bereits das bloße Öffnen der Eier in diesem Stadium der Entwicklung erhebliche negative Auswirkungen auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen hat. In nur 48 % der geöffneten und wiederverschlossenen Eier konnte sich ein Embryo entwickeln bzw. hat der Embryo bis zum Tag 8 überlebt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (94 %) beträgt die Differenz 46 %. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Schlupfrate am Tag 21 nochmals deutlich schlechter ausfällt.

Betrachtet man die Gruppe mit Punktion der Keimscheibe, kann erkannt werden, dass auch die Punktion an sich nochmals einen negativen Effekt auf die Entwicklungsfähigkeit hat. Die Entwicklungsfähigkeit bis Tag 8 betrug in diesem Versuch nur noch 20 %.

Auf Grundlage dieser Daten sollte weiterführend untersucht werden, inwieweit es überhaupt möglich ist, ein Ei in dieser Entwicklungsphase zu öffnen. Auch wenn dieser Versuch statistisch nicht belastbar ist, ist der Trend doch deutlich zu sehen. 20 % Überlebensrate bis Tag 8 sind keinesfalls praxistauglich.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen des Projektes konnte ein Protokoll entwickelt werden, welches es prinzipiell ermöglicht, bei braunschaligen Eiern die Keimscheibe durch die intakte Kalkschale hindurch zu detektieren, gezielt ein Loch über der Keimscheibe in die Kalkschale mittels Lasertechnik zu applizieren und die Keimscheibe anschließend zu punktieren bzw. eine minimale Anzahl von Blastodermzellen zu entnehmen, um eine Geschlechtsbestimmung durchführen zu können.

Für einen praxisreifen Einsatz muss allerdings noch analysiert werden, worauf die teilweise hohen Brutverluste bei einzelnen Teilschritten zurück zu führen sind und durch welche Modifikationen des Verfahrens auch ökonomisch akzeptable Schlupfraten erzielt werden können. Zumindest das Entfärben der braunschaligen Eier mit nass-chemischen Methoden scheint angesichts der Ergebnisse der Brutversuche bei Lohmann Tierzucht keinen negativen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen zu haben.

Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung für die *in ovo*-Geschlechtsbestimmung im intakten Ei. Diese Methode wird es in Zukunft erlauben, embryonale Strukturen, welche für eine *in ovo*-Geschlechtsbestimmung herangezogen werden sollen, zuverlässig in braunschaligen Eiern zu detektieren. Die zusätzlich durchgeführten Schlupfversuche haben die Befürchtung entkräftet, dass die teilweise Zerstörung der Kutikula zwangsläufig zu nicht schlupffähigen Küken führt. Für das Problem der Detektierbarkeit der Keimscheibe bzw. frühembryonaler

Strukturen in braunschaligen Eiern konnte damit ein praxistauglicher Ansatz entwickelt werden.

Leipzig, 14. Januar 2014

Prof. Dr. Maria-E. Krautwald-Junghanns