

Schlussbericht vom 16.02.2024

zu IGF-Vorhaben Nr. 21705 N

Thema

Entwicklung einer Untersuchungsmethode für die Bestimmung von Mikroplastik-Partikeln in der Herstellung von Papier und Karton mittels Fluoreszenz

Berichtszeitraum

01.03.2021 - 31.08.2023

Forschungsvereinigung

Kuratorium für Forschung und Technik der Zellstoff- und Papierindustrie im VDP e.V.

Forschungseinrichtung(en)

Technische Universität Darmstadt, Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik

Gefördert durch:

Inhalt

1	Motivation und wirtschaftliche Relevanz für KMU	5
2	Stand der Forschung und Entwicklung	6
2.1	Mikroplastik – Begriffsdefinition	6
2.2	Mögliche Ein- und Austräge von Mikroplastik bei der Papierherstellung	6
2.2.1	Altpapier	6
2.2.2	Einsatz von chemischen Additiven bei der Papierherstellung	7
2.2.3	Abrieb	8
2.3	Analysenmethoden	8
2.3.1	Probenahme	8
2.3.2	Probenaufbereitung	9
2.3.3	Chemische Analytik	10
3	Forschungsziele und Lösungsweg	13
4	Versuchsdurchführung und Ergebnisse	14
4.1	Entwicklung des Messsystems	14
4.2	Aufbau des Messsystems	16
4.2.1	Spezifikation der Kamera	17
4.2.2	Objektiv	18
4.2.3	Farbfilter	19
4.2.4	Beleuchtung	20
4.2.5	Kreuztisch zur Probenpositionierung in der horizontalen Ebene	23
4.2.6	Fokus zur Einstellung des Probenabstands in vertikaler Richtung	24
4.3	Software	25
4.3.1	Bildaufnahme	25
4.3.2	Bilddatenverarbeitung	28
4.3.3	Steuerungsprogramm	33
4.4	Bestimmung von Partikelgrößen	35
4.5	Fluoreszenzmethode A – FLIM	39
4.5.1	Signal-Rauschverhältnis der FLIM-Kamera	42

4.5.2	Güte der Kalibrierung.....	43
4.5.3	Korrektur des Dunkelstroms im Rahmen der Background Correction	43
4.5.4	Filter-Algorithmus zur Verbesserung der Messung.....	48
4.6	Fluoreszenzmethode B – Adaptiver Farbfilter	52
4.7	Diskussion zur Eignung der Messmethoden für die Identifizierung von Mikroplastikpartikeln in Realproben	53
5	Sachgerechte Verwendung der finanziellen Mittel.....	55
5.1	Personalausgaben	55
5.2	Ausgaben für Geräte.....	55
5.3	Ausgaben für Leistungen Dritter.....	55
6	Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)	55
6.1	Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse	55
6.2	Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit	55
6.3	Aussagen zur voraussichtlichen industriellen Umsetzung der FuE-Ergebnisse nach Projektende	56
7	Ergebnistransfer	56
7.1	Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit	56
7.2	Geplante spez. Transfermaßnahmen nach Abschluss des Vorhabens.....	57
8	Durchführende Forschungseinrichtung.....	58
9	Literatur	59

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/Einheit	Bedeutung
KMU	Kleine und mittlere Unternehmen
PTS	Papiertechnische Stiftung
NIR	Nahinfrarot
PMV	Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik
TU	Technische Universität
DIN	Deutsches Institut für Normung
EN	Europäische Norm
ISO	International Organization for Standardization
GC	Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
UV	Ultraviolett
LDPE	Light Density Polyethylen
PA	Polyamid
HDPE	High Density Polyethylen
PS	Polystyrol
PMMA	Polymethylmethacrylat
PC	Polycarbonat
UHDPE	ultra-high molecular weight
PET	Polyethylenterephthalat
POM	Polyoxymethylene
ASA	Acrylnitril-Styrol-Acrylester
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
AP	Arbeitspaket
PCO	Pioneering in Cameras and Optoelectronics
PVC	Polyvinylchlorid
PLA	Poly lactide
PU	Polyurethane
CSEM	Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA

3D	3-Dimensional
COM	Communication port
AR	Advanced Research
ROI	Region of Interest
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
BC	Backgroundcorrection

1 Motivation und wirtschaftliche Relevanz für KMU

Fragen zu Herkunft, Verbleib und Auswirkungen von Mikroplastik in der Umwelt beherrschen seit einigen Jahren die öffentliche Diskussion. Plastikpartikel werden in der Umwelt schlecht und nur sehr langsam abgebaut, sie können mehrere Jahrhunderte in Flüssen, Seen, Meeren, Schlämmen und anderen Umweltmatrices existieren und sich durch Meeresströmungen, Wind, aber auch durch phytokatalytischen Abbau weiter zersetzen und verbreiten. Über die Nahrung können Wasserorganismen diese Plastikpartikel aufnehmen.

Auch in der Papierherstellung ergibt sich die Frage, ob durch die Produktionsprozesse Mikroplastikpartikel in die Umwelt oder auch in die Papierprodukte eingetragen werden. In Deutschland gab es im Jahr 2022 144 Betriebe in der Zellstoff- und Papierindustrie, bei denen jährlich eine Gesamtabwassermenge von ca. 215 Mio. m³ anfällt [1, 2]. Ein Eintrag von Mikroplastikpartikeln in das Prozess- und Abwasser der Papierfabriken kann verschiedene Ursachen haben:

- Eintrag von Kunststoffen über das Altpapier (in Form von beschichteten Verpackungspapieren und -karton, Kunststoffanteilen in Papierprodukten wie Fensterbriefumschlägen, Bäckertüten beim Discounter, Fehlwürfen, etc.),
- Verwendung von chemischen Additiven und Streichfarben in der Papierherstellung,
- Abrieb von Maschinenteilen.

Der Austrag von Mikroplastikpartikeln ist nicht nur über die Wasserphase möglich, ein Teil dieser Stoffe wird auch mit dem Rejekt ausgeschleust, verbleibt im Papier oder wird in der Abwasserreinigungsanlage an den Schlämmen der biologischen Abwasserbehandlung adsorbiert. Über die Art, Menge und Zusammensetzung von Mikroplastikpartikeln in den gereinigten Papierfabriksabwässern liegen bis heute keine belastbaren Daten vor.

Mikroplastikpartikel sind nicht nur im Abwasser von Papierfabriken von Interesse, zunehmend wird auch nach den Anteilen von Mikroplastik in Papierprodukten gefragt. Dies gilt insbesondere, wenn das Papier, wie z. B. Toilettenpapier, nach bestimmungsgemäßem Gebrauch desintegriert (zertifiziert) in die kommunalen Abwasserreinigungsanlagen (ARA's) gelangt und Reststoffe von dort ebenfalls in die Oberflächengewässer abgegeben werden. Auch Papiere, die nach ihrem primären Gebrauch zur Kompostierung gelangen (z. B. Zeitungen, Bioabfalltüten), sollten möglichst frei sein von biologisch schwer abbaubaren Kunststoffpartikeln.

Die analytische Bestimmung von Mikroplastik in den Papierfabriksabwässern und Papierprodukten ist eine anspruchsvolle Aufgabe, zu der bisher keine wissenschaftlichen Arbeiten publiziert wurden.

2 Stand der Forschung und Entwicklung

2.1 Mikroplastik – Begriffsdefinition

Eine einheitliche und verbindliche Definition für „Mikroplastik“ existiert nicht. Die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) beschreibt Mikroplastik als alle festen, polymerhaltigen Partikel, denen Additive oder andere Substanzen zugesetzt worden sein können, von denen mindestens 1 Prozent der Gesamtmasse eine Größe unter 5 mm aufweisen, im Falle von Fasern eine Länge von 3 nm bis 15 mm und die ein Längen- zu-Durchmesser-Verhältnis >3 aufweisen [3]. In einer neueren Pressemitteilung der Europäischen Kommission werden unter dem Begriff Mikroplastik alle synthetischen Polymerpartikel mit einer Größe unter 5 Millimeter verstanden, die unlöslich, organisch und schwer abbaubar sind [4].

Je nach Herkunft und Eintragsweg in die Umwelt wird zwischen primärem und sekundärem Mikroplastik unterschieden. Primäres Mikroplastik sind Plastikpartikel, die bereits in der o. g. Größe produziert werden und in dieser Form in die Umwelt gelangen (z. B. Peelings, Kunststoffpellets). Sekundäres Mikroplastik entsteht erst durch die Nutzung von Kunststoffen (z. B. Reifenabrieb oder freigesetzte Textilfasern) oder durch chemischen, physikalischen und/oder biologischen Abbau aus größeren Plastikpartikeln [5].

2.2 Mögliche Ein- und Austräge von Mikroplastik bei der Papierherstellung

2.2.1 Altpapier

Einen möglichen Eintrag von Plastikpartikeln in den Papierherstellungsprozess stellt der Eintrag über das Altpapier dar. Mit einer Altpapiereinsatzquote von 79 % im Jahr 2022 ist Altpapier mengenmäßig der wichtigste Rohstoff für die Papierproduktion in Deutschland [1]. Über das Altpapier können verschiedene synthetische Polymere in den Papierkreislauf eingetragen werden: Um fett- und wasserdichte Papiere herzustellen, werden diese z. B. mit einer Beschichtung aus Polymeren wie Polyethylen, Polypropylen oder Polyethylenterephthalat versehen. Gestrichene Papiere werden häufig mit Styrol-Butadien-Latices hergestellt. Bei der Weiterverarbeitung von Papier werden Polyethylen- oder Polypropylen-Wachse eingesetzt, beispielsweise als Bestandteil von Druckfarben,

Tinten und Toner für Laserdruck oder als Additive in Heißkleber. Auch finden sich in den Fabriken, die einen hohen Anteil an Wellpappenverpackungen als Altpapier verarbeiten, häufig kleine Styropor-Kügelchen im Ausgangsstoff. Inwieweit durch die Außenlagerung des Altpapiers in den Papierfabriken auch Einträge durch die Atmosphäre, z. B. Reifenabrieb relevant sein können, wird diskutiert.

Bei der Altpapier-Stoffaufbereitung wird der überwiegende Kunststoff-Anteil über das Grob- und Feinrejekt ausgetragen. Dies ist für sehr kleine Kunststoffpartikel und bestimmte Polymerarten jedoch aufgrund ihrer spezifischen Dichte nicht immer vollständig möglich, wodurch sich Probleme bei der Herstellung von Recyclingpapieren ergeben können. Lagern sich die kleinen Polymerpartikel bei der Stoffaufbereitung zu größeren Aggregaten zusammen, können klebrige Verunreinigungen im Gutstoff, sogenannte Stickies, entstehen. Der Stickygehalt von Altpapierstoffsuspensionen kann mit verschiedenen Bestimmungsmethoden abgeschätzt werden (z. B. INGEDE-Methode 4 [6] und PTS-Methode mittels NIR Imaging Technik [7]). Auch wurden von unserem Fachgebiet Fluoreszenzmethoden zur Stickybestimmung untersucht. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der kleinen Polymerteilchen, die sich zu Stickies zusammenlagern, zu den Mikroplastikpartikeln zu rechnen ist. Durch die Untersuchung von Stickies kann die (Mikro-)Plastik-Belastung bei der Altpapieraufbereitung grob abgeschätzt werden. Jedoch können mit dieser Methodik nur Agglomerate synthetischer Polymere erfasst werden, eine Partikel-Bestimmung und originäre Größenverteilung der Partikel ist nicht möglich. Zudem werden auch natürliche Polymere wie Harze mitbestimmt [8].

Mikroplastik-Partikel können über das Abwasser aus dem Papier-Recycling in die Umwelt gelangen [9]. Zu Mikroplastik-Gehalten in Papierfabriksabwässern, die aus der Altpapierverarbeitung stammen, ist nur wenig bekannt. In einer Studie aus Norwegen wurde abgeschätzt, dass bis zu 1 % der Mikroplastik-Emissionen in Norwegen aus dem Papier-Recycling stammen könnte [10, 11]. Dafür wurde im Jahr 2013 in einer Studie in wenigen Stichproben im Abwasser einer Anlage für Papierrecycling der Gehalt an Mikroplastik untersucht. Dabei wurden Gehalte zwischen 3 und 33 mg Mikroplastik pro Liter bestimmt, eine genaue Bestimmung der Partikelzahl wurde nicht durchgeführt.

2.2.2 Einsatz von chemischen Additiven bei der Papierherstellung

In der Papierindustrie werden verschiedene synthetische Polymere bei der Papierherstellung und –verarbeitung eingesetzt. Dispersions-Kunststoffe kommen in der Herstellung und Verarbeitung von Papier zum Einsatz, um die Eigenschaften des Papiers zu verändern oder Veredelungen für grafische Papieranwendungen

durchzuführen. Beispielsweise können bei der Formulierung von Streichfarben synthetische Polymere wie Styrol-Butadien-Copolymere, Polyvinylalcohol oder Polyvinylacrylate als Bindemittel zum Einsatz kommen. Auch werden Polyurethan-Dispersionen als Oberflächenleimungsmittel eingesetzt. Polyethylen- oder Polypropylen-Wachse kommen als Bestandteile von Druckfarben und Additiven in der Papierverarbeitung zum Einsatz. Diese Stoffe kommen nicht nur durch das Recyceln von Papier wieder in den Kreislauf (siehe oben), sondern können auch direkt in der jeweiligen Papierfabrik in das Prozesswasser und damit in das Abwasser gelangen.

2.2.3 Abrieb

Faserstoffe und Faserstoffsuspensionen kommen in Kontakt mit verschiedenen Anlagenteilen aus Kunststoffen, die einen Verschleiß (Abrieb) zeigen. Dazu gehören Förderbänder, Lagerbehälter, Dichtungen, Bespannungen der Papiermaschine und andere.

2.3 Analysenmethoden

2.3.1 Probenahme

Während die Probenahme für Papierproben direkt im Handel oder bei den produzierenden Papierfabriken erfolgen kann, ist die Probenahme für Abwasserproben deutlich komplizierter. Im Rahmen einer Masterarbeit an unserem Fachgebiet im Jahr 2018 sind verschiedene Methoden getestet und geeignetes Gerät zur repräsentativen und verlustfreien Entnahme von Abwasserproben angeschafft worden [12]. Die Realproben sind direkt aus dem Zu- und Ablauf der Papierfabriken mit einer mobilen Entnahmeeinrichtung aus Pumpe und zwei hintereinander geschalteten Edelstahlfilterkerzen (Maschenweite 150 µm und 20 µm) entnommen worden (Probenvolumen 500 l). Abbildung 2-1 zeigt die Filterschicht aus Fasern, Füllstoffen und Kunststoffpartikeln, die sich bei der Entnahme von 500 l Abwasserprobe auf der Oberfläche der Filterkerze bildet.



Abbildung 2-1: Filterkuchen auf der 150 μm -Filterkerze bei der Abwasserprobenahme in einer Papierfabrik [12]

In einer Studie zur Untersuchung zur Häufigkeit von Mikroplastik im Abwasser von Industrieanlagen in Deutschland wird die Vorgehensweise zur Probenahme detailliert beschrieben. Die Grundlage bilden auch hier Siebe mit unterschiedlichen Maschenweiten von 1.000 μm , 100 μm und 10 μm . Um eine repräsentative Probenahme zu gewährleisten, erfolgt die Probenahme diskontinuierlich, in festen Zeitabständen gemäß DIN EN ISO 5667-1 (2023). Dies wird durch eine zuschaltbare Pumpe realisiert, welche einen definierten Volumenstrom aus dem zu untersuchenden Abwasserstrom durch die Siebe leitet [13].

2.3.2 Probenaufbereitung

Die Abtrennung der Matrix in den Papier- und Abwasserproben besteht in der Separation der Kunststoffpartikel von den anderen Feststoffen der Probe (hier vor allem Zellulosefasern und Füllstoffe). Hierzu wurden in [12] und in einer weiteren Bachelorarbeit am PMV der TU Darmstadt [14] umfangreiche Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, die festen Begleitstoffe der Probe möglichst vollständig abzutrennen, ohne Verluste an den zu analysierenden Plastikpartikeln hinnehmen zu müssen. Dies konnte sowohl für Papiere als auch für die Filtrerrückstände aus der Abwasserreinigung durch Zugabe von 30 %-igem Wasserstoffperoxid und 78 %-iger Schwefelsäure erreicht werden. Der Einfluss dieser Chemikalien auf die Kunststoffpartikel wurde anhand von Modellsuspensionen sowohl gravimetrisch als auch mikroskopisch (Veränderungen an Größe und Form der Partikel) untersucht. Sollten in einer Realprobe unbekannter Zusammensetzung weitere Störstoffe enthalten sein, kann eine Dichteseparation mit Natriumiodid-Lösung erfolgen [14]

2.3.3 Chemische Analytik

Die chemische Analytik von Mikroplastikpartikeln in Umwelt- oder Materialproben ist aufgrund der Teilchenanzahl, der verschiedenen Größenklassen und der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kunststoffe sehr komplex. Die Auswahl eines geeigneten Analysenverfahrens für die Mikroplastikbestimmung muss nach sorgfältiger Definition der Zielstellung der Untersuchungen erfolgen. Von besonderer Bedeutung ist die Festlegung der Partikelgrößenbereiche, die mit der Untersuchungsmethode erfasst werden sollen. Im Wesentlichen werden zwei verschiedene Zielsetzungen verfolgt [15]:

1. Identifizierung und Bestimmung der Massengehalte

Die Bestimmung der Massengehalte an Mikroplastikpartikeln in einer Probe ist immer dann sinnvoll, wenn regelmäßige, wiederholte Messungen im Rahmen der Überwachung durchgeführt werden sollen und/oder die Wirkung von Maßnahmen zur Reduzierung von Kunststoffeinträgen beurteilt werden soll. Dabei kann im Einzelfall z. B. durch die fraktionierte Filtration eine Eingrenzung der Partikelgrößen vorgenommen werden. Detaillierte Angaben zu der Partikelgröße, -anzahl und -form sind nicht möglich. Häufig wird das Messergebnis in Massen-% je Kunststoffsorte angegeben. Nicht in jedem Fall ist sichergestellt, dass dieses Messergebnis tatsächlich aus dem Vorhandensein von Mikroplastikpartikeln resultiert und nicht aus vernetzten oder langkettigen Polymerstrukturen mit deutlich höherer Partikelgröße.

Für die Detektion kommen Pyrolyse-GC/MS-Systeme zum Einsatz, im einigen Fällen auch Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)-Systeme [15].

2. Identifizierung der Mikroplastikpartikel, Partikelanzahl, -größe und -form

Die Partikel der verschiedenen Kunststoffe können differenziert nach Partikelform, -anzahl und -größe bestimmt werden und gleichzeitig mittels verschiedener Detektionsmethoden auch in kleineren Konzentrationen identifiziert werden. Da häufig nur eine Teilmenge einer Probe (z. B. Abwasserprobe) untersucht werden kann, ist die Homogenität der analysierten Probenaliquote von besonderer Bedeutung. Grundsätzlich gilt, dass zahlenmäßig deutlich mehr kleine als große Partikel gefunden werden. Die Analyse von sehr kleinen Partikeln ist sehr aufwendig und für reale Proben z. T. bisher nur begrenzt möglich ($< 5 \mu\text{m}$). Als Detektionsverfahren kommen für diese Zielstellung im Wesentlichen spektroskopische Methoden zum Einsatz, hauptsächlich Mikro-FTIR-, Mikro-Ramanspektroskopie, eine Kopplung dieser beiden Methoden, aber auch NIR-Techniken sowie Fluoreszenzmethoden. Durch die Kopplung mit der Mikroskopie können einzelne Partikel separat betrachtet, vermessen und identifiziert werden. In der

Praxis ist bei den heutigen Methoden der Probenahme und chemischen Analyse von einer unteren Bestimmungsgrenze bei der Partikelgröße von ca. 20 µm auszugehen. Die Erstellung von Massenbilanzen und ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Messmethoden ist mit großen Differenzen verbunden und nur bei einer klaren Definition der Partikelgröße möglich [15].

3. Untersuchung von Plastikpartikeln mittels Fluoreszenz

Erste Untersuchungen zur Bestimmung von Mikroplastik-Partikeln mittels Fluoreszenz wurden von *Andrady et al.* im Jahr 2011 veröffentlicht. *Andrady* verwendete Nilrot als lipophilen fluoreszierenden Farbstoff, der auf hydrophobe Moleküle wie Lipide und unpolare Polymere in-situ aufzieht und fluoreszierende Moleküle bildet, die zur Quantifizierung mittels Fluoreszenzspektrometer geeignet sind. Auf dieser Basis können für unterschiedliche analytische Aufgaben geeignete Untersuchungsmethoden entwickelt werden, die selektiv, schnell und kostengünstig sind und sowohl die Identifizierung als auch die Quantifizierung verschiedener Stoffe in unterschiedlichen Matrices erlauben [16]. Die Fluoreszenzmessung nach Zugabe von Nilrot ist unter anderem auch Grundlage der Bestimmung von Mikrostickies in Altpapierstoffsuspensionen mittels Durchflusszytometrie [17–19]. *Maes et al.* haben die Fluoreszenzmessungen für die Bestimmung von Mikroplastikpartikeln detaillierter untersucht. Die Messung wurde durch Anregung der angefärbten Moleküle mit blauem Licht durchgeführt, die emittierte Fluoreszenzstrahlung wurde durch Fotografieren durch einen Organgefilter aufgenommen. Mittels Bilderkennung wurden die fluoreszierenden Partikel auf dem Filter identifiziert und ausgezählt und die Ergebnisse mit denen der parallel durchgeführten Infrarot-Mikroskopie verglichen, wobei sehr gute Übereinstimmungen für viele Plastikarten gefunden wurden [20]. Einen ähnlichen Ansatz nutzten auch Hengstmann und Fischer, in dem sie verschiedene Mikroplastikpartikel unterschiedlicher Partikelgröße mit Nilrot anfärbten und die Ergebnisse bei Messung mit der UV-Licht-Photobox mit denen des Fluoreszenzmikroskops verglichen. Insbesondere im Bereich der großen Mikroplastikpartikel > 0,63 mm erwies sich die UV-Licht-Photobox als geeignete Methode für eine zuverlässige und schnelle Mikroplastikanalyse [21]. Vielversprechend sind auch Arbeiten aus den letzten Jahren, in denen die solvatochromenen Eigenschaften des Nilrot und der Einsatz weiterer Fluoreszenzfarbstoffe parallel getestet wurden, um die Identifizierung von Plastikpartikeln aufgrund unterschiedlicher Polaritäten auszunutzen [22, 23]. Ebenfalls auf Grundlage der Fluoreszenzeigenschaften von mit Nilrot angefärbten Kunststoffpartikeln konnten Sancataldo et al. zeigen, dass die Emissionsspektren sowie die Fluoreszenzlebensdauer

für verschiedene Kunststoffe charakteristisch ist und eine Identifizierung der Kunststoffart ermöglicht [24]. Eine Identifizierung von Mikroplastik auf Basis der Fluoreszenzabklingzeit ist aber auch ohne vorheriges Anfärben mit Nilrot möglich, wie in weiteren Studien gezeigt wurde [25–27]

Eigene Vorarbeiten an der Forschungseinrichtung haben gezeigt, dass die Mikroplastikpartikel durch das Anfärben mit Nilrot in unterschiedlichen Lösemitteln charakteristische Emissionsspektren zeigen, deren solvatochrome Verschiebungen mit der eingestrahlten Wellenlänge unterschiedlich stark ausfallen (siehe Abbildung 2-2:) [14]. Bei einer Untersuchung einer Mischung von Plastikpartikeln könnte dieses Phänomen unter Nutzung von chemometrischen Analysetools der Quantifizierung und Identifizierung verschiedener Kunststoffsorten dienen. Zu diesem Schluss kam auch Pedriza im Ausblick ihrer kürzlich publizierten Untersuchungen [22].

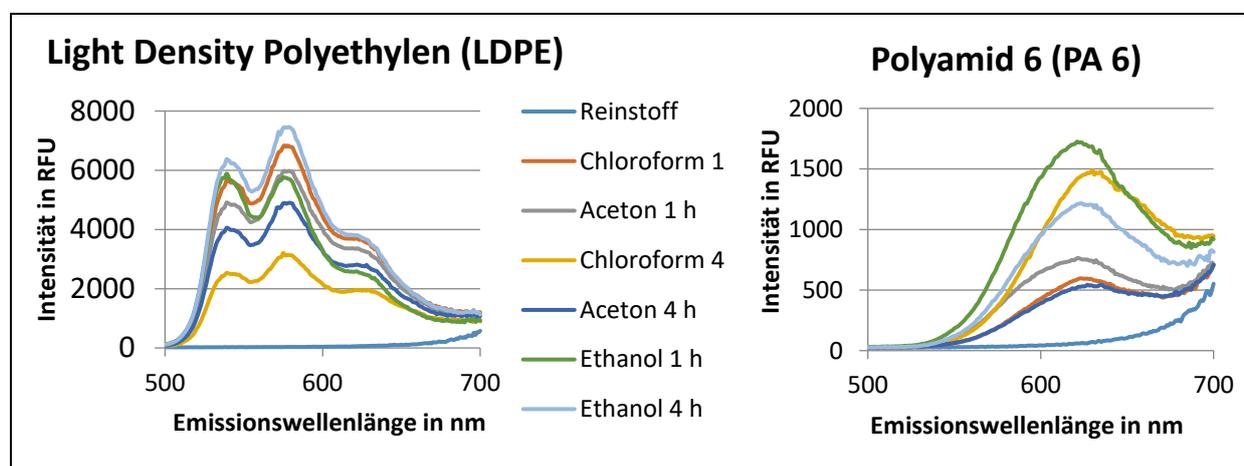


Abbildung 2-2: Fluoreszenzspektren von LDPE und PA 6, angefärbt mit Nilrot, in unterschiedlichen Lösemitteln [14]

Im Zusammenhang mit der Sortierung von Altplastik für den Recyclingprozess wurde untersucht, ob die unterschiedliche Lebensdauer der Fluoreszenzstrahlung (Fluoreszenzabklingzeit) von verschiedenen Kunststoffen (mit und ohne Fluoreszenzfarbstoffen) als Grundlage für die automatische Sortierung von Plastik eingesetzt werden kann [28–30]. Die Fluoreszenzintensität nimmt nach der Anregung exponentiell ab. Dabei gibt die Fluoreszenzlebensdauer τ die mittlere Zeit an, die ein Molekül bei der Fluoreszenz in einem angeregten Zustand bleibt, bevor es ein Photon emittiert. Die Fluoreszenzlebensdauern von Kunststoffen (ohne Anfärbung) liegen im Bereich weniger ns, wie aus Abbildung 2-3 ersichtlich.

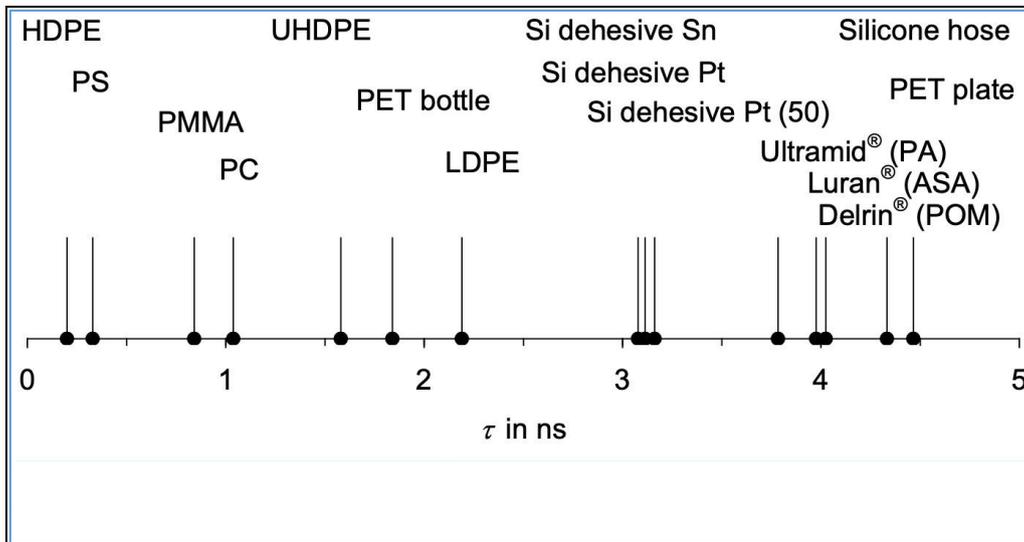


Abbildung 2-3: Fluoreszenzlebensdauer unterschiedlicher technischer Polymere [30]

In Voruntersuchungen zu diesem Projektantrag ist ein Glasfaserfilter, auf dem die Filtrerrückstände der Anreicherung von Papierfabriksabwasser gesammelt worden, mit Hilfe einer Fluorescence lifetime imaging (FLIM) – Kamera untersucht worden (ohne vorherige Anfärbung, siehe Abbildung 2-4) In der Darstellung ist erkennbar, dass auf dem Filter zahlreiche unterschiedliche Mikroplastikpartikel (Größenbereich nach fraktionierter Filtration 20 µm bis 500 µm) mit verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern (gekennzeichnet durch unterschiedliche Farbtöne) enthalten sind.

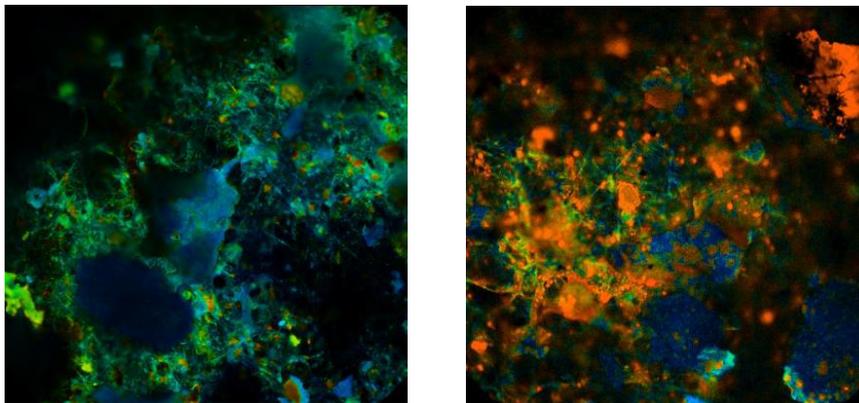


Abbildung 2-4: Vorversuche zur Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer verschiedener Kunststoffe mittels FLIM-Kamera bei der Anregungswellenlänge von 405 nm (links) und 535 nm (rechts)

3 Forschungsziele und Lösungsweg

In dem vorliegenden Projekt sollen zwei verschiedene Fluoreszenzmethoden zur Untersuchung von Mikroplastikpartikeln in Papierfabriksabwässern und Papieren entwickelt werden. Im Folgenden sollen mit einer der beiden Methoden, die erfolgversprechend zuverlässige und reproduzierbare Messergebnisse liefert,

Realproben aus der Papierherstellung auf ihren Mikroplastikanteil untersucht werden. Ggf. kann auch eine Kopplung der Methoden sinnvoll sein. Die Untersuchung von Mikroplastikpartikeln in Abwässern und Produkten der Papierherstellung ist eine sehr komplexe Aufgabenstellung, die in diesem Projekt nicht allumfassend lösbar sein wird. Mit den zu entwickelnden Fluoreszenzmethoden wird daher nicht das Ziel verfolgt, Massenbilanzen zu allen Stoffströmen der Ein- und Austräge der Papierproduktion zu erstellen. Viel mehr liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung einer belastbaren Untersuchungsmethode für die Bestimmung von Mikroplastik in diesen Industrieabwässern und Produkten, mit der die Identifizierung und die Größenklassifizierung der Mikroplastikpartikel in dieser Matrix gelingen kann, sowie auf der Erstellung einer ersten Datenbasis, um möglicherweise hinsichtlich Mikroplastikein- oder -austrag auffällige Prozessschritte zu identifizieren.

Das Forschungsvorhaben ist in insgesamt 6 Arbeitspakete (AP) (plus AP 7: Dokumentation) unterteilt. Zunächst werden verschiedene Kunststoffpartikel beschafft, welche als Referenzkunststoffe und zur Erstellung einer Datenbank verwendet werden. Für die Mikroplastikanalyse wird ein Messsystem entwickelt. Das Messsystem basiert einerseits auf der Fluorescence lifetime imaging (FLIM-)Methode, andererseits auf der Spektralanalyse. Für die Realisierung des Messaufbaus werden verschiedene Komponenten beschafft und installiert. Zudem stellt die Entwicklung einer Software zur Aufnahme und Auswertung der Proben einen zentralen Bestandteil für die Etablierung einer neuartigen Messmethode dar. Anhand der beschafften Mikroplastikpartikel wird anschließend analysiert, ob auf Basis der FLIM-Methode, der Spektralanalyse oder durch Kombination beider Ansätze eine bestmögliche Wiedererkennungsrates der Kunststoffart und Partikelgrößenverteilung möglich ist. Mit dem optimierten Messsystem werden abschließend Realproben untersucht. Der Fokus liegt hierbei auf der Analyse von Papierproben und Prozesswasserproben aus Papierfabriken.

4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

4.1 Entwicklung des Messsystems

Beide Fluoreszenzmethoden erfassen das durch Fluoreszenz emittierte Licht. Die klassische Fluoreszenzspektroskopie wertet die spektralen Unterschiede in der Emissionsintensität aus. Die Dynamik des Signals d. h. die charakteristischen Anstiegs- und Abklingzeiten bleiben dabei unberücksichtigt. Erst die Modulation der Beleuchtung und spezielle Aufnahmetechnik ermöglichen die Messung der Fluoreszenzabklingzeit als eine eigenständige, weil von der Intensität unabhängige Messgröße.

Der Aufbau zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) unterscheidet sich im Wesentlichen von der Fluoreszenzspektroskopie durch die Modulation der Anregung und die zeitlich aufgelöste Erfassung des emittierten Lichts.

Das zu erfassende Partikelgrößenspektrum stellt eine wesentliche Randbedingung für die Auslegung des Messaufbaus für beide Fluoreszenzmethoden dar. Die Obergrenze von 5 mm ergibt sich aus der Definition von Mikroplastik. Die untere Bestimmungsgrenze wurde auf 20 µm Partikeldurchmesser festgelegt.

Die modulierte Anregung erfolgt mit einem sogenannten FLIM Laser im nahen UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 395 nm. Als bildgebender Sensor dient eine FLIM-Kamera. Mit ihrem speziellen Aufbau kann diese neben der Intensität auch die Phasenverschiebung und damit die Dynamik eines Lichtsignals erfassen.

Für die Entwicklung der Messsysteme wurden diverse Komponente benötigt. Ein Teil der Komponenten wurde zu Beginn des Projektes entsprechend der Vorgaben aus dem Finanzierungsplan beschafft. Alle sonstigen verwendeten Geräte und Komponente waren bereits aus anderen Projekten vorhanden. Eine Übersicht der relevanten verbauten und getesteten Komponenten für die Messsysteme ist in Tabelle 4-1 gelistet.

Tabelle 4-1: Übersicht der verwendeten Komponenten für den Messaufbau

Komponente	Typ	Hersteller	Quelle
FLIM-Kamera	pco.flim	Excelitas Technologies Corp.	Excelitas PCO GmbH
UV-Laser	pco.flim-Laser 395 nm	Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH	Excelitas PCO GmbH
Objektiv	Micro-NIKKOR-P Auto 1:3.5 alternativ zu Micro-NIKKOR 105 mm	Nikon	PMV
Farbfilter	VariSpec VIS2	Cambridge Research & Instrumentation, Inc.	PMV
Kollimator	Mikroskopobjektiv 2x	Rodenstock	PMV
Spiegel	86330 (dichroitisch)	Edmund Optics	Edmund Optics
Kreuztisch	iMC-P mit LES 5 (2x)	Fa. isel Germany AG	PMV
Lichtquelle	Kaltlichtquelle 8375	FOSTEC	PMV
Leuchttisch	FOSTEC ACE Plate	Fa. Schott	PMV

Für die Entwicklung der Messsysteme sowie die Erstellung einer Datenbank wurden zudem diverse Mikroplastikpartikel untersucht. Die verwendete Mikroplastikpartikel sind in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2: Übersicht der untersuchten Mikroplastikpartikel

Kunststoffart	Hersteller/Bezeichnung	Partikelform und -größe
PU Farbe: Naturell	Covestro (Desmopan 1080A)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
PLA Farbe: Naturell	NatureWorks Ingeo 4043D	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
PA Farbe: Naturell	nicht bekannt	Würfelförmig, Ca 0,8 bis 1 mm Kantenlänge
PVC Farbe: Naturell	Colourmaster Nip Ltd (PVC)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
PVC Farbe: Naturell	nicht bekannt	Pulver, ca. 50 bis 200 µm
PS Farbe: Naturell	nicht bekannt (Empera 251 L)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
PP Farbe: Naturell	Colourmaster Nip Ltd (PP Novolen)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
PU Farbe: Naturell	Covestro AG (Desmopan 1080 A)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
HDPE Farbe: Naturell	Colourmaster Nip Ltd (HDPE 5021D)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm
LDPE1 Farbe: Naturell	Nicht bekannt	Pulver, ca. 100 bis 400 µm
LDPE2 Farbe: Naturell	Colourmaster Nip Ltd (LDPE 605 BA)	Kugelförmig, ca. 2 bis 3 mm

Die folgenden Abschnitte beschreiben die für die Messung notwendigen Hard- und Softwarekomponenten. Nachfolgende Kapitel gehen auf die damit realisierten Fluoreszenzmethoden A (FLIM) und B (Adaptiver Farbfilter) ein.

4.2 Aufbau des Messsystems

Die wichtigsten Komponenten des Messsystems sind einerseits Kamera mit Objektiv und Farbfilter und andererseits die Elemente zur Beleuchtung der Probe. Der Kreuztisch ermöglicht das Abscannen von größeren Probeflächen, wie z. B. Filterblätter. Software steuert die Bildaufnahme, d. h. die Kamera, den Farbfilter, die Beleuchtung und den Kreuztisch. Sie beinhaltet auch die Routinen zur Bildanalyse und zur Kalibrierung des Systems. Abbildung 4-1 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

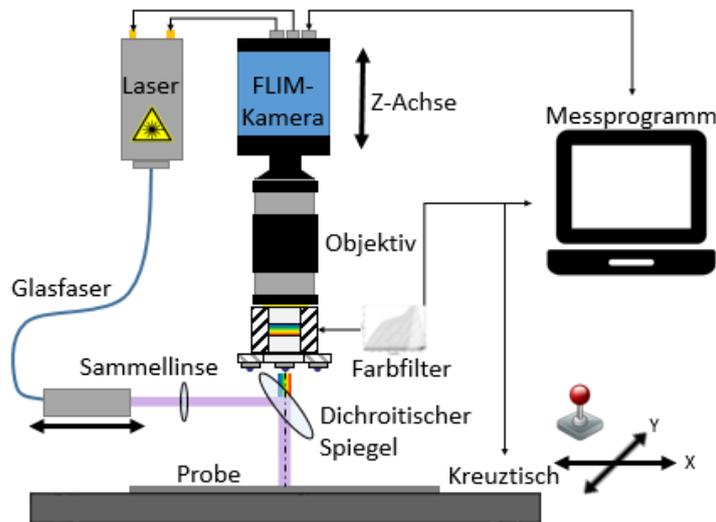


Abbildung 4-1: Schema des Versuchsaufbaus.

4.2.1 Spezifikation der Kamera

Bei der Kamera handelt es sich um eine pco.flim der PCO AG, Kehlheim, die in diesem Projekt planmäßig beschafft wurde (Geräteinvestition). Seit der Übernahme am 03.09.2021 gehört PCO zum Technologiekonzern Excelitas Technologies® Corp. mit Sitz in Waltham, Massachusetts, USA.

In der pco.flim-Kamera ist der CMOS Sensor QMFLIM2, welcher von CSEM (Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA) und PCO entwickelt wurde [31]. Der Sensor verfügt über eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln. Die Auflösung der Kamera ist mit 1008 x 1008 Pixeln angegeben [31], im praktischen Betrieb erzeugt sie jedoch Bilder mit einer Auflösung von 1008 x 1004 Pixeln. Die 1008 px entsprechen dabei der Breite b_{sensor} und die 1004 px der Höhe h_{sensor} des Bildes. Mit Hilfe des internen Frequenzsynthesizers können Frequenzen im Bereich von 5 kHz – 40 MHz betrieben werden. Zudem verfügt das Kamerasystem über eine Asymmetrie-Korrektur, die bereits während des Aufnahmeprozesses erfolgt. Bei aktivierter Asymmetrie-Korrektur beträgt die Bildrate etwa 20 Bilder/s.

Die Steuerung und die Bilddatenübertragung erfolgen über eine USB 3.0-Schnittstelle. Die relevanten Kennzahlen der pco.flim-Kamera sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Kennzahlen der Kamera pco.flim

Parameter	Wert
Auflösung	1008 x 1004 px (1008 x 1008 px angegeben)
Pixelgröße	5,6 µm x 5,6 µm
Bereich der Modulationsfrequenz	5 kHz – 40 MHz
Dynamikumfang	1:1024 (10 Bit)
Mögliche Belichtungszeiten	1 ms – 2 s

4.2.2 Objektiv

Bei dem Objektiv handelt es sich um ein Nikon Micro-NIKKOR-P Auto 1:3.5 mit Brennweite $f = 55 \text{ mm}$, das über einen Nikon-C-Mount-Adapter mit der Kamera pco.flim verbunden ist. An der Naheinstellgrenze von 35 cm liefert das Objektiv ein scharf abgebildetes Messfeld mit einer Kantenlänge von rund 10 mm. Der Fokusring wurde so fixiert, dass bei größter Bildschärfe die Pixelgröße 10 µm beträgt. Somit ergibt sich ein effektives Messfeld von 10,08 mm horizontal und 10,04 mm vertikal. Das Linienraster MGP-10 von Newport mit 10 Linienpaaren per mm dient hierbei als präzise Vorlage.

Das Mikroskopobjektiv Rodenstock (2x) besitzt eine feste Brennweite und wird als C-Mount direkt mit der Kamera pco.flim verbunden. Als Fixfokusobjektiv mit 2-facher Vergrößerung ergibt sich zwingend eine Pixelauflösung von 2,8 µm und eine Messfeldgröße von 7,93 mm². Im Vergleich dazu ist die Messfläche beim Nikon-Objektiv mit 101,2 mm² um Faktor 12,8 größer. Das Mikroskopobjektiv von Rodenstock liefert sehr gute Bilder mit hoher Auflösung auf Kosten der Lichtstärke. Das Objektiv sollte nur bei intensiver Fluoreszenz eingesetzt werden.

Das C-Mount-Zoomobjektiv 9-1248 lieferte mit und ohne Zwischenringe Bilder mit unscharfen Bereichen sowie dunklen Rändern und Verzeichnungen. Dieses Objektiv ist für Messungen nicht geeignet und nur der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.

Das ebenfalls getestete Objektiv Micro-NIKKOR 105 mm, Öffnungsverhältnis 1:4, Nr. 201038, besitzt eine Nahstellgrenze von 45 cm. Damit lassen sich Pixelgrößen ab 6,9 µm realisieren. Bei einer Pixelgröße von 10 µm beträgt der Objektstand rund 67 cm. Die Lichtausbeute sinkt im direkten Vergleich mit dem Micro-NIKKOR-P 55 mm auf etwa $\frac{1}{4}$. Dieser Wert ergibt sich aus dem fast doppelten Abstand zur Probe und dem kleineren Öffnungsverhältnis. Damit scheidet dieses Objektiv als Alternative aus.

Fazit: Für die gewählte Auflösung von 10 µm je Bildpunkt eignet sich das Objektiv Nikon Micro-NIKKOR-P 55 mm durch seine Bauform und durch seine Lichtstärke im besonderen Maße.

4.2.3 Farbfilter

Als elektrisch durchstimmbarer Farbfilter dient der CRI VariSpec VIS2, mit dem bereits in den letzten Jahren Untersuchungen am PMV durchgeführt wurden. Er funktioniert nach dem Messprinzip des Hyperspectral-Imagings und ist für die bildgebende Spektralanalyse konzipiert. Der Filter besteht aus einem Optik- und einem Steuermodul mit serieller Schnittstelle (RS232). Die Optik besitzt eine Öffnung von 35 mm \varnothing , so dass die Sicht des darüber liegenden Objektivs auf das Messfeld nicht eingeschränkt ist. Die Bauhöhe des Optikmoduls beträgt 45 mm.

Das Optikmodul basiert auf mehreren in Reihe geschalteten Filterstufen, wobei jede Stufe zwei parallele, lineare Polarisationsfilter enthält, welche ein Flüssigkristall-Verzögerungselement einschließen. Der Polarisationsfilter am Eingang spaltet das einfallende Licht in gleiche Komponenten entlang der beiden Kristallachsen auf. Abbildung 4-2 zeigt schematisch den Aufbau des Filters.

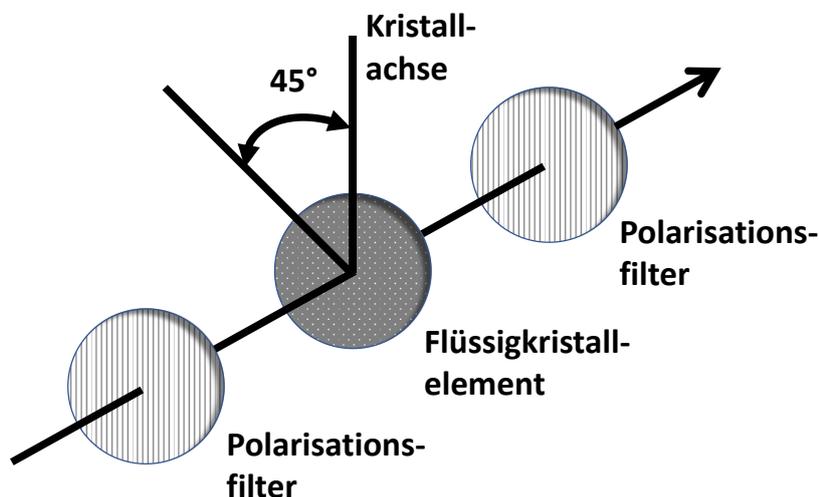


Abbildung 4-2: Prinzipieller Aufbau einer Filterstufe des Emissionsfilters (angelehnt an [32]).

Durch Anlegen einer Spannung an das Flüssigkristallelement wird der Brechungsindex einer der Kristallachsen verändert. Eine Lichtkomponente wird gegenüber der anderen verzögert, wodurch eine Phasenänderung entsteht. Beim Austritt aus dem Flüssigkristallelement vereinen sich die beiden Komponenten wieder zu einem vorhersehbaren Polarisationszustand. Der Ausgangspolarisator überträgt das Licht parallel zu seiner Übertragungsachse. Da die Phasenänderung von der Wellenlänge abhängt, wird durch den Flüssigkristallverzögerer bestimmt, welche Wellenlängen übertragen werden. Die Durchlässigkeit ist ebenfalls von der Wellenlänge abhängig [32]. Abbildung 4-3 zeigt die relative Durchlässigkeit über der Wellenlänge.

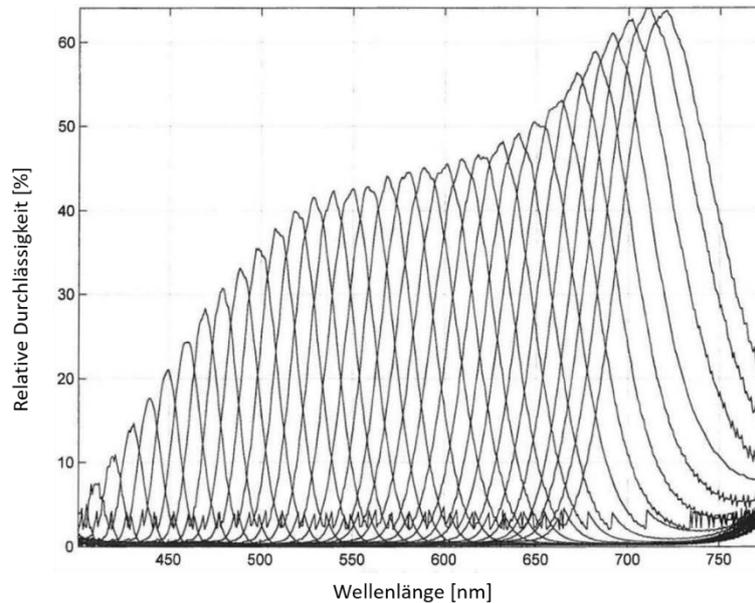


Abbildung 4-3: Relative Durchlässigkeit des VariSpec Farbfilters in Abhängigkeit der Wellenlänge [32].

Der VairSpec Farbfiler wird über eine serielle Schnittstelle gesteuert. Zum Senden der Befehle ist die in Tabelle 4-4 aufgelistete Konfiguration der Schnittstelle erforderlich.

Tabelle 4-4: Konfiguration zum Senden von Befehlen an den Farbfiler via serieller Schnittstelle [32].

Parameter	Wert
COM-Port Nummer	4 (vom PC abhängig)
Symbolrate	9600 Baud
Daten-Bits	8
Stop-Bits	1
Paritäts-Bit	no parity

Die Wellenlänge kann dann mit dem Befehl „W<Wellenlänge>“ gesetzt werden. Der nutzbare Wellenlängenbereich liegt zwischen 400 und 720 nm. „W550“ setzt die Wellenlänge beispielsweise auf 550 nm. „W?“ gibt die aktuell eingestellte Wellenlänge aus. Ganze Wellenlängenbereiche lassen sich automatisiert durchlaufen, um spektrale Aufnahmen einer Probe zu erhalten. Ein entsprechendes Messprogramm wurde mit der Software „NIS Elements“ entwickelt.

4.2.4 Beleuchtung

Der eingesetzte UV-Laser (Geräteinvestition in diesem Projekt) stellt die zentrale Beleuchtungsquelle dar. Maßgeblich für die Bestrahlungsstärke ist die emittierte Laserleistung bezogen auf die beleuchtete Fläche. Letztere bewegt sich zwischen π mm² für 2 mm Strahldurchmesser und 176,7 mm² für 15 mm Ø. Die Laserleistung beträgt im Dauerstrichbetrieb (CW-Mode) 120 mW und im getakteten Betrieb (FLIM) 60 mW.

Daraus ergeben sich Bestrahlungsstärken zwischen von 340 W/m² bis zu 38,2 kW/m². Geeignete Maßnahmen zum Strahlenschutz sind zwingend erforderlich.

Für das Einrichten des Messaufbaus kam die Kaltlichtquelle FOSTEC 8375 mit einer 150 W Halogenbirne (Modul DDL) in Verbindung mit der Fostec ACE Fiber Optic Plate zu Einsatz. Die Fa. Schott produziert die ACE Plate. Die effektive Größe des Leuchtfelds beträgt 120 mm * 100 mm. Durch eine Modifikation des FOSTEC 8375 lässt sich die Halogenbirne auch über ein externes Labornetzteil betreiben. Dies ermöglicht einen konstanten Betrieb und reproduzierbare Einstellungen.

4.2.4.1 UV-Laser

Der pco.flim-Laser weist einen digitalen Modulationsfrequenzbereich von 0 – 250 MHz auf und deckt somit den Modulationsfrequenzbereich der pco.flim-Kamera von 5 kHz – 40 MHz vollständig ab. Das Gesamtsystem ist daher für die Messung von Fluoreszenzlebensdauern im Nanosekundenbereich geeignet [33]. Hersteller des verbauten Lasermoduls ist die Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH in Rodgau. Den pco.flim-Laser gibt es mit unterschiedlichen Wellenlängen. Nach Abstimmung mit dem Hersteller wurde für das Projekt ein System mit einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Leistung von 120 mW ausgewählt. Bei Versuchen im PCO-Labor induzierte der pco.flim-Laser mit 405 nm Wellenlänge in den Referenzkunststoffen vergleichbare Fluoreszenz. Allerdings liegt dieser Laser sehr nahe an der Grenzwellenlänge des dichroitischen Spiegels.

Die Omicron Control Center Software steuert den Laser über dessen USB-Anschluss und ermöglicht die Einstellung der Betriebsparameter. Abbildung 4-4 zeigt die Einstellungen für eine FLIM-Messung mit einer auf 100 mW begrenzter Laserleistung. Durch die rechteckförmige Modulation liegt die effektive Laserleistung bei 50 mW.

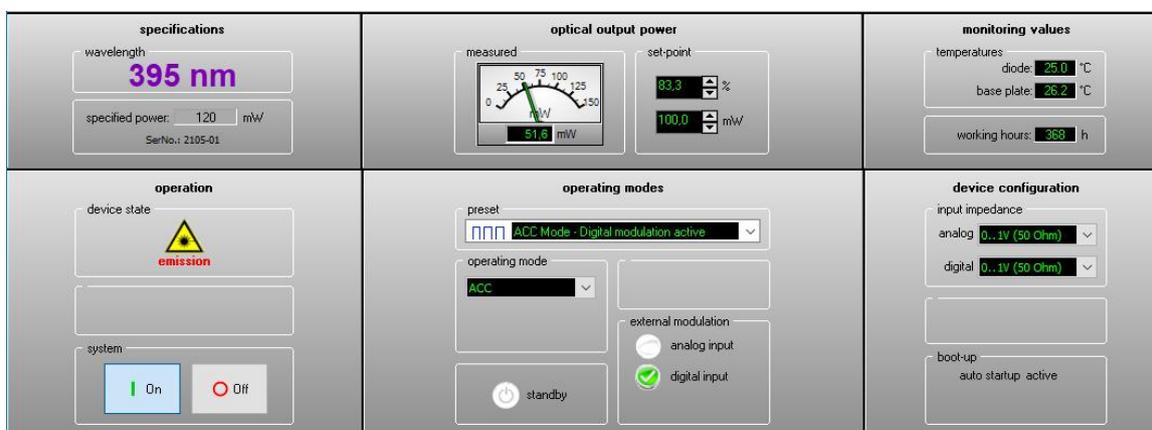


Abbildung 4-4: Omicron Lasersteuerung mit Einstellungen für FLIM

4.2.4.2 Kollimator

Das Laserlicht tritt divergent aus dem Lichtleiter aus und wird mit Hilfe des verbundenen Rodenstock 2x Mikroskopobjektivs gesammelt. Der Durchmesser der damit erzeugt punktförmigen Probenbeleuchtung lässt sich durch Verschieben der Einheit zwischen 2 mm und 15 mm einstellen.

4.2.4.3 Spiegel

Der Strahlengang zwischen Objektiv und Messfläche erfordert im Bereich des Spiegels eine offene, quadratische Fläche von 20 mm Kantenlänge. Der dichroitische Spiegel 86330 von Edmund Optics misst 35,6 mm * 25,2 mm, was bei einem Anstellwinkel von 45° einer projizierten Fläche von 25,2 mm * 25,2 mm entspricht. Er teilt bei seiner Grenzwellenlänge von 409 nm den einfallenden Lichtstrahl hälftig ($T = 50\%$). Im Bereich von 415 nm bis 850 nm ist der Spiegel lichtdurchlässig. Bei 45° Einfallswinkel beträgt der mittlere Lichttransmissionsgrad 0,90. Damit gehen durch Reflektion am Spiegel lediglich 10 % der induzierten Fluoreszenz verloren. Dagegen lenkt der Spiegel den Laserstrahl im UV-Bereich nahezu verlustfrei auf die Probe. Der mittlere Reflektionsgrad im Wellenlängenbereich von 325 nm bis 404 nm liegt bei 0,98 für 45° Einfallswinkel. Sowohl von der Baugröße, wie auch von seinen optischen Eigenschaften eignet sich dieser Spiegel zur Bestrahlung der Probe und zur Erfassung des Fluoreszenzsignals.

Der mittels 3D-Druck gefertigte Spiegelhalter ist bündig mit dem Farbfilter verschraubt und beinhaltet die verstellbare Aufnahme des Kollimators. In Abbildung 4-5 sieht man den Aufbau und zwei rötlich fluoreszierende Kunststoffpartikel.

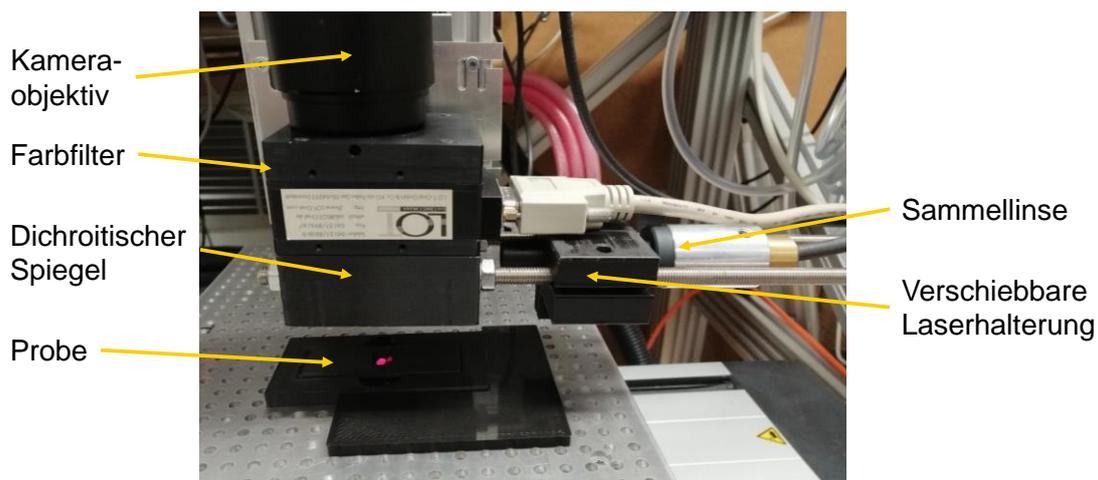


Abbildung 4-5: Aufbau mit Farbfilter, Spiegelhalter, Kollimator und fluoreszierender Probe auf dem Kreuztisch

4.2.5 Kreuztisch zur Probenpositionierung in der horizontalen Ebene

Die Grundplatte zur Aufnahme von Proben misst 280 mm * 240 mm, um auch Laborblätter mit 200 mm Durchmesser oder größere Filter aufzunehmen. Mittels Kreuztisch der Fa. isel Germany lässt sich die Probe unter dem optischen Aufbau auf einen halben Bildpunkt genau positionieren. Die Ansteuerung der Vorschübe in x- und y-Richtung erfolgt aus dem Messprogramm.

Der 2-Achsen Kreuztisch der Firma isel Germany AG, Eichenzell, besitzt zwei rechtwinklig angeordnete Kugelgewindenvorschübe Typ LES 5 mit jeweils 590 mm Länge. Diese ermöglichen die Probe mit einer Schrittweite von 5 µm horizontal zu positionieren. Beide Achsen können getrennt voneinander verfahren werden. Der frei programmierbare iMC-P Step-Controller ist über eine serielle Schnittstelle angebunden. Die zum Senden von Befehlen erforderliche Konfiguration ist Tabelle 4-5 zu entnehmen.

Tabelle 4-5: Konfiguration zum Senden von Befehlen an den Kreuztisch via serielle Schnittstelle.

Parameter	Wert
COM-Port Nummer	7 (vom PC abhängig)
Symbolrate	19200 Baud
Daten-Bits	8
Stop-Bits	1
Paritäts-Bit	no parity

Die Befehle, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 4-6 aufgelistet. Bei der relativen und der absoluten Bewegung müssen die Werte für vertikale Position x_1 , horizontale Position x_2 , vertikale Verfahrgeschwindigkeit v_1 und horizontale Verfahrgeschwindigkeit v_2 eingesetzt werden.

Tabelle 4-6: Liste der genutzten Befehle zur Steuerung des Kreuztisches.

Parameter	Befehl
Achsenanzahl setzen	@03
Fahrt zur Referenzposition	@0R3
Relative Bewegung	@0A x_1, v_1, x_2, v_2
Absolute Bewegung	@0M x_1, v_1, x_2, v_2
Abfrage der aktuellen Position	@0P

Bei den Einheiten der Positionen handelt es sich um „Schritte“, bei den Geschwindigkeiten um „Schritte pro Sekunde“. Ein Schritt entspricht 5 µm und ist die

kleinste Einheit, um die eine Achse von dem Schrittmotor verfahren werden kann. Die Position darf den Wert „0“ erhalten, die Geschwindigkeiten müssen immer größer als „0“ sein. Es sind nur ganze Zahlen zulässig. Ein positiver Wert für x_1 entspricht einer Bewegung nach hinten und führt bei x_2 zu einer Bewegung nach rechts. Die Orientierung der Achsen ist in Abbildung 4-6 zu sehen. Der Befehl zur Abfrage der aktuellen Position liefert eine Zeichenkette im Format „XXXXXXYYYYZZZZZZ“. Die ersten 6 Zeichen geben die Position in x_1 Richtung, die zweiten 6 Zeichen die Position in x_2 Richtung als Hexadezimalzahl wieder. Für eine Interpretation der Schritte müssen diese in Dezimalzahlen umgewandelt werden, beispielsweise mit dem „Windows Taschenrechner“. Die letzten 6 Zeichen enthalten immer 000000, da eine dritte Achse nicht vorhanden ist.



Abbildung 4-6: Kreuztisch mit Ausrichtung der beiden Achsen

Nach dem Herstellen der Stromversorgung muss zunächst die Achsenanzahl gesetzt werden. Die Steuerung des Filters ist ebenfalls von der Software „NIS Elements“ aus möglich und kann daher in Makros verwendet werden.

4.2.6 Fokus zur Einstellung des Probenabstands in vertikaler Richtung

Um das Bild für die Aufnahme scharfstellen zu können, ist das Modul aus Kamera, Farbfilter und Kollimator mit einer Lineareinheit mit Spindelführung verbunden und kann in Z-Richtung bewegt werden. Die Einstellung erfolgt motorisch mit einem Schrittmotor oder manuell über ein Stellrad. Das Modul ist in Abbildung 4-7 dargestellt. Der Motor wird derzeit nicht genutzt, kann aber für eine (semi-) automatische Fokussierung eingesetzt werden.

Zum Fokussieren nutzt man die Live Ansicht in NIS-Elements mit einer möglichst kurzen Belichtungszeit. So können im Intensitätsbild Konturen erkannt und diese möglichst scharf eingestellt werden.

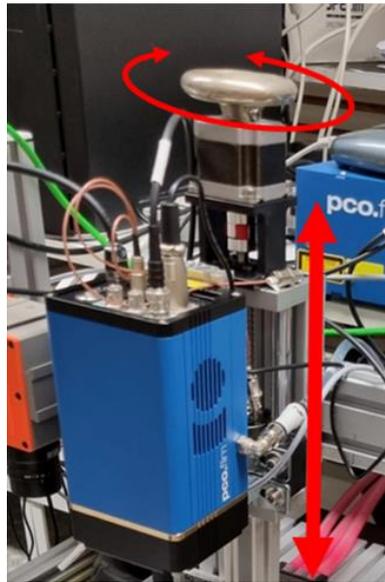


Abbildung 4-7: Stellrad zum Fokussieren der optischen Einheit.

4.3 Software

Die Bedienung des Versuchstands erfolgt über die Softwareplattform NIS-Elements AR der Fa. Nikon. Die Kennung AR steht für "Advanced Research" und beinhaltet ein Modul für die vollautomatische Bildaufzeichnung und eine Reihe leistungsstarker Analyse- und Visualisierungs-Tools. Die verwendete Version 5.42.02 wurde mit einem speziellen Treiber für die pco.flim erweitert. NIS-Elements lädt den Kamertreiber beim Start, konfiguriert die pco.flim und implementiert eine Reihe von FLIM-spezifischen Funktionen zur Kalibrierung, zur Messung und zur Darstellung von Fluoreszenzabklingzeiten. Für den UV-Laser bietet NIS-Elements kein spezielles Interface, so dass der Betrieb und die Konfiguration des Lasers über das Programm Omicron Control Center erfolgt.

Zur pco.flim gibt es die PCO Camera Control Software pco.camware in der Version 4.07. Man kann mit dieser Software die pco.flim bedienen und auch Bilder in Form von Rohdaten aufzeichnen. Diese Software kann keine Abklingzeiten ermitteln. Sie wurde unter anderem zur Fehlererkennung benutzt.

4.3.1 Bildaufnahme

NIS-Elements bietet die drei Betriebsmodi Live, Capture und Find. Der Find-Modus liefert ein fortlaufendes Intensitätsbild, um Objekte sichtbar zu machen. Der Live-Modus bestimmt fortlaufend die Abklingzeiten der einzelnen Bildpunkte und stellt Intensität, Phasenwinkel und Modulation sowie die daraus ermittelten Abklingzeiten nach Phase

und Modulation dar. Abbildung 4-8 zeigt beispielhaft die Messung der Fluoreszenzabklingzeit an einem PVC-Partikel mit einem 2 mm Laserstrahl.

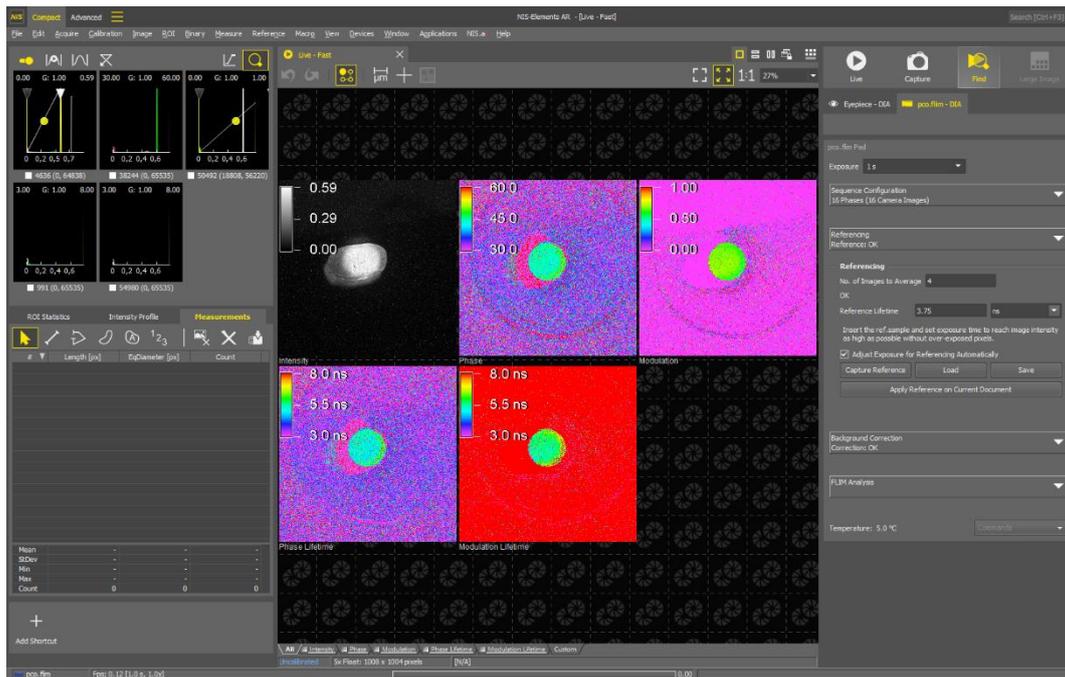


Abbildung 4-8: FLIM-Messung mit NIS-Elements (beispielhaft PVC-Partikel, ca. 2x3 mm)

Innerhalb des Laserpunkts liegt die Phase grob bei $45^\circ \pm 10^\circ$ und die Modulation bei etwa $0,5 \pm 0,3$. Außerhalb dieser Bereiche liefert der in NIS-Elements implementierte Auswertalgorithmus niedrige Abklingzeiten nach Phase und bis zu 333 ns nach Modulation. Dadurch erscheint in der Abbildung 4-9 die Modulation Lifetime außerhalb des Messflecks überwiegend rot.

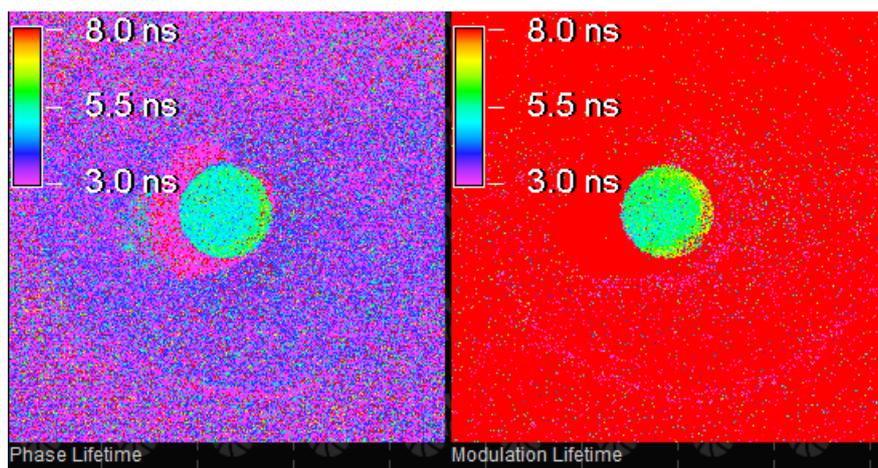


Abbildung 4-9: Ausschnittvergrößerung von FLIM-Messung mit NIS-Elements (beispielhaft PVC-Partikel, ca. 2x3 mm)

Innerhalb und außerhalb des Messflecks weisen die Abklingzeiten eine große Streuung auf. Ursachen hierfür sind das Signal-Rauschverhältnis der Kamera, die Güte der

Kalibrierung und die Korrektur des Dunkelstroms im Rahmen der Background Correction. Diese Punkte werden im Einzelnen näher erläutert.

Die fluoreszierenden Objekte treten deutlich hervor, wenn die Option Intensity Modulated Display die Abbildungen mit dem Intensitätsbild verknüpft, wie in Abbildung 4-10 dargestellt. Dies ermöglicht eine bessere Darstellung des Partikels.

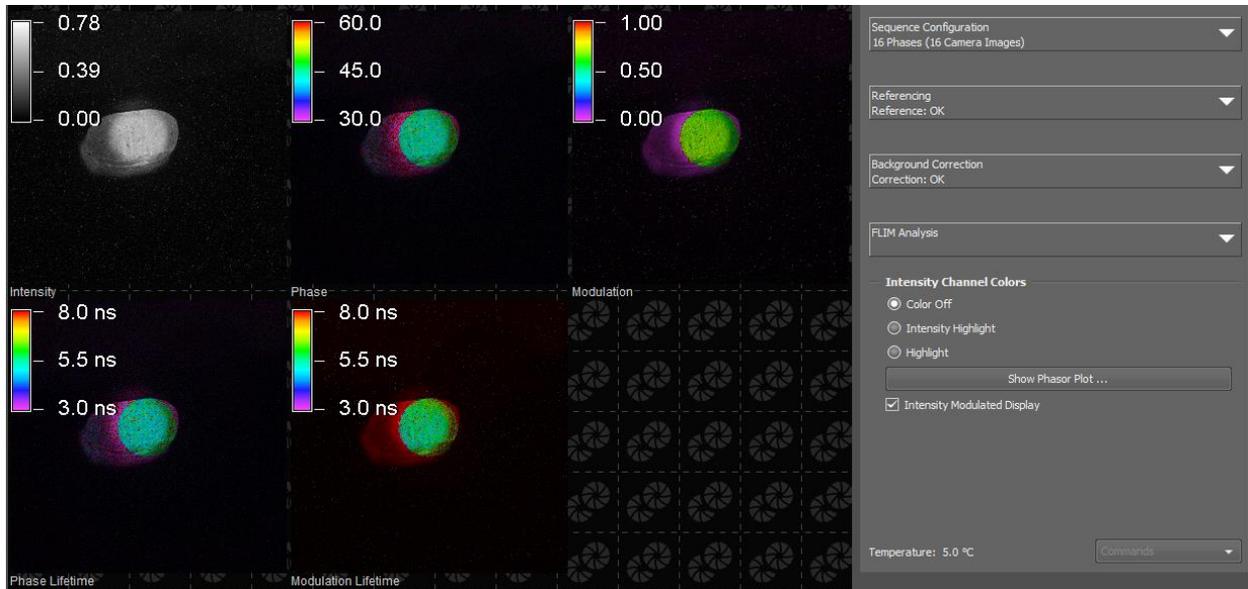


Abbildung 4-10: Darstellung mit der Option Intensity Modulated Display (beispielhaft PVC-Partikel, ca. 2x3 mm)

Mit einem Mausklick auf „Show Phasor Plot“ erscheinen die ermittelten Abklingzeiten als Phasenplot, wie Abbildung 4-11 beispielhaft zeigt. Die Darstellung ermöglicht eine erste visuelle Bewertung der durchgeführten Messung. Die Punkte sollten sich, wie abgebildet, nahe am Einheitskreis konzentrieren. Die Abklingzeit liegt hier im Bereich von 5,3 ns.

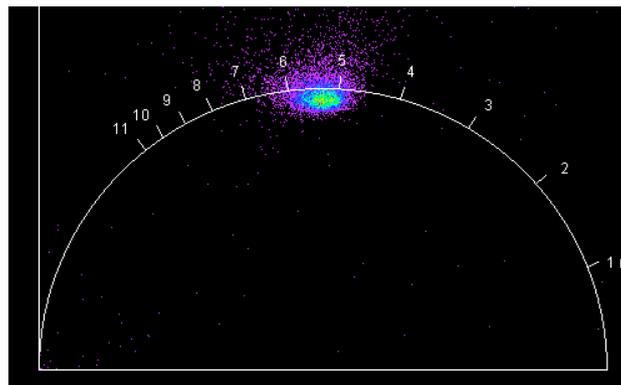


Abbildung 4-11: Lifetime Phasor Plot (beispielhaft PVC-Partikel, ca. 2x3 mm)

Die Abbildung 4-12 illustriert die Einstellmöglichkeiten in der Maske zur pco.flim. Die Funktionen ermöglichen die Konfiguration der Kamera, die Kalibrierung der FLIM-Messung (Referencing) und die Einstellung der Dunkelstromkorrektur (Background Correction).

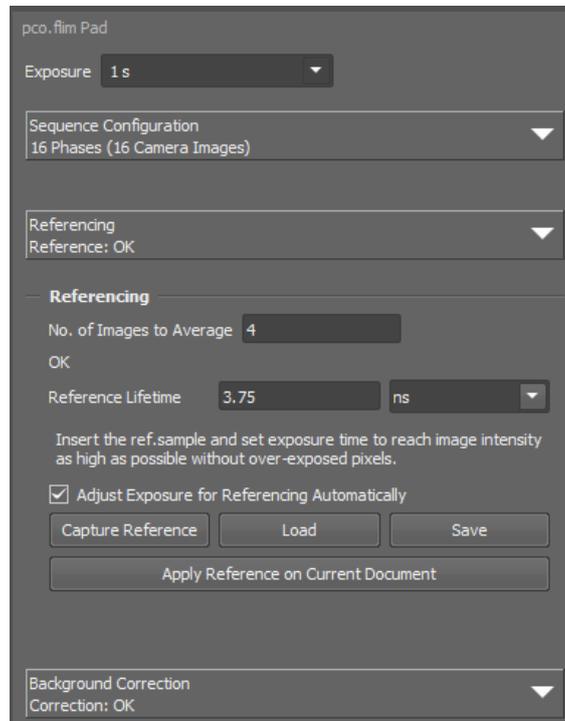


Abbildung 4-12: Maske mit Einstellungen pco.flm

Als Referenz dient in diesem Beispiel die Kalibriervorlage UMM-SFG. Es handelt sich um einen von PCO vermessenen, grünen Fluoreszenzstandard mit einer mittleren Fluoreszenzabklingzeit von 3,75 ns, wie in Abbildung 4-13 dargestellt. Diese wurde im Rahmen des Projektes für die Kalibrierung und als Referenzprobe beschafft.

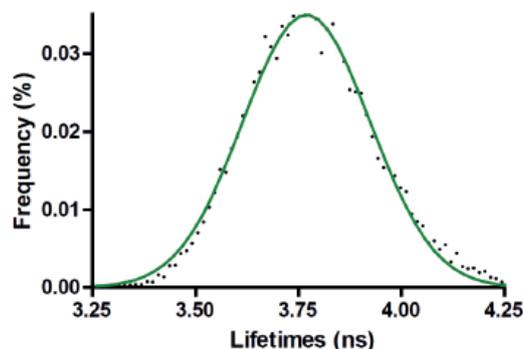


Abbildung 4-13: Kalibriervorlage UMM-SFG mit einer mittleren Fluoreszenzabklingzeit von 3,75 ns

Wichtig ist die aktivierte Background Correction, die für jeden Pixel der Kamera den Dunkelstrom ermittelt und die Intensitätssignale im Rohbild entsprechen kompensiert. Ein eigener Abschnitt widmet sich den Problemen der hier realisierten Background Correction.

4.3.2 Bilddatenverarbeitung

Die Methode Capture von NIS-Elements löst eine FLIM-Messung aus. Dabei wird eine Sequenz von Bildpaaren (Tap A und B) bei unterschiedlicher Phasenlage zur getakten Beleuchtung aufgenommen und ausgewertet. Der Auswertalgorithmus ist in der

Routine verborgen. Zuerst kompensiert die Background Correction den Dunkelstrom der Kamerapixel als Funktion der Belichtungszeit. Das Ergebnis wird als Intensitätsbild gezeigt. Anschließend wertet die Routine die Sequenz der Bildpaare aus, um die Phasenlage und die Modulation der einzelnen Pixel zu ermitteln und darzustellen. Abbildung 4-8 zeigt beispielhaft in der oberen Bilderreihe die Intensität, die Phasen und die Modulation. In der unteren Reihe sind die daraus ermittelten Abklingzeiten Phase Lifetime und Modulation Lifetime abgebildet. Die Abklingzeiten ergeben sich unter Zuhilfenahme der hinterlegten Referenzmessung.

Als Ausgangspunkt für die weitere Auswertung liefert die Methode Capture die fünf Ergebnisbilder Intensity, Phase, Modulation, Phase Lifetime und Modulation Lifetime. Die Ergebnisbilder lassen sich in NIS-Elements weiterverarbeiten und zur Dokumentation oder für eine externe Analyse abspeichern. Zentrale Elemente der Weiterverarbeitung sind:

- Outlier Detection: Erkennung und Entfernung von Ausreißern,
- Filterung zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses,
- Segmentierung zur Abgrenzung zwischen Partikeln und Hintergrund,
- Labeling: Partikel durchnummerieren bzw. registrieren,
- Bildpunkte registrierter Partikel isolieren und statistisch auswerten,
- Listen von Partikeln erstellen mit Intensity, Phase Lifetime und Modulation Lifetime.

Die Eigenschaften Intensity, Phase Lifetime und Modulation Lifetime hängen von äußeren Rahmenbedingungen wie z. B. von der eingestellten Wellenlänge des elektrisch durchstimbaren Farbfilters ab. Die gezielte Variation der Randbedingungen erfolgt mit Hilfe eines Programms, das die Komponenten des Messaufbaus steuert.

4.3.2.1 Outlier Detection

Die Erkennung von Ausreißern erfolgt hier mittels einer Plausibilitätsprüfung. Für die Ergebnisbilder wurden die in Tabelle 4-7 gelisteten Grenzen festgelegt.

Tabelle 4-7: Bewährte Einstellungen für die Plausibilitätsprüfung von Bildpunkten

Parameter	Untergrenze	Obergrenze	Bemerkung
Intensity	10 %	70 %	Unter- und Übersteuerung vermeiden
Phase	30°	60°	Arbeitspunkt liegt bei 45°
Modulation	50 %	90 %	Parameter für Beleuchtungskontrolle
Phase / Modul. Lifetime	2 ns	8 ns	Typ. Arbeitsbereich für die Abklingzeit insbesondere beim Anfärben mit Nilrot
Dunkelwert	64	8192	Intensität 0...65535, 2 s Belichtungszeit

Pixel außerhalb der eingestellten Grenzen werden als Ausreißer markiert. Ein entsprechender Wert wird mit der Kennung NaN für „Not a Number“ markiert. Geeignete bildanalytische Routinen und Filter behandeln NaN-Werte als Fehlstellen und blenden diese Bildpunkte bei den Berechnungen aus. Abhängig von der Zielstellung macht es Sinn, einzelne Kriterien für die Erkennung von Ausreißern logisch zu kombinieren.

In diesem Kontext sei erwähnt, dass einige Kamerapixel einen hohen Dunkelstrom aufweisen, den die Background Correction nicht oder nur schlecht kompensiert. Deshalb werden Pixel mit hohem Dunkelwert ebenfalls markiert, um daraus resultierende Messfehler auszublenden. Dazu wurde der Dunkelstrom als Intensität bei einer Belichtungszeit von 2 s erfasst und als Bild hinterlegt.

4.3.2.2 Bildanalytische Filter

Mit Hilfe eines Tiefpass-Filters lässt sich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern. Als linearer Filter kommt ein Mean-Filter in Frage, der den jeweiligen Bildpunkt durch den Mittelwert der Nachbarpixel im gegebenen Umkreis ersetzt. Da jeder einzelne Wert gleichermaßen in den Mittelwert eingeht, verfälschen Gradienten und fehlende Werte das Ergebnis. Daher kommt in dieser Anwendung stattdessen ein Median-Filter zum Einsatz. Dieser nichtlineare Filter ist robuster gegenüber fehlenden Werten und extremen Schwankungen, da der jeweilige Pixel durch den Zentralwert der Nachbarpixel ersetzt wird. Die Nachbarschaft ist hier mit einem Radius von 5 Pixeln d. h. 50 μm festgelegt. Der Median ermöglicht diesen relativ großen Umkreis, da die Gefahr, dass ein benachbartes Partikel einen Anteil von mehr als 50 % einnimmt, gering ist. Die Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses liegt bei Faktor 9. Der Median-Filter brückt vereinzelte Fehlstellen. Fehlstellen mit über 100 μm \varnothing bleiben allerdings erhalten.

4.3.2.3 Segmentierung und Labeling

Um Objekte in einem Bild zu erkennen, müssen diese vom Bildhintergrund isoliert werden. Im vorliegenden Fall sind die Eigenschaften des Probenträgers besser bekannt als die der Partikel. Daher macht es Sinn, zunächst die Bildpunkte des Hintergrunds zu selektieren. Anschließend muss der Algorithmus die Objekte im Bild trennen und registrieren. Diese Aufgabe ist nicht trivial, da die Fluoreszenz der Partikel von der Wellenlänge abhängt. Das bedeutet, dass die Intensitätsbilder als Funktion des Farbfilters zu betrachten sind. Bei einer Schrittweite von 10 nm und einem Wellenlängenbereich von 450 nm bis 720 nm ergibt sich Spektrum aus 28 Einzelbildern, welche sinnvollerweise als ein Stack von Intensitätsbildern verarbeitet werden.

Nicht fluoreszierende Anteile des Hintergrunds d. h. von Probenhalter und Partikelunterlage lassen sich im Maximum des Stacks von Intensitätsbildern als dunkle Stellen erkennen. Da das Maximum eines Bildpunkts über alle Wellenlängen gebildet wird, erscheinen alle fluoreszierenden Anteile als helle Bereiche. Sollten sich in der Unterlage bzw. im Objektträger fluoreszierende Anteile, wie z. B. optische aufgehellte Fasern aus Papieren befinden, so sind diese anhand ihres Spektrums separat zu erfassen und dem Hintergrund zuzuordnen. Alle Pixel des Bildhintergrunds bilden eine Maske, mit der störende Bereiche ausgeblendet werden.

Das bereinigte Stack von Intensitätsbildern bildet den Ausgangspunkt zur Registrierung von Partikeln. Die wellenlängenabhängige Fluoreszenz lässt Objekte in der Tiefe des Stacks erscheinen und wieder verschwinden. Im Maximumbild des Stacks erscheinen alle Objekte mit ihrer höchsten Fluoreszenz. Für die automatisierte Auswertung ohne die sonst notwendige Bestimmung individueller Schwellenwerte, nutzt das Programm die Funktion Auto Threshold von ImageJ mit der Option Huang Algorithmus. Letzter erwies sich für diesen Anwendungsfall als besonders effektiv. Manche Algorithmen, wie z. B. „Shanbhag“, „Minimum“ oder „Intermodes“, zeigten Probleme die Partikel zu erkennen. Andere Algorithmen, wie z. B. „IsoData“, „Li“, „MaxEntropy“, „Moments“, „Otsu“, „RenyiEntropy“ oder „Yen“, bereiten die unterschiedlichen Grautöne in größeren Objekten Schwierigkeiten. Auch bezüglich des Bereichs um die Partikel zeigt der Huang Algorithmus Vorteile gegenüber den Algorithmen „Default“, „Li“, „IsoData“, „Mean“, „MinError“, „Percentile“ oder „Triangle“.

Die mittels Segmentierung erstellte Maske bildet alle erfassten Partikel ab. Die verbundenen Komponenten dieser Maske lassen sich mit der bildanalytischen Funktion Labeling durchnummerieren. Damit bekommt jedes Objekt bzw. Partikel eine eindeutige Kennung zugeordnet.

4.3.2.4 Bildpunkte registrierter Partikel verarbeiten

Mit Hilfe der Maske durchnummerierter Objekte lassen sich die Bildpunkte sämtlicher Ergebnisbilder den erfassten Partikeln eindeutig zuordnen. Aus der Maske selbst erschließt sich die Fläche jedes Partikels über die Summe von Bildpunkten mit der gleichen Kennung. Um das Fluoreszenzspektrum von Partikeln zu erhalten, verknüpft man die Maske als „Region of Interest“ (ROI) bildanalytisch mit dem Stack der Intensitäten und lässt sich die Mittelwerte für die gemessenen Wellenlängen ausgeben. Gleichermaßen verfährt man mit den anderen Stacks, um die spektralen Werte z. B. für Phase Lifetime und Modulation Lifetime zu erhalten. Neben den Mittelwerten lassen sich auch statistische Größen, wie Standardabweichung, Minimum, Maximum etc. ausgeben.

Die Funktion Analyze Particles von ImageJ kann die Partikel anhand der durch die Segmentierung erzeugten Maske detektieren und auch vermessen. Dabei kann auch der Größenbereich eingegrenzt werden. Um kleine Partikel auszublenden, wurde hier als untere Grenze 1000 μm^2 gewählt, was einem flächengleichen Durchmesser von 35 μm entspricht. Für die Vermessung wurden die in Tabelle 4-8 aufgelisteten Parameter ausgewählt.

Tabelle 4-8: Ausgewählte Parameter der Partikelanalyse

Parameter	Beschreibung
Label	Beinhaltet Bildnamen, Partikel-ID und Slice Nummer
Area	Größe des Partikels in μm^2
Mean	Arithmetischer Mittelwert aller Grauwerte im Partikelbereich
StdDev	Standardabweichung bei der Bildung des arithmetischen Mittelwertes
Mode	Der häufigste Grauwert im Partikelbereich
Min/Max	Minimum und Maximum der Grauwerte im Partikelbereich
Perim	Perimeter d. h. Umfang des Partikelbereichs
Circ	Maß für die Kreisförmigkeit des Partikels, $Circ = 4\pi \cdot Area / Perim^2$, 1 entspricht einem perfekten Kreis, je kleiner der Wert, desto länglicher die Form.
Median	Median aller Grauwerte im Partikelbereich
Slice	Nummer des Slices, entspricht dem Index der Wellenlänge, bei der die Aufnahme erstellt wurde
AR	Aspect Ratio, Verhältnis von großer zu kleiner Halbachse einer gefitteten Ellipse um die Partikelkontur
Round	Der Kehrwert von AR
Solidity	Verhältnis der Größe des Partikels zu der Größe seiner konvexen Hülle

Die Liste mit den aus den Intensitätsbildern ermittelten Partikeleigenschaften wird als Textdatei für die weitere Verarbeitung zwischengespeichert.

4.3.2.5 Listen von Partikeln erstellen

Die Liste mit den in Tabelle 4-8 dargestellten Parametern liefert hinreichende Informationen für die morphologische Charakterisierung von Partikeln. Damit lässt sich sofort Partikelanzahl, -fläche und Partikelgrößenverteilung berechnen.

Die Algorithmen zur Materialerkennung, wie die Fluoreszenzmethode A – FLIM und die Fluoreszenzmethode B – Adaptiver Farbfilter, benötigen spektrale Daten von Intensity, Phase Lifetime und Modulation Lifetime. Das Fluoreszenzspektrum von Partikeln lässt sich dadurch erzeugen, dass man mit Hilfe der vorhandenen Maske im Stapel von Intensitätsbildern die Partikel selektiert und die Eigenschaften Mean über alle Wellenlängen ermittelt. Die bestehende Liste mit Partikeldaten wird anschließend um dieses Intensitätsspektrum ergänzt. Analog wird die Liste mit Spektren von Phase Lifetime und Modulation Lifetime erweitert. Die Standardabweichung der spektralen Werte sollten mit abgespeichert werden. Sie helfen bei der Selektion und der Darstellung von Daten. Mit der um diese Information erweiterten Liste endet der bildanalytische Teil.

4.3.3 Steuerungsprogramm

Die Bildaufnahme erfordert zwingend auch die Kontrolle der peripheren Komponenten des Messaufbaus. Für die spektrale Messung muss der Farbfilter durchgestimmt werden. Dazu muss das Steuerungsprogramm entsprechende Befehle an den Filter senden, Messungen auslösen und deren Ergebnisse als spektrale Daten zusammenfassen. Darüber hinaus muss die Probe verfahren werden, um größere Flächen zu vermessen. Abbildung 4-14 illustrierte die Positionierung und das Erstellen spektrale Messungen.

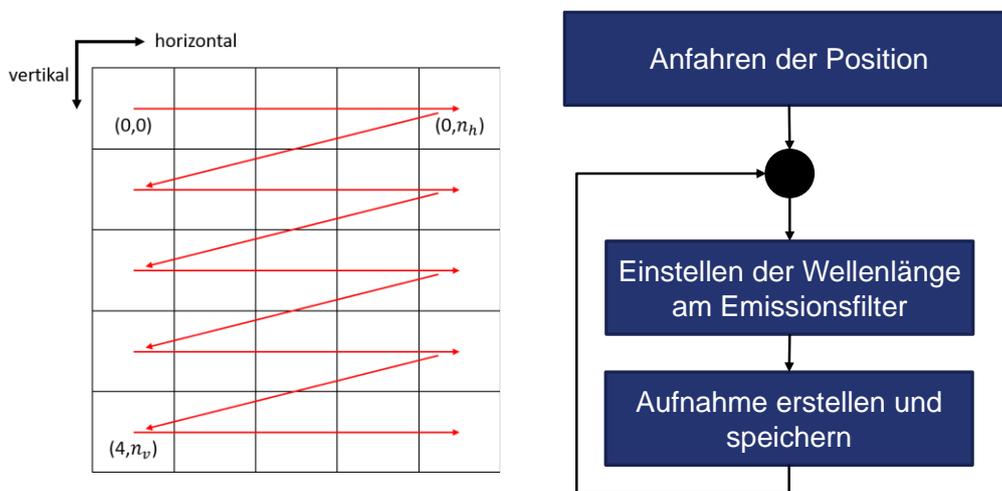


Abbildung 4-14: Schema der Aufnahmeprozesses

Die Größe des Probenträgers reicht von 1 cm x 1 cm für Siliziumwaver bis zum Durchmesser von 20 cm Ø bei Laborblättern. Die Steuerung verfährt dazu den Kreuztisch zwischen 2 mm (kleinste Beleuchtung) und 10 mm (Messfeld). Die kleinstmögliche Schrittweite beträgt 5 µm. Durch Wahl eines kleineren Vorschubs, erreicht man eine mehr oder weniger starke Überlappung der Bilder. Ein halber Vorschub in beiden Richtungen führt jeweils zu einer 50-prozentigen Überlappung der Bilder und damit zur eine Vierfachbestimmung. Das Programm scannt entsprechend der Parameter

in Tabelle 4-9 die Probe ab, löst an jeder Position spektrale Messungen aus, setzt die Teilbilder zu einem großen Bild zusammen und wertet überlappende Bildbereiche aus. Das Zusammenführen von Teilbildern, das sogenannte Stitching, ermöglicht das Segmentieren und das Labeln von Partikeln, welche über Teilbilder hinausragen.

Tabelle 4-9: Parameter zur Steuerung der automatisierten Bildaufnahme

Parameter	Bemerkung
λ_{min}	Kleinste Wellenlänge für die Variation des Farbfilters
λ_{max}	Größte Wellenlänge für die Variation des Farbfilters
$\Delta\lambda$	Schrittweite zwischen zwei Wellenlängen
x_{start}	Koordinate der oberen linken Ecke als Tupel (x_1, x_2)
x_{end}	Koordinate der rechten unteren Ecke als Tupel (x_1, x_2)
Δx	Schrittweite ($\Delta x_1, \Delta x_2$)

Die Routine legt eine Ordnerstruktur an, um die von NIS-Elements erzeugten Ergebnisbilder d. h. Teilbilder für Intensity, Phase, Modulation, Phase Lifetime und Modulation Lifetime für die jeweilige Position des Kreuztisches und der am Filter eingestellten Wellenlänge abzuspeichern. Für jede gemessene Wellenlänge gibt es einen Ordner. In diesem Unterverzeichnis ist für jede Messposition ein Satz Ergebnisbilder als TIF-Datei abgelegt, wie in Abbildung 4-15 dargestellt. Die Messposition ergibt sich aus n_h und n_v .

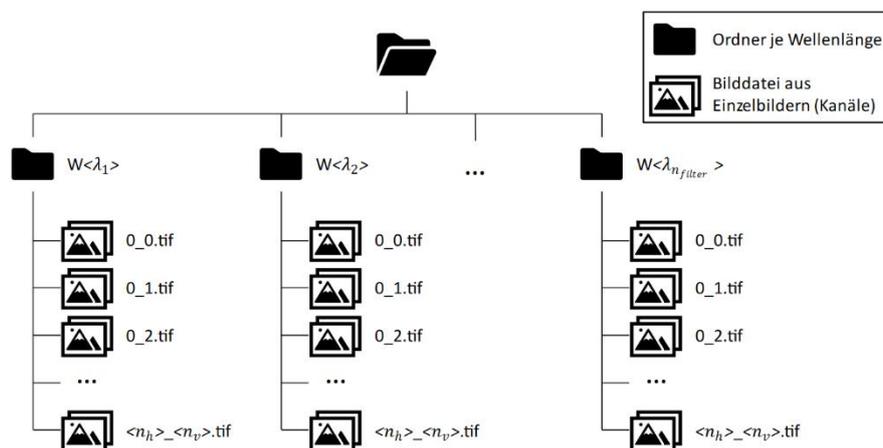


Abbildung 4-15: Ordnerstruktur der einzelnen Bilddateien nach dem Aufnahmeprozess.

Das Sticking der Teilergebnisse speichert die zusammengesetzten Ergebnisbilder als spektrale Bilderstapel (Stack) in einem separaten Unterverzeichnis, wie Abbildung 4-16 veranschaulicht. So liegen im Stack intensity.tif die Intensitätsbilder der einzelnen Wellenlängen als dritte Dimension übereinander. Dieser Bearbeitungsschritt erleichtert die weitere Bildanalyse.

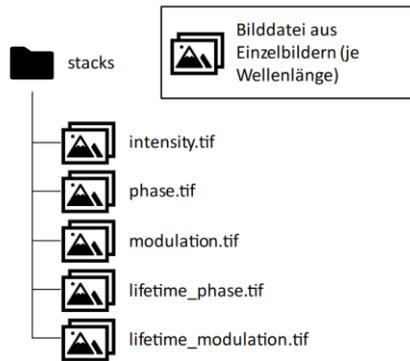


Abbildung 4-16: Ergebnis des Bearbeitungsprozesses

Der Algorithmus zur Segmentierung und Labeling greift auf diese spektralen Bilderstapel zu. Die daraus erzeugte Liste von Partikeln findet sich im Wurzelverzeichnis der Messung. Beide Auswertemethoden, die Fluoreszenzmethode A – FLIM und die Fluoreszenzmethode B – Adaptiver Farbfilter, haben Zugriff auf die Dateien der Ordnerstruktur.

4.4 Bestimmung von Partikelgrößen

Das Messprogramm erzeugt eine Liste mit Eigenschaften segmentierter Partikel. Der Parameter Area weist die Fläche des Partikels in μm^2 aus. Anhand der Partikelfläche lässt sich dessen flächengleiche Durchmesser berechnen. Über alle erfassten Partikel ergibt sich die Gesamtfläche und die Partikelgrößenverteilung. Für Statistiken hinsichtlich Kunststoffart bedarf es deren Zuordnung mittels der Fluoreszenzmethode A – FLIM oder Fluoreszenzmethode B – Adaptiver Farbfilter.

Die Validierung der Partikelgrößenbestimmung erfolgte mit Nilrot angefärbten Kunststoffpartikeln zweier Partikelsorten unterschiedlicher Größenbereiche.

Dazu werden 0,05 g Nilrot-Pigmente in 74,95 g Ethanol gelöst. Abbildung 4-17 zeigt die Prozedur für 20 mg PVC-Partikel in einem Reagenzglas (1), welche mit 20 mg der Nilrot-Lösung versetzt (2) und nach einer Einwirkzeit von 10 min mit demineralisiertem Wasser aufgeschwemmt (3) und auf Papiertücher überführt (4) und getrocknet werden.

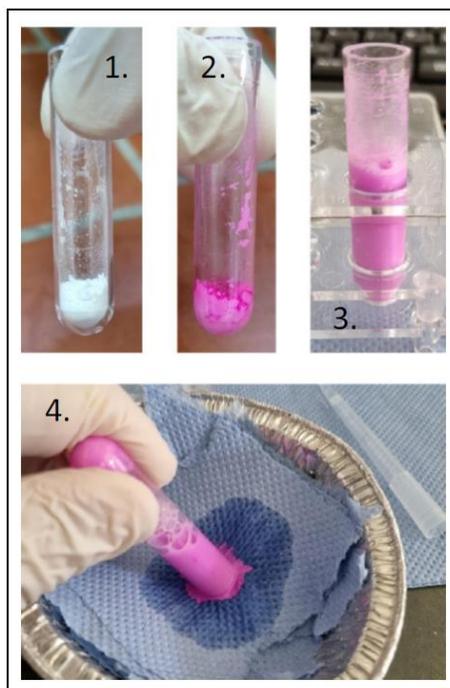


Abbildung 4-17: Anfarbeprozess von Kunststoffpartikeln mit Nilrot.

Derart angefarbte Partikel liefern deutlich stärkere Intensitätssignale und damit die Voraussetzung für eine Auswertung der Partikelgrößenverteilung

Die Gruppe der kleinen Partikel besteht aus PVC mit einer mittleren Größe von 40 μm . Partikel aus LDPE mit einer mittleren Größe von 300 μm repräsentieren die Gruppe größerer Kunststoffpartikel. Die PVC-Partikel liegen im Größenbereich, die das Messsystem erkennen soll. Die beiden Partikelsorten wurden auf einer Glasfläche verteilt und auf einen schwarzen Karton als Probenträger durch Abgautschen übertragen.

Zur Beurteilung der Flächenbestimmung wurden die Aufnahmen der Messapparatur mit denen eines Mikroskops verglichen. Die Referenzaufnahmen erfolgten mit dem Keyence Digital Microscope VHX-600. Die Aufnahmen beider Systeme wurden gleichermaßen aus Teilbildern zusammengesetzt (Stitching) und das jeweilige Gesamtbild segmentiert und analysiert. Abbildung 4-18 zeigt die beiden Intensitätsbilder zur Validierung der Partikelgrößenbestimmung.

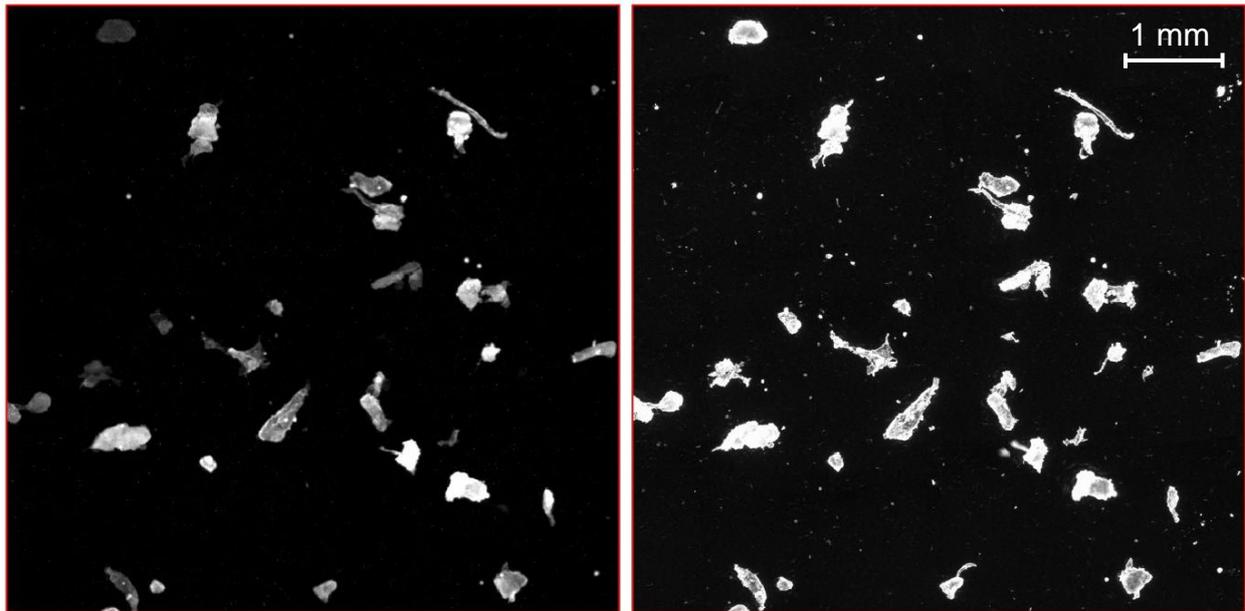
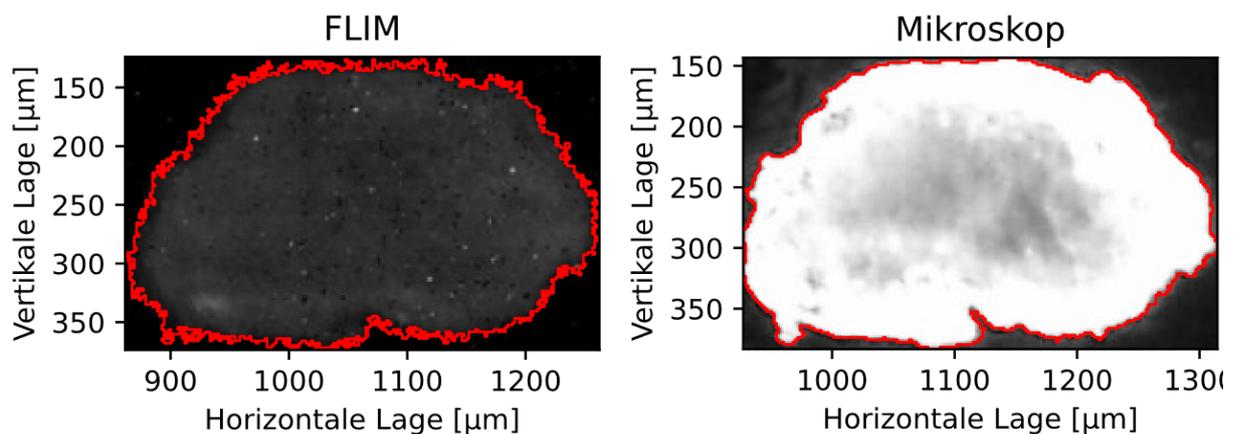


Abbildung 4-18: Links das Bild des Messapparatur, rechts das mit dem Mikroskop erstelle Bild.

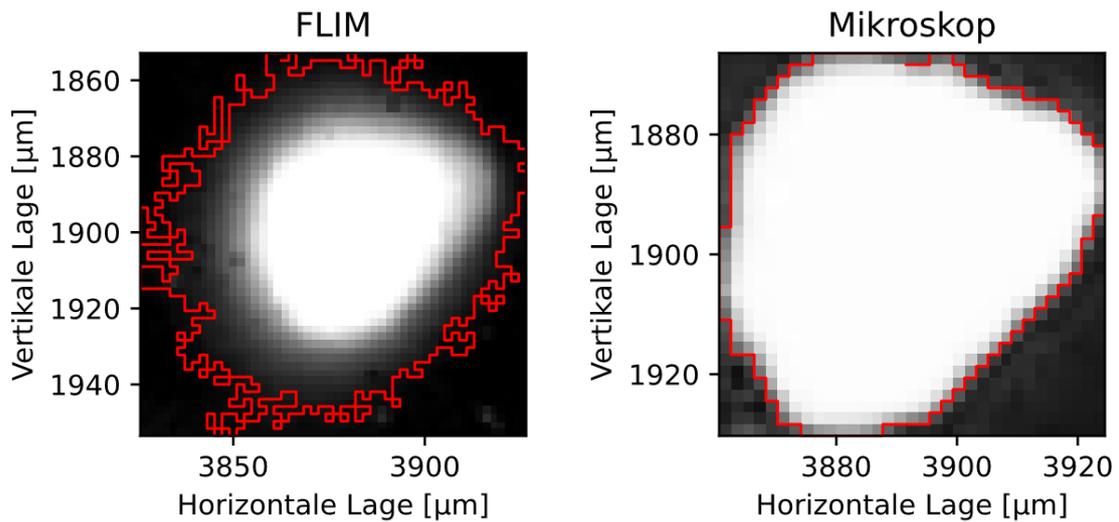
In dem Bild der Messapparatur wurden 48 Partikel mit einer Fläche über $1000 \mu\text{m}^2$ erkannt und im Referenzbild 52 Partikel. Abbildung 4-19 zeigt ein Partikel, das trotz des erheblichen Unterschieds in der Intensität von beiden Systemen gut erkannt wurde. Die Abweichung im Flächenwert beträgt lediglich 0,2 %. Bei allen Bildern des FLIM-Aufbaus zeigten die untersuchten Partikeln deutlich ausgefranste Konturen. Dies deutet auf eine Störung durch lokale Unterschiede zwischen den Bildpunkten hin.



	FLIM	Mikroskop	Verhältnis
ID	53	1	-
Fläche	72504.884	72664.979	0.998

Abbildung 4-19: Beispiel für Partikel mit sehr guter Übereinstimmung (LDPE; ca. $300 \mu\text{m}$)

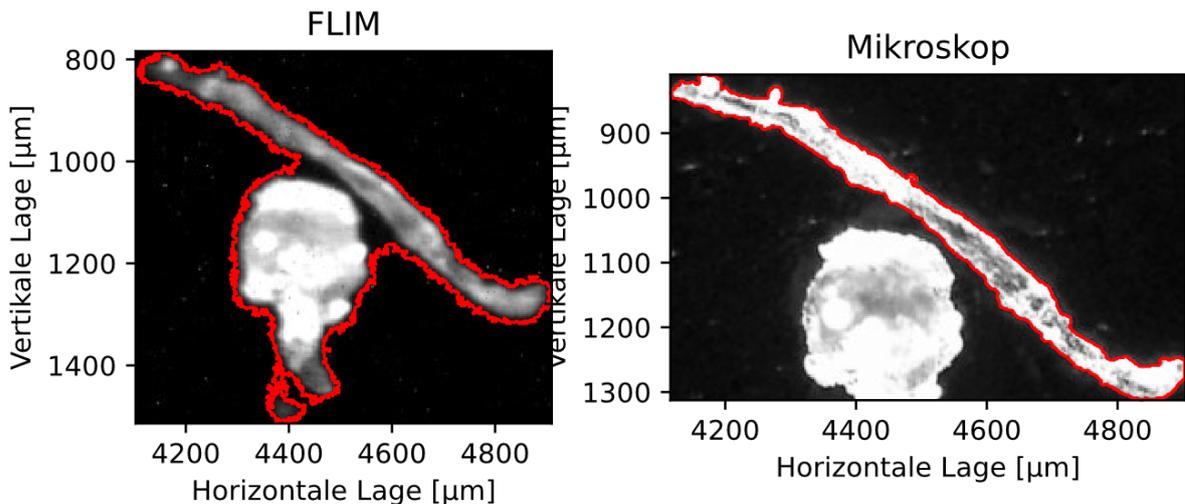
Bei kleinen Partikeln kann es vereinzelt zu Problemen bei der Schwellenwertsetzung kommen. Abbildung 4-20 zeigt ein Beispiel, bei dem die Fläche gegenüber der Referenz doppelt so groß ist.



	FLIM	Mikroskop	Verhältnis
ID	65	16	-
Fläche	6381.1	3066.286	2.081

Abbildung 4-20: Beispiel für ein kleines Partikel mit Segmentierungsproblem (PVC; ca. 50 µm)

Die Bildqualität beeinflusst die automatische Schwellenwertsetzung, so dass es Fehler bei der Trennung von Objekten geben kann, wie in Abbildung 4-21 für das Bild des FLIM-Systems zu sehen ist. Ggf. kann die Trennsicherheit durch Auswertung spektraler Unterschiede verbessert werden.



	FLIM	Mikroskop	Verhältnis
ID	58	6	-
Fläche	147916.23	44180.007	3.348

Abbildung 4-21: Fehlgeschlagene Trennung von Bildobjekten beim FLIM-System

Die Analyse von Intensitätsbildern der Messapparatur und des Lichtmikroskops zeigt, dass die entwickelte Methode die Partikel auf dem Probeträger segmentiert und die zur Partikelgrößenbestimmung notwendigen Werte liefert. Der Vergleich beider Systeme zeigt aber auch, dass die Bildqualität insbesondere bei der Detektion kleiner Partikel die Messgenauigkeit entscheidend beeinflusst.

4.5 Fluoreszenzmethode A – FLIM

Im Folgenden werden die Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzmethode A – FLIM beleuchtet. Ausgangspunkt ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauer als Methode zur Identifikation von Mikroplastikpartikeln mit Hilfe des vorgestellten Messaufbaus. Die klassische Messmethode bestimmt die Abklingkurve der Fluoreszenz durch Integrieren von Intensitäten bzw. Photonen nach Abschalten der Anregung. Der apparative Aufwand zur Messung von Abklingzeiten im Bereich von 100 ps ist enorm, da die hierfür erforderliche Signalbandbreite im GHz-Bereich liegt. Alternativ dazu gibt es die Möglichkeit, mit Hilfe der hier eingesetzten speziellen FLIM-Kamera die lokale Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Emissionssignal zu messen. Durch die synchrone Modulation von Kamerapixeln und des anregenden Lichtes können mit dem System Abklingzeiten in einem breiten Intervall analysiert werden.

Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem kann das das Fluoreszenzsignal exakt rekonstruiert werden kann, wenn es mit der doppelten Frequenz erfasst wird. Dazu besitzt die FLIM-Kamera für jeden Bildpunkt zwei Ladungssammelstellen, die im Folgenden als Topf A und Topf B oder auch als Tap A und Tap B bezeichnet sind. Das Umschalten zwischen Tap A und B erfolgt mit einer einstellbaren Phasenlage zur Modulation des UV-Lasers. Abbildung 4-22 illustriert die Aufnahme der Intensitätsbilder I_1 und I_3 für 0° Phasenlage und I_2 und I_4 für 90° Phasenlage.

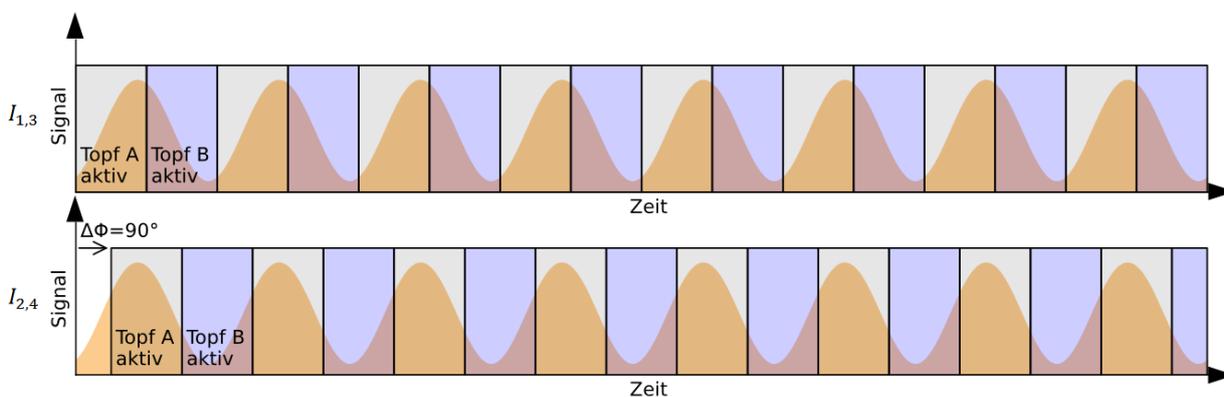


Abbildung 4-22: Erstellen von vier Einzelbildern I_1 , I_2 , I_3 und I_4 aufgeteilt in zwei Aufnahmen.

Da Tap B zu Tap A um 180° versetzt startet, entsprechen die Intensitätsbilder I_1 , I_2 , I_3 und I_4 im dargestellten Beispiel den Anteilen für die Phasenlagen 0° , 90° , 180° und 270° . Phasenverschiebung, Modulationsindex und Intensität des Emissionssignals ergeben sich aus den vier Intensitätswerten I_1 bis I_4 gemäß der Formeln 1, 2 und 3.

	$\Phi = \arctan\left(\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}\right)$	1
--	--	---

	$m_{em} = 2 \cdot \frac{\sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_4 - I_2)^2}}{I_1 + I_2 + I_3 + I_4}$	2
--	---	---

	$intensity = b_{em} = \frac{I_1 + I_2 + I_3 + I_4}{4}$	3
--	--	---

Zur Verbesserung der Messgenauigkeit lässt sich die Anzahl der Intensitätsbilder in NIS-Elements bis auf 16 erhöhen. Das entspricht 8 Aufnahmen mit jeweils Tap A und Tap B. NIS-Elements ermittelt daraus die 5 Ergebnisbilder Intensity, Phase, Modulation, Phase Lifetime und Modulation Lifetime.

Die Möglichkeiten der FLIM-Messung wurde an folgenden Kunststoffarten getestet:

- Polyethylen (HDPE und LDPE),
- Polyvinylchlorid (PVC),
- Polypropylen (PP),
- Polyurethan (PU),
- Polyamid (PA6).

Selbst bei maximaler Belichtungszeit und auf Emissionswellenlänge eingestelltem Farbfilter konnten nur sehr schwache Fluoreszenzsignale detektiert werden. Die Intensitäten lagen im Bereich von 2 % des Messbereichs der Kamera. Die Vermutung, dass ein UV-Laser mit 405 nm statt 395 nm eine deutlich höhere Fluoreszenz induziert, konnte durch Versuche widerlegt werden.

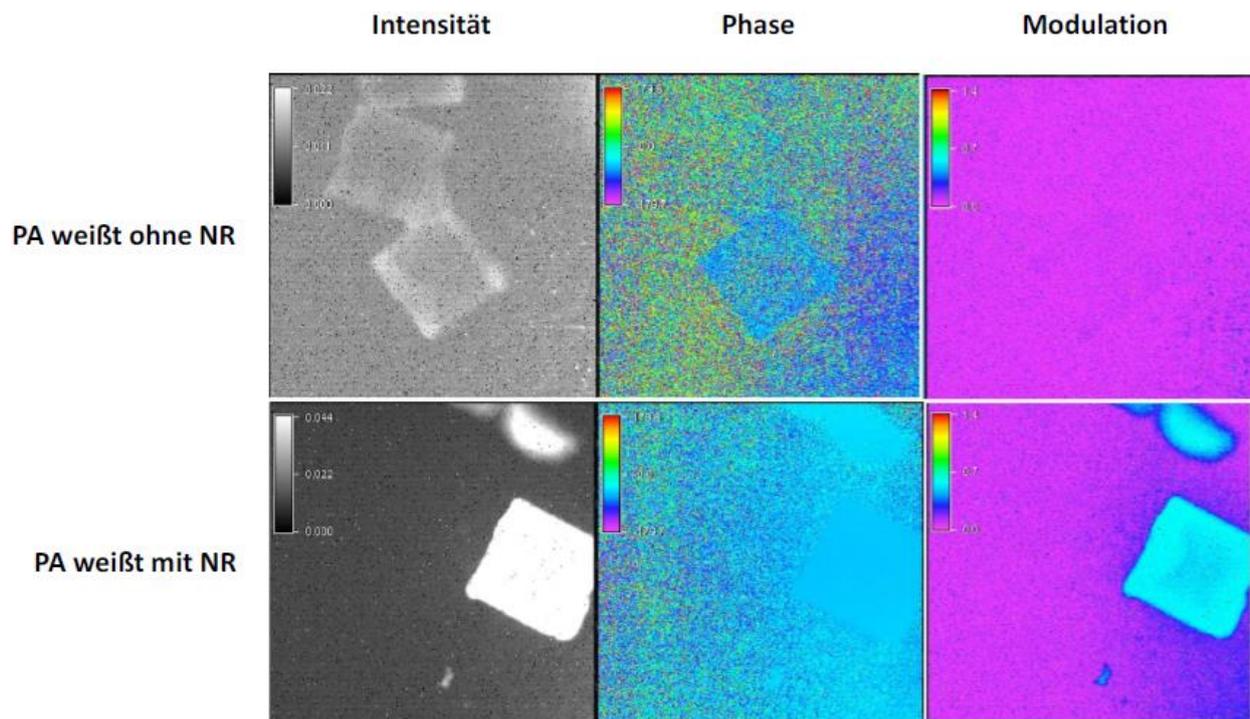


Abbildung 4-23: Aufnahmen weißer PA-Partikel, oben ungefärbt und unten mit Nilrot angefärbt.

Ohne ausreichendes Fluoreszenzsignal lässt sich keine Abklingzeit bestimmen, wie Abbildung 4-24 illustriert. Daher wurden die Mikroplastikpartikel, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, angefärbt. Aber auch die mit Hilfe von Nilrot fluoreszierenden PVC-, PA- und LDPE-Partikel erzeugen in dem Beispiel keine eindeutigen Abklingzeiten. So liegt die Abklingzeit bei LDPE zwischen 0,3 und 3,5 ns. Bei dem PVC-Partikel geht der Bereich von etwa 1,5 bis 4,0 ns. Dabei sollten die Materialien einheitliche Abklingzeiten besitzen.

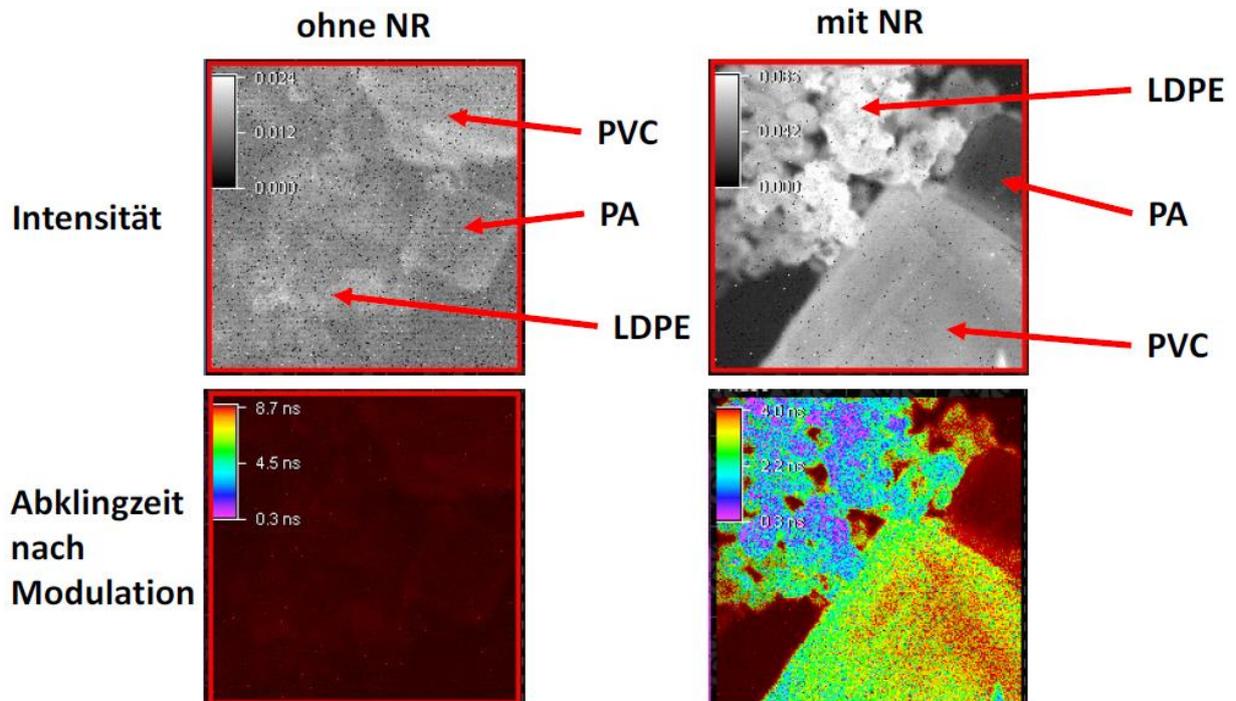


Abbildung 4-24: Intensität und Abklingzeit von PVC-, PA- und LDPE-Partikeln ohne und mit Nilrot.

Die betrachteten Kunststoffarten lieferten ohne Anfärbung kein hinreichendes Fluoreszenzsignal. Polyurethan, Polyamid und Polyvinylchlorid lassen sich besonders gut anfärben. Die Tabelle 4-10 listet die graduellen Unterschiede.

Tabelle 4-10: Fluoreszenz getesteter Kunststoffarten

Kunststoffart	Fluoreszenz ohne NR	Fluoreszenz mit NR
Polyethylen (PE)	-	+
Polypropylen (PP)	-	+
Polyurethan (PU)	-	++
Polyamid (PA)	-	++
Polyvinylchlorid (PVC)	-	++
Polystyrol (PS)	-	+
Poly lactide (PLA)	-	+

Ein Algorithmus zur Identifizierung von Kunststoffen auf der Basis von Fluoreszenzabklingzeiten benötigt eine Materialdatenbank mit eindeutigen und verlässlich reproduzierbaren Werten. Dies konnte mit der Messapparatur nicht erreicht

werden. Zur Diagnose und zur Eingrenzung der Messproblematik wurden die FLIM-Kamera und die Bildverarbeitung durch NIS-Elements genauer untersucht.

Als mögliche Ursachen für die große Streuung der Abklingzeiten kommen das Signal-Rauschverhältnis der Kamera, die Güte der Kalibrierung und die Korrektur des Dunkelstroms im Rahmen der Background Correction in Frage.

4.5.1 Signal-Rauschverhältnis der FLIM-Kamera

Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) liefert einen Hinweis auf die technische Qualität des Nutzsignals. Zur Berechnung werden hier Grauwerte, d. h. Amplituden statt Signalleistung herangezogen. Das SNR ergibt sich somit aus dem Intensitätssignal bezogen auf das Rauschsignal. Der Rauschanteil im Bild lässt sich über die stochastischen Schwankungen von Pixelsignalen ermitteln. Bei einer invarianten Vorlage ist der Rauschanteil die Standardabweichung über die Zeit. Das SNR wurde jeweils an Sequenzen von 128 Bildpaaren (Tap A/B) mit Belichtungszeiten von 2 ms, 200 ms, 1 s und 2 s an einem weißen Leuchtfeld, der Fostec ACE Fiber Optic Plate, mit Hilfe der Software pco.camware ermittelt. Die Kaltlichtquelle FOSTEC 8375 wurde so eingestellt, dass das Intensitätssignal d. h. die mittlere Helligkeit der Bilder über alle Belichtungszeiten hinweg im Bereich zwischen 33 % und 83 % liegt. Die mittlere Helligkeit über alle Einstellungen beträgt 58 % bei einem SNR von 137 d. h. 42 dB. Hinsichtlich Intensität und Rauschen zeigen Tap A und Tap B hier keine signifikanten Unterschiede, d. h. Tap A und Tap B sind gleichermaßen empfindlich. Das Rauschsignal korreliert weder mit Belichtungszeit noch mit der Helligkeit. Durch das konstante Rauschsignal von 0,0042 im Intensitätsintervall von 0,33 bis 0,83 reicht das Signal-Rausch-Verhältnis von 122 bis 196. Das SNR steigt nahezu linear mit dem Nutzsignal, d. h. dem Fluoreszenzsignal der Partikel. Hochgerechnet auf 100 % Intensität liegt das SNR der pco.flim bei 238 bzw. 48 dB. Das SNR von Digitalkameras wird selten in Datenblättern aufgeführt, daher ist ein Vergleich schwierig. Die Sony XC-75CE ist eine monochrome Industriekamera älterer Bauart mit einem SNR von 54 dB, was einem Amplitudenverhältnis von 501 entspricht. Möglicherweise steht das schlechtere SNR der pco.flim in Verbindung mit einem horizontalen Linienmuster, welches langsam in vertikaler Richtung durch das Bild zieht. Diese horizontalen Linien beruhen auf Störsignalen, welche durch den elektrischen Aufbau der Kamera bedingt sind. Laut Hersteller kann das Auftreten dieser Störung durch eine Modifikation in der Kamera reduziert werden. Ein höheres SNR im Bereich von ≥ 54 dB wäre für die Bestimmung von Abklingzeiten wünschenswert. Die Versuche zum Signal-Rausch-Verhältnis zeigen

keine bauartbedingten Unterschiede zwischen Tap A und B. Daher dürften diesbezüglich auch keine großen Unterschiede unter NIS-Elements auftreten.

4.5.2 Güte der Kalibrierung

Für die Messung der Abklingzeit sind die Signallaufzeiten in den Systemkomponenten entscheidend. Deshalb muss das Messsystem regelmäßig und zwingend nach jeder Änderung des Aufbaus, wie z. B. beim Verschieben des Kollimators zur Fokussierung des Laserstrahls auf der Probe, neu kalibriert werden. Dies geschieht mit Hilfe Kalibriervorlage UMM/SFG 200x, die von PCO mit 3,75 ns spezifiziert ist.

Wichtig ist es, für die Kalibrierung die gleiche Laserleistung zu nutzen, die auch bei der Messung verwendet wird. Offensichtlich verändert sich das Timing des Systems signifikant, wenn die Laserleistung verändert wird. Um bei unterschiedlichen Laserleistungen zu messen, wurden z. B. Kalibrierdateien für 60 mW, 100 mW und 120 mW erzeugt. Für die Messung muss dann die passende Kalibrierdatei ausgewählt und geladen werden.

4.5.3 Korrektur des Dunkelstroms im Rahmen der Background Correction

Bei genauerer Betrachtung der Intensitätsbilder zeigen einige Bildpunkte starke Abweichungen, insbesondere bei geringen Signalstärken, die hohe Belichtungszeiten erfordern. Es sind immer die gleichen Bildpunkte, die auffallen, unabhängig von der Vorlage. Im Folgenden wird geprüft, inwiefern die Background Correction zur Verfälschung von Messwerten führt.

Jeder Kamerachip besitzt fertigungsbedingte Unterschiede im Dunkelstrom der Bildpunkte. Der Grauwert eines unbelichteten Pixels besteht aus einem Basiswert (Offset) und einem mit der Belichtungszeit ansteigenden Anteil. Die Steigung (Slope) hängt vom jeweiligen Dunkelstrom ab. Die Aufgabe der Background Correction (BC) ist es, den Dunkelwert im Sinne einer Störgrößenaufschaltung zu kompensieren. Dazu muss die BC den Offset und die Steigung für jeden Bildpunkt zu ermitteln. Um die Bedeutung der BC zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 4-25 die Bandbreite des Intensitätssignals bei abgedunkelter Kamera für zwei Belichtungszeiten. Bei moderater Belichtungszeit von 100 ms liegt das Signal unter 4 % des Maximalwerts. Bei 2 s überschreiten einzelne Pixel durch ihren hohen Dunkelstrom die 50 % Marke. Die Messungen erfolgten mit Hilfe der Software pco.camware.

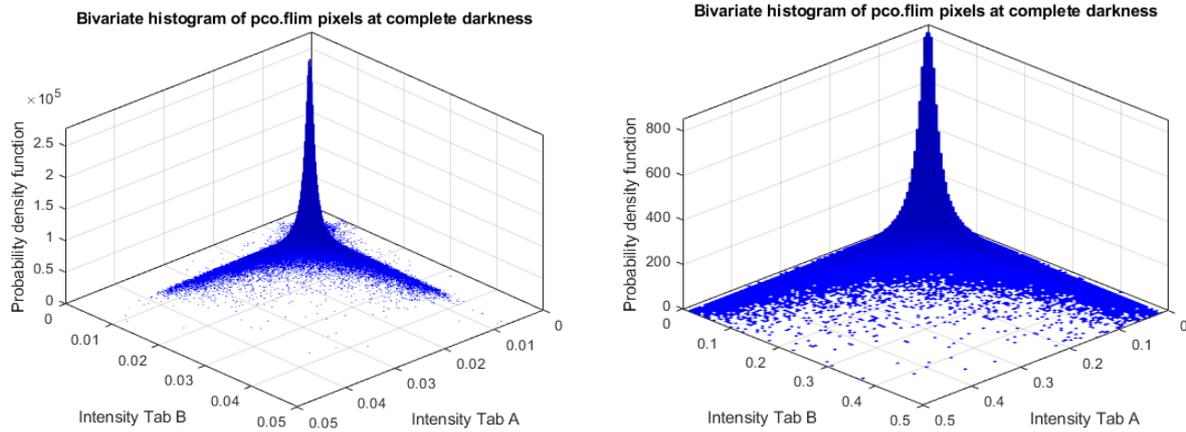


Abbildung 4-25: Vergleich des Dunkelsignals der pco.flim bei Belichtungszeiten von 100 ms (links) und 2 s (rechts)

Die Software NIS-Elements bietet die Background Correction als Option für die PCO-FLIM-Kamera. Dabei werden die Rohbilder der Kamera vor der Auswertung korrigiert, so dass im Idealfall die abgedunkelte Kamera für alle Bildpunkte die Intensität 0 liefert und zwar unabhängig von der Belichtungszeit.

Um die Charakteristik der Bildpunkte zu erfassen, muss der Lichtweg blockiert und eine Messroutine gestartet werden. Für die Durchführung wird lediglich die Anzahl der aufgenommenen Bilder festgelegt. Je mehr Bilder gemittelt werden, desto kleiner ist das Rauschen im Bild. Hohe Werte verbessern das Signal-Rausch-Verhältnis, verlängern aber den Prozess. Im konkreten Fall wurde der voreingestellte Wert von 100 Bildern verwendet. Die Ergebnisse der Messungen zur BC liegen im NIS-Elements-Format als nd2-Datei vor. Die BC-Daten bestehen aus jeweils 4 Kanälen mit 4 Bildern deren Zuordnung nicht dokumentiert ist.

Eine ordnungsgemäß durchgeführte BC ist erforderlich, um verlässliche Daten zu generieren. Um ihre Wirkweise zu überprüfen, wurden Bilder bei völliger Dunkelheit mit und ohne BC aufgenommen. Als Belichtungszeit wurden 2 ms, 200 ms und 2 s gewählt. Die in Tabelle 4-11 dargestellten Mittelwerte ohne BC steigen wie erwartet mit der Belichtungszeit. Die Mittelwerte mit BC liegen durchweg bei nahezu null, was für eine korrekte Kompensation des Dunkelstroms spricht.

Tabelle 4-11: Mittelwerte der Intensitätssignale für verschiedene Belichtungszeiten

Mittelwerte	Berechnungsgrundlage: Matlab trimmean() excluding 10 % outliers		
Belichtungsdauer	2 ms	200 ms	2 s
Dunkelbild ohne BC	0,01227	0,01907	0,07829
Dunkelbild mit BC	0,00038	0,00029	0,00035

Bei einigen Pixeln treten trotz BC deutliche Abweichungen der Intensität im Vergleich zum Mittelwert auf. Das ist darauf zurückzuführen, dass der Dunkelstrom bei den betroffenen Pixeln so hoch ist, dass die Pixel vorzeitig gesättigt sind. Ein derart nichtlineares Verhalten führt zu Abweichungen, die von der BC nicht kompensiert werden können. Um bei der späteren Bildauswertung keine Fehlinformationen zu erzeugen, müssen die betroffenen Pixel lokalisiert werden.

Zur genaueren Analyse bedarf es eines geeigneten Testsignals mit bekannter Abklingzeit und einer definierten Variation der Intensität. Die Abklingzeit der Kalibriervorlage UMM/SFG 200x ist mit 3,75 ns spezifiziert. Ein spiegelndes Linienmuster aus Chrom auf einem Glasträger, einem sogenannten Ronchi Gitter, Typ MGP-10 von Newport erhöht lokal die Reflektion, so dass ein charakteristisches Intensitätsprofil entsteht. Abbildung 4-26 zeigt die fluoreszierende Kalibriervorlage, die mit einem fokussierten UV-Laserstrahl von 2,6 mm \varnothing angeregt wird.

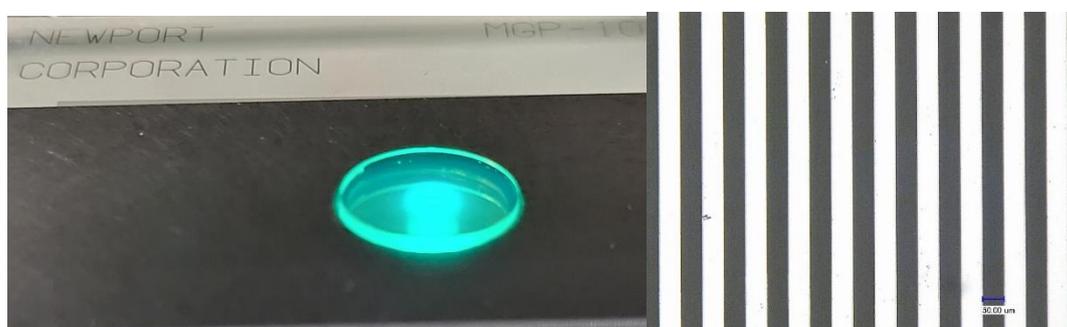


Abbildung 4-26: Kalibriervorlage auf spiegelndem Ronchi Gitter und eine Aufnahme des MGP-10
Linienrasters 10 / mm \rightarrow spiegelnde Balken von 50 μm Breite

Dass die BC Tap A und Tap B unterschiedlich behandelt, verdeutlicht Abbildung 4-27. Bei Tap A (links) treten trotz BC helle Pixel deutlich hervor, während bei Tap B (rechts) die BC offensichtlich funktioniert. Außerdem ist das Nutzsignal von Tap A mit einem mittleren Grauwert von 27534 im Vergleich zu 50331 bei Tap B um rund 45 % verringert. Die Belichtungszeit beträgt in diesem Beispiel 2 s. Die Kalibrierung erfolgte mit den maximal möglichen 16 Phasen und bei inaktivem Additional Phase Sampling, um Einflüsse durch das Tauschen von Tap A und B zu vermeiden.

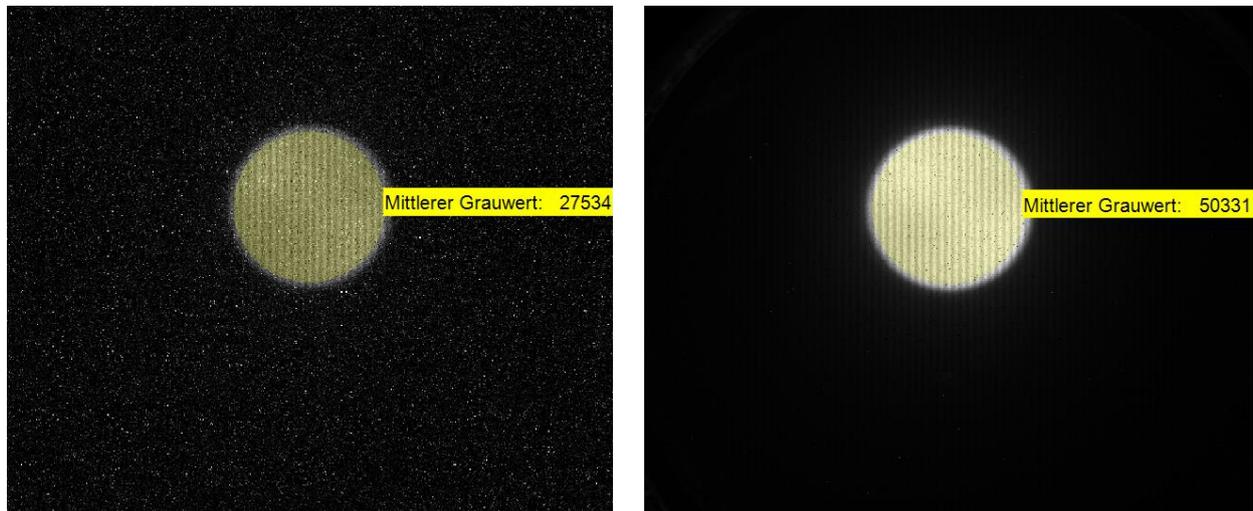


Abbildung 4-27: Ungleiche Wirkung der Background Correction auf Tap A (links) und Tap B (rechts)

Betrachtet man den Verlauf der mittleren Grauwerte über die 12 Intensitätsstufen der Kalibrierdateien so zeigt sich für den den Bereich außerhalb des Laserstrahls der in Abbildung 4-28 dargestellte Verlauf. Ohne BC steigt das Intensitätssignal von Tap A und B gleichermaßen an, während die Kurven mit BC stark divergieren. Die BC wirkt sich offensichtlich auf Tap B stärker aus als auf Tap A, was den visuellen Eindruck aus Abbildung 4-27 bestätigt.

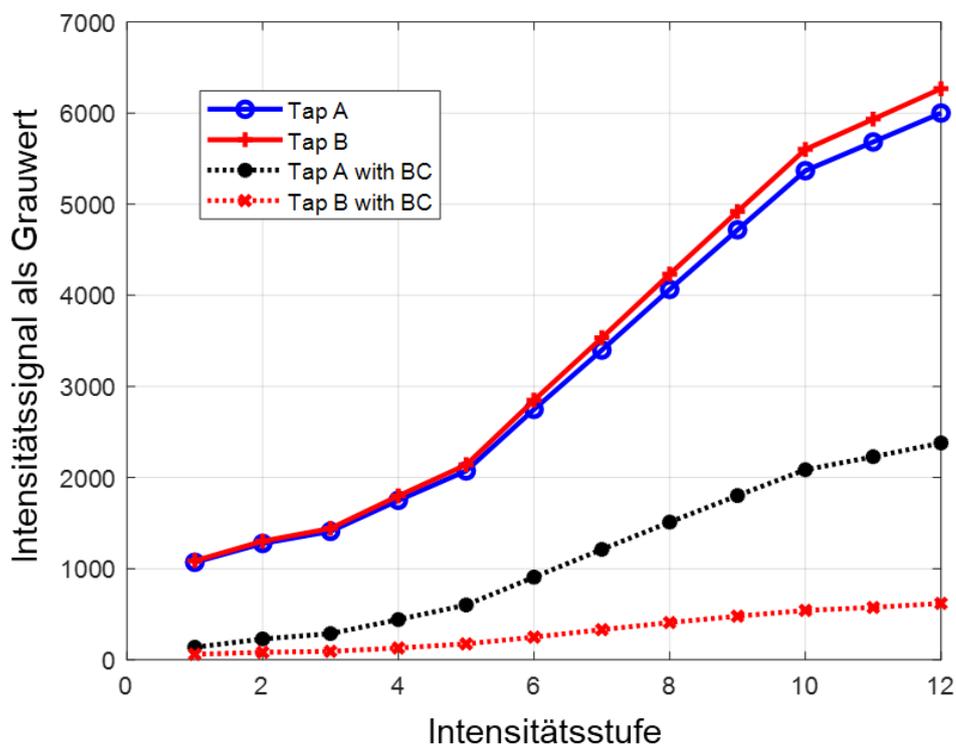


Abbildung 4-28: Mittlere Grauwerte außerhalb des Laserstrahls

Analog zu Abbildung 4-28 zeigt Abbildung 4-29 den Verlauf der Intensitätssignale von Tap A und B im Bereich des Laserstrahls. Ohne BC liegt das Nutzsignal von Tap B rund 70 % über dem von Tap A und etwa 95 % bei aktiver BC.

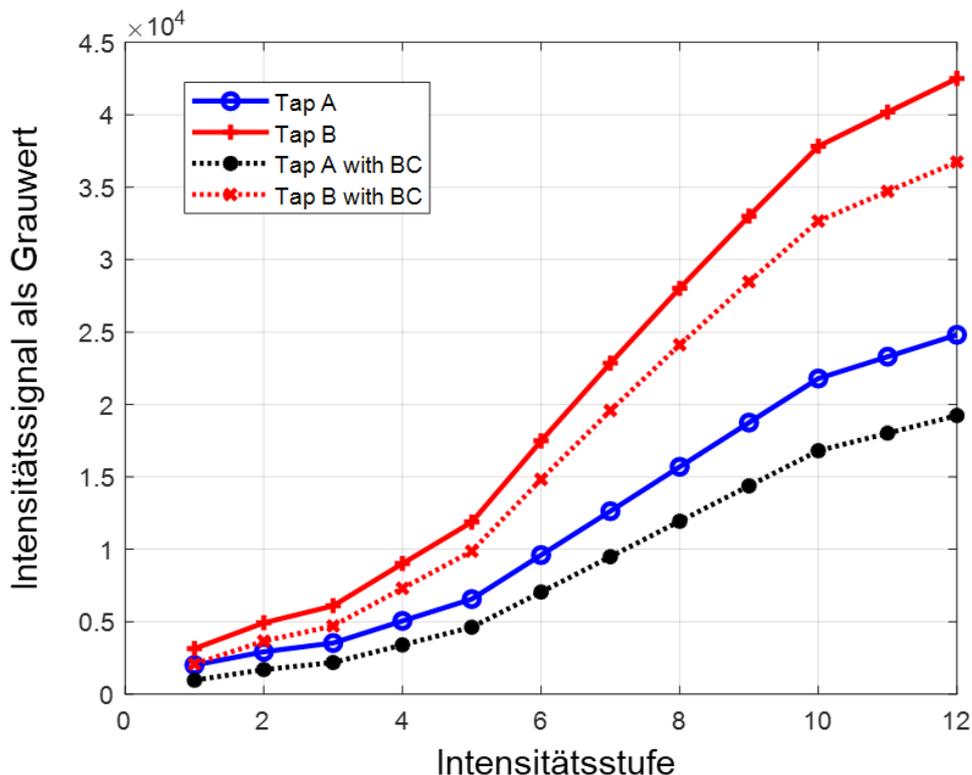


Abbildung 4-29: Mittlere Grauwerte im Bereich des Laserstrahls

Mit Hilfe des Linienmusters lässt sich die Amplitude des Nutzsignals betrachten. Entsprechend der höheren Empfindlichkeit von Tap B sollte auch dessen Amplitude steigen. Das in Abbildung 4-30 aufgetragene Intensitätsprofil von Tap B besitzt eine rund 20 % größere Amplitude als Tap A. Entsprechend der höheren Empfindlichkeit von Tap B müsste hier Amplitude 95 % größer sein d. h. rund das Doppelte betragen.

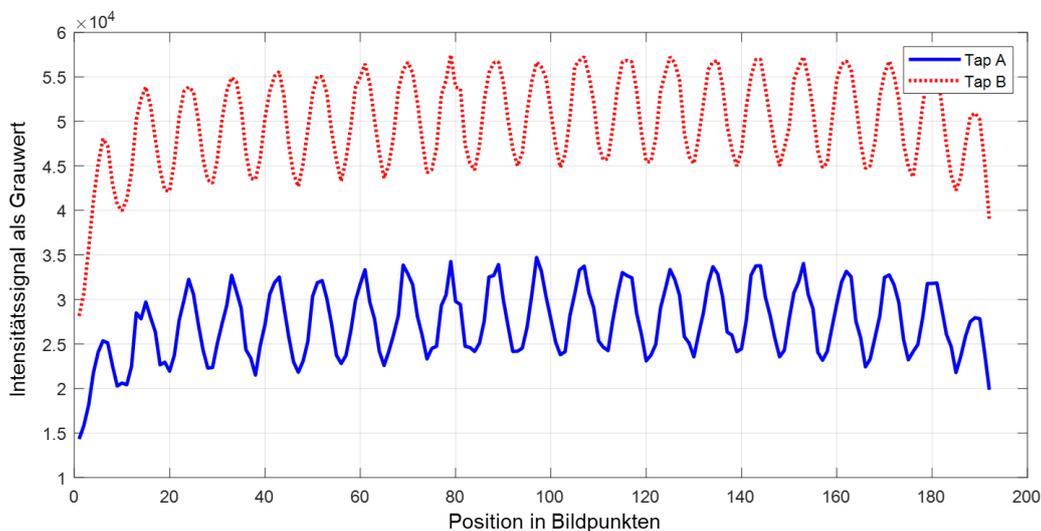


Abbildung 4-30: Grauwertprofile von Tap A und B für den vom UV-Laser angeregten Bereich

Unklar ist, wie stark sich die Unterschiede in Signalintensität und Amplitude letztendlich auf die Messung der Abklingzeit auswirken. Die ungleiche d. h. deutlich schlechtere Background Correction bei Tap A beeinflusst mit Sicherheit die Berechnung der korrekten Abklingzeiten.

4.5.4 Filter-Algorithmus zur Verbesserung der Messung

Die vorgestellten Probleme mit Software und Kamera insbesondere bei den langen Belichtungszeiten führen zu inkonsistenten Abklingzeiten und hohen lokale Varianzen, die Erkennung von Materialien behindern oder zumindest erschweren. Im Folgenden wird ein speziell für diese Anwendung entwickelter Filter-Algorithmus zur Verbesserung des Signals vorgestellt. Der Algorithmus besteht aus einer Kombination von unterschiedlichen Maßnahmen:

1. Pixel mit hohem Dunkelstrom ausblenden
2. Punkte lediglich im Intensitätsintervall von 10 % bis 70 % zulassen
 - 10 % als Untergrenze wegen Signal/Rausch-Verhältnis
 - 70 % als Obergrenze wegen möglicher Übersteuerung
3. Phasenverschiebung auf den Bereich 30° bis 60° einschränken
 - Arbeitspunkt liegt bei 45°
4. Modulation muss zwischen 50 % und 90 % liegen
5. Abklingzeit nach Phase und nach Modulation eingrenzen z.B. 2 bis 8 ns
6. Median-Filter mit Radius von 5 Bildpunkten

Hohe Intensität des UV-Lasers verbessert die Messbedingungen. Zur Schaffung der bestmöglichen Voraussetzungen wurde der Laserstrahl 2 mm Ø d. h. maximal fokussiert. Unbeleuchtete Bildbereiche sind ausgeblendet und hier werden nicht dargestellt.

Im ersten Schritt erfolgt der Ausschluss von Kamerapixeln mit besonders hohem Dunkelstrom. Das sind Punkte von Tap A und B, welche im Dunkelbild bei 2 s Belichtungszeit einen Grauwert von 16284 übersteigen. Innerhalb der Maske von 2 mm Ø entfallen darauf 5694 von 35629 Pixelpaaren Tap A + B bzw. 16 % der Bildpunkte. Abbildung 4-31 zeigt das zugrundeliegende Dunkelbild.

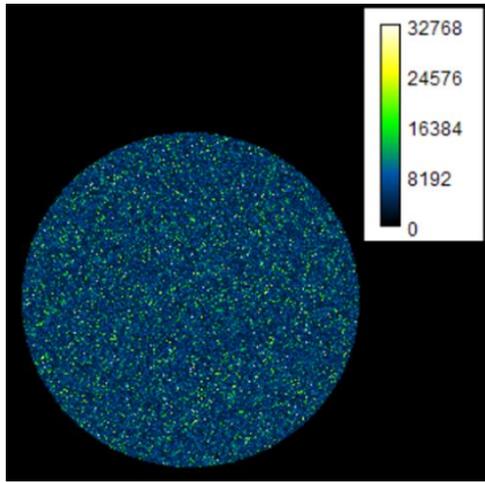


Abbildung 4-31: Intensitätsbild in Grauwerten der abgedunkelten Kamera bei 2 s Belichtungszeit

Daraus leitet sich eine binäre Maske ab, wobei die ausgeblendeten Bildpunkte in Abbildung 4-32 gelb dargestellt sind. Die schwarzen Flächen bleiben erhalten. Die entstehenden Lücken in der Abklingzeit können ggf. durch Verschieben der Probe (Doppelbestimmung) und lokalen Median-Filtern gebrückt werden.

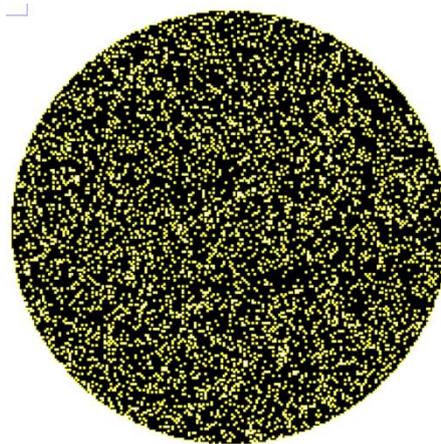


Abbildung 4-32: Maske von Pixeln mit hohem Dunkelstrom

Ober und Untergrenzen für die Kriterien Intensität, Phase und Modulation ergeben sich aus Erfahrungswerten und lassen sich an die Gegebenheiten anpassen. Der zulässige Bereich für die Abklingzeiten hängt von der Probe und ist hier auf das Anfärben mit Nilrot abgestimmt. Jedes Ausschlusskriterium setzt den entsprechenden Bildpunkt auf ungültig d. h. auf NaN. Ein spezieller Filter ersetzt den jeweiligen Bildpunkt durch den Medianwert aus benachbarten Bildpunkten, wobei NaN-Werte nicht berücksichtigt werden. Diese würden ansonsten zu einem Fehler oder zu einem NaN als Ergebnis führen. Der betrachtete Umkreis lässt sich an die Partikelgröße und die Güte der Vereinzlung angepasst werden. Bei einem Median-Filter mit einem Radius von 3 Bildpunkten reicht ein Abstand von 1 bis 2 Bildpunkten zum nächsten Partikel, um Übersprechen von Abklingzeiten zu vermeiden. Für eine intensivere Glättung sind im Folgenden die

Ergebnisse für die Kunststoffe PA, PU und PVC mit einem Median-Filter mit Radius 5 dargestellt. Die ausgewählten Kunststoffpartikel aus Tabelle 4-10 liefern mit Nilrot angefärbt die intensivste Fluoreszenz und damit die besten Voraussetzungen zur Validierung der getroffenen Maßnahmen.

Abbildung 4-33 zeigt die gefilterten Abklingzeiten von zwei würfelförmigen Partikeln aus Polyamid. Die Werte nach Phase und Modulation liegen mit 4,71 ns und 4,79 ns dicht beieinander. Die Standardabweichung nach Phase beträgt lediglich 0,084 ns, was einem Variationskoeffizienten (VarK) von 1,8 % entspricht. Die Standardabweichung nach Modulation ist mit 0,354 ns und einem VarK von 7,4 % deutlich höher. Für die höchste Intensität der Fluoreszenz ist hier die Wellenlänge des Farbfilters auf 605 nm eingestellt.

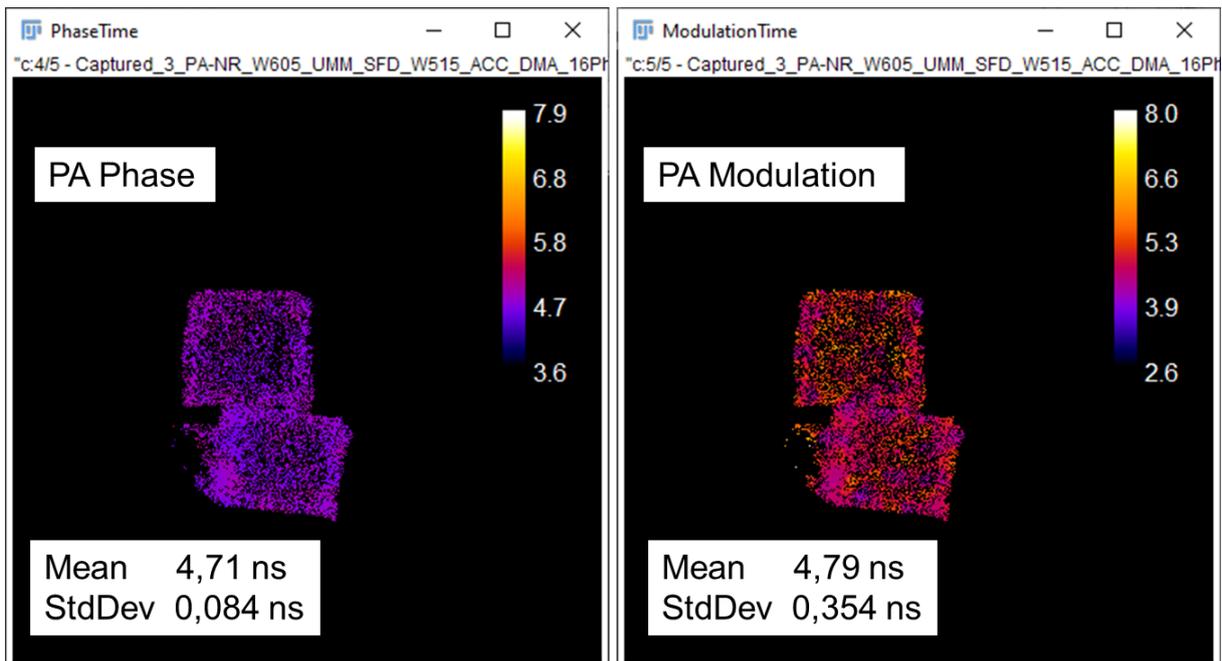


Abbildung 4-33: Anwendung der Filter-Algorithmen am Beispiel von Polyamid (PA)

Durch den Filter-Algorithmus heben sich die PA-Partikel klar vom Untergrund ab. Während das Phasenbild durchweg plausible Abklingzeiten liefert, sind im Modulationsbild Stellen mit Abklingzeiten von mehr als 6 ns sichtbar. Bei kleinen Objekten kann das zur Fehlinterpretation führen.

In Abbildung 4-34 sieht man eine signifikante Differenz von 0,43 ns zwischen der Abklingzeit nach Phase von 5,2 ns und nach Modulation von 4,76 ns für ein relativ großes PU-Partikel. Letztere ist nahezu identisch mit der mittleren Abklingzeit der PA-Partikel. Die Wellenlänge liegt hier bei 625 nm.

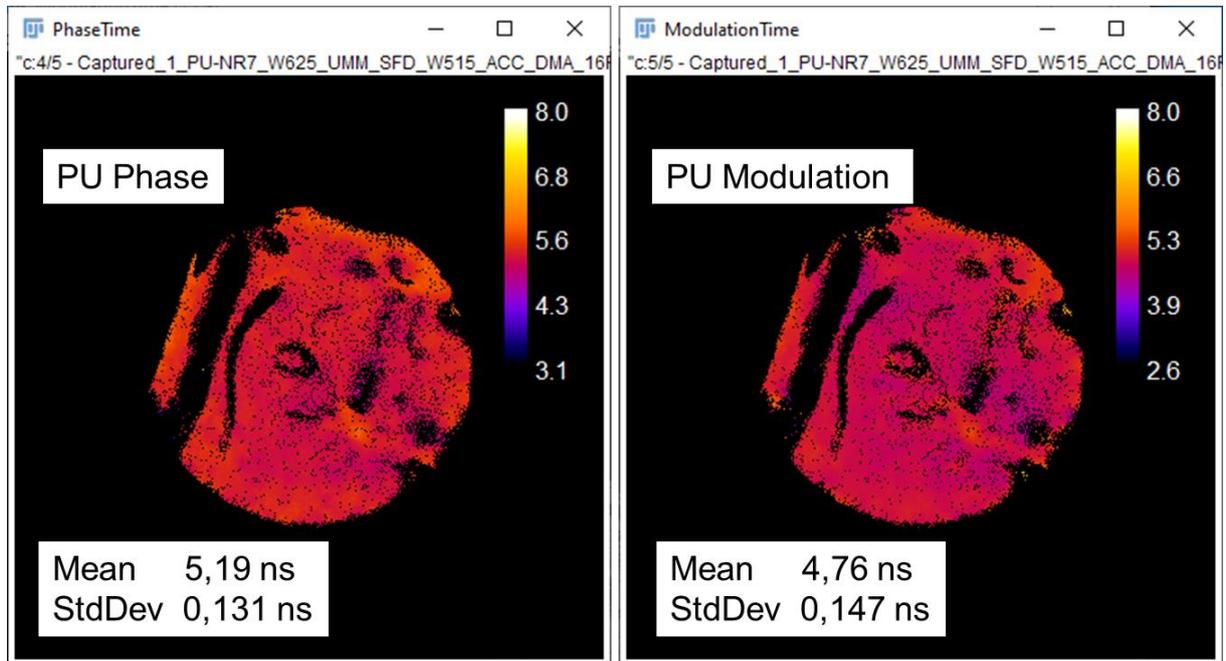


Abbildung 4-34: Anwendung der Filter-Algorithmen am Beispiel von Polyurethan (PU)

Im Bild der Abklingzeit des PU-Partikels sieht man relativ große Fehlstellen. Ggf. müssten weitere Maßnahmen ergriffen werden, um gesicherte Messwerte bei kleineren Partikeln zu erhalten.

Abbildung 4-35 zeigt die Abklingzeiten eines relativ großen PVC-Partikels. Wie auch beim Beispiel des PU-Partikels weisen die mittleren Abklingzeiten nach Phase (5,32 ns) und nach Modulation (4,99 ns) eine eindeutige Differenz von 0,33 ns auf. Die Standardabweichungen sind mit 0,159 ns und 0,208 ns moderat, aber im Bild lassen sich Bereiche mit deutlichen Abweichungen erkennen, deren Ursache unbekannt ist. Wie beim PA-Partikel ist die Wellenlänge des Farbfilters auf 605 nm eingestellt.

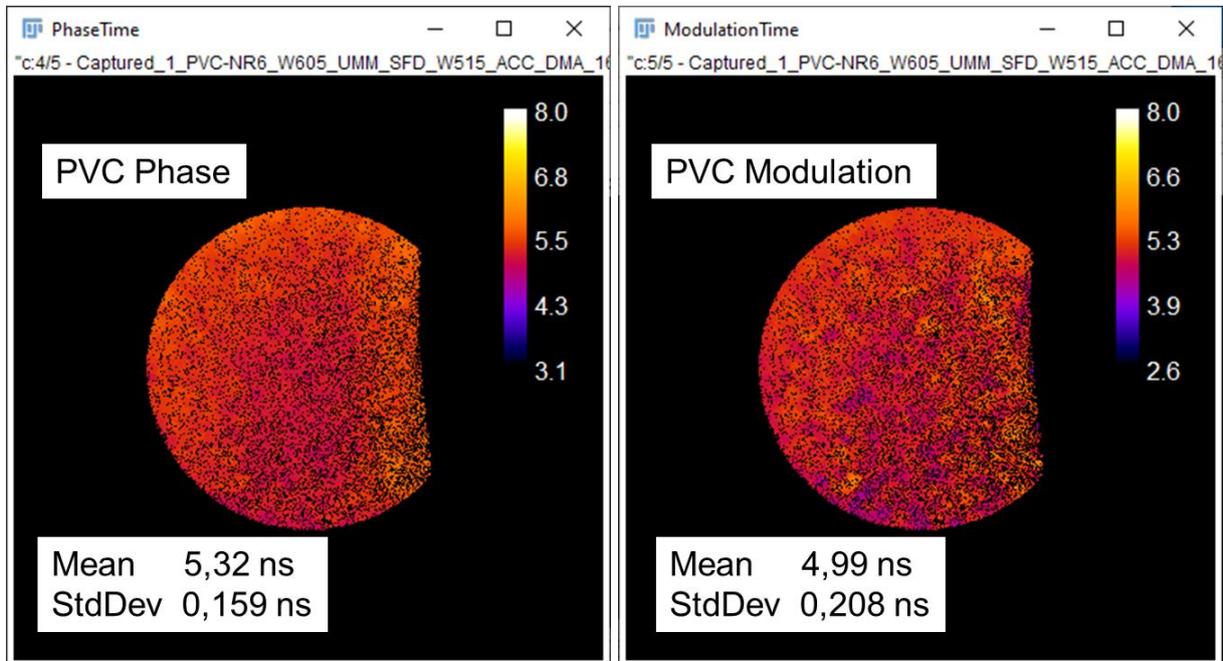


Abbildung 4-35: Anwendung der Filter-Algorithmen am Beispiel von Polyvinylchlorid (PVC)

Die drei Beispiele zeigen die erreichbaren Grenzen des Messsystems unter den aktuellen Randbedingungen.

4.6 Fluoreszenzmethode B – Adaptiver Farbfilter

Die Fluoreszenzmessmethode B basiert auf den spektralen Intensitätsbildern, die im Zuge der FLIM-Messungen erzeugt wurden. Alternativ dazu lässt sich der Messaufbau ohne FLIM-Messung betreiben. Dabei kann der UV-Laser mit seiner vollen Leistung im Dauerstrich (CW) betrieben werden, da die Modulation des Lichtsignals entfallen kann. Ohne FLIM-Messung sollte die Anzahl der Aufnahmen auf 1 reduziert werden, um die Messzeit zu verkürzen.

Es wurden 8 Kunststoffe analysiert. Die Partikel wurden wie in Kapitel 4.4 beschrieben vor der Messung mit Nilrot gefärbt. Von jedem Kunststoff wurde eine Partikel untersucht. Die in Abbildung 4-36 gezeigten Emissionsspektren entsprechen jeweils dem gemittelten Wert aller vermessenen Bildpunkte eines Partikels und verdeutlichen das Potential der Fluoreszenzmessmethode B.

Spektraler Verlauf untersuchter Kunststoffpartikel

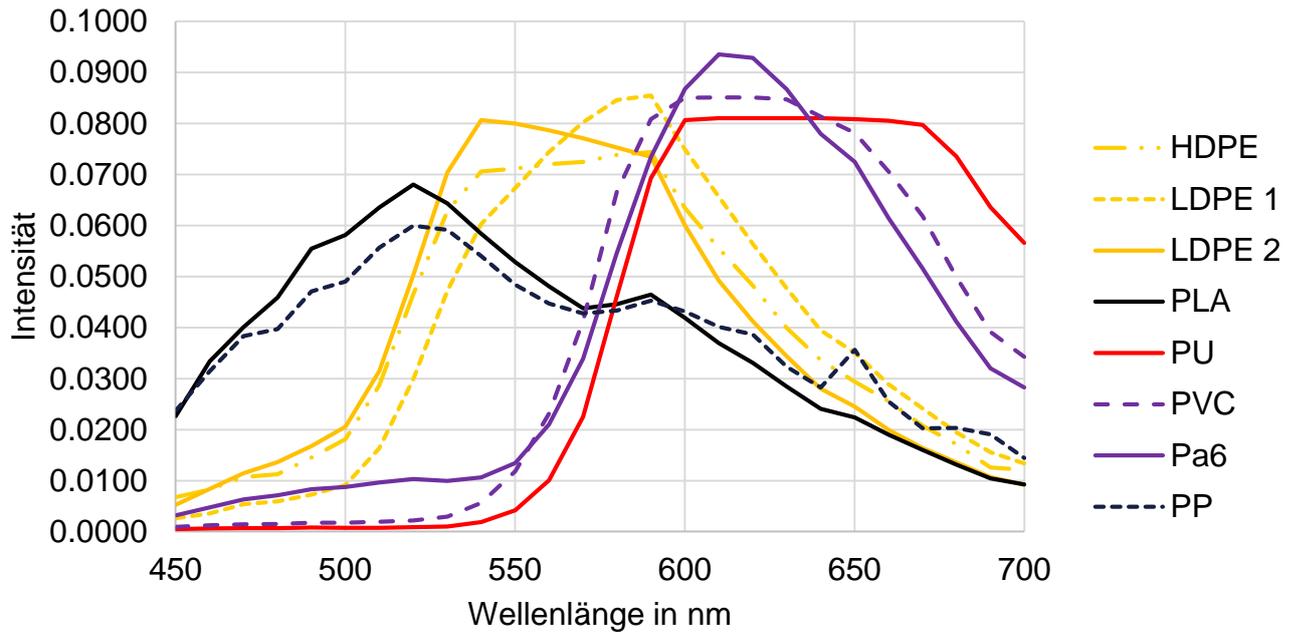


Abbildung 4-36: Messungen an Referenzkunststoffen, welche mit Nilrot angefärbt wurden

Bei allen untersuchten Kunststoffpartikel kann ein Emissionsspektrum detektiert werden. Es zeigt sich, dass manche Kunststoffarten ein ähnliches Emissionsspektrum aufweisen und andere ein deutlich abweichendes Emissionsspektrum besitzen. Bei den untersuchten Kunststoffen lassen sich drei stark voneinander abweichende spektrale Verläufe erkennen, was eine Unterteilung der Kunststoffe in drei Gruppen ermöglicht. Die erste Gruppe bilden PP und PLA, in eine andere Gruppe können PVC und PA6 zusammengefasst werden und in einer letzten Gruppe die unterschiedlichen PE. Zwischen den Gruppen ist eine Differenzierung auf Basis der Emissionsspektren möglich. Innerhalb einer Gruppe reichen die Unterschiede im spektralen Verlauf nicht aus, um eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen. Eine zuverlässige Identifikation der Kunststoffart bei Mikroplastikpartikeln einzig auf Basis des spektralen Verlaufs der Fluoreszenz ist demnach nicht möglich.

4.7 Diskussion zur Eignung der Messmethoden für die Identifizierung von Mikroplastikpartikeln in Realproben

Die durchgeführten Arbeiten zeigen, dass der Messaufbau Mikroplastikpartikel erfassen kann, welche mit der Fluoreszenzfarbe Nilrot angefärbt wurden. Nur durch Anfärben kann eine zur Detektion hinreichende Stärke des Fluoreszenzsignals erreicht werden. Die Bestimmung der Partikelgrößen funktioniert für Partikel im Größenbereich von ca.

200 µm gut. Für deutlich kleinere Partikel sind die Algorithmen zur bildanalytischen Auswertung anzupassen, um eine verlässliche Größenbestimmung zu ermöglichen.

Zur Identifikation der Kunststoffart von Mikroplastikpartikeln wurde der spektrale Verlauf der Fluoreszenz und die Fluoreszenzabklingzeit von verschiedenen Kunststoffen untersucht. Das Emissionsspektrum konnte für verschiedene Kunststoffe zuverlässig detektiert werden. Aufgrund der teils hohen Ähnlichkeit der Emissionsspektren verschiedener Kunststoffarten ist eine eindeutige Zuordnung jedoch nicht möglich.

Die entwickelte Messmethode der Fluoreszenzabklingzeit liefert leider nicht die erhofften Resultate. Die Abklingzeiten nach Phase und Modulation sind nicht konsistent und variieren für dieselbe Kunststoffart in Abhängigkeit der Partikelposition und Beleuchtungsdauer. Zudem treten lokale Schwankungen innerhalb von Partikeln auf, welche möglicherweise durch die Oberflächenmorphologie oder durch lokale Unterschiede beim Anfärben verursacht werden. Unter diesen Bedingungen ist eine Untersuchung von Realproben nicht zielführend. Die Ressourcen für die Arbeitspakete 5 und 6 wurden daher in Abstimmung mit dem PbA zur Ursachenforschung und zur Problembehebung genutzt.

Zur Eingrenzung der Messfehler wurden Kamera und Software untersucht. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Kamera entspricht nicht den Erwartungen an die spezifizierte 14 bit Auflösung. Weitaus problematischer ist aber der hohe Dunkelstrom einzelner Bildpunkte, die sich bei hohen Belichtungszeiten nicht mehr kompensieren lassen.

Die von NIS-Elements dazu eingesetzte Background Correction verfälscht die Signale zusätzlich, da sie die beiden Kanäle A und B unterschiedlich behandelt. Das Signal von Tap A erscheint deutlich schwächer als das von Tap B und auch die Background Correction funktioniert bei Tap A viel schlechter. Da die Fluoreszenzabklingzeit auf Basis von Intensitätsunterschieden zwischen Tap A und Tap B berechnet wird, sind die auftretenden fehlerhafte Werte nachvollziehbar. Trotz diverser Optimierungsansätze zur Erhöhung des Fluoreszenzsignals und der Anwendung von Filteralgorithmen, um fehlerhafte Werte im Rahmen der Auswertung auszuschließen, konnten keine wiederholbaren und konsistenten Fluoreszenzabklingzeiten ermittelt werden.

Für zukünftige Arbeiten mit der Kombination aus FLIM-Kamera und NIS Elements sollte daher zuvor eine mit dem Softwareentwickler abgestimmte Fehlersuche erfolgen, um Programmierfehler zu lokalisieren und zu beseitigen. Eine weitere Optimierung betrifft die Intensität des verwendeten UV-Lasers, um die Belichtungsdauer deutlich zu reduzieren. Belichtungszeiten im Bereich von ≤ 100 ms bei guter Ausleuchtung des Messfelds würden sich positiv auf die Signalqualität und die Messgeschwindigkeit auswirken. Vermutlich führt auch der vom Kamerahersteller vorgesehene Eingriff in die

Hardware zu einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses und damit zu einer stabileren Messung der Abklingzeit.

5 Sachgerechte Verwendung der finanziellen Mittel

5.1 Personalausgaben

Es wurden 19,36 PM wissenschaftliches Personal mit der Qualifikation HPA A eingesetzt. Beantragt waren 20 PM.

5.2 Ausgaben für Geräte

Im Rahmen des Projekts wurde eine FLIM-Kamera der Fa PCO zum Preis von 36.652,00 € und ein FLIM-Laser der Fa PCO zum Preis von 13.339,90 € angeschafft. Der Preis entsprach der beantragten Bruttosumme für diese Geräte. Die FLIM-Kamera und der FLIM-Laser bilden zentralen Komponenten für die Durchführung des Forschungsprojektes.

5.3 Ausgaben für Leistungen Dritter

Im Rahmen des Projektes wurden, wie geplant, keine Ausgaben für Leistungen Dritter getätigt.

6 Wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)

6.1 Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse

Die Forschungsergebnisse können helfen, Möglichkeiten zur Detektion und Klassifizierung von Mikroplastik auf Basis der Fluoreszenzeigenschaften von Kunststoffen besser zu verstehen und darauf basierende Methoden zu optimieren.

6.2 Voraussichtlicher Beitrag zur Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit

Mit einer schnellen Umsetzung der Ergebnisse ist aktuell nicht zu rechnen, aber es wurden wesentliche Beiträge zur Frage der Eignung der FLIM-Technologie zur MP-Detektion geleistet. Diese können zukünftig eventuell helfen, eine optimierte Methode zu entwickeln, welche eine schnelle und vergleichsweise Kostengünstige Identifizierung von Mikroplastik ermöglicht.

6.3 Aussagen zur voraussichtlichen industriellen Umsetzung der FuE-Ergebnisse nach Projektende

Eine industrielle Umsetzung der Ergebnisse ist auf Basis der vorliegenden Forschungsergebnisse derzeit unwahrscheinlich. Sofern die noch vorhandenen Herausforderungen bezüglich des Zusammenwirkens von NIS-Elements und der FLIM-Kamera bewältigt werden, ist eine industrielle Umsetzung aufgrund der Vorteile der Messmethode im Vergleich zu anderen Analysemethoden aber denkbar.

7 Ergebnistransfer

7.1 Durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit

Die im Projektantrag dargestellten Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft wurden teilweise durchgeführt. Bereits während der Projektlaufzeit wurde das Thema bei verschiedenen Fachveranstaltungen und in diversen Vorträgen vorgestellt. Aufgrund der unvollständigen Methodenentwicklung und der fehlenden Messung von Realproben wurde während der Projektlaufzeit auf eine Fachveröffentlichung verzichtet. Eine Auflistung der während der Projektlaufzeit durchgeführten Transfermaßnahmen ist in Tabelle 7-1 dargestellt.

Tabelle 7-1: Durchgeführte Transfermaßnahmen während der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/ Zeitraum
Einbeziehung von Multiplikatoren	Ergebnistransfer in die Wirtschaft durch Berichte und Vorträge	Vortrag am IGF-Tag der FV Zellstoff- und Papierindustrie / Darmstadt	04.11.2021 13.10.2022 07.12.2023
		Veröffentlichung des Zwischenberichts	1 x jährlich
Treffen des PbA	Projekt- und Ergebnisdarstellung im projektbegleitenden Ausschuss	Arbeitstreffen des PBA (Vortrag, Fortschrittsbericht und Diskussion, persönliche Kommunikation)	31.05.2021 23.05.2022 24.08.2023
Gremienarbeit	Ergebnistransfer Papierindustrie	Vortrag auf Umweltausschuss des Verbandes Die Papierindustrie	04.09.2023
Akademische Lehre	Ausbildung von Studierenden, Kennenlernen und Vermitteln wissenschaftlicher Erkenntnisse und Methoden	Vorlesungen, Tutorien, Praktika	laufend
		Masterthesis zum Thema „Entwicklung einer Messmethode zur Analyse von Mikroplastikpartikeln auf Basis von Fluoreszenz“ von Tobias	Eingereicht am 18.07.2022

		Steil	
Medien	Sicherung der allgemeinen Zugänglichkeit von Projektinformationen und -ergebnissen	Präsentation auf Homepage des PMV der TU Darmstadt	laufend

7.2 Geplante spez. Transfermaßnahmen nach Abschluss des Vorhabens

Die geplanten Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit sind in Tabelle 7-2 zusammengefasst.

Tabelle 7-2: Geplante Transfermaßnahmen nach Ablauf der Projektlaufzeit

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/ Zeitraum
Einbeziehung von Multiplikatoren	Ergebnistransfer an interessierte Fachverbände sowie in Industrie und Wirtschaft und Sicherung der allgemeinen Zugänglichkeit von Projektinformationen und -ergebnissen	Veröffentlichung des Abschlussberichts auf Homepage des PMV	Ab Q2 2024
		Veröffentlichung der Zusammenfassung auf Homepage des Verbandes Die Papierindustrie e.V.	Ab Q2 2024
		Vortrag am IGF-Tag der FV Zellstoff- und Papierindustrie / Darmstadt	Q4 2024
Akademische Lehre	Ausbildung von Studierenden, Kennenlernen und Vermitteln wissenschaftlicher Erkenntnisse und Methoden	Vorlesungen, Tutorien, Praktika	laufend
Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse	Information des breiten Fachpublikums	Fachzeitschriften, z. B. Wochenblatt für Papierfabrikation, IPW, TAPPI Journal	Q3 2024

8 Durchführende Forschungseinrichtung

Technische Universität Darmstadt

Fachgebiet Papierfabrikation und Mechanische Verfahrenstechnik (PMV)

Alexanderstr. 8

64283 Darmstadt

Homepage: www.pmv.tu-darmstadt.de

Telefon: 06151 / 16 22 580

Telefax: 06151 / 16 22 581

Fachgebietsleiter: Prof. Dr.-Ing. Samuel Schabel

Projektleiter: Patrick Jahn

9 Literatur

1. Die Papierindustrie: 2023 - Ein Leistungsbericht. Abgerufen am 06.02.2023 unter: <https://www.papierindustrie.de/papierindustrie/statistik/papier-2023-herunterladen>.
2. Weßel, C. et al.; Wasser- und Rückstandsumfrage der deutschen Zellstoff- und Papierindustrie 2022.; Abgerufen am 06.02.2023 unter: https://www.papierindustrie.de/fileadmin/0002-PAPIERINDUSTRIE/07_Dateien/6_Positionen/2022_Veroeffentlichung_Zusammenfassung_Wasser-_und_Rueckstandsumfrage_-_DIE_PAPIERINDUSTRIE.pdf.
3. N. N.; ECHA Public consultation. ECHA proposes restriction on intentionally added microplastics. 7 p. ; Abgerufen am 10.03.2020 unter: <https://echa.europa.eu/documents/10162/b949137e-57a6-dde0-9f62-7ad0f58b123b>.
4. N.N., Europäischen Kommission zu Mikroplastik vom 25.09.2023; Abgerufen am 08.02.2024 unter: https://germany.representation.ec.europa.eu/news/neue-eu-verordnung-verhindert-umwelt-verschmutzung-durch-mikroplastik-2023-09-25_de.
5. Hamann, L.; Mikroplastik: Quellen und Mengen von Berlin bis ins Meer. Vortrag zum BfR-Verbraucherforum Mikroplastik. Berlin 06.06.2019; Abgerufen am 20.03.2020 unter <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/mikroplastik-quellen-und-mengen.pdf>.
6. INGEDE-Method 4: Analysis of macrostickies in pulps. Updated version of April 2013.; Abgerufen am 11.03.2020 unter: <https://www.ingede.com/ingindx/methods/ingede-method-04-2013.pdf>.
7. Pigorsch, E.; Hamann, L.; Finger, M.: Neues Messverfahren zur direkten Makrosticky-Bestimmung. Wochenbl. f. Papierfabrikation 2/2018 S. 80-85.
8. Lang, S.; Kersten, A.; Harling, S. (2019): Mikroplastik–relevant für die Papierindustrie? Eine Bestandsaufnahme. Wochenbl. f. Papierfabrikation 147 (11), S. 698-703.
9. Lassen, C., Hansen, S. F., Magnusson, K., Hartmann, N. B., Rehne Jensen, P., Nielsen, T. G., & Brinch, A. (2015). Microplastics: Occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. Copenhagen K: Danish Environmental Protection Agency.; Abgerufen am 06.02.2024 unter: https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/118180844/Lassen_et_al._2015.pdf.
10. Sundt, P.; Schulze, P.-E.; Syversen, F. (2014) Sources of microplastics-pollution to the marine environment. Mepex for the Norwegian Environment Agency;

Abgerufen am 06.02.2024 unter:

<https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M321/M321.pdf>.

11. Dubaish, F.; Liebezeit, G. (2013): Suspended Microplastics and Black Carbon Particles in the JadeSystem, Southern North Sea. *Water, Air, & Soil Pollution* 224: 1352.
12. Petrescu, D.: Untersuchungen zur Bestimmung von Mikroplastikpartikeln in Prozess- und Abwässern der Papierherstellung. Masterarbeit TU Darmstadt (2018). 114 S.
13. BARKMANN-METAJ, L., F. WEBER, H. BITTER, S. WOLFF, S. LACKNER, J. KERPEN und M. ENGELHART. Quantification of microplastics in wastewater systems of German industrial parks and their wastewater treatment plants. *The Science of the total environment*, 2023, 881, 163349. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.163349
14. Yazdandoost Koshravi, N. V.: Untersuchungen zur Identifizierung von Mikroplastik-Partikeln in gereinigten Papierfabrikabwässern mittels Fluoreszenz. Bachelorthesis. TU Darmstadt (2019), 74 S.
15. N. N.: Mikroplastik-Analytik. Diskussionspapier im Rahmen des BMBF Forschungsschwerpunktes „Plastik in der Umwelt“ Stand Oktober 2018.; Abgerufen am 06.02.2024 unter <https://bmbf-plastik.de/sites/default/files/2018-10/Diskussionspapier%20Mikroplastik-Analytik.pdf>.
16. Andrady, A. L.: Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 2011, 62(8), 1569-1605.
17. Philpott, M. J.: Flow cytometry and its application to the pulp and paper industry. 4 p.; Abgerufen am 06.02.2024 unter https://www.pita.org.uk/images/Pages_from_Axchem_Paper_Technology_Autumn_2016_LR_Download.pdf.
18. Diaz, G. et al.: Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron* 39 (2008) 819–824; doi: 10.1016/j.micron.2008.01.001.
19. Lewis, C.; Zabihian, M.: Keep Your Paper Machine Deposit-free. 3 p.; Abgerufen am 06.02.2024 unter: <https://www.yumpu.com/en/document/view/29658874/keep-your-paper-machine-deposit-free-kemira-flyto-article-in->.
20. Maes, T. et al.: A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Sci. Rep.* 7, 44501; doi: 10.1038/srep4450 (2017).

21. Hengstmann, E.; Fischer, E. K.: Nile red staining in microplastic analysis – proposal for a reliable and fast identification approach for large microplastics. *Environ Monit Assess* 191:612, 9 p.; <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7786-4> (2019).
22. Pedriza, A. M.: Microplastic determination in environmental samples using a fluorescence-based approach. 59 p.; Universitat de Barcelona (2019).; Abgerufen am 06.02.2024 unter: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/137941>.
23. Karakolis; E. G. et al.: Fluorescent Dyes for Visualizing Microplastic Particles and Fibers in Laboratory-Based Studies. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2019, 6, p. 334-340.
24. SANCATALDO, G., G. AVELLONE und V. VETRI. Nile Red lifetime reveals microplastic identity. *Environmental science. Processes & impacts*, 2020, 22(11), 2266-2275. Verfügbar unter: doi:10.1039/d0em00348d
25. ADRIAN MONTELEONE, WERONIKA SCHARY, FOLKER WENZEL, HEINZ LANGHALS und DANIEL R. DIETRICH. Label-free identification and differentiation of different microplastics using phasor analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)-generated data. Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cbi.2021.109466
26. FANG ZHOU, XIN WANG und GUANGXIN WANG AND YANXIA ZUO. A Rapid Method for Detecting Microplastics Based on Fluorescence Lifetime Imaging Technology (FLIM). Verfügbar unter: doi:10.3390/toxics10030118
27. ADRIAN MONTELEONE, FOLKER WENZEL, HEINZ LANGHALS und DANIEL DIETRICH. New application for the identification and differentiation of microplastics based on fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). Verfügbar unter: doi:10.1016/j.cbi.2021.109466
28. Langhals, H. et al.: Binary Fluorescence Labeling for the Recovery of Polymeric Materials for Recycling. *International Journal of Environmental Engineering*, 7, 124-132. <https://doi.org/10.5282/ubm/epub.22054>.
29. Langhals, H. et al.: High Performance Recycling of Polymers by Means of Their Fluorescence Lifetimes. *Green and Sustainable Chemistry*, 2014, 4 144-150. <http://dx.doi.org/10.4236/gsc.2014.43019>.
30. Langhals, H. et al.: Improved High Performance Recycling of Polymers by Means of Bi-Exponential Analysis of Their Fluorescence Lifetimes. 2015, *Green and Sustainable Chemistry*, 5, 92-100. <http://dx.doi.org/10.4236/gsc.2015.52012>.
31. FRANKE, R. und G.A. HOLST. Frequency-domain fluorescence lifetime imaging system (pco.flim) based on a in-pixel dual tap control CMOS image sensor. In: D.L.

FARKAS, D.V. NICOLAU und R.C. LEIF, Hg. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XIII*: SPIE, 2015, 93281K.

32. CRI. *VariSpec Quick Start Guide*. Revision 4.1, Mai 1995.

33. HOLST, G.A. *pco.flim camera system* [online]. *FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING - APPLICATION SIMPLIFIED...* pco.flim data sheet [Zugriff am: 22. Juli 2022]. Verfügbar unter: https://www.pco.de/fileadmin/user_upload/pco-product_sheets/DS_PCOFLIM_V302.pdf