



Technische Universität Graz
Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik

Dissertation

**Entwicklung eines fluoreszenzoptischen
Verfahrens zur Ermittlung von
Materialstrukturen auf Basis eines
automatisierten Mikrotomiekonzeptes**

von

Harald Schöffner

Graz, April 2012

Betreuer der Arbeit
Prof. Dr. Wolfgang Bauer

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Datum

Harald Schöffner

Entwicklung eines fluoreszenzoptischen Verfahrens zur Ermittlung von Materialstrukturen auf Basis eines automatisierten Mikrotomiekonzeptes

von

Harald Schöffner

Gegenwärtig werden zahlreiche bildgebende Methoden zur Erstellung von 3D Datensätzen der Papierstruktur durch verschiedene Messsysteme neu entwickelt. Einige Systeme bieten besonders hohe Auflösungen, andere wiederum große Probenvolumina. Neben diesen Anforderungen ist ebenfalls die Bildqualität der Messergebnisse entscheidend für die weitere Bildverarbeitung. In dieser Arbeit wird eine adaptierte Serienschnittmethode, bei der, zur Steigerung des erforderlichen Bildkontrastes, Fluoreszenzmethoden eingesetzt werden.

Basierend auf dem Messsystem μ STRUCSCOP Gen.1 wurde diese Methode der vollautomatisierten 3D Bildaufnahme neu aufgebaut und um zusätzliche Komponenten erweitert. Die Erweiterungen im Messsystem erlauben die Digitalisierung von Probenvolumen bis einige 100 mm^3 , auch für histologische Proben, bei entkoppelt hoher Auflösung des Lichtmikroskops. Die im Messsystem μ STRUCSCOP Gen.2 vorhandene Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, durch spezielle Lichtquellen und Filtersysteme bzw. eigene Färbemethoden, eine kontrastreiche Bildqualität zwischen Fasern und Einbettmittel.

Die Messung von Fluoreszenzemissionen in ungefärbten und gefärbten Papierstrukturen ist kein neues Feld, obwohl in der Anwendung für die Generierung von 3D Bilddaten kaum Messsysteme zu finden sind. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Verfahren nutzen die primäre und sekundäre Fluoreszenz, um Fasern und Füllstoffe zu lokalisieren. Trotz Artefakte, die zur Zeit noch die Genauigkeit begrenzen, ist der erreichte Kontrast deutlich besser als bei Echtlichtaufnahmen.

Die Ergebnisse von Messungen an verschiedenen ungefärbten und gefärbten Papiersorten wurden für die automatisierte Messung der Porosität und zu 3D Rekonstruktionen von Papierproben verwendet. Außerdem wurden 3D Rekonstruktionen von in der Histologie üblichen Proben durchgeführt.

Schlagwörter:

Serienschnitttechnik, dreidimensional, Papierstruktur, Fasernetzwerk, Füllstoffverteilung, Autofluoreszenz, Fluoreszenz, 3D Papiermodelle, Porosität.

Development of an automated serial sectioning based concept for measuring and visualization of structures in soft materials using fluorescence methods

by

Harald Schöffner

Currently different imaging methods for measuring 3D data of paper structures are under development. Some systems provide a high resolution, some a large sample volume. Especially the image contrast is important for subsequent image analysis. In the present work methods for increasing the contrast by fluorescence techniques are described.

Based on the existing system μ STRUCSCOP Gen.1 which provide the automatic measurements of 3D data image stacks, the device was redesigned and upgraded by additional components. These components enable a better performance for digitization of images up to several hundreds of mm^3 , even for histological samples. At high resolution and for large sample volumes, the presented fluorescence techniques use different illumination sources and filter systems in combination with fluorescent paper raw materials or dyes to increase the contrast between the fibres and the embedding medium.

The application of fluorescence techniques in the field of paper science is not new, but applications for 3D structure analysis of paper samples are rare. In the present work primary and secondary fluorescence was used to localize fibres and fillers. Artefacts caused during digitization decrease the image quality, but nevertheless, the achieved contrast is significantly higher compared to standard light microscopic images.

The results of different measurements with original and dyed paper samples are used e.g. for an automatic determination of the paper's porosity and for 3D volume reconstructions. Furthermore, 3D reconstructions of a histological sample were carried out.

keywords:

serial sectioning, three dimensional, paper structure, fibre network, filler distribution, primary fluorescence, fluorescence, 3D paper model, porosity.

Danksagung

Zu Beginn bedanke ich mich bei meinem Betreuer Prof. Wolfgang Bauer, Leiter des Instituts für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik der Technischen Universität Graz. Zahlreiche Hinweise und Empfehlungen für wissenschaftliches Arbeiten gingen in seiner Betreuung einher mit großer Unterstützung meiner eigenen Vorschläge. Meinem Kollegen Hannes Kritzinger danke ich für die Hilfe während der Projektlaufzeit, die nicht nur die Herstellung aller notwendigen Kontakte miteinschließt, sondern auch die Korrekturen bei papiertechnischen Angelegenheiten.

Weiters bedanke ich mich bei den Mitarbeitern im RSA Projekt μ STRUCSCOP, Prof. Weninger, Stefan Geyer, Ulrich Hirn, Prof. Bischof, Michael Donoser und Peter Kontschieder, für deren Einsatz für das Projekt. Das führte schließlich zu einem erfolgreichen Ende.

Besonderen Danke spreche ich Barbara Hummer aus. Zum Einen waren es unzählige Laborarbeiten die sie im Rahmen des Projekts durchführte, zum Anderen auch ihre Mithilfe in zahlreichen papiertechnischen Fragen. Auch Christian Probst sei an dieser Stelle Dank gesagt. Er hatte bei allen feinmechanischen Fragen eine Antwort parat.

Meinem Bürokollegen Wolfgang Fischer danke für seine Toleranz und Hilfsbereitschaft während der gemeinsamen 2 Jahre im selben Büro. Gerade wegen der abwechslungsreichen Phasen von wenig bis viel (und manchmal zuviel) Arbeit, war es eine spannende Zeit.

Unserer Sekretärin Claudia Bäumel danke ich für die ständige und freundliche Betreuung bei allen administrativen Angelegenheiten, auch wenn sich meine Fragen nach einigen Monaten wiederholten.

Den anderen Mitarbeitern am Institut Harry, Matthias, Christian, Karin, Frederick, Albrecht, Heidi, Irmi, Manuela, Kerstin, Rene, Michael, Albert und Mario sei an dieser Stelle Dank gesagt, da sie alle eine familiäre Atmosphäre geschaffen haben, die die Arbeit am Institut erleichtert hat.

Weiters bedanke ich mich bei Prof. Hermetter für die Unterstützung in speziellen fluoreszenztechnischen Fragen.

Meinen Familienangehörigen, insbesondere meiner Mutter Johanna, meiner Schwester Sabine und meinem Vater Hartwig, möchte ich abschließend danken. Diese waren immer eine unerlässliche Stütze für meine Arbeit.

Danke.

Harald Schöffner
Graz, April 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aufgabenstellung	2
1.2. Innovationen der vorliegenden Arbeit	4
1.3. Aufbau Dissertation	4
2. Methoden für die Ermittlung der 3D Papierstruktur	6
2.1. Einleitung	6
2.2. 2D und 3D Messmethoden	7
2.3. Fluoreszenzmethoden im Allgemeinen und in der Papiertechnik	12
2.3.1. Methoden zur Steigerung der Bildqualität in der Lichtmikroskopie	13
2.3.2. Definition der Fluoreszenz	15
2.3.3. Eigenschaften der Fluoreszenz	16
2.3.4. Primäre und sekundäre Fluoreszenz	22
2.3.5. Fluorophore und Färbemethoden	25
2.3.6. Fluoreszenzmikroskope	32
2.4. Zusammenfassung	37
3. Die μSTRUCSCOP Methode	39
3.1. Einleitung	39
3.2. Aufbau und Eckdaten des Messsystems	39
3.3. Hardwarekomponenten und Eigenschaften	42
3.4. Benutzeroberfläche zur Messablaufsteuerung	47
3.4.1. Registerkarte LIVE VIEW	48
3.4.2. Registerkarte MESSABLAUF	51
3.4.3. Registerkarte MESSUNG	53
3.5. Softwarekomponenten und Eigenschaften	54
3.5.1. Online 1D und 2D Stitching	55
3.5.2. Hardware Aligning mit Positionssensor	56
3.5.3. Online Hardware und Online Software Aligning	59
3.6. Künftige Entwicklungen	61
3.7. Zusammenfassung	62
4. Methoden der Fluoreszenzmessungen und Ergebnisse	63
4.1. Einleitung	63
4.2. Ablauf der μ STRUCSCOP Methode	64
4.2.1. Herstellung von Laborpapier	64
4.2.2. Strategie für die Auswahl von Fluorophoren und Färbemethoden	65

4.2.3.	Laborarbeiten für die Vorbereitung zur Messung und Justierung der Messparameter	69
4.2.4.	Qualitative und Quantitative Bewertung von Fluoreszenzbildern	69
4.2.5.	Behandlung der Artefakte in den einzelnen Arbeitsschritten	72
4.3.	Messung von Papier durch primäre Fluoreszenz	81
4.3.1.	Evaluiierung der primären Fluoreszenz der Papierproben	81
4.3.2.	Messung und Ergebnisse	83
4.4.	Messung von Papier durch sekundäre Fluoreszenz	84
4.4.1.	Ablauf und Ergebnisse der Harzfärbung	85
4.4.2.	Ablauf und Ergebnisse der Massefärbung	88
4.4.3.	Ablauf und Ergebnisse der Kombination aus Massefärbung mit Harzkontrastierung	96
4.4.4.	Ablauf und Ergebnisse der Papierfärbung	101
4.5.	Zusammenfassung	111
5.	Anwendungsbeispiele für die Messung von 3D Strukturen	113
5.1.	Einleitung	113
5.2.	Messung der Porosität von Papier	113
5.2.1.	Einleitung	114
5.2.2.	Papierproben	115
5.2.3.	Messung mit der μ STRUCSCOP Methode und automatische Berechnung der Porosität in Matlab	117
5.2.4.	Diskussion	119
5.3.	Evaluiierung einer 3D Rekonstruktion von gefärbten Laborpapier	120
5.3.1.	3D Rekonstruktion von massegefärbtem Eukalyptuspapier	121
5.3.2.	Diskussion	122
5.4.	Evaluiierung einer 3D Rekonstruktion eines tierischen Embryos	124
5.4.1.	Histologische Probe	124
5.4.2.	Messung und 3D Rekonstruktion	124
5.4.3.	Diskussion	124
5.5.	Zusammenfassung	125
6.	Zusammenfassung und Ausblick	127
6.1.	Die μ STRUCSCOP Methode	127
6.2.	Adaption von Fluoreszenztechniken für die Papieranalyse	128
6.3.	Anwendungsbeispiele	128
6.4.	Ausblick	130
A.	Kenndaten der Fluorophore	132
A.1.	Materialbezugsquellen der verwendeten Färbemittel	132
A.2.	Strukturformeln und Spektren	132

B. Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf das Spektrum	140
C. Kenndaten der Filterwürfel	143
C.1. Filterwürfel <i>A</i>	143
C.2. Filterwürfel <i>GFP</i>	143
C.3. Filterwürfel <i>BFP/GFP</i>	145
D. μSTRUCSCOP Hardware	146
D.1. Kenndaten und Spektren der Lichtquellen	146
D.2. Kenndaten des Fluoreszenzmikroskops DM2500 MH	147
D.3. Kenndaten Lineartische	148
D.4. Kenndaten Mikrotom Leica RM 2255	148
D.4.1. Schaltplan für die Ansteuerung des Mikrotoms	149
D.4.2. Elektronische Bauteile	149
D.5. Schaltplan für die Verdrahtung der externen Schnittstelle mit dem Mi- krotom und der Pneumatik	150
D.6. Kenndaten Positionssensors	150
D.7. Kenndaten Pneumatiksystem	150
D.8. Kenndaten Kamera	151
D.9. Kenndaten schwingungsgedämpfter Tisch	152
D.10. Kenndaten Steuerungs-PC	152
E. μSTRUCSCOP Software	154
E.1. Steuerungssoftware	154
E.2. ICG Software	154
E.3. Unit Test Software	155
E.4. Alicona IFM Software	155
Literaturverzeichnis	156

Abbildungsverzeichnis

2.1. Abgrenzung verschiedener Messmethoden.	8
2.2. Farb- bzw. Wellenlängenspektrum	16
2.3. Vereinfachtes Jablonski Diagramm.	17
2.4. Möglichkeiten der Abgabe von Anregungsenergie eines Moleküls.	18
2.5. Anregungs- und Emissionsspektrum der Fluoreszenz.	19
2.6. Jablonski Energiebänder Diagramm	20
2.7. Einfluss der Anregungswellenlänge auf das Emissionsspektrum.	22
2.8. Strukturformel des Basismoleküls von Lignin	23
2.9. Strukturformel von Fluorescein	26
2.10. Strukturformel von 4,4'-Diamino-stilben-2,2'-disulfonsäure	27
2.11. Fluoreszenzspektrum Macrolex Fluoreszenzgelb 10G.	29
2.12. Einfluss Lösungsmittel auf das Absorptionsspektrum von Phenol	31
2.13. Einfluss des Lösungsmittels auf das Spektrum von Eosin,sprittlöslich.	32
2.14. Prinzipbild eines Fluoreszenzmikroskops	33
2.15. Spektrum Lichtquelle und Objektivtransmissionskurve	34
2.16. Skizze eines Filterwürfels von Leica	35
2.17. Spektrum Macrolex FG 10G und Transmission des Filterwürfels GFP	36
2.18. Fluoreszenzbilder bei unterschiedlichen Objektiven	37
3.1. Das μ STRUCSCOP Messsystem	40
3.2. Spektrum der VIS Lichtquelle	43
3.3. Filterrad und Filterwürfel des Leica DM 2500 M	44
3.4. Montage und prinzipielle Funktion des Positionssensors	45
3.5. Abweichung der Endposition des Probenhalters des Mikrotoms	46
3.6. Spektrale Sensitivität der Kamera.	47
3.7. Registerkarte LIVE VIEW der grafischen Benutzeroberfläche (Teil 1).	48
3.8. Registerkarte LIVE VIEW der grafischen Benutzeroberfläche (Teil 2).	50
3.9. Registerkarte MESSABLAUF der grafischen Benutzeroberfläche.	51
3.10. Auswahl einer kleineren Region für die Aligning Software.	52
3.11. Registerkarte MESSUNG der grafischen Benutzeroberfläche.	53
3.12. Blockschaltbild der Programmarchitektur	54
3.13. Bildfelder bei 1D und 2D Stitching	56
3.14. Bildserie SW Aligning.	56
3.15. Bildserie HW und SW Aligning mit korrigiertem Achsenversatz	57
3.16. Flussdiagramm für HW Aligning Varianten	58
3.17. Zwei prinzipielle Methoden für das Aligning.	59
3.18. Evaluierung von HW und SW Aligning anhand eines Bohrlochs.	60

3.19. Evaluierung von HW und SW Aligning anhand von Bohrlöchern. . . .	61
4.1. Hergestellte, ungefärbte Laborpapiersorten	65
4.2. Methode zur Auswahl eines Fluorophores.	66
4.3. Schwellwertfindung bei Fluoreszenzbildern.	70
4.4. Qualitative und quantitative Bewertung des Fluoreszenzbildes.	72
4.5. Mögliche Artefakte in den Arbeitsschritten.	73
4.6. Durchscheinartefakte durch Fluoreszenzlicht.	74
4.7. Durchscheinartefakte durch Fluoreszenzlicht 2.	75
4.8. Vergleichsmessung der Durchscheinartefakte mit einem CLSM.	76
4.9. Durchscheinen bei Echtlichtaufnahmen.	76
4.10. Verteilen von Färbemittel beim Einbetten der Probe.	77
4.11. Primäre Fluoreszenz des Einbettmittels TechnoVit.	78
4.12. Artefakte beim Stitching durch fehlende Bildstrukturen.	79
4.13. Einfluss des Kameraparameters <i>Gamma</i>	81
4.14. Autofluoreszenz bei Laborpapier aus TMP Faserstoff.	84
4.15. Ablauf der Harzfärbung	85
4.16. Harzfärbung mit nicht-fluoreszierenden Chromophoren.	87
4.17. Ergebnisse der Harzfärbung	88
4.18. Ablauf der Massefärbung	89
4.19. Massefärbung von Eukalyptuslaborpapier mit Tinopal UP.	90
4.20. Massefärbung von Laborpapier mit Eosin,sprit (Filterwürfel A)	92
4.21. Massefärbung von Laborpapier mit Eosin,sprit (Filterwürfel GFP)	93
4.22. Massefärbung mit unterschiedlichen Dosierungen	95
4.23. Ergebnisse der Massefärbung	96
4.24. Ablauf der Kombination von Massefärbung mit Harzkontrastierung.	97
4.25. Spektren des Filterwürfels BFP/GFP und der Fluorophore.	98
4.26. Mehrfachfärbung von TMP Faserstofflaborpapier.	99
4.27. Mehrfachfärbung von Eukalyptuszellstofflaborpapier.	100
4.28. Ergebnisse der Kombination von Massefärbung mit Harzkontrastierung.	101
4.29. Ablauf der Papierfärbung	102
4.30. Papierfärbung mit Tinopal UP.	104
4.31. Einfluss verschiedener Schwellwerte in der Papierfärbung.	105
4.32. Strukturformel Rhodamine 123.	106
4.33. Eukalyptuszellstoffpapier gefärbt mit <i>Rhodamine 123</i>	106
4.34. Strukturformel CaCO_3	108
4.35. Papierfärbung mit <i>Calcium Green 1</i>	110
5.1. Messmethoden zur Bestimmung der Porosität.	114
5.2. Papierprobenentnahme für die Porositätsmessung	116
5.3. Echtlichtaufnahmen der TMP Faserstoffproben.	116

5.4. Berechnung der Porosität mit Matlab.	117
5.5. Histogramme der gemessenen Porosität.	118
5.6. Mittelwerte der gemessenen Porosität.	119
5.7. 3D Volumenrekonstruktion einer Eukalyptuspapierprobe (Probe 1). . .	122
5.8. 3D Volumenrekonstruktion einer Eukalyptuspapierprobe (Probe 2). . .	123
5.9. 3D Rekonstruktion eines Mäuseembryos.	125
5.10. Artefakte bei der 3D Rekonstruktion des Mäuseembryos.	126
A.1. Strukturformel von Macrolex Fluoreszenzgelb 10G.	133
A.2. Fluoreszenzspektrum von Macrolex Fluoreszenzgelb 10G.	134
A.3. Fluoreszenzspektrum von Eosin,spritlöslich.	135
A.4. Fluoreszenzspektrum von Tinopal UP.	136
A.5. Fluoreszenzspektrum von Tinopal ABP-E.	137
A.6. Strukturformel von Rhodamine 123.	138
A.7. Spektrum von Rhodamine 123.	138
A.8. Strukturformel von Calcium Green 1.	139
A.9. Spektrum von CalciumGreen1.	139
B.1. Absorptionsspektrum Eosin,spritlöslich mit 4 Lösungsmitteln.	141
B.2. Emissionsspektrum Eosin,spritlöslich mit 4 Lösungsmitteln.	142
C.1. Transmissionsspektrum des Filterwürfels A	144
C.2. Transmissionsspektrum des Filterwürfels GFP	144
C.3. Transmissionsspektrum des Filterwürfels BFP/GFP	145
D.1. Spektrum Lichtquelle KL2500LCD	147
D.2. Wellenlängenspektrum EL6000	147
D.3. Schaltplan der Mikrotomelektronik.	149
D.4. Blockschaltbild externe Schnittstelle.	150
D.5. Spektrale Eigenschaften der Kamera.	151
D.6. Spektrale Eigenschaften des Kamerafilters	152

Tabellenverzeichnis

3.1. Eckdaten des μ STRUCSCOP Messsystems	42
3.2. Resultierende Bildversatz beim Mikrotomversatz.	57
4.1. Kenndaten der nicht fluoreszierenden Chromophore.	86
4.2. Kenndaten der OBAs für die Massefärbung.	89
4.3. Kenndaten der Fluorophore für die Massefärbung.	91
4.4. Ergebnisse Dosierungsversuche bei der Massefärbung.	94
4.5. Kenndaten des optischen Aufhellers <i>Tinopal UP</i>	102
4.6. Kenndaten des Fluorophors Rhodamine 123.	105
4.7. Kenndaten des Fluorophors <i>Calcium Green 1</i>	108
5.1. Parameter der Papierproben zur Porositätsmessung.	116
5.2. Ergebnisse der Porositätsmessung.	119
C.1. Kenndaten des Filterwürfels A.	143
C.2. Kenndaten des Filterwürfels GFP.	144
C.3. Kenndaten des Filterwürfels BFP/GFP.	145
D.1. Kenndaten der VIS Lichtquelle.	146
D.2. Kenndaten der UV Lichtquelle.	146
D.3. Kenndaten Fluoreszenzmikroskop.	148
D.4. Kenndaten der Lineartische.	148
D.5. Kenndaten des Rotationsmikrotoms.	148
D.6. Liste der elektronischen Bauteile für die Mikrotomelektronik.	149
D.7. Kenndaten Positionssensor	150
D.8. Kenndaten Pneumatiksystem	151
D.9. Kenndaten Kamera	151
D.10. Kenndaten schwingungsgedämpfter Tisch	152
D.11. Kenndaten Steuerungscomputer	153

Einleitung

Die detaillierte Analyse der Eigenschaften von Papier und der in der Herstellung verwendeten Rohmaterialien ist für Innovationen unumgänglich. Dazu werden seit Jahrzehnten Messmethoden eingesetzt, die zu Beginn vielfach in anderen wissenschaftlichen Disziplinen ihre Anwendung fanden. Das so gefundene Wissen war und ist maßgeblich für die Steigerung der Qualität von Papier und die Effizienz der Herstellung verantwortlich.

Anfang und Mitte des 20. Jahrhunderts waren diese Analysemethoden noch, aus heutiger Sicht, einfache mechanische bzw. physikalische, chemische und optische Messmethoden, die entweder auf das fertige Papier oder auf einzelne Rohmaterialien angewendet wurden. In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts und besonders in den letzten 20 Jahren eröffneten neue Messmethoden aufgrund der technischen Informatik und Computertechnik Möglichkeiten, die bis dato noch nicht ausgeschöpft sind. Dazu gehören, was für die vorliegende Arbeit interessant ist, bildgebende Messmethoden, wie PC-gestützte konventionelle Lichtmikroskopie (wide-field microscopy), konfokale Lichtmikroskopie (CLSM), Elektronenmikroskopie (EM), Mikrotomographie (μ CT), und andere.

Alle diese Messsysteme wurden und werden verstärkt zur Analyse von Papierstrukturen eingesetzt. Die Kenntnis der 3D Verteilung von Papierrohmaterial, sowie der inneren geometrischen Struktur von Papier (z.B. Poren), ist eine ideale Ergänzung zu den bereits etablierten und z.T. standardisierten Messmethoden (z.B. indirekte Messung der Porosität durch Permeabilität). Anfangs beschränkten technische Grenzen noch den Messbereich und die Messauflösung der bildgebenden Methoden. Mittlerweile ist aber genügend Rechenleistung durch neue Computersysteme verfügbar.

Eine Barriere in der Analyse von Papier ist die Anforderung von hoher Auflösung bei gleichzeitig großer Probengröße. Da Papier stark inhomogen ist, muss eine große Probengröße von einigen mm^2 gemessen werden, um statistisch vernünftige Aussagen

treffen zu können. Gleichzeitig sind die eingesetzten Rohmaterialien oft nur mit sehr hoher Auflösung unter $1\text{ }\mu\text{m}$ erfassbar.

Bei der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Papier, können z.B. folgende Kenngrößen von Papier unmittelbar aus den Bilddaten ermittelt werden:

- Lage bzw. Orientierung der Fasern im Papier,
- Zustand der Faser bzw. der Faseroberfläche,
- 2D/3D Verteilung der Fasern im Papier,
- 2D/3D Verteilung der Füllstoffe im Papier,
- 2D/3D Verteilung des Strichs im Papier,
- Lage von Poren, und
- geometrische Struktur der Poren.

Diese Daten wiederum erlauben Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Papiereigenschaften und den Parametern Herstellungsprozesses.

1.1. Aufgabenstellung

Wie schon erwähnt, sind eine Reihe von hochtechnisierten Messsystemen im Einsatz, von denen allerdings nur die lichtmikroskopische Methode $\mu\text{STRUCSCOP}$ Generation 1, basierend auf einer Serienschnitttechnik nach WILTSCHKE UND DONOSER (2004), WILTSCHKE ET AL. (2010) alle folgenden Anforderungen für die Papiertechnik erfüllen kann:

- eine Probengröße von einigen hundert mm^3 (i.V. zu EM und CLSM),
- bei einer Auflösung bis unter $1\text{ }\mu\text{m}$ (i.V. zu μCT),
- mit einfacher, automatisierbarer Handhabung (i.V. zu CLSM und EM), und
- mit geringen Kosten (i.V. zu EM, CLSM und μCT),

Aus den Forschungstätigkeiten der letzten Jahre entstand am Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik ein Messsystem, das die notwendigen Anforderungen, für die Messungen der 3D Struktur von Papier und weichen Materialien, erfüllt. Dieser Forschungsprototyp ($\mu\text{STRUCSCOP}$) wurde über mehrere Jahre aufgebaut. Wie bei einem Forschungsprototypen üblich, sind einzelne Komponenten je nach Verfügbarkeit getestet und eingesetzt worden. Das hat zur Folge, dass einzelne Hardware und Softwarekomponenten im Falle eines Schadens nicht mehr wartbar sind.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung dieses Forschungsprototypen in einen kommerziell verwertbaren vorindustriellen Prototypen (μ STRUCSCOP Gen.2).

Dies beinhaltet bezüglich der Hardwarekomponenten:

- Aktualisierung der Hardwarekomponenten auf den Stand der Technik,
- Verfügbarkeit und Wartbarkeit der Komponenten über mehrere Jahre,
- Integration eines hochgenauen Positionssensors zur Unterstützung der Bildverarbeitung,
- Integration eines Fluoreszenzmikroskops zur Anwendung von Fluoreszenzmethoden in der Papiertechnik, und
- Modularer Aufbau des Messsystems für künftige Erweiterungen.

Diese Weiterentwicklung beinhaltet bezüglich der Softwarekomponenten:

- Zentrale Benutzeroberfläche nach ISO Standard 9241-110,
- Modular aufgebaute Steuerungssoftware (auch für künftige Erweiterungen),
- Online Bildverarbeitung (Stitching und Aligning), und
- Erweiterung des Bildfelds auf 2D (Stitching).

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Selektion von möglichen Ansätzen von Fluoreszenzmethoden für die papiertechnische Analyse. Vorrangig soll damit der Bildkontrast im digitalisierten 3D Bilderstapel angehoben werden, um weitere Bildverarbeitung (z.B. automatisierte Segmentierung) zu ermöglichen. In diesem Teil der Aufgabenstellung soll daher der Bildkontrast zwischen folgenden Komponenten verbessert werden:

- Papierrohmaterialien und Einbettmedium (um die 3D Porenstruktur messen),
- Fasern und Einbettmittel (um die Fasermorphologie bestimmen zu können), und
- Anorganisches Papierrohmaterial (Füllstoff) und organisches Papierrohmaterial (um die 3D Füllstoffverteilung messen zu können).

Um die technischen Ressourcen des μ STRUCSCOP Gen.2 Messsystems optimal zu nutzen, soll aus einem großen Feld von Fluoreszenzmethoden, ein Überblick der anwendbaren Techniken recherchiert werden. Das beinhaltet die ständige Abstimmung und Erweiterung der Hard- und Software des μ STRUCSCOP Gen.2 Messsystems auf unterschiedliche Fluoreszenzfärbemethoden. Die so gefunden Ansätze sollen am neuen Messsystem getestet und evaluiert werden.

1.2. Innovationen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der bestehende Prototyp technisch aufgerüstet und funktionell durch Bildverarbeitung und Fluoreszenzmikroskopie erweitert. Fluoreszenzmethoden ermöglichen u.a. den Bildkontrast zu erhöhen. Weiters wird Fluoreszenz eingesetzt, um die Lokalisierung mit dem Lichtmikroskop zu ermöglichen. Eine eigens entworfene Steuerungssoftware ermöglicht mit der Fertigstellung des vorindustriellen Prototyps, den Messablauf vollständig zu automatisieren. Mit diesem Messsystem μ STRUCSCOP Generation 2 ist es möglich papieranalytische Untersuchungen, basierend auf fluoreszenzoptischen Verfahren, durchzuführen. Dafür wurden zahlreiche Labormethoden aus der medizinischen Technik evaluiert und eine Reihe von Verfahren für die Papiertechnik adaptiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch zahlreiche mögliche Weiterentwicklungen dokumentiert. Die μ STRUCSCOP Methode ist modular aufgebaut. Somit ist es möglich Neuerungen in Hardware, Software und in der Fluoreszenzmikroskopie einfach zu integrieren.

1.3. Aufbau Dissertation

Im **Kapitel 2** der vorliegenden Arbeit wird ein Überblick der bestehenden Methoden zur bildgebenden zwei- und dreidimensionalen Strukturanalyse von Papier dargestellt. Da diese Messmethoden mittlerweile interdisziplinär eingesetzt werden, ist eine Abgrenzung zwischen Messmethoden und deren Anwendungen in der medizinischen und papiertechnischen Analyse, mit und ohne Fluoreszenzmethoden, angeführt. Schwerpunkte für die vorliegende Arbeit sind Methoden, die Fluoreszenztechniken anwenden, da diese möglicherweise für die Papiertechnik adaptiert werden können. Da fluoreszenzoptische Methoden und Komponenten in der 2D und 3D Papieranalyse immer noch neu und selten zu finden sind, wird in diesem Kapitel eine Einführung in die Fluoreszenz und die Fluoreszenzmikroskopie gegeben.

Im **Kapitel 3** wird die im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelte Methode μ STRUCSCOP Gen.2 vorgestellt. Es werden bestehende und weiterentwickelte Hardware- und Softwarekomponenten beschrieben. Darin werden deren Notwendigkeit begründet und weiters deren Vor- und Nachteile erläutert. Insbesondere sind das die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware und das online Hardware/Software Aligning auf Basis eines hochgenauen Positionssensors.

Im **Kapitel 4** wird der prinzipielle Ablauf der μ STRUCSCOP Methode erläutert. Es werden aus der Literatur bekannte, prinzipielle Fluoreszenzfärbetheorien verwendet und mit drei verschiedenen Färbemethoden für die Papiertechnik adaptiert. Weiters werden die getesteten Laborpapiersorten und die notwendigen Laborarbeiten erläutert. Die gemessenen Bilddaten werden, anhand einer qualitativen und quantitativen Bewertung, diskutiert. In den einzelnen Arbeitsschritten entstehen Artefakte, welche

die Bilddaten der Messergebnisse beeinflussen können. Diese Artefakte werden ebenfalls in diesem Kapitel erläutert. Der Hauptteil dieses Kapitels ist die Beschreibung der durchgeführten Färbemethoden und die Bewertung deren Ergebnisse.

Im **Kapitel 5** ist eine Evaluierung für eine Anwendung der μ STRUCSCOP Methode zur Analyse der Porosität im Papier zu finden. Weiters sind nach einfacher Bildverarbeitung durch Schwellwertbildung, 3D Modelle von Papier dargestellt und deren Qualität wird diskutiert. Da die μ STRUCSCOP Methode nicht nur auf Papier beschränkt ist, wird in diesem Kapitel, als Beispiel für weitere Anwendungen, die Rekonstruktion eines tierischen Embryos gezeigt.

Das **Kapitel 6** fasst die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen und bietet einen Ausblick auf weitere Methoden und Möglichkeiten für die fluoreszenzbasierende Messung mit der μ STRUCSCOP Methode.

Im **Anhang** sind sämtliche Daten zu den Hardwarekomponenten, Spektren der verwendeten Filterwürfeln und Fluorophore gelistet. Die entworfenen Schaltpläne der elektronischen Schaltungen sowie deren Materialbezugsquellen sind ebenfalls angeführt. Weiters sind die zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit für den Autor interessanten Internet Links zum Thema angegeben.

Methoden für die Ermittlung der 3D Papierstruktur

In diesem Kapitel werden gängige Messsysteme und Methoden für die 2D und 3D Analyse von Papier vorgestellt und nahe liegenden Systemen aus der Medizin und der Papiertechnik gegenübergestellt. Danach folgt eine Einführung in die Fluoreszenz (Eigenschaften und Färbemittel) und eine Darstellung der notwendigen Hardware in einem Fluoreszenzmikroskop.

2.1. Einleitung

Die Notwendigkeit der dreidimensionalen Analyse von Papier wurden bereits von WILTSCHKE (2006) und KRITZINGER (2010) erläutert. Die daraus resultierenden Anforderungsparameter für ein 3D Messsystem waren und sind:

1. Auflösungen im Bereich von μm und darunter sind notwendig, um originalgetreue Bilder von Papier und Papierbestandteilen, wie Pigmenten und Füllstoffen (bis zu $1\ \mu\text{m}$) oder auch Fasern (bis zu $30\ \mu\text{m}$ im Durchmesser) zu erhalten.
2. Die Größe der Papierproben muss eine statistische Aussage zulassen, d.h. lokale Schwankungen in der Papierstruktur sollen das Messergebnis nicht beeinträchtigen.
3. Die Probengröße sollte prinzipiell unabhängig von der Auflösung des Messsystems sein.
4. Die Kombination dieser Anforderungen soll dennoch eine vorteilhafte Kosten-Nutzen Situation gegenüber anderen 3D Systemen ermöglichen.

WILTSCHE (2006) unterscheidet in seiner Recherche über wissenschaftlich und kommerziell vorhandene Messtechnik, zwischen zerstörungsfreien und nicht-zerstörungsfreien Methoden. Weiters ist es möglich den Messungen einzelner Papierbestandteile auch die geeignetsten Messsysteme zuzuordnen, da eine Messung mit beispielsweise dem Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscopy, AFM), mit seiner hohen Auflösung aber geringen Probengröße, besonders für die Analyse von einzelnen Fasern und deren Oberflächen, geeignet ist (siehe SCHMIED ET AL. (2009)). Ein Messablauf mit dem Mikrotomographen (CT, μ CT) ermöglicht beispielsweise eine rasche Analyse von unpräparierten, großen Papierproben, aber, da Papier ausschließlich aus leichten Atomen besteht, nur mit geringerer Bildqualität und in Konsequenz mit geringerer effektiver Auflösung, als bei Proben mit beispielsweise Goldatomen (siehe SASOV ET AL. (2009B)).

2.2. 2D und 3D Messmethoden

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Analyse von Papier und Bestandteilen mittels Fluoreszenzmethoden für Strukturen bis, wie oben gelistet, in den sub- μ m Bereich und Probengrößen bis zu hundert mm^3 . Fluoreszenzmethoden werden gegenwärtig mehrheitlich in der medizinischen Analyse eingesetzt, um vor allem den Bildkontrast zu erhöhen - siehe MULISCH UND WELSCH (2010). Einige typische Fluoreszenzmethoden wurden in der vorliegenden Arbeit für die 3D Analyse von Papier adaptiert - siehe Kapitel 4. Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht mit häufig verwendeten 2D und 3D bildgebende Messsystemen und Messmethoden in der Papiertechnik und in der Medizin. Die 4 definierten Bereiche sind:

1. die Analyse von Papier und Bestandteilen,
2. die Analyse von Papier und Bestandteilen mittels Fluoreszenzmethoden,
3. die medizinische Analyse und
4. die medizinische Analyse mittels Fluoreszenzmethoden.

Im Folgenden werden die Messsysteme und Messmethoden aus Abbildung 2.1 alphabetisch angeführt und kurz erläutert. Die Auflistung basiert auf der Bearbeitung von WILTSCHE (2006) und WILTSCHE ET AL. (2010). Ergänzende oder weiterführende Referenzen sind jeweils angegeben.

AFM (Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskop): Dieses nicht zerstörungsfreie Messsystem wird bei sehr hohen Auflösungen (zig nm) aber kleinen Probengrößen (μ m) eingesetzt, um z.B. Oberflächen von Papierfasern in 3D zu messen - siehe SCHMIED ET AL. (2009).

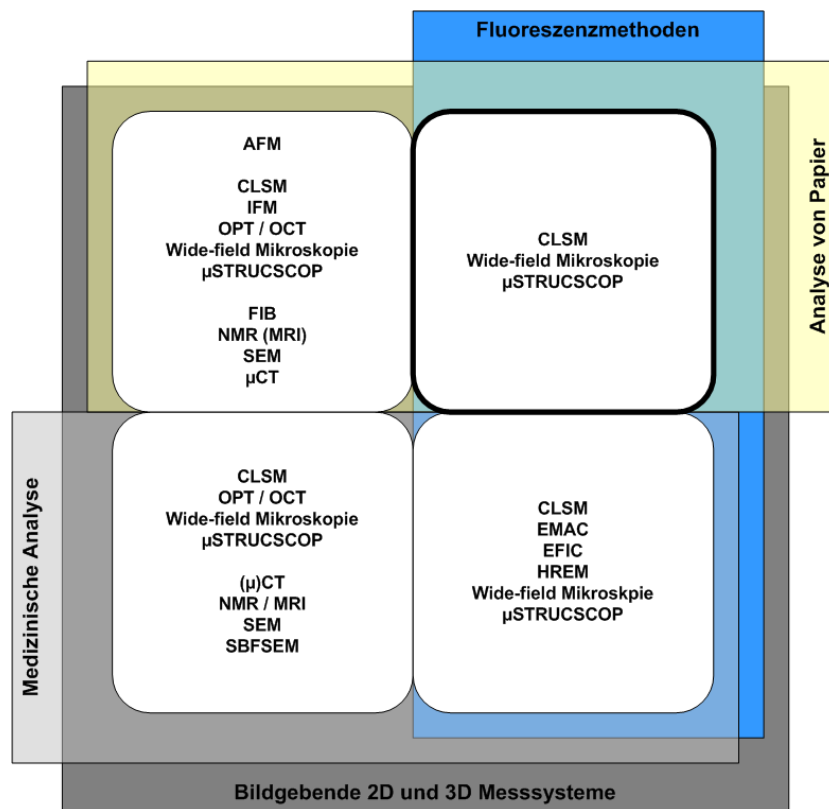


Abb. 2.1. Die Anwendungsgebiete der gelisteten Messmethoden überschneiden sich teilweise und zeigen bei der Nutzung fluoreszenzoptischer Methoden in der Analyse von Papier vergleichsweise nur eine geringe Anzahl verfügbarer Messsysteme.

CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy): Das CLSM hat sich zu einem der wichtigsten 2D und 3D Messgeräte in der Medizin und der Papiertechnik etabliert. Die Möglichkeit der optischen Schnitte hat, vor allem in der Medizin und bei Materialien mit geringer optischer Dichte, große Vorteile (zerstörungsfreie Messung, optimal aligned Schnittebenen oder einfache Probenpräparation). Weitere Infos dazu sind im Standardwerk von PAWLEY (1995) und bei WILHELM ET AL. (2009) zu finden. Die Abnahme der Signalintensität bei Zunahme der Probendicke begrenzt allerdings eine umfangreiche 3D Messung.

Von CAPEK ET AL. (2009) wurden bereits Messungen an Rattenembryos durchgeführt, welche die Mikrotomie, also physikalisches Schneiden, mit optischen Schnitten durch das CLSM kombinieren. Diese wurden anschließend aligned. Außerdem wurden größere Probenflächen vermessen und gestitched. Diese Messung erfordert jedoch zeitintensive Benutzereingriffe (z.B. das Auftragen der einzelnen Mikrotomschnitte auf die Objektträger). Von ERZEN ET AL. (2009) wurden Methoden zur automatischen Bildverarbeitung vorgeschlagen, um aus den 3D Datensätzen von menschlichem Gewebe

Kapillaren zu segmentieren, deren Orientierung im Raum und deren Länge zu erfassen. Die Dimension von Kapillaren sind im selben Größenbereich wie Papierfasern. In der Analyse von Papier wird das CLSM in Kombination mit Fluoreszenzmethoden bereits seit Anfang der 90er Jahre verwendet. ROBERTSON ET AL. (1992) färbten Papierfasern mit Fluoreszenzfarbstoffen und erstellten 3D Modelle. Diese Modelle konnten per Software virtuell in anderen Raumebenen geschnitten werden. Ein häufiges Einsatzgebiet ist die Echtzeitanalyse von autofluoreszierendem Lignin in Papierfasern z.B. während dem Bleichen, wie in der Arbeit von BARSBERG UND NIELSEN (2003), oder die Ermittlung der 3D Verteilung von Lignin in der Faser - siehe LI UND REEVE (2004). Neben der Strichanalyse, wie bei OZAKI ET AL. (2006B), wurde von HORVATH (2008) auch die Adsorption von fluoreszierenden Mikropartikel (Dextranen) an einzelne Fasern mit dem CLSM in 3D untersucht. In Kombination mit der 2-Photonen Mikroskopie konnten JANG ET AL. (2011) die Autofluoreszenz von unterschiedlich stark präparierten Papierproben nutzen, um die Verteilung der Füllstoffe, der Fasern, der Tinte, der Poren und des Strichs in 2D darzustellen (Infos zur 2 Photonen Mikroskopie sind in VALEUR (2001) zu finden). Außerdem wurden Ansätze zur 3D Porenanalyse vorgestellt. Von ARTHUR ET AL. (2011) wurde die Penetration fluoreszenzmarkierter Tinte ins Papier in 2D gemessen.

EFIC (Episcopic Fluorescence Image Capturing): Bei dieser nicht zerstörungsfreien von WENINGER UND MOHUN (2002) vorgestellten 3D Fluoreszenzmethode für die histologische Untersuchung, werden Auflösungen im μm Bereich bei Probengrößen bis 10 mm^3 erreicht. Eine zusätzliche Färbung der Proben (Embryos) mit Fluoreszenzfarbstoffen ist nicht notwendig, da die Autofluoreszenz des organischen Gewebes stark genug ist. Mit einem Mikrotom wurden physikalische Schnitte der Probe angefertigt. Die Schnittoberfläche des verbleibenden Harzblocks wurde mit einem konventionellen Auflichtmikroskop (widefield microscope) fotografiert.

EMAC (External Marker Based Image Congruencing): Bei diesem 3D Verfahren von STREICHER ET AL. (1997), wurden physikalische Schnitte einer histologischen Probe angefertigt und nach Aufbringen auf Objektivträger, Durchlichtaufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop erstellt. Um ein automatisiertes und genaues Aligning der einzelnen Bilder im resultierenden 3D Stapel anfertigen zu können werden außerhalb der eingebetteten Probe Markierungen (Bohrlöcher) zugefügt. Ein spezielles Softwareprodukt richtete die versetzten und verzerrten Einzelschnitte wieder aufeinander aus.

FIB (Focused Ion Beam): Bei dieser nicht zerstörungsfreien von ENGSTLER UND MÜCKLICH (2009) vorgestellten 3D Methode werden physikalische Schnitte mit einem fokussierten Ionenstrahl direkt und ohne Präparation innerhalb eines REM (Rasterelektronenmikroskop) durchgeführt. Anschließend werden Aufnahmen von z.B. kleineren Abschnitten im Papierstrich mit dem REM gemacht - siehe PAPIERTECHNISCHE

STIFTUNG (2011). Diese Methode erlaubt Probenflächen nicht größer als μm^2 . Wird zum physikalischen Schneiden der Probe die Methode BIB (Broad Ion Beam) verwendet sind Probenflächen bis mm^2 möglich, diese Vorrichtung befindet sich aber außerhalb des REM und erfordert daher erheblichen Zeitaufwand für den Wechsel der Proben während einer 3D Messung.

HREM (High Resolution Episcopic Microscopy): Bei dieser, nicht zerstörungsfreien Methode von WENINGER ET AL. (2006), ist eine Weiterentwicklung von EFIC (siehe oben). In dieser Arbeit wurden histologische Proben (Embryos) mit Fluoreszenzfarbstoffen unspezifisch (Eosin) und spezifisch gefärbt. Das Messsystem besteht aus einer Kamera, einem Fluoreszenzmikroskop und einem Mikrotom, das auf einem 2D beweglichen Achsensystem steht. Es konnte gezeigt werden, dass Auflichtmikroskopie (eng. episcopic microscopy) bezüglich Auflösung und Probengröße den Anforderungen einer üblichen Analyse histologischer Proben entspricht.

IFM (Infinite Focus Measurement): Diese zerstörungsfreie 2D (3D in der Oberfläche) Messmethode wird auch für die Analyse von Papieroberflächen verwendet. Ein Lichtmikroskop generiert mittels Fokusvariation Aufnahmen der Oberflächenbeschaffenheit von z.B. Papier (WIND (2011)).

NMR / MRI (Nuclear Magnetic Resonance / Magnetic Resonance Imaging): Diese zerstörungsfreie 3D Messmethode wird für die medizinische Analyse von organischen Geweben und für die Analyse von Papier verwendet. Dem Vorteil der einfachen Handhabung steht hingegen eine geringe Auflösung (theoretisch bestenfalls $10\mu m$) gegenüber - siehe WENINGER UND MOHUN (2002) und WILTSCHKE (2006).

OPT / OCT (Optical Projection Tomography / Optical Coherence Tomography): Wie schon von WILTSCHKE (2006) beschrieben, ist die Auflösung noch zu gering, um eine detaillierte Analyse von Papier zu ermöglichen. Auch WENINGER ET AL. (2006) schränkt die Möglichkeiten für histologische Proben ein, da die Proben möglichst transparent sein müssen.

REM (Rasterelektronenmikroskop, Scanning Electron Microscope): Vor allem Auflösung (bis in den nm Bereich) und Bildkontrast sprechen für diese Messmethode. ARONSSON (2002) hat mit diesem Messsystem die Möglichkeit der Bestimmung von dreidimensionalen Porenverteilungen im Papier evaluiert. Dabei verwendete er eine Serienschneittechnik mittels Mikrotom. CHINGA ET AL. (2004) stellten eine Schleiftechnik vor, um 3D Bilddatensätze der Papierproben mit einem REM generieren zu können. Um die Genauigkeit des Aligning zwischen den Bildern zu verbessern, wurden Polystyrenkugeln verschiedener Größe miteingebettet. Beide Techniken bieten Auflösungen bis in den nm Bereich, benötigen allerdings eine intensive Probenpräparation

und hohen manuellen Aufwand. Mit diesem Messsystem sind, in Kombination mit physikalischem Schneiden, 3D Analysen in der Medizin (siehe unten - SBFSEM) und Papiertechnik möglich.

SBFSEM (Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy): Diese von DENK UND HORSTMANN (2004) vorgestellte, nicht zerstörungsfreie 3D Messmethode, besteht aus einem Ultramikrotom, das in der Probenkammer eines REM montiert wurde. Die Auflösung ist entsprechend dem REM sehr hoch (bis unter 10nm), bei zwingend gekoppelten Probenflächen von etwa $15\mu\text{m}^2$. In der Arbeit wurden Gewebeprobe mit einem Volumen von etwa $(10 \times 20 \times 25)\mu\text{m}^3$ mit einer Auflösung von 12,7 nm/Pixel digitalisiert. Wie von WENINGER ET AL. (2006) angemerkt wurde, ist die Anwendung aufgrund des geringen Probenvolumens auf Zellen und Embryos im Frühstadium begrenzt. Auch für Papiermessungen ist die Probenfläche zu gering. Die Messung einzelner Fasern und Faser-Faserbindungen von Papier wurden mit einem prinzipiell ähnlichen Aufbau realisiert.

Wide-Field Mikroskopie (Konventionelle Lichtmikroskopie mit weitem Fokusbereich):

Das konventionelle Lichtmikroskop ist, trotz geringerer Fokusschärfe gegenüber dem CLSM, nach wie vor in allen Bereichen zu finden und wird es auch bleiben. Besonders in medizinischen Messungen hat sich die Fluoreszenzmikroskopie auch mit diesem Mikroskoptyp (wie auch das CLSM) durchgesetzt. Prinzipiell ist nur eine 2D Messung durchführbar, jedoch ist in Kombination mit physikalischem Schneiden auch eine 3D Bilddatengenerierung möglich. Zahlreiche Anwendungen sind hier im medizinischen Bereich zu finden. Erwähnt werden soll an dieser Stelle nur die Arbeit zur HREM Methode (siehe oben) und die Arbeit von KAZAKIA ET AL. (2006). Beide Methoden sind durch automatisierte Schnitttechnik und einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop zur 3D Bilddatengenerierung implementiert worden. KAZAKIA ET AL. (2006) verwendeten eine Kombination aus einer CNC Fräsmaschine, einer Vakuumpumpe und einem Fluoreszenzmikroskop mit einer CCD Kamera. Die Messung ist sehr zeitaufwändig - bei einer Auflösung von $(3 \times 3 \times 8)\mu\text{m}^3$ wurde ein Probenvolumen von ca. 250mm^3 in 87 h vermessen. Als sinnvolle Weiterentwicklung schlagen die Autoren eine Kombination aus ihrem System mit einem CLSM vor.

Trotz geringerer Fokusschärfe als das (teurere) CLSM, ist das konventionelle Lichtmikroskop auch in der papiertechnischen Analyse stark vertreten. Die beiden typischen Betriebsmoden (Auflicht und Durchlicht) sind, je nach Anwendung, zu finden. Von QUACKENBUSH (1984) wurde bereits die Strichbeschaffenheit mittels UV Anregung untersucht. Die Messung der Penetration von OBA ins Basispapier war ein Bestandteil der Arbeit von FORSTRÖM ET AL. (2003). Zur Visualisierung von Flockungs- und Adsorptionsprozesse bei der Herstellung von Papier, wurden von WHIPPLE UND MALTESH (2000) Fluoreszenzmarkierungen mit Rhodamine-B verwendet. Mithilfe eines Britt Jar Gerätes, dem markierten Flockungsmittel und fluoreszierenden Mikro-

kugeln, wurde die Suspension hergestellt. Danach wurden Proben auf Objektträgern aufgebracht und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine in-situ Methode zur Bestimmung der Bindefläche von Faser-Faser Bindungen mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden von THOMSON (2007) und THOMSON ET AL. (2008) vorgestellt. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode basiert auf der 3D Messmethode μ STRUCSCOP, das ebenfalls ein Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit physikalischem Schneiden verwendet.

μ STRUCSCOP: Diese nicht zerstörungsfreie 3D Messmethode für Normallichtbetrieb, wurde bereits von WILTSCHKE (2006), WILTSCHKE ET AL. (2010), WILTSCHKE UND DONOSER (2004), DONOSER ET AL. (2005), KAPPEL (2010), KRITZINGER ET AL. (2009) und KRITZINGER (2010) vorgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses 3D Messsystem weiterentwickelt und durch Fluoreszenztechniken bzw. Fluoreszenzmethoden erweitert. Eine detaillierte Erklärung dieser Methode ist im Kapitel 3 zu finden. Erste Ergebnisse wurden veröffentlicht (SCHÄFFNER ET AL. (2010)).

μ CT (Mikrocomputertomographie): Diese zerstörungsfreie 3D Messmethode wird in der Medizin und in der Papiertechnik verwendet. Vorteilhaft sind die geringe, bis nicht notwendige Probenpräparation und die hohe Probengröße. Es konnten bei speziellen Proben Auflösungen bis 100nm nachgewiesen werden - siehe SASOV ET AL. (2009B). Aufgrund der atomaren Zusammensetzung von Papierbestandteilen (vorwiegend leichte Atome der Papierfasern oder der Füllstoffe, keine schweren Atome wie Metalle, etc.), ist die Bildschärfe bzw. der Bildkontrast bei kommerziellen μ CTs, trotz der hohen Auflösung, gering. In der Arbeit von AXELSSON (2009) wurden 3D Bild-daten aus den einfacheren Desktop μ CTs, mit polychromatischer Strahlung und den sehr komplexen Großanlagen Synchrotronen mit monochromatischer Strahlung für die Analyse der Porenstruktur in Papier verwendet. Die Bildqualität eines Synchrotrons ist sehr gut, aber diese Geräte sind nur in Spezialfällen verfügbar.

Weitere bildgebende Tomographen aus der Medizintechnik arbeiten mit Photonene-mission (Single Photon Emission Computer Tomography - SPECT) oder mit Positro-nen (Positron Emission Tomography - PET).

2.3. Fluoreszenzmethoden im Allgemeinen und in der Papiertechnik

Die folgenden, in diesem Abschnitt zusammengefassten, Erläuterungen der Prinzipien der Fluoreszenz dienen einem besseren Verständnis für die vorliegende Arbeit und sind größtenteils den Büchern ARDENNE ET AL. (1997), VALEUR (2001), PAVIA ET AL. (2001), GRÜNDLER (2004), LAKONICZ (2006) und MULISCH UND WELSCH (2010) ent-nommen. Weiters wurden für diese Erläuterungen folgende Webseiten eingesehen:

LIFE TECHNOLOGIES¹, OPTICAL MICROSCOPY PRIMER², LUMINESZENZ - CHEMILUMINESZENZ - BIOLUMINESZENZ³ und LUMINESZENZ⁴ zu finden. Weiterführende Literaturstellen sind an den jeweiligen Textstellen angegeben.

Nach einer kurzen Überleitung von der normalen Lichtmikroskopie zur Fluoreszenzmikroskopie, wird in diesem Abschnitt das Phänomen Fluoreszenz grundlegend erklärt und an wichtigen Stellen bereits auf Teile der vorliegenden Arbeit Bezug genommen.

2.3.1. Methoden zur Steigerung der Bildqualität in der Lichtmikroskopie

Neben den primären Eigenschaften eines optischen Systems, wie Auflösung oder Vergrößerung, gibt es weitere Methoden um die Bildqualität zu verbessern. Bei Messungen mit Lichtmikroskopen haben sich mehrere Möglichkeiten zur Steigerung des Kontrastes (und damit der Bildqualität) etabliert. Neben Erweiterungen in der Hardware des Mikroskops, werden, vor allem in der medizinischen Analyse, z.B. Strukturen in der Probe angefärbt, um diese besser sichtbar zu machen. Es existiert eine Vielzahl von Färbemethoden für die Durchlicht- und Auflichtmikroskopie. Die meisten Kontrastmethoden, die ohne Färbung der Probe arbeiten, funktionieren nur in der Durchlichtmikroskopie - siehe MULISCH UND WELSCH (2010) und PAWLEY (1995). Zu den am häufigsten verwendeten Kontrastmethoden zählen:

- **Dunkelfeldmethode** (direkt reflektiertes Licht wird blockiert),
- **Rheinberg Beleuchtung** (direkt reflektiertes Licht wird farbig gefiltert),
- **Phasenkontrast** (Phasenunterschiede des Lichts von der Probe wird genutzt),
- **Schrägbeleuchtung** (damit werden reliefartige Strukturen der Probe sichtbar),
- **Modulationskontrast** (Polarisationsfilter werden in der Intensität moduliert),
- **differentieller Interferenz Kontrast (DIC)** (die leistungsfähigste Methode), und
- **Kontraststeigerung durch Färbung mit Chromophoren** (z.B. Fluoreszenzfärbung).

¹Life Technologies Corporation, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

²Florida State University, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

³Friedrich-Schiller-Universität Jena, <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

⁴Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/Lumineszenz>, Eingesehen im April 2010.

Im Folgenden werden die oben angeführten Methoden in Anlehnung an die Bücher PAWLEY (1995) und MULISCH UND WELSCH (2010) erläutert. Weiters wurde folgende Webseite eingesehen: LICHTMIKROSKOPIE ONLINE⁵.

Dunkelfeldmethode: Die Dunkelfeldmethode ist besonders passend für kleine oder kontrastarme Strukturen und kann auch für Auflichtmikroskope verwendet werden. Spezielle Dunkelfeldobjektive sammeln nur gestreutes und gebeugtes Licht, welches von der Probe kommt. Licht, das mit normalen Hellfeldobjektiven gesammelt wird (nicht abgelenkt und somit direkt von der Probe), wird bei dieser Kontrastmethode geblockt. Diese Methode wird aber heute nur noch selten verwendet.

Rheinberg Beleuchtung: Die Rheinberg Beleuchtung funktioniert prinzipiell wie die die Dunkelfeldmethode. Anstelle der Blende zur Blockierung des direkt reflektierten Lichts von der Probe, wird hierbei ein farbiger Filter verwendet. Der Hintergrund ist damit homogen farbig ausgeleuchtet. Diese Methode kann ebenfalls für die Auflichtmikroskopie verwendet werden.

Phasenkontrast: Diese Methode kann nur in der Durchlichtmikroskopie und bei Proben, die aufgrund ihrer Transparenz nur sehr schwache Konturen im Hellfeld erzeugen, eingesetzt werden. Das Licht, das durch die Probe leuchtet, verursacht aufgrund unterschiedlicher Weglängen und Brechungsindizes einen Phasenunterschied, welcher durch Intensitätsunterschiede der Signalstärke des Mikroskopbildes ersichtlich wird. Dazu ist es notwendig, zusätzliche optische Komponenten in den Strahlengang einzubringen. Eine prinzipielle Einschränkung dieser Methode wird durch die Größe und Konsistenz der Probe vorgegeben.

Schrägbeleuchtung: Durch diese, auch für die Auflichtmikroskopie geeignete Methode, werden reliefartige Strukturen in einer Probe sichtbar gemacht, indem eine zusätzliche Blende einen Teil der Beleuchtung abdeckt. Durch Änderung der Lage dieser Blende können auch Vorzugsrichtungen innerhalb der Probenstrukturen verdeutlicht werden. Allerdings wird bei dieser Methode die Auflösung des Bildes verringert.

Modulationskontrast: Hierbei werden zusätzliche optische Komponenten in den Strahlengang eingebracht. Zwei modulierbare Polarisatoren regeln die Lichtintensität der Anteile im Licht, das von der Probe kommt. Diese Lichtkomponenten werden durch die Probe unterschiedlich stark in ihrer Amplitude gedämpft. Mit dieser Methode entstehen, wie in der Schrägbeleuchtung, reliefartige Strukturen.

⁵Universität Wien, <http://www.univie.ac.at/mikroskopie/index.htm>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

Differenzieller Interferenzkontrast (Differential Interference Contrast): Diese Methode ist die leistungsfähigste Methode zur Kontraststeigerung von ungefärbten Proben in der Durchlichtmikroskopie. Durch zusätzliche optische Komponenten (Polarisatoren, Nomarski-Prisma, Wollaston-Prisma, etc.) wird der Strahlengang des Licht in zwei linear polarisierte, normal zueinander stehende Komponenten aufgeteilt. Eine durchläuft die Probe und die Zweite, im Gegensatz zu den vorhin genannten Methoden, läuft vollständig an der Probe vorbei. Je nach Dicke und Konsistenz der Probe entstehen Phasenunterschiede in den beiden Strahlengängen. Diese Laufzeitunterschiede werden durch einen Analysator sichtbar gemacht. Mit dieser Technik für die Durchlichtmikroskopie können Proben bis 150 μm Dicke untersucht werden.

Kontraststeigerung durch Färbung mit Chromophoren: Besonders in der medizinischen Analytik haben sich zahlreiche Färbemethoden entwickelt. Neben der prinzipiell, nur für die Durchlichtmikroskopie (diascopic microscopy) geeigneten Färbung mit nicht-fluoreszierenden Chromophoren, kann die Färbung mit Fluoreszenzfärbemitteln (Fluorophore) auch für die Auflichtmikroskopie (eng. episcopic microscopy) verwendet werden. Unabhängig von der Art des Mikroskops, hat sich die Färbung mit Fluorophoren zu einer der wichtigsten Methoden in der Lichtmikroskopie entwickelt. Mit Hilfe der Fluoreszenz können strukturelle Informationen, biologische Prozesse in Zellen, Geweben, Organen und Organismen sichtbar gemacht werden. Auch in der Papiertechnik wird seit den 90er Jahren Fluoreszenz verwendet, um Papier zu untersuchen - siehe Abschnitt 2.2 und Abschnitt 2.3.3.

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Fluoreszenzfärbung für die papiertechnische Analyse adaptiert.

2.3.2. Definition der Fluoreszenz

Fluoreszenz ist eine Untergruppe der Lumineszenzerscheinungen (siehe auch auf den Webseiten OPTICAL MICROSCOPY PRIMER⁶ und LUMINESZENZ⁷). Lumineszenz, also die Emission von Licht, ist die Konsequenz aus vorhergehenden chemischen oder physikalischen Reaktionen. Je nach Art der Anregung wird Lumineszenz eingeteilt in:

- **Biolumineszenz** (biochemische Reaktionen, z.B. Glühwürmchen),
- **Elektrolumineszenz** (Zufuhr von elektrischer Energie, z.B. Leuchtdioden),
- **Thermolumineszenz** (Zufuhr von thermischer Energie), und
- **Photolumineszenz** (Zufuhr von Energie durch Aufnahme von Licht).

⁶Florida State University, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

⁷Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/Lumineszenz>, Eingesehen im April 2011.

Die Fluoreszenz gehört, zusammen mit dem ähnlich ablaufenden Phänomen der Phosphoreszenz, zur Gruppe der **Photolumineszenz**. Es ist also eine Leuchterscheinung, die nach vorheriger Anregung mit Licht stattfindet. Dieses Phänomen wurde 1851 von STOKES erstmals beobachtet (siehe ARDENNE ET AL. (1997)) und zwar bei dem fluoreszierenden Mineral Fluorit - daher auch der Name **Fluoreszenz**. Alexander Jablonski hat 1935 die zugrundeliegende Physik der Fluoreszenz beschrieben und mit dem sg. Jablonski-Diagramm dargestellt - siehe Abschnitt 2.3.3. Licht besteht aus elektromagnetischen Wellen in einem bestimmten Wellenlängenband. Das Phänomen der Fluoreszenz ist aber auch in anderen Wellenlängenbereichen von elektromagnetischen Wellen zu finden - z.B. bei der Röntgenstrahlung in Mikrotomographen, wie in der Arbeit von SASOV ET AL. (2009A) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit den, in der Lichtmikroskopie häufig verwendeten, **UV und VIS Bändern** von 350nm bis 750nm gearbeitet - siehe folgende Abbildung 2.2.

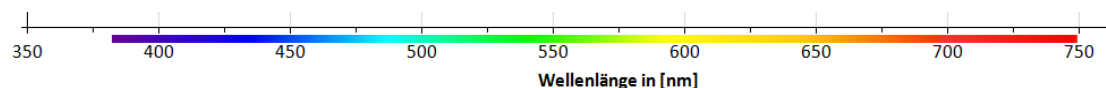


Abb. 2.2. Das Farb- bzw. Wellenlängenspektrum von den Bändern UV und VIS, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Absorbiert ein einzelnes Atom ein einfallendes Photon, ist das Absorptionsspektrum im Normalfall sehr schmalbandig. Bei Molekülen ist jedoch eine große Anzahl an Anregungszuständen möglich und daher ist das Absorptionsspektrum auch üblicherweise breitbandig - siehe PAVIA ET AL. (2001) und Abbildung 2.5. Die Moleküle oder die Teile eines Moleküls, welche zur Fluoreszenz geeignete Elektronenpaare besitzen, werden als Fluorophore bezeichnet - siehe LAKONICZ (2006). Das Emissionslicht der Fluoreszenz ist immer längerwelliger als das Licht der Anregung. Dieser Energieverlust wird STOKES SHIFT genannt - siehe Abbildung 2.3.

2.3.3. Eigenschaften der Fluoreszenz

Das Phänomen Fluoreszenz wird üblicherweise in drei Phasen geteilt:

1. **Absorption von Licht,**
2. **Energieabgabe bzw. Energieverlust, und**
3. **Emission von Licht.**

Abbildung 2.3 zeigt den prinzipiellen Ablauf im vereinfachten Energiebandmodell nach Jablonski. Zuerst **(1)** wird ein Fluorophor durch Anregungslicht vom Grundzustand S_0 in einen höheren energetischen Zustand gehoben. Danach **(2)** wird Energie

z.B. in Form von Wärme abgegeben. Dabei sinkt der Anregungszustand auf eine der diskreten Energiestufen darunter. Zuletzt (3) wird, beim Übergang des höherenergetischen Zustands zurück in den Grundzustand S_0 , Energie in Form von Photonen abgegeben.

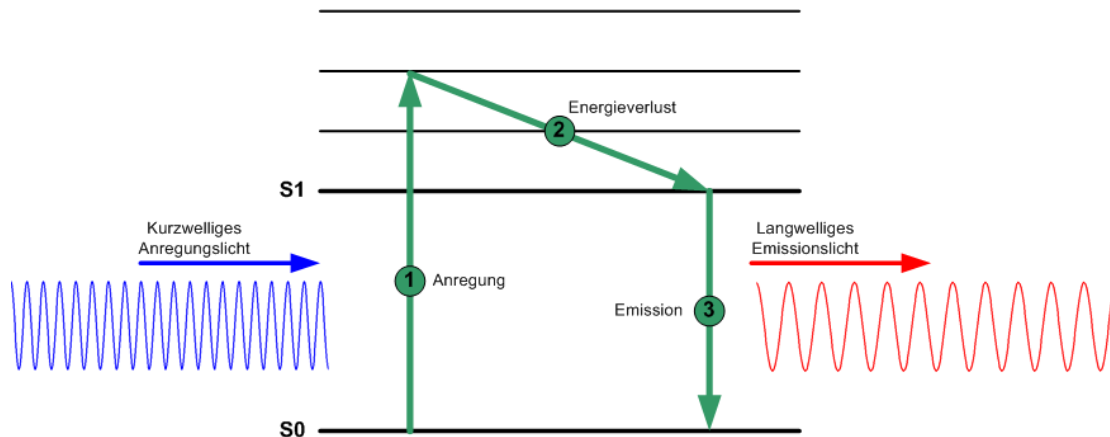


Abb. 2.3. Prinzipieller Ablauf der Fluoreszenz im vereinfachten Energiebandmodell nach Jablonski. Zuerst (1) erfolgt die Anregung eines Fluorophores durch Licht, danach (2) wird ein Teil der Anregungsenergie z.B. in Form von Wärme abgegeben, und zuletzt (3) erfolgt die Emission von Fluoreszenzlicht. (Die Abbildung ist adaptiert nach INVITROGEN (2010)).

Die zur Anregung verfügbare Energie ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts und wird nach folgender Formel berechnet:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

E ... Energie in [J]

h ... Plancksches Wirkungsquantum in [Js]

ν ... Lichtfrequenz in [Hz]

c ... Lichtgeschwindigkeit in [m/s]

λ ... Wellenlänge des Anregungslichtes in [m]

Ein Teil dieser Anregungsenergie ist in Form von Bewegungsenergie im Fluorophor gespeichert. Je nach Fluorophor und der Systemumgebung in der das Molekül schwingt, existieren nach VALEUR (2001) und LAKONICZ (2006) verschiedene Möglichkeiten um diese Anregungsenergie wieder abzugeben - siehe folgende Abbildung 2.4.

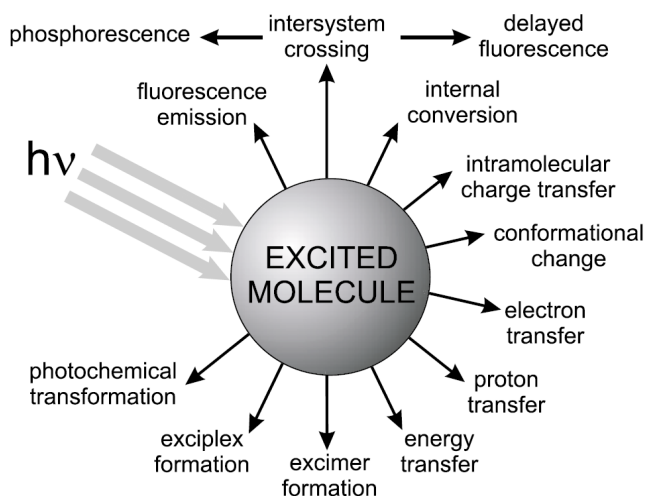


Abb. 2.4. Das angeregte Fluorophor bzw. Molekül kehrt durch Abgabe der Anregungsenergie auf ein niedrigeres Energieniveau oder in den Grundzustand S_0 zurück. Je nach Fluorophor und Systemumgebung wird die Energie durch eine der abgebildeten Möglichkeiten abgegeben. (VALEUR (2001))

Die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Prozesse aus Abbildung 2.4 die zur Abgabe von Energie führen sind:

- **Fluoreszenz** (Emission von Licht),
- **Intersystem crossing** (führt zu zeitverzögerter Fluoreszenz),
- **Interne Konversionen** (führt zu größerem Stokes Shift),
- **Ladungstransfers auf andere Moleküle** (Förster Resonanz Energie Transfer - FRET), und
- **Excimer Bildung** (führt zu einer Änderung des Emissionsspektrums).

Durch die Abgabe von Energie zwischen Anregung und Emission ändert sich notwendigerweise auch die Wellenlänge des Lichts. Bei der Fluoreszenz ist das emittierte Licht daher immer längerwelliger, als das absorbierte Licht. Die Änderung der Wellenlänge (Stokes Shift) wird mit folgender Formel beschrieben:

$$\Delta E = h \cdot \frac{c}{\Delta \lambda}$$

ΔE ... Energiequant in [J]

h ... Plancksches Wirkungsquantum in [Js]

c ... Lichtgeschwindigkeit in [m/s]

$\Delta \lambda$... Änderung Wellenlänge in [m]

Die Änderung der Wellenlänge zwischen den Spektrenmaxima (Stokes Shift), dargestellt in Abbildung 2.5, hängt von der abgegebenen Energie in der Phase 2 ab. Das prinzipielle Wellenlängenspektrum von Molekülen, wie es bei Fluoreszenz auftritt, ist ebenfalls in Abbildung 2.5 zu sehen.

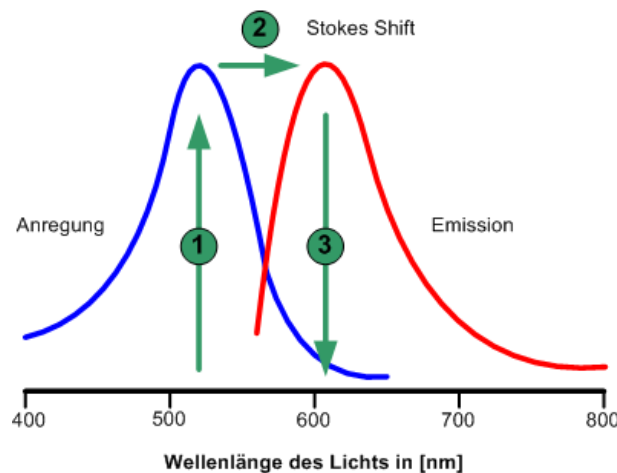


Abb. 2.5. Prinzipielles Fluoreszenzspektrum bei Anregung und Emission mit den charakteristischen Phasen bei Fluoreszenz. (blau) Anregungs- bzw. Absorptionsspektrum. (rot) Emissionsspektrum. (Die Abbildung ist adaptiert nach INVITROGEN (2010))

Je nach Fluorophor und Systemumgebung existiert ein Spektrum für die Anregung (ist im Allgemeinen gleich dem Absorptionsspektrum) und die Emission. In der Regel existiert ein Maximum je Spektrum. Eine detaillierte Darstellung bzw. Beschreibung der physikalischen Vorgänge in den drei Phasen der Fluoreszenz sind im Jablonski-Diagramm, siehe Abbildung 2.6, dargestellt und werden im Folgenden beschrieben.

Wie im Diagramm in Abbildung 2.6 dargestellt, wird der Grundzustand vor der Anregung mit S_0 bezeichnet. Aufgrund von thermischer Bewegung der Moleküle sind weitere Zustände möglich, die dem S_0 Modus folglich überlagert sind (dünnere Linien über der dicken S_0 Linie in der Abbildung 2.6). Diese thermischen Zwischenzustände sind in jedem weiteren Zustand (S_1 , S_2 , ...) zu finden. Diese thermische Vibrationsenergie

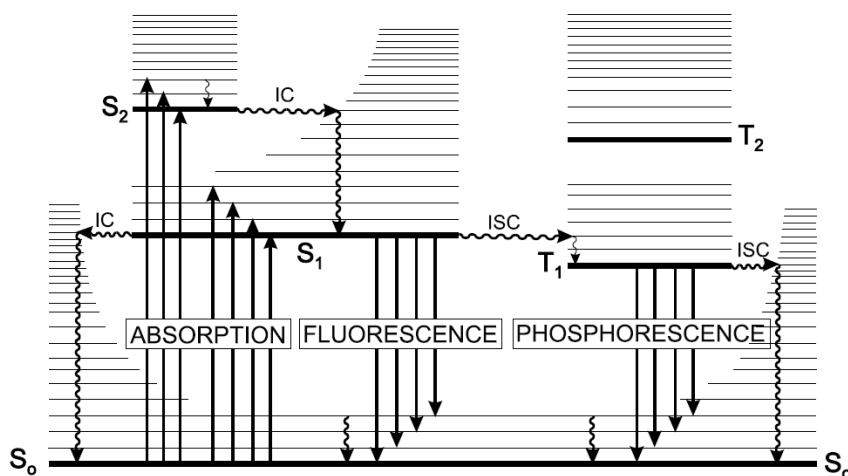


Abb. 2.6. Im dargestellten Jablonski Energiebänder Diagramm ist der Grundzustand S_0 und weitere Anregungszustände S_1 und S_2 zusehen. Die feinen Linien über diesen Zuständen kennzeichnen weitere, durch die thermische Eigenbewegung der Moleküle verursachte, Zustände. Weitere Punkte im Diagramm sind: (IC) internal conversion, (ISC) inter system crossing, (T) spezieller Zwischenzustand bei der Phosphoreszenz. (LAKONICZ (2006))

gie wird in Form von Wärme abgegeben. Daher befinden sich die meisten Moleküle in den Grundzuständen. Fluoreszenzemission tritt auf, wenn es bei einem Übergang vom Anregungszustand S_1 (oder von einem der thermischen Zustände) zum Grundzustand S_0 (und dessen thermischen Zuständen) kommt und die Energiedifferenz dabei in Form von Photonen abgegeben wird.

Bei der Phosphoreszenz wird der Schwingungszustand vor der Lichtemission auf einen weiteren Zwischenzustand T_1 transformiert. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist, dass die statistische Größe Lebensdauer τ bei der Fluoreszenz typischerweise einige Nanosekunden groß ist, und bei der Phosphoreszenz bis zu einigen Stunden dauern kann.

Da die Energieabgabe durch ein Photon zufällig erfolgt, ist die Fluoreszenzintensität mit der statistischen Kenngröße τ (mittlere Lebensdauer der Fluoreszenz des Fluorophores) gekoppelt. Die Fluoreszenzintensität nach der Anregung folgt daher folgen-

der Exponentialfunktion:

$$I = I_0 e^{(-\frac{t}{\tau})}$$

I ... Fluoreszenzintensität zur Zeit t in [W/sr]

sr ... Steradian bzw. Raumwinkel in [1]

I_0 ... Fluoreszenzintensität unmittelbar nach Ende der Anregung in [W/sr]

t ... Zeit in [s]

τ ... mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands in [s]

Bei den meisten Fluorophoren ist die mittlere Lebensdauer im Bereich von 10^{-10} s bis 10^{-7} s - siehe VALEUR (2001). Diese Kenngröße ist für spezielle Fluoreszenztechniken in der Medizin sehr wichtig. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluorophore während der Messung kontinuierlich mit Licht angeregt. Daher ist die Lebensdauer der angeregten Zustände nicht relevant.

Zusammenfassend können folgende wichtige Parameter der Fluoreszenz aufgezählt werden:

- (1) **Maximum des Absorptionsspektrums λ_{abs}** ist die Wellenlänge, bei der vom Fluorophor die maximale Lichtmenge (Anzahl Photonen) zur Anregung absorbiert wird.
- (2) **Maximum des Emissionsspektrums λ_{em}** ist die Wellenlänge, bei der die höchste Emissionslichtintensität der Fluoreszenz messbar ist.
- (3) **Stokes Shift ($\lambda_{abs} - \lambda_{em}$)** ist die Änderung der Wellenlänge zwischen Anregungslicht und Fluoreszenzemissionslicht.
- (4) **Absorptionsmaß ϵ (extinction coefficient)** ist ein Maß für die Fähigkeit eines Fluorophors Photonen zu absorbieren und damit in Schwingungsenergie umzuwandeln. Je höher dieser Koeffizient ist, desto mehr Elektronen werden durch die einfallenden Photonen angeregt. Infolge dessen werden auch mehr Photonen bei Rückgang der Elektronen in den Grundzustand emittiert. Die Fluoreszenzlichtemission ist somit heller.
- (5) **Quantenausbeute Q_f (quantum yield)** ist ein Maß für die Fähigkeit eines fluoreszierenden Moleküls (oder Atoms), die absorbierte Anregungsenergie in Emissionsenergie umzuwandeln. Je höher diese Ausbeute ist, desto heller wird die Fluoreszenzemission sein. Je nach Fluorophor sind Fluoreszenzausbeuten bis annähernd 100% möglich.

Weiters sei noch erwähnt, dass ein Fluorophor, unabhängig von der Anregungswellenlänge, innerhalb des Absorptionsspektrums, ein Emissionsspektrum mit demsel-

ben Maximum der Emission aufweist. Abbildung 2.7 zeigt diesen Einfluss bei unterschiedlichen Wellenlängen A (ca. 560nm) bis E (ca. 470nm). Bei Anregung mit der Wellenlänge A ist das Emissionsspektrum maximal, da die maximale Anzahl an Photonen absorbiert wird. Die Wellenlänge des Emissionsmaximums ist auch bei einer Anregung mit Wellenlänge E gleich groß. Allerdings ist die Emissionsintensität geringer.

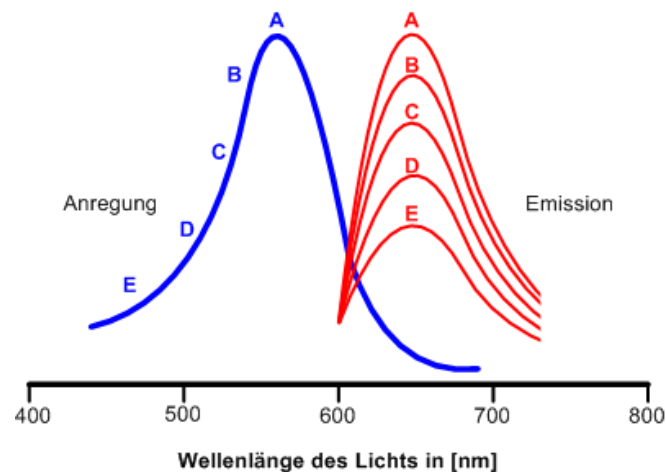


Abb. 2.7. Einfluss der Anregungswellenlänge auf das Emissionsspektrum. Bei Anregung mit der Wellenlänge A (ca. 560nm) ist das Emissionsspektrum am Größten, da mehr Photonen absorbiert werden. (Die Abbildung ist adaptiert nach INVITROGEN (2010))

Typische Anwendungen für die Fluoreszenz sind in der *Fluoreszenzspektroskopie*, in der *Fluoreszenzmikroskopie* und in der *Fluoreszenzanalyse* (*Fluoreszenzspektralanalyse*) zu finden (siehe ARDENNE ET AL. (1997) und GRÜNDLER (2004)).

Für die Naturwissenschaften hat sich nach MULISCH UND WELSCH (2010) die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile zu einer der wichtigsten Untersuchungsmethoden entwickelt. Von der Messung einzelner Moleküle, über Zellen, bis zu ganzen Organismen werden Fluoreszenzmethoden verwendet. Auch in der Papiertechnik sind seit Anfang der 1990er Fluoreszenzmethoden zur Bestimmung der 2D und 3D Strukturen von Papierbestandteilen in Verwendung. Industrielle Anwendungen in den Materialwissenschaften sind bisher selten, z.B. die Qualitätskontrolle von geschliffenem Chromstahl (KERN (2003)).

2.3.4. Primäre und sekundäre Fluoreszenz

Bei der Charakterisierung von Fluoreszenzemissionen wird unterschieden in:

- **primäre Fluoreszenz:** Die zu untersuchende Probe bzw. die relevante Probenstruktur enthält Fluorophore. Bei Anregung mit Licht passender Wellenlänge tritt Fluoreszenz auf.

- **sekundäre Fluoreszenz:** Die zu untersuchende Probe bzw. die relevante Probenstruktur enthält keine Fluorophore. Um Fluoreszenzmethoden zu nutzen, muss die Probe bzw. die Probenstruktur zuvor mit Fluorophoren gefärbt werden.

Primäre Fluoreszenz Eine Reihe von Biomolekülen (aromatische Aminosäuren, einige Proteine und Vitamine, Chlorophyll,...), Mineralien (Fluorit, Calcit, Selenit,...) und viele Kunststoffe enthalten Fluorophore. Diese können daher ohne Zugabe von Farbstoffen fluoreszieren. Generell wird man versuchen, die primäre Fluoreszenz (auch Autofluoreszenz genannt, intrinsic fluorescence) so gut wie möglich für eine Messung zu nutzen, da die Probe im Originalzustand belassen werden kann. Weitere Details dazu sind in ROST (1995) zu finden.

In medizinischen Anwendungen werden optische Sensoren zur Analyse von Stoffen durch Autofluoreszenz eingesetzt, z.B. um die chemische Zusammensetzung zu bestimmen (GRÜNDLER (2004) und PAWLEY (1995)). WENINGER UND MOHUN (2002) verwenden die primäre Fluoreszenz von biologischem Gewebe, um 3D Bilddaten von Embryonen zu generieren. Das aktuell bekannteste autofluoreszierende Protein ist das GFP (green fluorescent protein) und dessen Derivate.

Auch in der Papiertechnik wird die Autofluoreszenz genutzt. Ligninmolekülkomplexe bestehen im wesentlichen aus drei Basismolekülen, die je einen aromatischen fluoreszierenden Ring enthalten - siehe Abbildung 2.8.

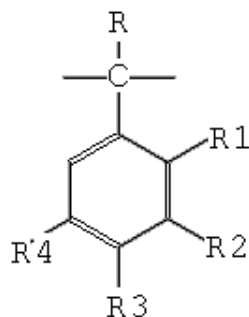


Abb. 2.8. Strukturformel Basismolekül Lignin. Je nach Typ sind Alkohole und Carbonylgruppen in Form von Doppelbindungen gebunden (R, R1 bis R4).

Messungen der Fluoreszenzspektren von Lignin wurden und werden durch spektrophotographische Messungen durchgeführt. In Holzschliff-faserstoffen wurde das Fluoreszenzspektrum von Lignin in der Arbeit von POLCIN UND RAPSON (1971) untersucht. Ebenfalls spektrophotographisch gemessen wurde Holzstoff in der Arbeit von OLMSTEAD UND GRAY (1993) und ZHU UND GRAY (1993). Die Fluoreszenzspektren der Anregung reichten von 300nm bis unter 700nm und die resultierenden Emissionswellenlängen von unter 400nm bis über 700nm. Interessanterweise konnten bei verschiedenen Holztypen, unterschiedliche Spektracharakteristika gemessen werden. Die Autoren schließen daraus, dass unterschiedliche Ligninkomplexe im Holz vorkommen.

Ab Anfang der 1990er wurde die CLSM für Messungen zur räumlichen Verteilung von Lignin in einer Faser mit der Arbeit von BARSBERG UND NIELSEN (2003) vorgestellt. Es konnte mit dem CLSM die Änderung der Fluoreszenzemission von Lignin während der Einwirkung von Oxidationsmitteln in Echtzeit gemessen werden. Messungen zur 2D (und ansatzweise 3D) Struktur von gesamten Papierproben wurde von JANG ET AL. (2011) mit der CLSM in Kombination mit einem 2 Photonenanregungssystem gemessen. In dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit zur 3D Porenanalyse skizziert. Papierbestandteile, die Lignin enthalten, können also durch entsprechendes Anregungslicht bei Fluoreszenzmessungen verwendet werden. Die auftretenden Wellenlängenmaxima sind dabei von Holzart zu Holzart unterschiedlich und auch die Vorbehandlung hat Einfluss auf die Bänder. Gebleichter Zellstoff hat eine deutlich geringere Autofluoreszenz als ungebleichter Zellstoff, wie ZHU UND GRAY (1993) anhand der kanadischen Schwarzfichte gezeigt hat. Durch das Bleichen werden Ligninmoleküle beschädigt oder zerstört und das wirkt sich auf die Fluoreszenz aus. Keine der üblich verwendeten mineralischen Additive für Papier, wie GCC, PCC, Kaolin oder Talkum, sind autofluoreszierend.

Sekundäre Fluoreszenz Werden einer Probe Fluorophore beigemischt oder einzelne Strukturen angefärbt und diese entsprechend dem Anregungsspektrums angeregt, spricht man von sekundärer Fluoreszenz. Anwendungsfelder für diese Art der Färbung sind in der medizinischen Analyse in sehr großen Zahl vorhanden und in medizinischen Literatur wie z.B. PAWLEY (1995), LAKONICZ (2006) oder MULISCH UND WELSCH (2010) nachzulesen.

Zur Messung der dreidimensionalen Papierstruktur nach gezielter (spezifischer) Färbung konnte bis dato in der Literatur nur wenig gefunden werden. Einzelne Papierbestandteile wurden aber bereits angefärbt und teils mit einem konventionellen Mikroskop oder einem CLSM untersucht. Fluoreszenzgefärbte Papierfasern wurden bereits Anfang der 1990er von ROBERTSON ET AL. (1992) mit dem CLSM gemessen und in mehreren virtuellen Schnitten durch die Faser dargestellt. WHIPPLE UND MALTESH (2000) visualisierte mit einem konventionellen Fluoreszenzlichtmikroskop die Flockungs- und Adsorptionsprozesse in der Herstellung von Laborpapier mit einem Britt Jar Tester. Dazu wurde das Flockungsmittel mit dem Fluorophor Rhodamin-B markiert und zusätzlich fluoreszierende Mikrokugeln verwendet. THOMSON ET AL. (2008) konnte erstmals Faser-Faser Bindungen in-situ und in 3D vermessen - siehe auch THOMSON (2007) und THOMSON ET AL. (2007). In dieser Arbeit wurden zwei Faserstoffsuspensionen mit unterschiedlichen, für FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) Anwendungen geeigneten, Fluorophoren gefärbt. Anschließend wurden aus zwei unterschiedlich gefärbten Fasern Bindungen gebildet und diese bei mehreren Pressdrücken am Objektträger mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht. HORVATH (2008) verwendete fluoreszenzmarkierte Dextrane um die Adsorption dieser Mikropartikel in die Faserporen mit einem CLSM zu visualisieren. Da-

bei konnten eindeutige Zusammenhänge zwischen Partikelgröße und Partikelladung zum Adsorptionverhalten bestimmt werden.

Messungen der sekundären Fluoreszenz in der Papiertechnik wurden auch durch die oft vorhanden optischen Aufheller durchgeführt. QUACKENBUSH (1984) regte diese Aufheller im Papierstrich mit UV Licht an, um Rückschlüsse auf Fehler in der Strichbeschaffenheit zu erhalten. In der Arbeit von FORSTRÖM ET AL. (2003) sind ebenfalls optische Aufheller und deren Penetrationseigenschaften in das Basispapier basierend auf der sekundäre Fluoreszenz evaluiert worden.

2.3.5. Fluorophore und Färbemethoden

Fluorophore sind Moleküle oder Teile von Molekülen die Fluoreszenz verursachen - siehe LAKONICZ (2006). Fluorophore gehören zur übergeordneten Gruppe der farbgebenden Moleküle, der Chromophore. Diese Gruppe von Atomen absorbiert einen Teil des einfallenden Lichts und reflektiert den anderen Teil - siehe PAVIA ET AL. (2001). Die dabei aufgenommene Energie wird z.B. als Wärme abgegeben. Der nicht absorbierte Anteil des einfallenden Lichts wird ohne Zeitverzögerung reflektiert und ist für die Eigenfarbe des Farbstoffes verantwortlich. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wird bei den fluoreszierenden Farbstoffen, den sg. **Fluorophoren**, ein Teil der absorbierten Energie wiederum als Licht mit höherer Wellenlänge, also mit weniger Energie, abgegeben.

Fluoreszierende, und damit farbgebende, Moleküle werden in eine der zwei folgenden Gruppen geordnet:

1. **Aromaten, und**
2. **Methine (Polyene und Polymethine).**

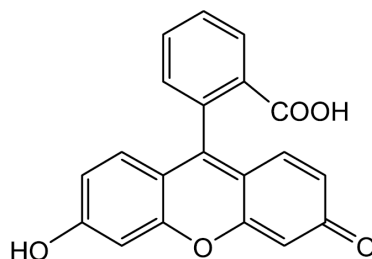
Beiden Gruppen ist das Vorkommen von konjugierten Doppelbindungen mit den für die Fluoreszenz notwendigen π -Elektronensystemen gemeinsam. Diese sind für die Aufnahme und Abgabe von Photonen, also für die Absorption des Anregungslicht und die Emission des Fluoreszenzlichts, verantwortlich. Alle Fluorophore sind aus Bestandteilen dieser beiden Gruppen aufgebaut. Im folgenden Absatz sind einige wichtige Klassen von Fluorophoren erläutert.

Klassen von Fluorophoren Aufgrund ihrer hellen Fluoreszenzemission haben sich die folgenden Klassen von Fluorophoren durchgesetzt. Diese Fluorophore sind nach ROST (1995) Derivate von - oder zugehörig zu folgenden chemischen Strukturen:

- **Acridine,**
- **Stilbene, und**

- **Xanthene.**

Zu den **Acridinen** gehört z.B. *Acridin Orange*, das schon seit den 1990er auch in der Papiertechnik verwendet wird. Allerdings ist dieser Farbstoff giftig und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Die wichtigste Gruppe von optischen Aufhellern in der Papiertechnik gehört zur Klasse der **Stilbene**. Zur Klasse der **Xanthene** gehören die bekannten und häufig verwendeten Farbstoffe der Unterklassen Eosin, Fluorescein (siehe Abbildung 2.9) und Rhodamine. Diese wiederum sind in zahlreiche Derivate untergliedert.



fluorescein

Abb. 2.9. Strukturformel von Fluorescein. VALEUR (2001)

Die meisten der erhältlichen Farbstoffe sind für eine spezielle Anwendung entwickelt worden. Der Großteil dieser Anwendungen findet sich zweifellos in der Medizin (siehe INVITROGEN (2010) und die Hersteller Website LIFE TECHNOLOGIES⁸). Daher gibt es eine sehr große Menge an Farbstoffen zur spezifischen und unspezifischen Färbung oder Markierung von Proteinen, Nerven, Zellbestandteilen, Antikörpern u.v.m. Weiters können bestimmte Fluorophore einzelne freie Ionen detektieren (z.B. Calcium-Green-1 oder Oregon Green). Laufend werden Fluorophore in ihren Eigenschaften optimiert. Seit einigen Jahren sind z.B. fluoreszierende Halbleiterkugeln (Quantum Dots) für den gesamten UV und VIS Bereich erhältlich. Ein weiterer Parameter dieser sehr teuren Fluorophore ist der Durchmesser (ab nm). Weitere detaillierte Auflistungen zu zahlreichen Farbstoffen für die Medizin und teilweise auch für andere Gebiete sind bei LAKONICZ (2006) und ROST (1995) zu finden.

Optische Aufheller Eine für die Papiertechnik sehr wichtige Klasse von Fluorophoren sind die optischen Aufheller (optical brightening agents - OBAs oder fluorescent whitening agents - FWAs). Von den sechs chemischen Gruppen der Aufheller ist die Gruppe der **Stilbene** die Größte (siehe Webseite LUMINESZENZ - CHEMILUMINESZENZ - BIOLUMINESZENZ⁹):

⁸Life Technologies Corporation, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

⁹Friedrich-Schiller-Universität Jena, <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

1. Stilbene,
2. Ethylenderivate mit zwei heteroaromatischen Resten,
3. Coumarinderivate,
4. 1,3-Diphenyl-2-pyrazoline,
5. Naphtaalimide, und
6. alle Verbindungen, in denen ein Aromat mit einem Heteroaromaten verbunden ist.

Etwa 80% der produzierten Aufheller gehören zu Derivaten der Stilbene, z.B. die wasserlösliche Untergruppe der *4,4'-Diamino-stilben-2,2'-disulfonsäure* - siehe Abbildung 2.10). Weitere Untergruppen sind *tetra-sulfo-Typ* und *hexa-sulfo-Typ* Derivate. Die Anregungswellenlängen sind nach SHAKESPEARE UND SHAKESPEARE (2011) im UVA (360-380nm) Bereich zu finden. Die Emissionsmaxima sind üblicherweise im Bereich von 420-450nm.

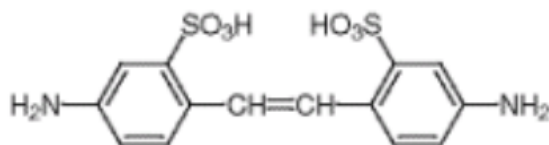


Abb. 2.10. Strukturformel von 4,4'-Diamino-stilben-2,2'-disulfonsäure. (Bild von Webseite LUMINESZENZ - CHEMILUMINESZENZ - BIOLUMINESZENZ¹⁰).

Spektrummessungen zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten optischen Aufheller sind in Anhang A zu finden.

Einteilung Farbstoffe und Färbetheorien Fluoreszenzfarbstoffe werden, wie normale Farbstoffe auch - siehe CORNELLY (1951), von MULISCH UND WELSCH (2010) in folgende Gruppen unterteilt:

1. basische (kationische) Fluorochrome/Fluorophore,
2. saure (anionische) Fluorochrome/Fluorophore, und
3. neutrale und undissoziierte Fluorochrome/Fluorophore.

Saure Farbstoffe sind meistens besser in Wasser löslich als in Ethanol. Umgekehrt sind basische Farbstoffe häufig besser in Ethanol löslich als in Wasser.

Die Art der Anwendungen der Farbstoffe wurde und wird nach MULISCH UND WELSCH (2010) rein empirisch ermittelt. Viele der Prozesse, die bei einer Färbung auftreten, sind noch ungeklärt. MULISCH UND WELSCH (2010) schlägt folgende Färbetheorien vor:

- **Chemische Färbung:** Eine chemische Reaktion bindet den Farbstoff an die Struktur.
- **Physikalische Färbung:** Die Löslichkeit des Farbstoffes, die Dichte der zu färbenden Probe und die Farbstoffmolekülgröße sind für die Färbeeigenschaften verantwortlich.
- **Physio-chemische Färbung:** Bei dieser Färbung ist die u.a. die elektrostatische Ladung für die Bindung des Farbstoffes verantwortlich.

Basierend auf diesen Färbetheorien wurden im Kapitel 4 Färbemethoden für die Papierfärbung mit Fluorophoren adaptiert und evaluiert.

Messung der Fluoreszenzspektren Die Auswahl eines Filtersystems für das Fluoreszenzmikroskop erfordert die Kenntnis der spektralen Eigenschaften des verwendeten Fluorophores. Diese können entweder einem Datenblatt entnommen werden, oder mit einem Fluoreszenzspektrographen gemessen werden. Dabei gilt zu beachten, dass besonders das für das Fluorophor verwendete Lösungsmittel (siehe Abbildung 2.13) und die Dosierung des Färbemittels Einfluss auf das Spektrum haben. In folgender Abbildung 2.11 ist das gemessene Fluoreszenzspektrum des Fluorophors Macrolex FY 10G im optimalen Lösungsmittel (EtOH) dargestellt. Gemessen wurde das Spektrum mit dem Hitachi F7000 Fluorescence Spectrophotometer¹¹. In dieser Messung wurde der Einfluss der Dosierung auf die Spektrumform beispielhaft untersucht.

Wie in Abbildung zu sehen ist, wird das Absorptionsspektrum in seiner Form verändert. VALEUR (2001) beschreibt übliche Fehler bei Spektrummessungen mit zu hohen Dosierungen. Der *innere Filtereffekt der Anregung* verursacht eine Abschwächung bzw. Absorption des Anregungslichtes bei der Messung, die zu einer geringeren Fluoreszenzintensität, trotz höherer Fluorophorkonzentration, führen. Der *innere Filtereffekt der Emission* führt zur einer Absorption der Photonen, die bei Wellenlängen emittiert werden, die mit dem Absorptionsspektrum des Fluorophores überlappen. Dieser Effekt verursacht eine Störung der Spektrumform, die bei steigender spektraler Überlappung, des Anregungs- (bzw. Absorptions)- und Emissionsspektrums, stärker wird. VALEUR (2001) schlägt für eine geeignet niedrige Dosierung weniger als 0.1 M vor.

¹¹Hitachi High-Technologies Corporation. <http://www.hitachi-hitec.com/global/science/fl/f7000.html>

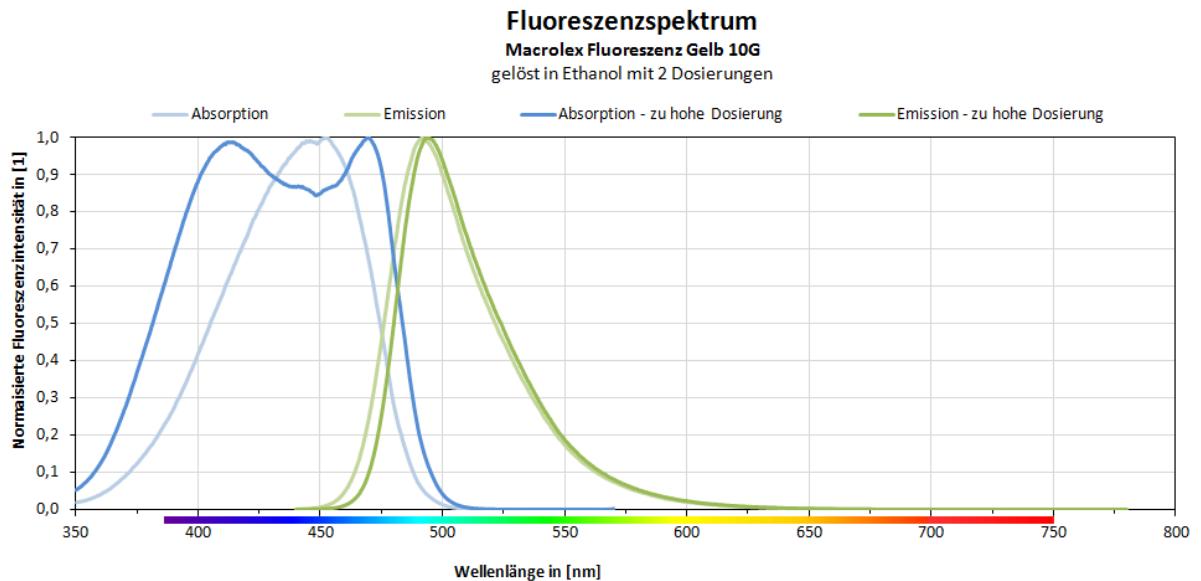


Abb. 2.11. Das abgebildete Fluoreszenzspektrum zeigt das Fluorophor Macrolex Fluoreszenzgelb 10G welches bei zwei verschiedenen Dosierungen gemessen wurde. Gemessen wurde das Spektrum mit dem Hitachi F7000 Fluorescence Spectrophotometer.

Diagramme mit den korrespondierenden Fluoreszenzspektren sind üblicherweise auf das Maximum normiert. In der Regel haben Fluorophore ein einziges Maximum im Anregungsspektrum und ein einziges Maximum im Emissionsspektrum. Nach diesen Wellenlängen sollten die Filtersysteme für das Fluoreszenzmikroskop ausgelegt werden. Es ist anzumerken, dass die Maxima der Spektren nicht notwendigerweise innerhalb der Transmissionsbänder der Filtersysteme liegen müssen, um optimale Messergebnisse zu erhalten.

Werden Fluoreszenzspektren gemessen, sind folgende Faktoren für die Emissionsintensität von primärem Einfluss:

- **Dosierung des Fluorophores** (muss niedrig genug sein damit keine Änderungen der Spektrumform auftritt - siehe Abbildung 2.11)
- **Quantenausbeute des Fluorophores** (hat unmittelbaren Einfluss auf die Fluoreszenzintensität), und
- **Intensität des Anregungslichtes** (hat ebenfalls direkten Einfluss auf die Emissionsintensität der Fluoreszenz).

Bei Fluorophoren mit spezieller Funktion (z.B. ionenselektive Fluorophore wie Calcium Green) werden vom Hersteller empfohlene Dosierungsbereiche angegeben. Aber, wie oben schon erwähnt, sind auch dafür Dosierungen nach empirischen Daten zu ermitteln, da die zur Verfügung stehende Mikroskophardware variieren kann. Z.B.

ist die Anregungslichtintensität abhängig von der Anwendung. Die Quantenausbeute von Fluorophoren ist jedoch systemunabhängig und kann für Dosierungsvergleiche verwendet werden. D.h. wenn das Fluorophor 1 mit den Parametern aus Messsystem 1 die Intensität 1 hat, dann hat auch i.d.R. das Fluorophor 2 mit derselben Quantenausbeute und den selben Parametern aus Messsystem 1 die Intensität 1.

Einflüsse der Systemumgebung auf die Fluoreszenz Je nach Sensibilität einer Fluoreszenzmethode bzw. des Fluorophores müssen Umgebungseinflüsse berücksichtigt werden. Seiteneffekte durch Störungen können die spektralen Eigenschaften (Wellenlängen der Maxima, Spektrumform) und die Quantenausbeute (Änderungen in der Fluoreszenzintensität) ändern. Die wichtigsten Einflüsse sind nach VALEUR (2001) und LAKONICZ (2006):

- Polarität der Lösungsmittels,
- Vorkommen von Ionen,
- pH-Wert der Lösung,
- Vorkommen von Quenchern im Lösungsmittel,
- Temperatur,
- Viskosität des Lösungsmittels,
- Druck,
- elektrisches Potential, und
- Wasserstoffbrücken-Bindungen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorophore reagieren sehr unterschiedlich auf diese Einflüsse und mussten auf die jeweilige Anwendung abgestimmt werden. Z.B. durfte bei der Färbung mit *Calcium Green* nur hochreines Wasser verwendet werden. Mit normalen Leitungswasser hätten die vorhanden Kalziumionen die Messergebnisse verfälscht. Die Färbung des Einbettmittels mit *Macrolex FY 10G* war hingegen sehr unempfindlich und war entsprechend einfacher durchzuführen.

Der Einfluss des Lösungsmittels (Einbettmittel zur Probenpräparation, Lösungsmittel bei der Färbung) wurde von PAVIA ET AL. (2001) beispielhaft in folgender Abbildung 2.12 dargestellt. Wird, wie in Abbildung 2.12 gezeigt, durch ein ungeeignetes Lösungsmittel das Absorptionsspektrum verändert, so wird sich auch das Emissionsspektrum ändern. Im Allgemeinen, und aus den empirischen Daten der vorliegenden Arbeit, kann gesagt werden, dass Änderungen der Fluoreszenzcharakteristika, bei unspezifischen Anwendungen oder breitbandigen Filtersystemen, sekundären Einfluss

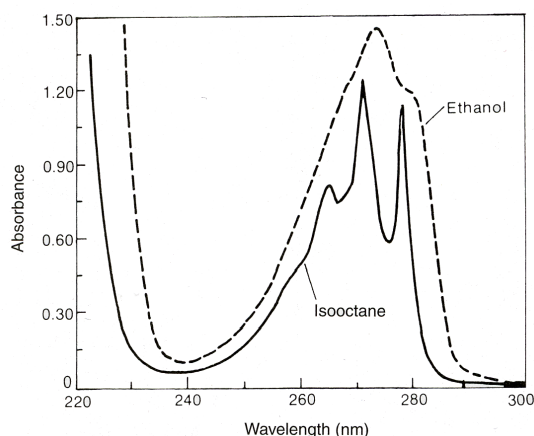


Abb. 2.12. Einfluss Lösungsmittel auf das Absorptionsspektrum von Phenol. (PAVIA ET AL. (2001)

).

auf die Messergebnisse haben. In Abbildung 2.13 sind die Emissionsspektren der eigenen Versuchen mit verschiedenen Lösungsmittel und dem Fluorophor Eosin, spritlöslich dargestellt. Alle Maxima wurden, wie üblich, auf 100% normiert. Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung der Emissionsmaxima bei 550nm in einem Bereich von etwa 30nm. Ein schmalbandiger Filter mit nur 20nm Durchlassbereich wäre hier von Nachteil. Ein Filtersystem mit 50nm Durchlassbereich würde noch genügend Licht der verschobenen Spitzen zur Kamera durchlassen. Auffällig ist auch ein zusätzliches Maximum bei 430nm das bei EtOH und besonders bei Essigester auftritt. Für eine Fluoreszenzfärbung eine Essigesterlösung zu verwenden, ist daher vermutlich auszuschließen, da im Spektrum zu vielen Störungen auftreten. Bei 770nm sind vier Spitzen zu sehen, die aufgrund der Anregungswellenlänge von 385nm mitgemessen werden. Das sind aber keine Emissionen durch Fluoreszenz, sondern das erste Vielfache der Anregungswellenlänge. Das Anregungsspektrum dieser Messung ist in Anhang A abgebildet.

Photobleaching Wie der Name schon sagt verursacht dieser Effekt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, bei Bestrahlung mit Licht (daher sollten Proben i.d.R. lichtgeschützt gelagert werden). Das ist eigentlich widersprüchlich, da ja Fluorophore eigens für die Bestrahlung mit Anregungslicht konzipiert sind. Da aber durch die Anregung mit Licht auch Defekte in der molekularen Struktur der Fluorophore entstehen, nimmt deren Fähigkeit zu fluoreszieren ab - siehe LAKONICZ (2006). Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit tendenziell bei allen Fluorophoren beobachtet. Kritisch war das nur bei *Calcium Green*, denn Messungen, die 1 Woche später aufgenommen wurden, zeigten eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität. Bei den an-

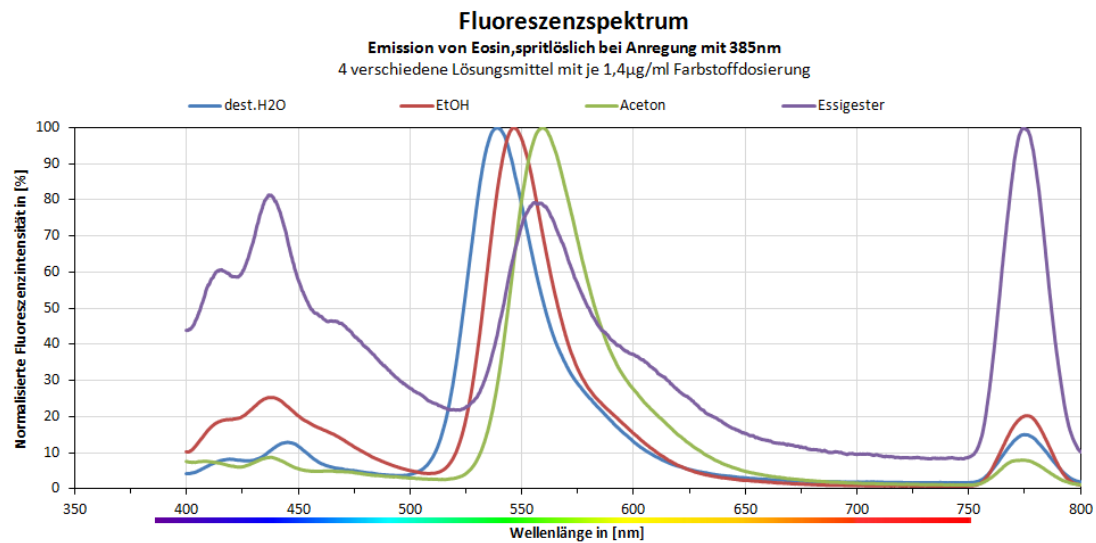


Abb. 2.13. Emissionsspektrum des Fluorophores Eosin, spritlöslich in verschiedenen Lösungsmitteln.

deren Fluorophoren zeigte sich erst nach mehreren Wochen eine messbare Abnahme der Emissionsintensität.

2.3.6. Fluoreszenzmikroskope

Ein Fluoreszenzmikroskop ist dem normalen Lichtmikroskop sehr ähnlich. Zum Betrieb von Fluoreszenzmethoden ist eine geeignete Kombination aus Färbemittel und Mikroskopbauteilen notwendig. Prinzipiell wird ein Fluoreszenzlichtmikroskop je nach Ausführungsform in zwei verschiedene Typen eingeteilt (MULISCH UND WELSCH (2010)):

- **Durchlichtmikroskop**, und
- **Auflichtmikroskop**.

Beide Typen finden zahlreiche Anwendungen in der medizinischen Analyse, sowie in den Materialwissenschaften und in der Papiertechnik - siehe Abschnitt 2.2. Abbildung 2.14 zeigt den prinzipiellen Aufbau dieser Varianten. Beim Durchlichtmikroskop wird das Licht einer Hellfeld-Lichtquelle durch den Kondensor auf die Probe geleitet. Das zur Fluoreszenz notwendige Anregungslicht wird von einer zweiten Lichtquelle durch das Objektiv auf die Probe geleitet. Beide Lichtpfade münden schließlich im Okular oder in einer Kamera. Bei einem Auflichtmikroskop ist nur ein Lichtpfad und eine Lichtquelle vorhanden. In der vorliegenden Arbeit wurde, basierend auf den Arbeiten von WILTSCHKE (2006) und WILTSCHKE ET AL. (2010), notwendigerweise wieder

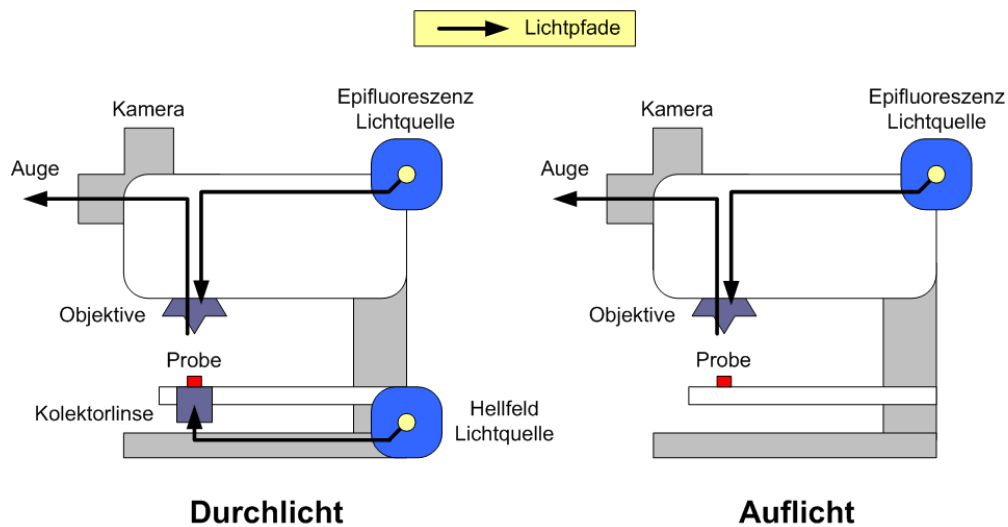


Abb. 2.14. Prinzipbild eines Fluoreszenzmikroskops. (links) Durchlichtmikroskop, (rechts) Auflichtmikroskop.

ein Auflichtmikroskop für die Erweiterung des Mikroskops mit Fluoreszenztechniken gewählt - siehe auch Kapitel 3.

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Methoden, um den Bildkontrast zu verbessern, passiert bei Fluoreszenzmethoden die Kontraststeigerung durch Lichtemission der Fluorophore, die in der Probe enthalten sind bzw. zugefügt wurden - siehe MULISCH UND WELSCH (2010). Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, müssen diese Fluorophore geeignet angeregt und deren Fluoreszenzlicht wiederum geeignet für einen Detektor aufbereitet werden. Diese Aufgabe übernimmt in einem Fluoreszenzmikroskop das Filtersystem. Ein Fluoreszenzauflichtmikroskop (episcopic fluorescence microscope) ist nach MULISCH UND WELSCH (2010) prinzipiell mindestens aus folgenden Teilen aufgebaut (siehe auch auf den Webseiten LIFE TECHNOLOGIES¹² und OPTICAL MICROSCOPY PRIMER¹³):

- **eine fluoreszenzgeeignete Lichtquelle** (für die notwendigen Lichtspektren),
- **ein Anregungsfilter** (für die Filterung des Anregungslichtes),
- **ein halbdurchlässiger Spiegel** (für die Leitung der Lichtpfade),
- **ein Sperrfilter** (für die Filterung des Fluoreszenzlichtes von der Probe),
- **ein fluoreszenzgeeignetes Objektiv** (für die Transmission der Lichtspektren),

¹²Life Technologies Corporation, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

¹³Florida State University, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>, Mehrmals eingesehen im Jahr 2010.

- ein Detektor bzw. eine Kamera (für die verwendeten Lichtspektren).

Fluoreszenz Lichtquelle: Die primäre Aufgabe der Lichtquelle ist die Beleuchtung der Probe, die die Fluorophore enthält, mit den Lichtbändern, die für Anregung der Fluorophore notwendigen sind. Außerdem sollte die Anregungsintensität in diesen spektralen Bereichen groß genug sein. Die üblicherweise verwendeten Quellen haben sehr unterschiedliche spektrale Eigenschaften. Je nach Anwendung werden, nach LAKONICZ (2006), Laser (eine einzelne Linie im Spektrum, von UV über VIS bis IR möglich), LED (schmales stetiges Spektrum, im UV, VIS und IR Band möglich), Halogenlampe (breites stetiges Spektrum, nur im VIS Band möglich), oder Gasentladungslampen verwendet. Zu den Gasentladungslampen gehören die Quecksilber(Hg) Dampfampe und die Xenon Lampe. Beide haben ein unstetiges Spektrum mit energiereichen Spitzen im UV und VIS Band - siehe STEMMER (2010). Abbildung 2.15 zeigt das Spektrum der Lichtquelle Leica EL6000¹⁴, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Es ist eine Quecksilberdampfampe (Brenner), deren verwertbares Spektrum von etwa 320nm bis 600nm reicht.

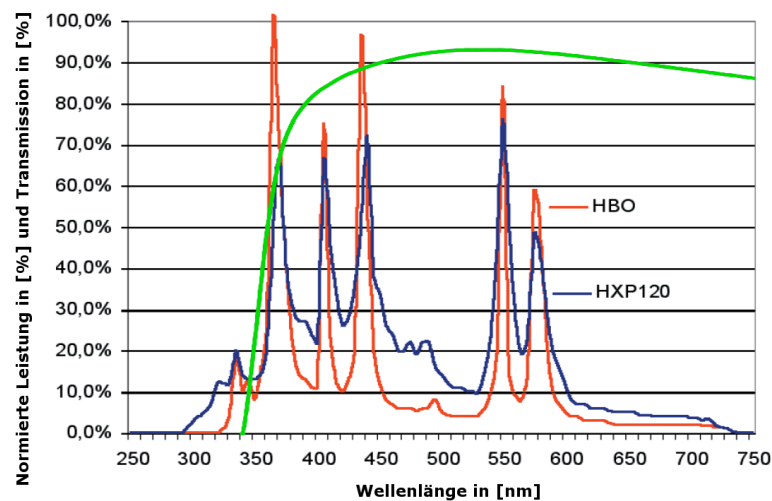


Abb. 2.15. Wellenlängenspektrum einer für das Messsystem μ STRUCSCOP verwendeten Lichtquelle (Quecksilber Dampfampe). Dem aus einem Datenblatt entnommen Spektrum wurde die Transmissionskurve der verwendeten Objektive überlagert. (rot + blau) Spektren des verwendeten Brenners HXP120 und ein Vergleichstyp HBO; (grün) Objektivtransmissionskurve. (LEICA MICROSYSTEMS, WELTZAR (GERMANY))

Wie oben erwähnt, sind die Spitzen in Abbildung 2.15 charakteristisch für eine Quecksilberdampfampe. Bei Anregung eines Fluorophors sollte mindestens eine dieser Spitzen im Anregungsspektrum liegen, um effiziente Fluoreszenz zu gewährleisten.

¹⁴Leica Microsystems, Weltzar (Germany). www.leica-microsystems.com

Filterwürfel (Anregungsfilter, halbdurchlässiger Spiegel und Sperrfilter): Die Aufgaben des Filtersystems (häufig als Filterwürfel ausgeführt) sind das Anregungslicht auf das Anregungsspektrum des Fluorophors zu begrenzen (Anregungsfilter, eng. excitation filter), den Strahlengang zum Objekt hin umzulenken (halbdurchlässiger Spiegel, eng. dichroic mirror) und schließlich das vom Fluorophor emittierte Fluoreszenzlicht gegebenenfalls nochmals zu filtern (Sperrfilter, eng. suppression/emission filter). Ein Filterwürfel ist daher ein Knotenpunkt für den Strahlengang und ein wesentlicher Bestandteil des Fluoreszenzmikroskops. Abbildung 2.16 zeigt den schematischen Aufbau der Mechanik und den Strahlengang durch den Würfel.

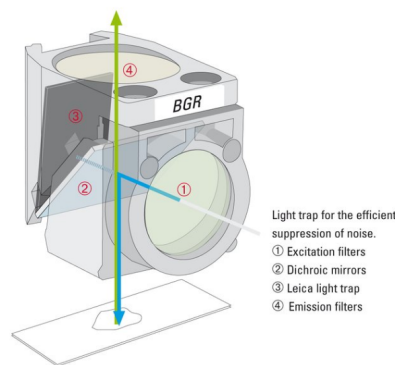


Abb. 2.16. Skizze eines Filterwürfels von Leica. (blauer Lichtpfad) Strahlengang nach dem Anregungsfilter abgelenkt vom Spiegel zum Objekt (grüner Lichtpfad) Strahlengang durch den Spiegel zum Emissionsfilter. LEICA MICROSYSTEMS, WELTZAR (GERMANY)

Angemerkt werden sollte dabei, dass das Anregungslicht in der Regel um einige 10er Potenzen stärker ist, als das Fluoreszenzlicht der Emission. Die Auswahl der Filter ist daher entscheidend für die resultierende Signalqualität. Prinzipiell wird zwischen den einfacheren Absorptionsfiltern und der präzisen Interferenzfiltern unterschieden. In Abbildung 2.17 ist das Spektrum des Fluorophors *Macrolex FG 10G* (gemessen mit dem Fluoreszenzspektrographen Hitachi F7000¹⁵) überlagert mit der Filtertransmission des Filterwürfel *GFP* von Leica¹⁶ (aus dem Datenblatt entnommen und geglättet) zu sehen. Anregungs- und Emissionsfilter sind als Bandpässe ausgeführt. Der halbdurchlässige Spiegel ist als Langpassfilter ausgeführt, um das viel stärkere Anregungslicht zusätzlich vom Fluoreszenzlichtspektrum zu trennen. Da sich Anregungs- und Emissionsspektrum überschneiden (siehe Abbildung 2.17), wäre ein Filterwürfel optimal, der nur innerhalb des Anregungsbandes spektrale Anteile der Anregungskurve enthält. Dasselbe gilt für die Emissionskurve. Bei Verwendung dieser Filterwürfel - Fluorophor Kombination wird ein Teil des emittierten Fluoreszenzlichts wiederum absorbiert (self-quenching). In Folge wird die Lichtintensität geringer sein.

¹⁵Hitachi High-Technologies Corporation. <http://www.hitachi-hitec.com/global/science/fl/f7000.html>

¹⁶Leica Microsystems, Weltzar (Germany). www.leica-microsystems.com

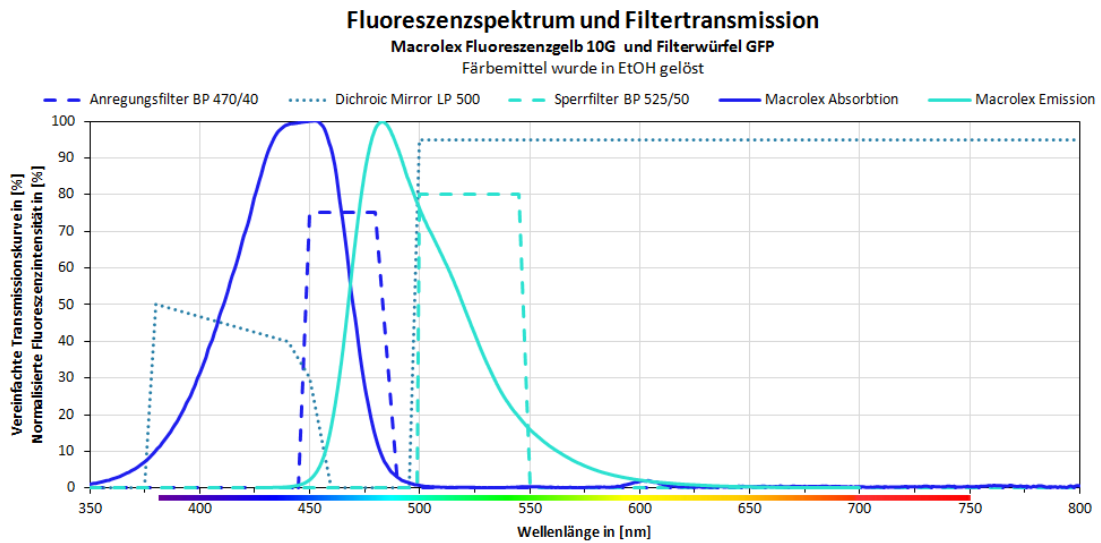


Abb. 2.17. Fluoreszenzspektrum des Fluorophors Macrolex Fluoreszenzgelb 10G überlagert mit der Transmissionskurve der Filterwürfels GFP. Gemessen wurde das Spektrum mit dem Hitachi F7000 Fluorescence Spectrophotometer.

In der vorliegenden Arbeit ist dieser Nachteil aber vernachlässigbar. Auch bei anderen, in dieser Arbeit verwendeten Filterwürfel - Fluorophor Kombinationen konnten Seiteneffekte durch Überschneidungen der Spektren vernachlässigt werden. Bei sehr präzisen Anforderungen oder sehr schwachen Emissionen werden Filter eigens für Fluorophore angefertigt. In der medizinischen Analyse sind solche Filtersysteme oft nach dem korrespondierenden Fluorophor benannt.

Fluoreszenz Objektive: Objektive, die für Fluoreszenzmessungen verwendet werden, müssen geeignete Transmissionskurven aufweisen, um die verwendeten Lichtspektren übertragen zu können. In der schon gezeigten Abbildung 2.15 ist das Lichtspektrum einer Quecksilberdampfampe mit der Transmissionskurve, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten achromatischen (2 Farben korrigierten) VIS Objektiven von Leica¹⁷ überlagert. Für Fluoreszenzanwendungen im oberen UV und VIS Bereich mit starken Fluoreszenzintensitäten ist dieser Objektivtyp einsetzbar - siehe auch MULISCH UND WELSCH (2010). Ein Teil des unteren UV Bereichs, sowie ein Teil der ersten spektralen Spitze der Lichtquelle werden abgeschnitten und sind daher für die Fluoreszenzmessung nicht verfügbar. Werden Fluorophore verwendet, die aber genau diesen spektralen Bereich von 320nm bis 350nm benötigen, muss ein anderes Objektiv verwendet werden, dessen Transmissionskurve auch diesen spektralen Bereich miteinschließt. Verfügbar sind spezielle Fluoreszenzobjektive (Fluorite) und UV Objektive, deren Kosten allerdings vergleichsweise deutlich höher sind. Weiters sind

¹⁷Leica Microsystems, Wetzlar (Germany). www.leica-microsystems.com

apochromatische (3 Farben korrigierte) Objektive z.B. bei Edmund Optics¹⁸ verfügbar, die nach MULISCH UND WELSCH (2010) für Fluorophore mit großem Stokes Shift verwendet werden sollten. Abbildung 2.15 zeigt beispielhaft den Unterschied in der Bildqualität bei verschiedenen Objektivtypen (Achromat, Fluorit und Apochromat). Für weitere Details zur Funktion und den Typen von Objektiven siehe MULISCH UND WELSCH (2010) und HENKEL (2003).

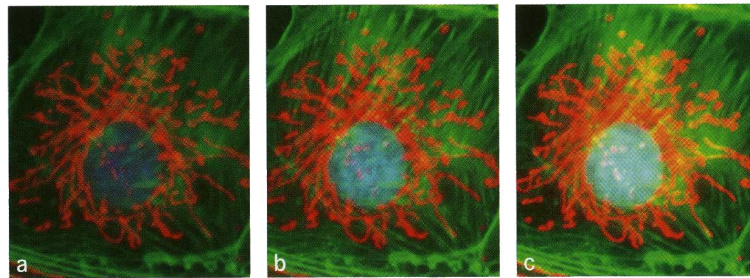


Abb. 2.18. Fluoreszenzbild derselben Probe (Endothelzelle) bei denselben Einstellungen für die Kamera und die Lichtquelle. Die Bildserie zeigt den Einfluss des Objektivtyps. (a) Achromat (b) Fluorit (c) Apochromat. (MULISCH UND WELSCH (2010))

Detektor bzw. Kamera: Bei konventionellen Lichtmikroskopen (widefield microscopes) werden als Detektoren CCD und CMOS Kameras eingesetzt. Vorteile der CCD Sensoren können mittlerweile auch von CMOS Sensoren erreicht werden (siehe STEMMER (2010)). Einer der wichtigsten Parameter ist die spektrale Empfindlichkeit. Verfügbar sind Kameras für den UV, VIS und IR Bereich, deren Spektren auch in die anderen Wellenlängenbänder einfließen. Außerdem ist zu unterscheiden zwischen monochromen Kameras und Farbkameras. Bei den Farbkameras ist über jedem Pixel ein Farbfilter angeordnet, häufig ist das der der Bayer-Filter. Dieser beinhaltet zwei grüne Pixel und je einen blauen und roten Pixel je Kamerapixel. Die doppelte Anzahl an grünen Pixeln ist der höheren Empfindlichkeit des menschlichen Auges bei der Farbe Grün angeglichen. Weitere Informationen dazu sind in STEMMER (2010) verfügbar.

2.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die notwendigen Parameter eines Messsystems zur Analyse von Papier und Papierbestandteilen festgelegt. Die verfügbare Auflösung sollte weniger als $1\ \mu\text{m}$ bei entkoppelten Probengrößen sein. Das ist ein Hauptkriterium bei der Entwicklung eines Messsystems für die Ermittlung von 3D Strukturen in Papier. Relevante Details in Papier (z.B. Beschaffenheit der Fasern oder die Füllstoffverteilung)

¹⁸Edmund Optics, Inc. www.edmundoptics.de

lung) sind im Mikrometerbereich zu finden. Um statistisch vernünftige Aussagen zu ermöglichen sind Probengröße von mindestens einigen Millimetern notwendig. Weiters wurden verschiedene bildgebenden Systemen in den Gebieten Medizin und Materialwissenschaften verglichen. Diese Verfahren wurden in Bezug auf deren Anwendung, Vor- und Nachteile erläutert. Aktuell verwendete Methoden in der Strukturanalyse von Papier verwenden, üblicherweise, die CLSM, die Tomographie oder die Elektronenmikroskopie. Wie bekannt, ist die Anzahl der Schnittebenen und damit die Probengröße, bei CLSM Methoden, aufgrund der Abhängigkeit der optischen Dichte der Probe, begrenzt. Bei mechanischen Schnitten ist ein erheblicher Mehraufwand zu erbringen (z.B. Aufbringen der Schnitte auf Objektträger oder Ausrichtung der Schnitte). Die einfach handzuhabende Tomographie liefert bei Papier zu wenig Bildkontrast um, trotz der ausreichenden Auflösung im Submikrometerbereich, detailreiche Messungen zu ermöglichen. Die Probengröße wäre bei μ CT Systemen hingegen optimal. In der Elektronenmikroskopie fehlt die notwendige Probengröße, diese wird aber, aufgrund der optimalen Auflösung, für Strichcharakterisierungen verwendet. Die Nachteile der oben beschriebenen etablierten Messverfahren können, wie in bestehenden Arbeiten gezeigt wurde, für die geforderten Anwendungen in der Papiertechnik von einem Auflichtmikroskop in Kombination mit einem Mikrotom behoben werden. Diese Lösung erfordert vergleichsweise mittelmäßigen Aufwand für die Probenpräparation. Die Auflösung reicht bis in den Submikrometerbereich und ist daher für die Strukturanalyse ausreichend. Die messbaren Probengrößen sind mittlerweile schon im Bereich von einigen Millimetern und kann weiter erhöht werden. Weiters wurde in diesem Kapitel auf Methoden zur Steigerung der Bildqualität eingegangen. Fluoreszenzmethoden zählen hierbei zu den effektivsten Techniken. Abschließend wurden die zugrundeliegenden Prinzipien der Fluoreszenz beschrieben. Erforderliche Mikroskopkomponenten wurden in der Literatur recherchiert, dargestellt und erklärt. Für den Betrieb eines Fluoreszenzmikroskops sind eine geeignete Lichtquelle, das korrespondierende Filtersystem und, eine für die jeweilige Wellenlänge der Fluoreszenzemission, passende Kamera erforderlich.

Die μ STRUCSCOP Methode

3.1. Einleitung

In diesem Kapitel wird die μ STRUCSCOP Methode vorgestellt. Diese Methode besteht aus dem Messsystem und den für die Papiertechnik adaptierten Fluoreszenz-techniken. Im Rahmen eines FFG Projekts wurde das μ STRUCSCOP Messsystem, basierend auf einem am Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik entwickelten Forschungsprototypen (μ STRUCSCOP Generation 1) zur Messung der 3D Papierstruktur, weiterentwickelt. In den Arbeiten von WILTSCHKE UND DONOSER (2004), DONOSER ET AL. (2005), KRITZINGER ET AL. (2009) und KRITZINGER (2010) sind die Funktionalitäten und Anwendungsgebiete des Forschungsprototypen dargestellt.

Das Messsystem μ STRUCSCOP Generation 2 (vorindustrieller Prototyp) wurde mit neuen Hardwarekomponenten und Softwaremodule aufgebaut und erweitert. Insbesondere waren das Komponenten für die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie und Module zur Erhöhung des Automationsgrades der Messung mittels 2D Stitching und HW/SW Aligning. Diese Erweiterungen wurden evaluiert und bewertet.

3.2. Aufbau und Eckdaten des Messsystems

Das Messsystem μ STRUCSCOP ist eine Kombination aus Hardware-Bauelementen und Software-Modulen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das Messsystem in der vorliegenden Arbeit eine Weiterentwicklung auf Basis des bereits bestehenden und seit Jahren eingesetzten Forschungsprototypen. Die Wartbarkeit dieses Prototypen wird aber immer schwerer bzw. ist zum Teil wegen zu alter Komponenten nicht mehr möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde, im Rahmen eines von der FFG geförderten Projekts, ein vorindustrieller Prototyp (μ STRUCSCOP Gen. 2) neu aufgebaut und mit zu-

sätzlichen Funktionen erweitert. Alle Komponenten wurden entsprechend dem Stand der Technik, den bekannten Anforderungen von Fluoreszenzmessungen, zukünftigen Entwicklungen bzw. Erweiterungen und der Wartbarkeit entworfen und eingebaut. Die Erläuterungen zu erneuerten Komponenten werden in diesem Kapitel kurz gehalten und teilweise nur der Vollständigkeit halber aufgelistet. Erweiterungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, werden detaillierter beschrieben, da diese den eigentlichen Grund für den Bau eines neuen Messsystems mit der Erweiterung für fluoreszenzoptische Verfahren darstellten.

Diese wesentlichen Erweiterungen sind:

- **erhöhter Automatisierungsgrad mit einer Benutzeroberfläche,**
- **Hardware-unterstützte Bildverarbeitung, und**
- **Betrieb des Lichtmikroskops mit Fluoreszenz.**

Eine Gesamtübersicht des Messsystems ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Da keine besonderen klimatischen Bedingungen vorhanden sein müssen, kann das System in einem normalen Laborraum aufgebaut werden. Zur mechanischen Entkopplung von der Umgebung ist ein schwingungsgedämpfter Tisch verwendet worden. Die Positionierung der Geräte richtete sich nach der zentralen Messeinheit - dem Fluoreszenzmikroskop.

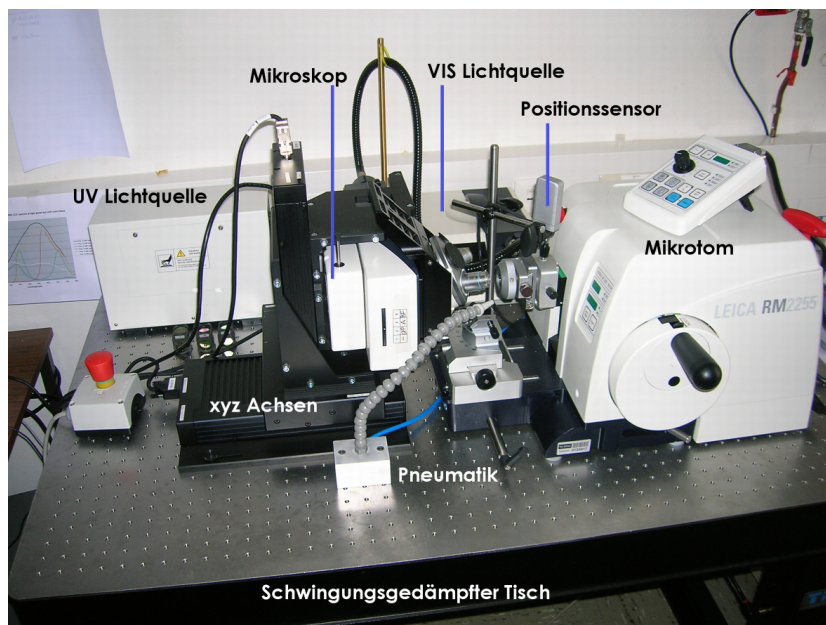


Abb. 3.1. Die aktuelle Anordnung der Hardwarekomponenten des μ STRUCSCOP Messsystems. Der Steuerungscomputer ist im Bild nicht zu sehen und ist neben dem Tisch platziert.

Die Einzelkomponenten der Hardware sind:

- 1) **UV- und eine VIS- Lichtquelle:** Diese dienen zur Anregung der Fluorophore in der Probe. (Die Anregung mit bestimmten spektralen Lichtbändern ist eine wesentliche Erweiterung gegenüber dem Forschungsprototypen.)
- 2) **Mikroskop mit Fluoreszenzsystem:** Das Mikroskop kann als konventionelles Lichtmikroskop oder als Fluoreszenzmikroskop verwendet werden. (Diese Komponente ist eine Erweiterung gegenüber dem Forschungsprototypen.)
- 3) **xyz Achsen:** Diese Lineartriebe werden zur freien Positionierung des Mikroskops im dreidimensionalen Raum verwendet.
- 4) **Mikrotom:** Zum Abtragen einzelner Schichten von der Probe wird ein Rotationsmikrotom verwendet.
- 5) **Positionssensor:** Die Endpositionen des Probenhalters des Mikrotoms werden über diesen Positionssensor gemessen. (Diese Komponente ist eine Erweiterung gegenüber dem Forschungsprototypen und liefert Daten für die automatische Bildverarbeitung.)
- 6) **Pneumatik:** Die beim Schneiden anfallenden Schnittreste werden durch ein Pneumatiksystem automatisch entfernt.
- 7) **Kamera:** Die Kamera ist durch einen CCD Sensor realisiert. Dieser muss für die entsprechenden Lichtspektren der Fluoreszenzemissionen sensitiv sein.
- 8) **Schwingungsgedämpfter Tisch:** Der Tisch dient zur Vermeidung von Schwingungen im Mikrometerbereich und ermöglicht damit eine stabilisierte Bildaufnahme.
- 9) **Steuerungs-PC:** Der PC enthält alle erforderlichen Softwaremodulen zur Steuerung der Hardwarekomponenten. Auf diesem PC ist das Steuerungsprogramm und die Benutzeroberfläche installiert.

Die Steuerung des Messsystems, also die Steuerung der Hardwarekomponenten untereinander, erfolgt über eine Benutzeroberfläche. Die Oberfläche wurde nach den Richtlinien der *EN ISO 9241 - Grundsätze der Dialoggestaltung* entworfen. Die Erweiterungen in der Software gegenüber dem Forschungsprototypen werden im Abschnitt 3.5 erläutert. Prinzipiell ist die Benutzerschnittstelle in 3 Registerkarten bzw. Oberflächen gegliedert:

- 1) **Live-View:** In dieser Registerkarte wird die ROI (region-of-interest) definiert und zur verschiedenen Kameraparameter justiert.
- 2) **Messablauf:** Hier ist der Eingabebereich für die Parameter für den automatisierten Messablauf zu finden, u.a. auch neue Elemente für die online Bildverarbeitung.

3) Messung: Diese Ansicht beinhaltet Steuerelemente zum Starten, Pausieren und Beenden der Messung. Weiteres sind Statusinformationen zur Messung dargestellt.

Eine kurze Auflistung der technischen Eckdaten des Systems ist in folgender Tabelle 3.1 zu sehen. Im folgenden Abschnitt 3.3 und im Anhang D sind weitere technische Daten der einzelnen Geräte zu finden.

(x/y) Auflösung	$> 0,47 \mu m$
(z) Auflösung	$> 1 \mu m$
(x/y) Probengröße (getestet)	$< 7 \times 5 mm^2$
(z) Probengröße (getestet)	$< 7 mm$
online stitching	bei mittlerem bis starkem Bildkontrast
online aligning	bei schlechtem bis starkem Bildkontrast
(x/y) Positioniergenauigkeit der Achsen	$2 \mu m$
(z) Positioniergenauigkeit der Achse	$0,1 \mu m$

Tabelle 3.1. Kurze Auflistung wichtiger Eckdaten des μ STRUCSCOP Messsystems.

3.3. Hardwarekomponenten und Eigenschaften

In diesem Abschnitt werden die Hardware Komponenten des μ STRUCSCOP Messsystems erläutert. Komponenten, die im Vergleich zum Forschungsprototypen prinzipiell unverändert geblieben sind, werden nur kurz beschrieben. Weitere Kenndaten dazu sind im Anhang D zu finden. Wesentliche Erweiterungen im Vergleich zum Forschungsprototyp werden detaillierter bzgl. der Auswahl, dem Einbau und der Funktion beschrieben.

Aus Gründen der Wartbarkeit und Austauschbarkeit der Hardwarekomponenten wurde eine eindeutige Abgrenzung zu den Software Modulen implementiert. D.h. der Tausch von Komponenten durch vergleichbare Teile hat keinen Einfluss auf das Steuerungsprogramm bzw. die Benutzeroberfläche.

UV- und eine VIS Lichtquelle: Wie bereits in Abschnitt 2.3.6 und in diesem Abschnitt erläutert, ist die Wahl einer geeigneten Lichtquelle notwendig und auf die restlichen Teile des Fluoreszenzmikroskops abzustimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Lichtquellen verwendet, die insgesamt eine spektrale Bandbreite von ca. 300 nm bis ca. 800nm, also vom oberen UV-Bereich bis in den oberen Bereich des sichtbaren roten Lichts haben. Fluorophore und Filterwürfel sollten nach diesen möglichen Anregungsfrequenzen ausgewählt werden. In Abbildung 2.15 und im Anhang D ist das Spektrum der Lichtquelle *Leica EL6000* für den UV und unteren bis mittleren sichtbaren Bereich abgebildet. Folgende Abbildung 3.2 zeigt das Lichtspektrum des Lichtquelle *Leica KL2500LCD*, die für den sichtbaren Lichtbereich (VIS) verwendet wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Objektive sind für das Lichtspektrum

dieser (VIS!) Lichtquelle optimal durchlässig. Weitere Kenndaten zu den Lichtquelle

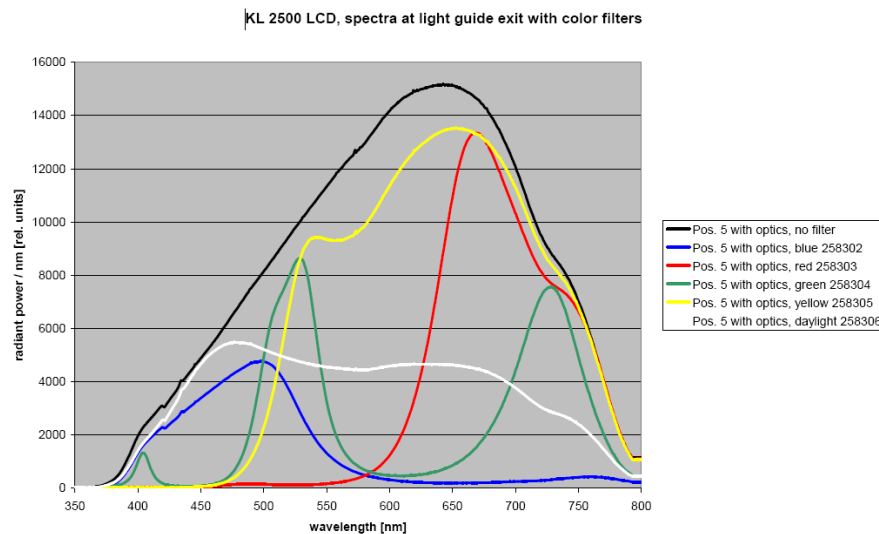


Abb. 3.2. Spektrum der VIS Lichtquelle *Leica KL2500LCD* mit verschiedenen Filternscheiben für die Vorfilterung innerhalb der Lichtquelle.

befinden sich ebenfalls im Anhang D.

Mikroskop mit Fluoreszenzsystem: Diese Komponente ist eine wesentliche Neuerung im Vergleich zum Forschungsprototyp. Aufbau und Funktion eines Fluoreszenzmikroskops wurde in Abschnitt 2.3.6 erklärt. Anforderungen für die Implementierung waren eine einfache Umrüstung zwischen normalen Lichtbetrieb und Fluoreszenzbetrieb. Dazu wurde der Hauptteil des *Leica DM 2500 MH*¹ durch den Händler zur Verfügung gestellt. Dieses Mikroskop ermöglicht Auflicht-, Hellfeld-, Dunkelfeld- und Fluoreszenzmikroskopie. Zur Anwendung von Fluoreszenz ist eine geeignete Kombination aus Lichtquelle, Filterwürfel, Objektiv und Fluorophor notwendig. Die notwendigen Filtersysteme werden in einem Filterrad durch kompakte Filterwürfel realisiert - siehe Abbildung 3.3.

Die in der vorliegenden Arbeiten verwendeten Filterwürfel und deren spektralen Eigenschaften sind in Abbildung 2.17 (Filterwürfel *GFP*) und im Anhang D (Filterwürfel *A*) abgebildet. Die verwendeten Objektive sind *Leica N PLAN EPI 10x*, *Leica N PLAN L 20x* und *Leica N PLAN L 50x*. Alle drei Objektive haben eine geeignete Licht-Transmission für den Fluoreszenzbetrieb des Mikroskops und der Lichtquelle - siehe Abbildung 2.15. Es ist hier anzumerken, dass Objektive mit einer besseren Transmission im UV Bereich mit derselben Lichtquelle stärkere Fluoreszenz bewirken. Wenige Versuche dazu zeigten, bei der oft schwachen Autofluoreszenz von Materialien und Papierfasern, eine deutliche Steigerung der Fluoreszenzintensität. Allerdings sind die-

¹Leica Mikrosysteme www.leica-microsystems.com/

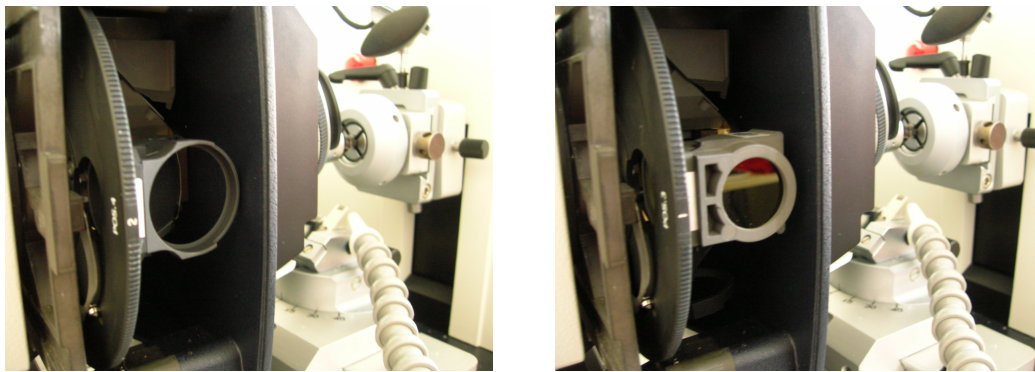


Abb. 3.3. Blick auf das Filterrad und die Filterwürfel des Leica DM 2500 M. (links) der fest montierte Filterwürfel für den normalen (VIS) Lichtbetrieb. (rechts) ein wechselbarer Filterwürfel.

se Objektive auch teurer (z.B. das *Zeiss Objektiv LD EC Epiplan-Neofluar 50x/0.55 DIC M27*²).

xyz Achsen: Wie schon im Forschungsprototypen wurden wieder xyz Achsen (Lineartische) zur dreidimensionalen Positionierung des Mikroskops verwendet. Die Konstruktion und die Bereitstellung geeigneter Schnittstellen für die Software wurden von einem Hersteller für mikroskopische Messtechnik durchgeführt (*Alicona Imaging GmbH*³). Die Positionierauflösung der Antriebe in x und y Richtung liegt bei 2 μm und in z Richtung liegt die Auflösung bei 0.1 μm . Insgesamt kann ein Volumen von (5x5x10) cm^3 befahren werden. Weitere Details zu den Antrieben sind in Anhang D zu finden.

Rotationsmikrotom: Wie schon beim Forschungsprototypen wurde wieder ein Rotationsmikrotom verwendet. Eine zeitsparende Neuerung des Modells *Leica RM 2255*⁴ ist ein Schnittfenster mit variabler Schnittgeschwindigkeit. Weitere Kenndaten sind in Anhang D zu finden. Die Ansteuerung des Mikrotoms erfolgt per Software durch das Steuerungsprogramm bzw. der Benutzeroberfläche. Dazu wurde eine eigens dafür angefertigte Schnittstelle des PCs verwendet. Ein Blockschaltbild der Verschaltung dieser Schnittstelle ist in Anhang D .Nach Verdrahtung zwischen Schnittstelle und Elektronik wird der Schaltkreis zwischen Mikrotom und Fußschalter der Mikrotoms angesteckt. Der Schaltplan für die Fußschalter Elektronik ist ebenfalls in Anhang D zu finden.

Positionssensor: Diese Komponente ist eine wesentliche Neuerung im Vergleich zum Forschungsprototyp. Der taktile Positionssensor bestimmt die Längendifferenz

²Carl Zeiss GmbH, Österreich www.zeiss.at

³Alicona Imaging GmbH www.alicon.at

⁴Leica Mikrosysteme www.leica-microsystems.com/

zwischen den Endstellungen des Mikrotomprobenhalters. Der Versatz der Endstellungen tritt nach dem Schneiden auf, da der Probenhalter des Mikrotoms nicht an der selben Position stehen bleibt. Da die Abweichungen bis über $200\text{ }\mu\text{m}$ betragen können, sind diese Versätze auch in den digitalisierten Bildern zu sehen. Im Forschungsprototyp wird der 3D Bilderstapel im Anschluss an die Messung durch eine spezielle Bildverarbeitungssoftware aligned. In der μ STRUCSCOP Methode übernimmt der Positionssensor einen Großteil des Aligning - mehr dazu weiter unten im Abschnitt 3.5.2. In folgender Abbildung 3.4 ist der gewählte Sensor *Heidenhain MT 1271*⁵ abgebildet.



Abb. 3.4. Der Positionssensor zur Messung von Längendifferenzen in den Endstellungen des Probenhalters am Mikrotom. (links) Foto Sensor, (mittig) Positionierung des Sensors am Mikrotom durch ein verstellbares Stativ, (rechts) Funktion Sensor am Mikrotom.

Weiters ist in der Abbildung 3.4 zu sehen, wie der Sensor am Probenhalter des Mikrotoms montiert wird. Gemessen wird parallel zur Bewegungsrichtung des Probenhalters, also vertikal zur Tischebene. Ein verstellbares Stativ ermöglicht die Positionierung des Sensors, die je nach Probengröße variiert werden kann.

Zur Evaluierung der Versätze des Mikrotoms wurden mehrere Messungen mit 200 Schnittebenen durchgeführt. In den meisten Fällen ist die Längendifferenz kleiner als $100\text{ }\mu\text{m}$. Eine generelle Tendenz der Abweichungen in positiver oder negativer Richtung konnte nicht festgestellt werden. In folgender Abbildung 3.5 sind exemplarisch die Ergebnisse einer Messung dargestellt. In diesem Diagramm sind Längendifferenzen von etwa $100\mu\text{m}$ im Bereich zwischen Schnitt 1 und 10 vorhanden. Weitere Kenndaten zum Positionssensor sind im Anhang D zu finden.

Pneumatiksystem: Das Pneumatiksystem zur automatischen Entfernung der Schnittreste wurde wie im Forschungsprototypen realisiert. Ein Magnetventil von

⁵DR. JOHANNES HEIDENHAIN GmbH www.heidenhain.at

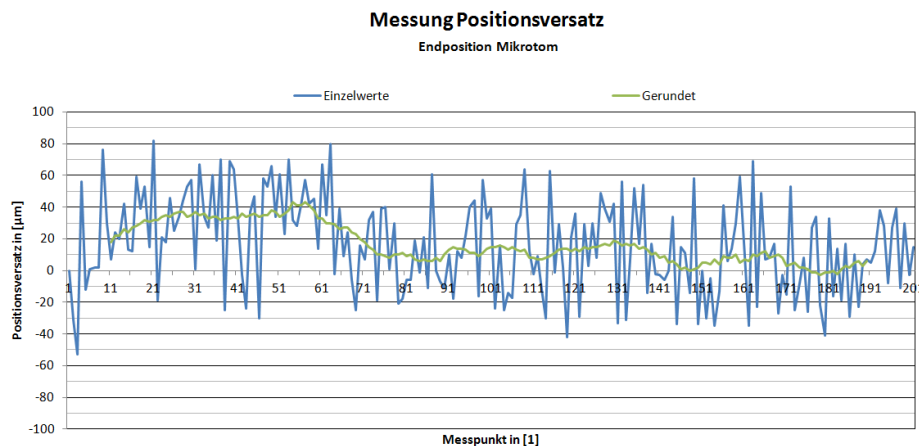


Abb. 3.5. Abweichung der Endposition des Probenhalters des Mikrotoms. (blau) Einzelwerte der Messung, (grün) gemittelte Werte über ± 10 Einzelmessungen.

*Bürkert Contromatic GmbH Austria*⁶ wird über eine spezielle Schnittstelle durch das Steuerungsprogramm angesteuert. Weitere Kenndaten zum Pneumatiksystem und der Schnittstelle sind in Anhang D zu finden.

Kamera: Die Auswahl der Kamera war keine prinzipielle Neuerung, im Vergleich zum Forschungsprototypen. Es wurde aber ein CCD Sensor mit größerer Chipfläche (7,15mm x 5,44mm) und kleinerer Pixelgröße (4,4 μm x 4,4 μm) gewählt. Die digitalisierten Bilder haben damit größere Pixelanzahl und kleinere Pixelgröße (und damit auch eine kleinere Voxelgröße). In der vorliegenden Arbeit wurde nur mit Fluoreszenzmissionen im sichtbaren Lichtspektrum gearbeitet. Daher ist auch dieser Parameter der Kamera festgelegt worden. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, sind die spektralen Empfindlichkeiten der RGB Kanäle der Kamera und der verwendete Filter, der die Empfindlichkeit der Kamera auf den sichtbaren Lichtbereich (400nm bis 700nm, Baader Filter) reduziert.

Bei der Auswertung von Fluoreszenzbildern ist die spektrale Verteilung der RGB Kanäle zu berücksichtigen. Je nach verwendeten Filterwürfel sind diese Bilder beispielsweise nur mit BLAU- und GRÜN-Anteil vorhanden. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, ist beim BLAU-Maximum des Kanals auch ein GRÜN-Anteil vorhanden. Aufgrund dieser Überlappung der RGB Kanäle, wird bei der Aufnahme eines scheinbaren und eigentlich "nur"blauen Bildes ein kleinerer Anteil, ebenfalls im GRÜN-Kanal, detektiert werden. Wird ein Bild anschließend in die einzelnen RGB Kanäle zerlegt, sind damit auch im GRÜN-Kanalbild Farbkomponenten vorhanden. Es wurde bemerkt, dass Strukturinformation von Papierproben, je nach Beleuchtungsstärke besser im GRÜN Kanalbild zu sehen sind, als im BLAU Kanal. Weitere Informationen

⁶Bürkert Contromatic GmbH Austria www.buerkert.at

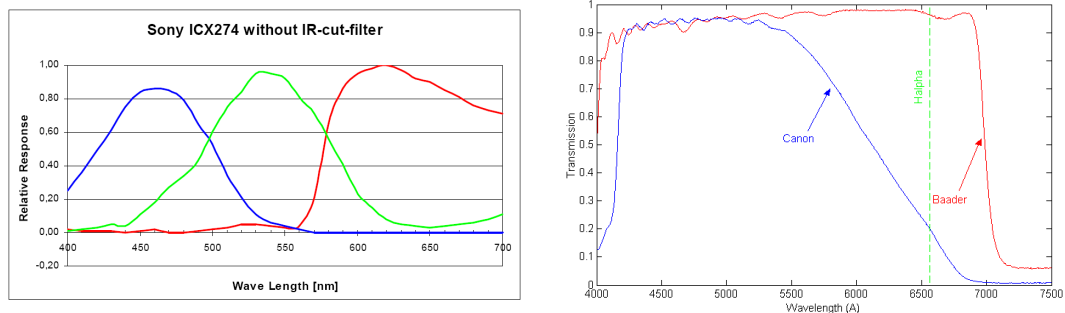


Abb. 3.6. Spektrale Sensitivität der Kamera. (links) Spektrale Empfindlichkeit der Kamera-kanäle R, G und B, (rechts) Kennlinie des verwendeten Baader Filters (10 nm = 1 Å).

zu den RGB Kanälen sind im Abschnitt 4.2.4 und im Kapitel 4 zu finden. Weitere Kenndaten zur Kamera sind in Anhang D zu finden.

Schwingungsgedämpfter Tisch: Der schwingungsgedämpfte Tisch zum Aufbau des Messsystems und zur Stabilisierung der Bildaufnahme gegen Vibrationen wurde wie, im Forschungsprototypen (μ STRUCSCOP Gen. 1) realisiert. Weitere Kenndaten zum Tisch *Linus Labortisch Serie 63*⁷ sind im Anhang D zu finden.

Steuerungs-PC: Der Steuerungs-PC ist ein handelsüblicher Industrie PC, der vom Messtechnikhersteller (*Alicona Imaging GmbH*⁸) zusammen mit einem Zusatz-Modul für die Ansteuerung der Achsen und des Positionssensors geliefert wurde. Der Steuerungs-PC hat 8 GB RAM, einen DualCore Prozessor mit 2,4 GHz Taktfrequenz und das Betriebssystem Windows Vista Premium installiert. Weiters ist am PC die *IFM G4* Software und ein *.net Server* installiert. Weiters kann auf Programmbibliotheken der IFM Software zugegriffen werden, um eine eigene Steuerung zu programmieren. Weitere Kenndaten zum Steuerungs-PC sind im Anhang D zu finden.

3.4. Benutzeroberfläche zur Messablaufsteuerung

Zur Steuerung des Messsystems wurde eine eigene grafische Benutzeroberfläche (GUI) entworfen und implementiert. Die gesamte Funktionalität der Steuerungssoftware ist durch die GUI zugänglich. Die Grundlagen für das grafische Design waren die Empfehlungen und Vorgaben der Norm *DIN EN ISO 9241-110 Grundsätze der Dialoggestaltung* - siehe auch SCHNEIDER (2008). Die Benutzeroberfläche und deren Steuerelemente wurden, im Vergleich zum Forschungsprototyp, wesentlich erweitert. Diese

⁷Linus bzw. Qioptiq Photonics GmbH & Co. KG www.qioptiq-shop.com

⁸Alicona Imaging GmbH www.alicon.at

Erweiterungen sind z.B. Bedienelemente für die online Bildverarbeitung während einer Messung. Funktion und Koordination der verwendeten Softwaremodule werden im Abschnitt 3.5 detailliert erläutert.

Basierend auf den Vorschlägen aus der Norm *DIN EN ISO 9241-110* wurde die Oberfläche in drei Registerkarten aufgeteilt:

- 1) **Live View:** Registerkarte zur Auswahl eines Messbereiches,
- 2) **Messablauf:** Registerkarte zur Festlegung der Messparameter, und
- 3) **Messung:** Registerkarte für die (eigentliche) Messung.

Die Gestaltung der Oberfläche wurde mit der Entwicklungsumgebung *Microsoft VC++ IDE* durchgeführt. Zukünftige Erweiterungen in der Ablaufsteuerung und Änderungen in den Softwaremodulen können daher einfach in die Oberfläche integriert werden.

3.4.1. Registerkarte LIVE VIEW

In der Registerkarte *Live View* sind Bedienelemente zur Navigation des Mikroskops auf der Probenoberfläche und zur Justierung des Kamerabildes positioniert. Das Kamerabild wird in Echtzeit an ein Display übertragen, um die Deklaration eines Messbereiches (ROI) auf der Probenoberfläche zu ermöglichen - siehe schwarzes Feld in Abbildung 3.7. Weitere Bereiche der Registerkarte sind im Folgenden überblicksmäßig beschrieben.

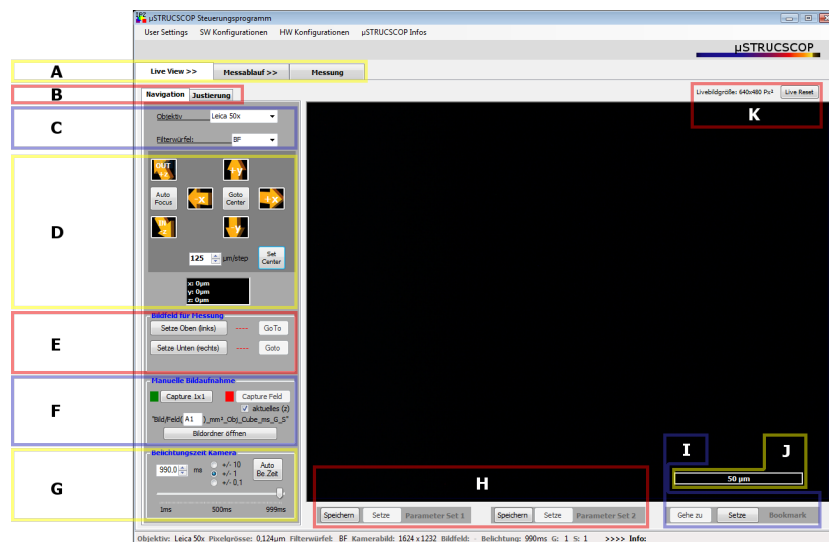


Abb. 3.7. Registerkarte LIVE VIEW der grafischen Benutzeroberfläche mit Gruppe der Navigationselemente. Einzelne Bedienbereiche sind farblich markiert und im Fließtext beschrieben.

- A) Hauptauswahl:** Hier wird zwischen den 3 Registerkarten umgeschalten.
- B) Weitere Auswahl:** Zur Selektion zwischen Navigationselementen (Registerkarte *Navigation*) und Elementen zur Kamerajustierung (Registerkarte *Justierung*) wird hier umgeschalten.
- C) Mikroskop:** Für eine korrekte Bildverarbeitung (stitching) ist die passende Auswahl⁹ bei jedem Objektivwechsel zu treffen.
- D) Achsen:** In diesem Bereich sind Bedienelemente für die Steuerung der Achsen positioniert. Neben der Achsenbewegung durch den Joystick sind auch manuell einstellbare Strecken fahrbar. Weiters werden die aktuellen relativen Koordinaten angezeigt.
- E) Bildfeld:** Für die Messung werden hier die erforderlichen Bildkoordinaten festgelegt. Die Eingabekoordinaten sind der obere, linke und der untere, rechte Eckpunkt (also ein Rechteck). Durch weitere Bildverarbeitung (stitching) werden dieses Kamerabilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt.
- F) Bildaufnahme:** Hier sind die Bedienelemente für die manuelle Einzelbild- und Bildfeldaufnahme positioniert. Alle verwendeten Kameraparameter und die Bildgröße werden im Dateinamen gespeichert.
- G) Belichtungszeit:** Zur Anpassung der Lichtquelle auf die verwendeten Filtersysteme und zur Justierung der Belichtungszeit stehen Schieberegler und eine numerische Eingabe zur Verfügung.
- H) Parameter Set:** Hier können die aktuellen Kameraparameter zwischengespeichert und bei Bedarf wieder automatisch gesetzt werden.
- I) Bookmark:** Dieses Element dient zur Zwischenspeicherung einer Achsenposition.
- J) Maßstab:** Dieser Balken zeigt den aktuellen Maßstab für das gesetzte Objektiv in Bereich C.

⁹Wird ein anderes Objektiv als die vorhanden Leica Objektive 10x, 20x und 50x verwendet, muss eine manuelle Adjustierung der Pixelgröße vorgenommen werden.

K) Live View Reset: Diese Funktion wird in den seltenen Fällen verwendet, in denen das Livebild der Kamera neu gestartet werden muss. Ein kompletter Programmneustart entfällt dadurch.

Folgende Abbildung 3.8 zeigt den zweiten Teil der Oberfläche von *LiveView* für die Justierung des Messsystems (insbesondere für die Justierung der Kamera).

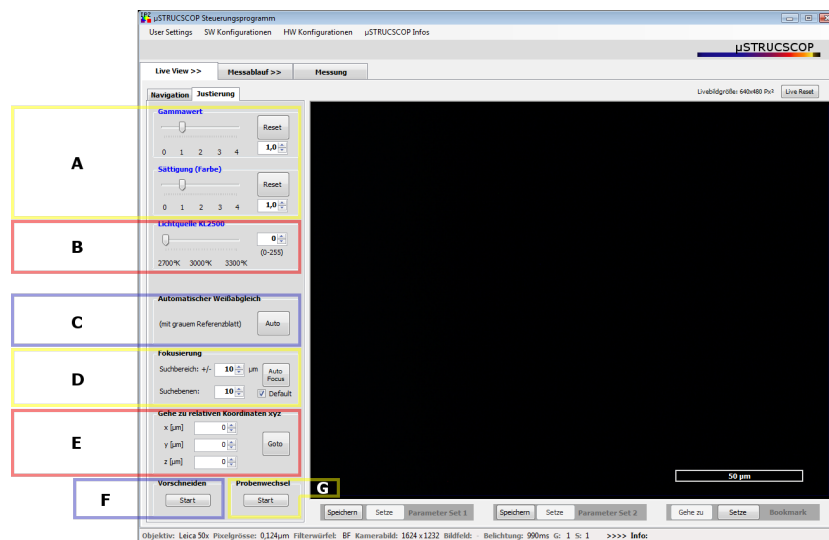


Abb. 3.8. Registerkarte LIVE VIEW der grafischen Benutzeroberfläche mit Gruppe der Justierungselemente. Einzelne Bedienbereiche sind farblich markiert und im Fließtext beschrieben.

A) Kameraparameter: Hier befinden sich Bedienelemente zur Einstellung des Gammawerts und der Sättigung der Kamera. Da diese Parameter nicht absolut sind, werden bei zwei verschiedenen Kamertypen und denselben Parametern verschiedene Bilder generiert werden.

B) Beleuchtungsstärke: Damit kann die VIS Lichtquelle per Software angesteuert werden. Dabei wird die Farbtemperatur in 256 Stufen eingestellt.

C) Weißabgleich: Zur korrekten Wiedergabe der Farben durch die Kamera muss bei Bedarf ein automatischer Weißabgleich mit einer grauen(!) Farbtafel durchgeführt werden. Für die vorliegende Arbeit war normales weißes Kopierpapier ausreichend.

D) Fokussierung: Hier werden Parameter für die Durchführung der Fokussierung eingestellt. Neben der Eingabe von eigenen Parameter kann auch ein voreingestellter Ablauf verwendet werden.

E) Koordinaten anfahren: Mit dieser Funktion kann die relative Koordinatenposition direkt angefahren werden.

F) Vorschneiden: Soll eine Probe vor der Messung schnell (vor)geschnitten werden, müssen keine Bilder aufgenommen werden. Der Einsatz der Pneumatik ist optional möglich.

G) Probenwechsel: Für einen einfacheren Probenwechsel fährt das Mikroskop in eine andere Position.

3.4.2. Registerkarte MESSABLAUF

In der Registerkarte *Messablauf* - siehe Abbildung 3.9 - werden die Parameter für die automatische 3D Messung eingestellt. Nachdem ein geeignetes Bildfeld für die Messung gefunden und eingestellt wurde, sind hier eine Reihe von Parametern zu setzen.

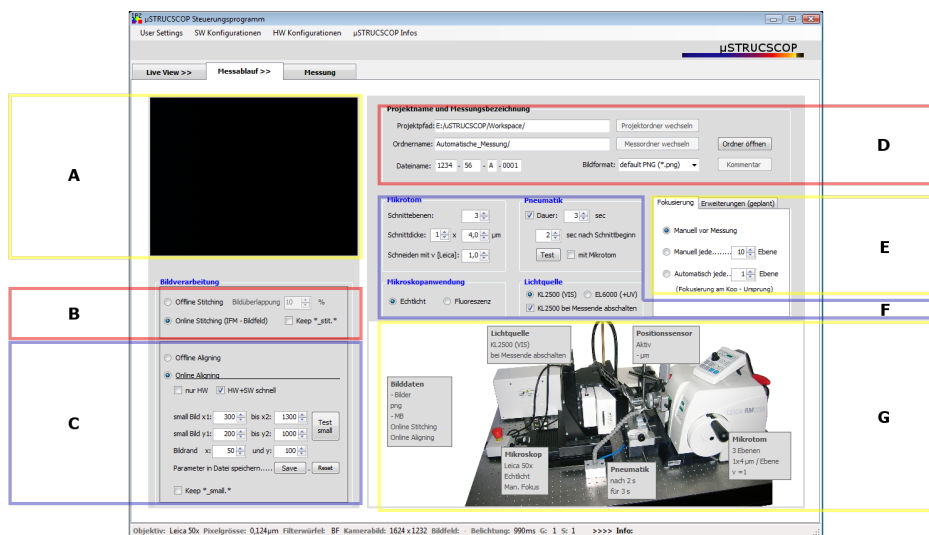


Abb. 3.9. Registerkarte MESSABLAUF der grafischen Benutzeroberfläche.

A) Live View: Während einer Messung sind hier Bilder der Kamera in Echtzeit zu sehen.

B) Parameter für die Bildverarbeitung (Stitching): Um zwischen Online (alicon) und Offline Stitching (IPP) umzuschalten, wurden diese Bedienelemente platziert. Eine genauere Erklärung dazu ist in Abschnitt 3.5.1 zu finden.

C) Parameter für die Bildverarbeitung (Aligning): Dieser Punkt ist eine der wesentlichen Erweiterungen des μ STRUCSCOP Messsystems. Eine Erklärung zum programmtechnischen Ablauf dazu ist in Abschnitt 3.5.3 zu finden. Weiters ist die Auswahl einer Region möglich, die für das Aligning verwendet wird. Um den vertikalen Versatz zwischen den Ebenenbildern zu berechnen, wurde bisher das gesamte Bild verarbeitet. Mit dieser Funktion wird ein kleineres Bild verwendet und das führt zu einer deutlich geringeren Verarbeitungszeit der Bildverarbeitungssoftware. In Abbildung 3.10 ist ein Ebenenbild und der kleinere Bildausschnitt dargestellt. Das originale gestitched Ebenenbild besteht aus 1x8 Bildern, der verwendete Bildausschnitt ist kleiner als ein einzelnes Bild. Die korrekte Funktion beim Einsatz der kleineren Bilder



Abb. 3.10. Auswahl einer kleineren Region für die Aligning Software. (links) Gesamtes Ebenenbild (rechts) Ausschnitt aus dem Ebenenbild das für das Aligning verwendet wird.

setzt aber voraus, dass genügend strukturierte Bildinformation (wie z.B. Papierfasern) vorhanden sind. Bei schief eingebetteten Proben wird sich die zuerst gewählte Region verschieben. In diesem Fall muss der Bildabschnitt entsprechend vergrößert werden.

D) Projektname, Dateipfad und Bildname: Die Eingabe dieser Parameter erleichtert die Verwaltung der Bilddateien. Der Bildname ist in seiner Form vorgegeben.

E) Fokussierung: Diese Parameter justieren die Fokussierung während der automatischen Messung. Es stehen drei verschiedene Moden zur Auswahl. Üblicherweise wird die automatische Fokussierung für jede Ebenen gewählt. Hier stehen außerdem weitere Registerkarten für spezielle Erweiterungen zur Verfügung.

F) Mikrotom, Pneumatik und Lichtquelle: Je nach Größe des 3D Stapels wird mit diesen Parametern die Anzahl der Bildebenen und die Anzahl der Schnittebenen pro Bild angegeben. Dadurch kann eine beliebige physikalische Schnittdicke (größer $1\mu\text{m}$) erreicht werden. Die Einstellungen für die Pneumatik müssen für die jeweilige Probe und Schnittgeschwindigkeit angepasst werden und können vorab getestet werden.

G) Statusanzeige der Messparameter: Hier sind alle Messablaufparameter und zusätzliche Informationen über den Messablauf angegeben. Beispielsweise werden die aktuellen Positionssensordaten für die aktuelle Ebenen gezeigt oder der voraussichtliche Bedarf an Speicherplatz berechnet.

3.4.3. Registerkarte MESSUNG

In der Registerkarte *Messung* wird die Messung mit den bereits definierten Parametern gestartet und der Ablaufstatus angezeigt. Gegebenfalls kann die Messung pausiert, gekürzt oder abgebrochen werden. Die Abbildung 3.11 zeigt diese Registerkarte.

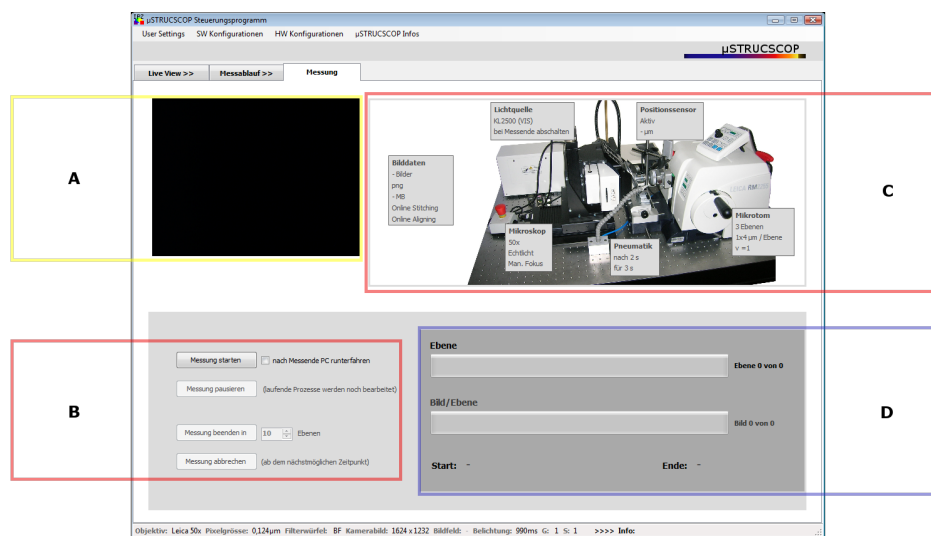


Abb. 3.11. Registerkarte MESSUNG der grafischen Benutzeroberfläche.

A) Live View: Während der Messung sind in diesem Fenster Bilder der Kamera in Echtzeit zu sehen.

B) Kontrollelemente: Hier befinden sich die Bedienelemente zum Starten, Pausieren, Kürzen und Abbrechen der Messung.

C) Statusanzeige der Messparameter: Alle eingestellten Messablaufparameter und zusätzliche Informationen werden hier angegeben. Beispielsweise werden die aktuellen Positionssensordaten für die aktuelle Ebenen gezeigt oder der voraussichtliche Bedarf an Speicherplatz berechnet.

D) Statusanzeige der Messung: Diese dient zur Darstellung des Status der Messung bzgl. aktuelle Ebenen und Zeitaufwand.

3.5. Softwarekomponenten und Eigenschaften

Die Softwarekomponenten enthalten alle modular entworfene und implementierten Programmcodes zur Ansteuerung der einzelnen Hardwarekomponenten. Jede Schnittstelle ermöglicht den Austausch der Hardwarekomponente oder der Softwarekomponente ohne die korrespondierende Komponente wechseln zu müssen. Das ist wichtig für den Fehlerfall oder bei zukünftigen Erweiterungen des Systems durch Upgrades oder Updates. Alle Softwaremodule wurden in ein Steuerungsprogramm eingebunden. Wie im vorigen Abschnitt 3.4 erwähnt, ist deren Steuerung durch den Benutzer über die Oberfläche möglich. Prinzipiell ist die Programmarchitektur, wie in Abbildung 3.12 dargestellt, aufgebaut.

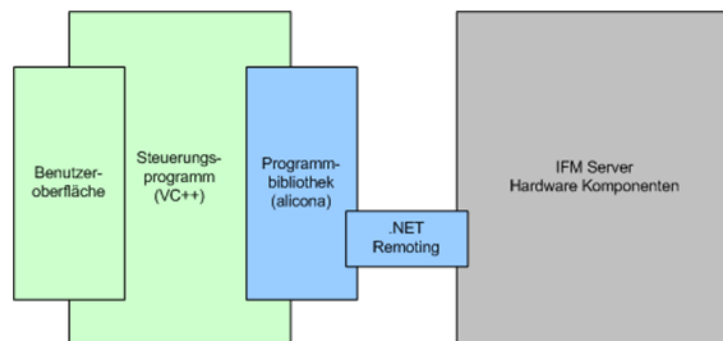


Abb. 3.12. Blockschaltbild der Programmarchitektur. (grün) für die vorliegende Arbeit programmierte Software (blau und grau) IFM Softwarebibliotheken und .NET Schnittstelle zum IFM Server. Diese Schichten sind die Basis für die "grünen" Programmschichten.

Zum Start der Benutzeroberfläche, beschrieben in Abschnitt 3.4, muss zuerst der IFM Server initialisiert werden. Danach ist der Zugriff der Steuerungssoftware auf die (alicona) Programmbibliothek möglich. Im Folgenden werden die notwendigen Softwaremodule kurz beschrieben - siehe auch WILTSCHKE (2006). Wesentliche Erweiterungen werden detaillierter erklärt und evaluiert. Die für den Betrieb der Hardware notwendigen Funktionen durch Softwaremodule waren:

- **Softwaremodul Rotationsmikrotom:** Dieses Modul beinhaltet Funktionen wie die Schnittausslösung über Elektronik, Auslösung des Not Stopps und zeitliche Ablaufsteuerung nach vorgegebenen Parametern.
- **Softwaremodul Lichtquelle:** Dieses Modul beinhaltet Funktionen wie das Einstellen der Lichtintensität, eine zeitliche Ablaufsteuerung und das Abschalten der Lichtquelle nach der Messung.
- **Softwaremodul Lineartische:** Dieses Modul beinhaltet Funktionen wie das Anfahren und Auslesen von relativen Koordinatenpositionen.

- **Softwaremodul Pneumatiksystem:** Dieses Modul beinhaltet Funktionen wie das Ein- und Ausschalten des Magnetventils und eine zeitliche Ablaufsteuerung nach vorgegebenen Parametern.
- **Softwaremodul Positionssensor:** Dieses Modul ist eine wesentliche Neuerung im Vergleich zum Forschungsprototyp. Es beinhaltet Funktionen wie das Einlesen von Positionswerten und kontinuierliche Messung am schneidenden Mikrotom.
- **Softwaremodul GUI Steuerungscomputer:** Das ist die zentrale Steuerung durch eine Benutzeroberfläche.

Weitere Softwaremodule im Messsystem μ STRUCSCOP, die für die Bildverarbeitung entwickelt bzw. adaptiert wurden und wesentliche Erweiterungen im Vergleich zum Forschungsprototypen darstellen sind:

- **Softwaremodul 1D und 2D Stitching:** Mit diesem Modul wird die online Bildverarbeitung zum Stitching verarbeitet. Weitere Details dazu sind im Abschnitt 3.5.1 zu finden.
- **Softwaremodul HW Aligning:** Mit diesem Modul werden Messdaten des Positionssensors mit dem automatischen Messablauf kombiniert. Damit ist es möglich während einer Messung Bildebenen aufeinander auszurichten (HW Aligning). Weitere Details dazu sind im Abschnitt 3.5.2 zu finden.
- **Softwaremodul Online HW und Online SW Aligning:** Mit diesem Modul wird Aligning durch Hardware (Positionssensor) und Software kombiniert. Weitere Details dazu sind im Abschnitt 3.5.3 zu finden.

3.5.1. Online 1D und 2D Stitching

Bisher wurden aufgenommene Einzelbilder erst nach jeder Messung zusammengesetzt. Diese Bilder waren vertikal angeordnet, also quasi 1 dimensional als Spalte oder Zeile, und ergaben ein Ebenenbild. Ein externes, lizenzpflichtiges Programm (Image Pro Plus - IPP) führte das Stitching durch. Außerdem ist der Forschungsprototyp nur darauf ausgelegt 1D Ebenenbilder bzw. deren Einzelbilder aufzunehmen - siehe Abbildung 3.13 (oben). Überschneidungen der Einzelbilder sind für die Bildverarbeitung notwendig.

Eine der Vorgaben für das FFG Projekt bzgl. Online Stitching in der vorliegenden Arbeit war die Integration einer online Variante dieser Bildbearbeitung. Damit werden die Kamerabilder einer Ebene noch während der Messung aufeinander ausgerichtet und als Ebenenbild gespeichert. Nach mehreren Programmvarianten der Projektpartner und einer externen Firma wurde die Softwarelösung der Firma Alicona adaptiert.

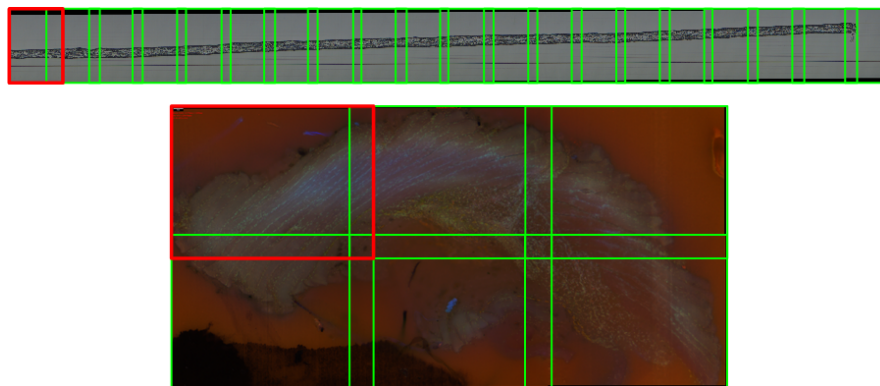


Abb. 3.13. Bildfelder bei 1D und 2D Stitching. Das rote Rechteck markiert ein Einzelbild. (oben) 1D Stitching einer 6mm langen Papierprobe (unten) 2D Stitching eines Mausnervs

Eine weitere Vorgabe für das FFG Projekt bzgl. Online Stitching in der vorliegenden Arbeit war die Realisierung eines großen Bildfeldes durch eine 2 dimensionale Bilder-matrix. Diese gewählte Lösung ermöglicht ebenfalls eine online Zusammensetzung von 2 dimensional Bildfeldern - siehe Abbildung 3.13 (unten).

3.5.2. Hardware Aligning mit Positionssensor

Die Aufgabe des taktilen Positionssensors ist die Messung der Längendifferenz, die zwischen zwei Mikrotomschnitten entsteht. Diese Differenz wurde bei Messungen mit dem Forschungsprototypen durch die nachfolgenden Bildverarbeitung (Aligning per SW) korrigiert. Eine Bildserie, die nach diesem Prinzip erstellt bzw. aligned wurde, ist in Abbildung 3.14 zu sehen.

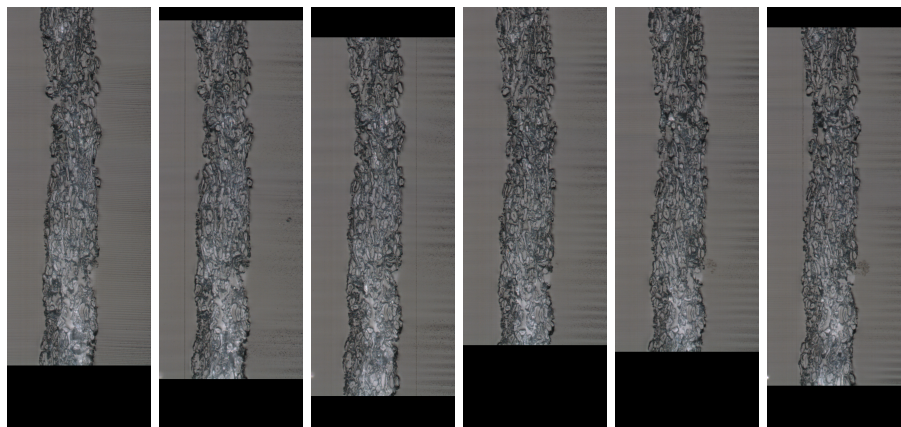


Abb. 3.14. Teil einer Bildserie mit Vergrößerung 50x, die mit SW Aligning aufeinander ausgerichtet wurden. Die schwarzen Ränder entstehen durch den Verlust von Bildinformation.

Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, sind große Bereiche schwarz, also ohne Bild-

information. Wird beispielsweise das erste Bild (außen links) als Referenz verwendet, sind die nachfolgenden Bilder entsprechend nach unten oder oben verschoben. Dieser Bildversatz entspricht dem Versatz des Mikrotomprobenhalters in der Endposition nach dem Schneiden. Bildinformation geht in diesem Fall durch den Bildversatz nach oben verloren. Der schwarze Bereich unten ist vorhanden, da in den restlichen Bildern dieser Messung auch Bilder vorkommen, die nur oben einen schwarzen Rand haben. Bei höheren Auflösungen ist dieser Versatz und der schwarze Rand größer, als bei kleinen Vergrößerungen. Typische Abweichungen des Mikrotoms wurden in Abbildung 3.5 im Abschnitt 3.3 dargestellt. Bei Längendifferenzen von beispielsweise $100\ \mu\text{m}$, sind die Versätze am Kamerabild bzw. im digitalisierten Bild von dem verwendeten Objektiv abhängig. Folgende Tabelle 3.2 zeigt die resultierende Verschiebung in Pixel des Kamerabildes bezogen auf die, in der vorliegenden Arbeit, verwendeten Objektive.

Vergrößerung	10x	20x	50x
Pixelgröße	$0,618\ \mu\text{m}$	$0,309\ \mu\text{m}$	$0,124\ \mu\text{m}$
Bildversatz	162 Px	324 Px	807 Px
Anteil Kamerabild	13%	26%	65%

Tabelle 3.2. Resultierender Bildversatz bei Mikrotomversatz von $100\ \mu\text{m}$ und verschiedenen Objektiven. Mit steigender Vergrößerung wird der Bildversatz größer.

Bei kleinen Bildfeldern und hohen Vergrößerungen sind die schwarzen Ränder störend bzw. erfordern in Konsequenz größere Bildfelder. Bei Bildserien mit sehr vielen Einzelbildern bzw. großen Bildfeldern und bei niedrigen Vergrößerungen wird dieser schwarze Rand weniger relevant sein. Abbildung 3.15 zeigt einen Teil einer Bildserie, bei der die Positionsdaten für das Aligning per SW verwendet worden war. Der schwarze Rand, also der Verlust von Bildinformation beim Schneiden deutlich geringer.

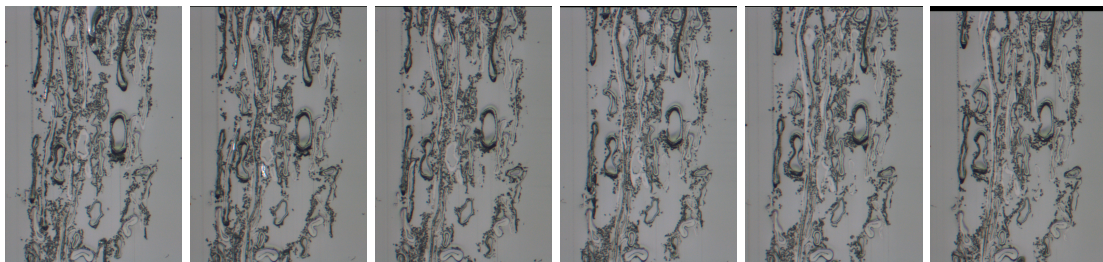


Abb. 3.15. Teil einer Bildserie mit Vergrößerung 50x die mit SW Aligning und den Positionssensorwerten (Korrektur des Achsenversatzes) verarbeitet wurden (HW Aligning Variante 1).

Ein weiterer Grund für die Verwendung der Positionsdaten (HW Aligning) ist die prinzipielle Funktion der Aligning Software in Bezug auf Zeitaufwand und Genauigkeit. Aligning Algorithmen vergleichen vorgegebene Bildbereiche zwischen den Bil-

dern und suchen nach Ähnlichkeiten. Je kleiner dieser Bereich ist, desto schneller ist die Bearbeitung. In Kombination mit dem Positionssensor, kann dieser Bereich deutlich verkleinert werden. So können Mikrotomabweichungen von über $100\ \mu\text{m}$ auf weniger als $5\ \mu\text{m}$ verringert werden. Ein kleinerer Suchbereich verringert auch die Fehlerwahrscheinlichkeit für die Ähnlichkeitsanalyse des Aligningalgorithmus.

Mit dem Sensor ist, wie oben beschrieben, eine Messung nach jedem Mikrotomschnitt während der 3D Bildaufnahme möglich. Diese Daten können prinzipiell nach zwei verschiedenen Methoden in die Bildverarbeitung integriert werden. In folgender Abbildung 3.16 sind diese beiden HW Aligning Varianten dargestellt.

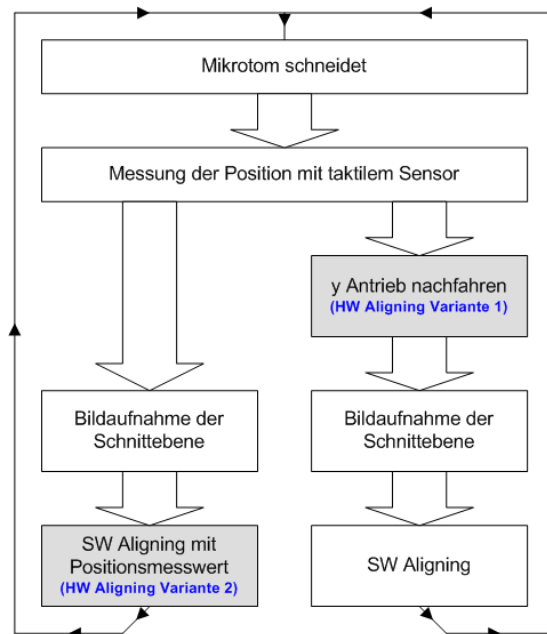


Abb. 3.16. Flussdiagramm der zwei prinzipiellen Varianten für das Aligning per HW. Der Unterschied ist der Zeitpunkt der Verarbeitung des Messwerts vom Positionssensor.

In der *HW Aligning Variante 1* werden die Positionsdaten vor der Bildaufnahme weiterverarbeitet. Da der vertikale Versatz durch den Positionssensor gemessen wird, kann dieser Versatz durch die Achsen nachgeregelt werden. Durch die Positioniergenauigkeit der y-Achse von etwa $2\ \mu\text{m}$ und der Messgenauigkeit des Messaufbaus mit dem Sensor sinkt der bleibende vertikale Versatz auf maximal etwa $5\ \mu\text{m}$. Die Bildaufnahme erfolgt also mit geringem Versatz zwischen den Ebenen und in Folge wird auch das SW Aligning weniger Bearbeitung benötigen. In der *HW Aligning Variante 2* werden die Positionsdaten erst nach der Bildaufnahme weiterverarbeitet. Der gemessene vertikale Versatz wird in Pixel umgerechnet und daraus ein Suchbereich für das SW Aligning berechnet. Die Bildaufnahme erfolgt dennoch mit dem größeren vertikalen Versatz durch das Mikrotom. Die Eingabe eines Zahlenwerts in die SW Aligning

Software und die Berechnung des Suchbereichs entfällt außerdem bei HW Aligning Variante 1. Aus diesen Gründen wurde die HW Aligning Variante 1 gewählt.

3.5.3. Online Hardware und Online Software Aligning

Mit der gewählten HW Aligning Variante 1 und dem SW Aligning ist nun eine geeignete Ablaufsteuerung für die Kombination aus HW und SW Aligning zu entwerfen. Da die HW Aligning Variante 1 gewählt wurde, kann das Softwaremodul für das SW Aligning unabhängig davon implementiert werden. Peter Kontschieder vom Institut für Bildverarbeitung (ICG) an der Technischen Universität Graz, ein FFG Projektpartner, hat ein command line Programm geschrieben, das 2 Ebenenbilder einliest, aufeinander ausrichtet und das positionskorrigierte Ebenenbild wieder ausgibt. Dabei sind u.a. Daten bzw. Parameter, wie die Ebenenbilder und Teilbilder davon, sowie die Eingabe eines Suchmodus (schnell oder robust) notwendig.

Dieses Softwaremodul wurde in der vorliegenden Arbeit in eine Ablaufsteuerung integriert, um eine beliebige Anzahl von Ebenenbildern online aufeinander auszurichten. Dafür wurden zwei prinzipielle Methoden evaluiert - siehe Abbildung 3.17. In der Abbildung (links) wird eine Ebene als Referenzebene festgelegt. Alle weiteren Ebenenbilder werden mit dieser Referenzebene verglichen und darauf ausgerichtet. Das Diagramm in der Abbildung (rechts) zeigt die zweite Variante. Dabei wird immer die Ebene vor der aktuell zu bearbeiteten Ebenen als Referenzebene festgelegt. Ist die aktuelle Ebene auf diese Referenzebene ausgerichtet, wird diese zur Referenzebene für die nächste Ebenen usw.

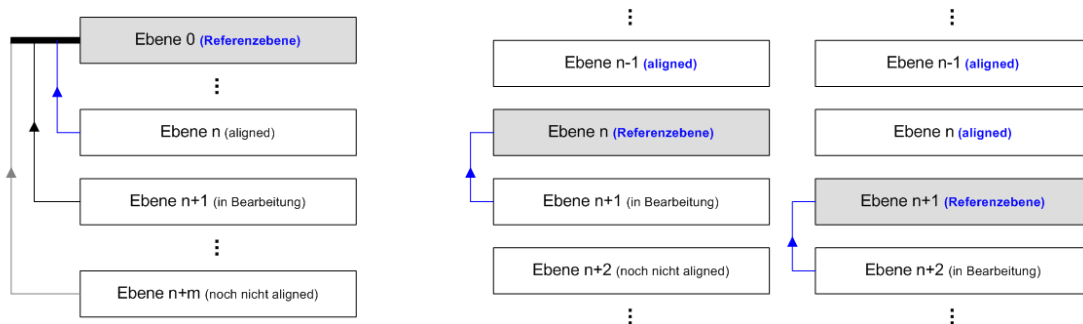


Abb. 3.17. Zwei prinzipielle Methoden für das Aligning der Bildebenen zueinander. (links) Methode mit einer festen Referenzebene für alle folgenden Ebenen (rechts) Methode mit einer fließenden Referenzebene für die nächsthöhere Ebene.

Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Die Ausrichtung von Bildern aufeinander wurde mithilfe von Bohrlöchern (siehe auch WENINGER ET AL. (1998)) evaluiert. Abbildung 3.18 zeigt den virtuell rekonstruierten Längsschnitt einer Bohrung. Die Methode mit einer festen Referenzebene garantiert geringe Folgefehler (i.V. zur zweiten Methode), also eine gerade Ausrichtung der Folgeebenen auf die Referenzebene. Dieser Folgefehler entsteht durch die Summierung von minimalen Versätzen zwischen zwei

Ebenen, die auch nach dem SW Aligning vorhanden sind. Sind diese Abweichungen über einige zig Ebenen gleichgerichtet entsteht bei der Methode mit der fließenden Referenzebene eine sichtbare Verzerrung des Bohrlochs - siehe Abbildung 3.18. Während der nur mit HW Aligning korrigierte Bildstapel ein Bohrloch rekonstruiert,

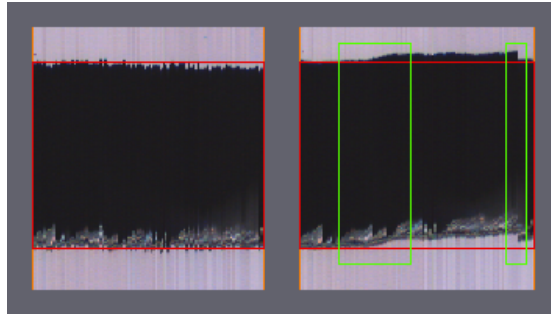


Abb. 3.18. Evaluierung von HW und SW Aligning anhand eines Bohrlochs. Dargestellt ist die yz Ansicht. Die roten Linien markieren einen idealen Zylinder. (links) 3D Bildstapel nach HW Aligning (rechts) 3D Bildstapel nach HW und SW Aligning. Am unteren Rand des Bohrlochs sind Schneidereste zu sehen, die eine Bewertung nur am oberen Rand der Bohrung ermöglichen. Die grünen Zylinder zeigen Fehlerstellen beim Aligning.

dessen Einzelebenen entlang des idealen (gebohrten) Zylinders variieren (siehe rotes Rechteck in Abbildung 3.18), ist im HW und SW Aligning rekonstruierten Bildstapel eine Stelle deutlich zu erkennen, in der sich die Folgefehler nach oben fortpflanzen (siehe grünes Rechteck in Abbildung 3.18). Die Folge ist, ein in einem Video nicht unmittelbar erkennbarer, Drift in der Papierstruktur an dieser Stelle. (Im Gegensatz zu einem sprunghaften Fehler im Aligning, wie es im zweiten grünen Rechteck zu sehen ist.) Wie häufig diese Folgefehler gleichgerichtet auftreten, wurde aus Zeitgründen nicht evaluiert. Prinzipiell ist auch eine Nachbearbeitung mit einem kommerziellen Bildverarbeitungsprogramm möglich, das die fehlerhaft ausgerichteten Bildebenen korrigiert.

Der entscheidende Vorteil der Methode mit fließender Referenzebene ist die quasi unbegrenzte Anzahl der Ebenen die aligned werden können. Bei der ersten Methode ist, je nach Probe und vorhandene Bildstruktur, nach spätestens 20 Ebenen zuwenig Information vorhanden, um die Ebenen sinnvoll vergleichen zu können. Das heißt, dass die Aligning Software keine ähnlichen Strukturen mehr erkennen kann, um den Bildversatz korrekt zu berechnen.

Gewählt wurde aus diesen Gründen die Methode mit der fließenden Referenzebene. Wie sich bei der oben beschriebenen Evaluierung zeigte, siehe auch Abbildung 3.19, ist wahrscheinlich eine Kombination dieser beiden Methoden aus Abbildung 3.17 optimal (z.B. eine Referenzebene die alle 10 Ebenen neu definiert wird).

In den 3D Ansichten eines Bohrlochs in Abbildung 3.19 zeigt sich der Nutzen der Kombination aus HW und SW Aligning. Während in dem nur mit HW Aligning be-

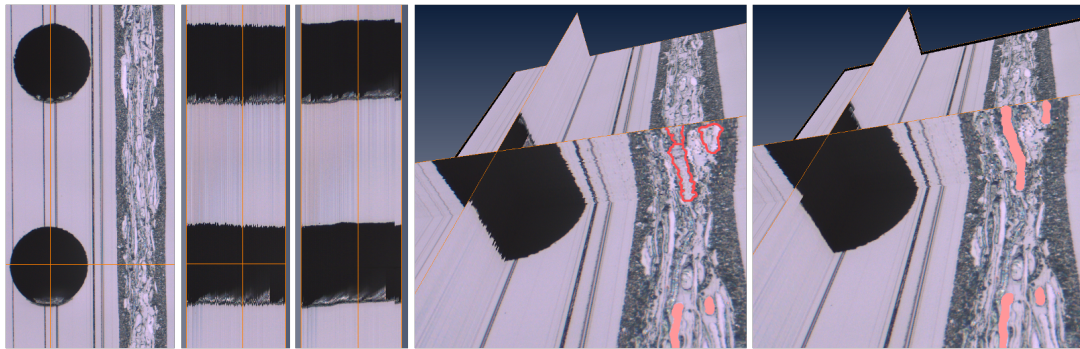


Abb. 3.19. Evaluierung von HW und SW Aligning anhand von Bohrlöchern. (links außen) Ebenenbild von Papier eingebettet in Harz mit zwei Bohrlöchern mit Durchmesser $120\ \mu\text{m}$. (links mittig) Virtuelles Bild in yz Ansicht nach dem HW Aligning. (Mitte) Virtuelles Bild in yz Ansicht nach dem HW und SW Aligning. (rechts mittig) Virtuelle Segmentierungsschnitte nach dem HW Aligning. (rechts) Virtuelle Segmentierungsschnitte nach dem HW und SW Aligning.

arbeiteten Bildstapel (linke 3D Ansicht) die Fasern der virtuellen Schnittebene nicht eindeutig erkennbar sind (rote Randmarkierungen), sind dieselben Fasern, in dem mit HW und SW Aligning bearbeiteten Bildstapel (rechte 3D Ansicht), eindeutig erkennbar (eingefärbte Fasern). An den virtuellen 3D Bohrlöchern ist außerdem zu erkennen, dass nur in vertikale (y) Richtung aligned wurde. Der horizontale Versatz der Bildebenen ist, bedingt durch die Genauigkeit der Achsen, garantiert kleiner gleich $2\ \mu\text{m}$.

3.6. Künftige Entwicklungen

Während der Projektlaufzeit der vorliegenden Arbeit haben sich Anwendungen für die Steuerungssoftware ergeben, die eine sinnvolle Erweiterung zum Messsystem darstellen. Diese sind für den Einsatz zur Analyse von Papier und medizinischen Anwendungen vorgesehen, da sie auch während den Messungen solcher Proben entstanden sind. Diese Erweiterungen sind:

- **Asynchrone Bildaufnahme in 3D Messungen:** Wird die Bildaufnahme durch die Kamera und den Achsen von der online Bildverarbeitung entkoppelt, ist die eigentliche Messung schneller fertig. Damit kann auch die Beleuchtung abgeschaltet werden (teure UV Brenner), was ebenfalls die Bestrahlung der Probe verringert. Parallel dazu, aber unabhängig von der aktuellen Ebene, wird die online Bildverarbeitung beenden.
- **Parameterset für die Bildaufnahme der Schnittebenen in 3D Messungen:** Damit können von derselben Probe, an den selben Stellen verschiedene Filterwürfel

und Belichtungszeiten bzw. Kameraeinstellungen in einer Messung verwendet werden.

- **Mehrere Bildfelder je Schnittebene in 3D Messungen:** Die Steuerungssoftware kann insofern erweitert werden, dass mehrere Bildfeld je Schnittebene digitalisiert wird. Damit sind größere Bereiche innerhalb einer Messung erfassbar.
- **RGB Farbkanaltrennung im Liveview:** Hier wird die spektrale Kamerasensitivität für die Verwendung von verschiedenen Fluorophoren und verschiedenen Kameraeinstellungen genutzt.

3.7. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde der vorindustrielle Prototyp der Messmethode μ STRUCSCOP erläutert. Die neue Generation des Messsystems bzw. der Messmethode beinhaltet neue Hardware- und Software-Komponenten, sowie weitere Anwendungsgebiete in der Papiertechnik durch die integrierte Fluoreszenzmikroskopie.

Insbesondere wurden die notwendigen optischen Komponenten für den Fluoreszenzbetrieb recherchiert und in das Messsystem eingebaut. Diese sind Lichtquelle, Filterwürfel, Objektive und Kamera. Bei Fluoreszenzanwendungen sind eine Vielzahl von Filtersystemen vorhanden, die fast ausschließlich auf die verwendeten Fluorophore abgestimmt sind.

Ein höherer Automatisierungsgrades des Messablaufs wurde durch spezielle Software Module und die angepasste Benutzeroberfläche erreicht. Die online Bildverarbeitungskomponenten 1D/2D Stitching sowie HW/SW Aligning wurden vorgestellt und kurz evaluiert. Es wurde eine Kombination aus Hardware basierendem Aligning (Messdaten mit Positionssensor) und SW basierendem Aligning ausgewählt, die für große Messserien geeignet ist (fließende Referenzebene). Ein Nachteil dieser Methode ist ein möglicher Folgefehler bei der Ausrichtung der Bildebenen. Dieser wurde aber aus Zeitgründen nicht genauer behandelt. Zur Korrektur wurde eine Kombination aus den vorgestellten Methoden erklärt. Durch den modularen Aufbau des Messsystems sind weitere Entwicklungen einfach integrierbar.

Methoden der Fluoreszenzmessungen und Ergebnisse

4.1. Einleitung

In diesem Kapitel werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden zur Messung von Papierstrukturen mittels Fluoreszenz beschrieben und deren Ergebnisse diskutiert.

Es ist eine sehr großen Anzahl von Fluoreszenzmethoden, vor allem in der medizinischen Analyse, in der Literatur zu finden. Neben Methoden, die die primäre Fluoreszenz nutzen, sind ebenfalls Techniken in Verwendung die die Zielstrukturen färben. Da allerdings nur wenige Methoden für die 3D Strukturanalyse von Papier vorhanden sind (siehe Abschnitt 2.3), wurden in der vorliegenden Arbeit drei prinzipielle Ansätze für die Färbung von Papierstrukturen erarbeitet. Diese basieren auf den im Standardwerk von MULISCH UND WELSCH (2010) vorgeschlagenen Färbetheorien. Das ist die physikalische, die physio-chemische und die chemische Färbung mit Chromophoren und, mit deren fluoreszierender Untergruppe, den Fluorophoren. Es wurden Färbemittel aus diesen drei Kategorien für die Papiertechnik angewendet, um Ansätze für deren Adaption mit der μ STRUCSCOP Methode bewerten zu können. Es hat sich gezeigt, dass durch Färbung der Papierproben Artefakte in der Messung auftreten können. Weiters sind Systemparameter für die Messung sorgfältig auszuwählen, um eine fehlerfreie Digitalisierung der Fluoreszenzbilder zu gewährleisten. Zur objektiven Evaluierung der digitalisierten Fluoreszenzbilder wird eine qualitative und quantitative Bewertung skizziert.

4.2. Ablauf der μ STRUCSCOP Methode

Die Verwendung von Fluoreszenzmethoden zur Messung und Analyse von Proben findet, wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, ihre Hauptanwendung in der medizinischen Analyse. Einige Techniken konnten für die Papiertechnik adaptiert werden und werden in diesem Kapitel vorgestellt. In den folgenden Abschnitten ist ein zweckmäßiger Ablauf für die Arbeit mit Fluoreszenzfärbungen für die vorliegende Arbeit mit der μ STRUCSCOP Methode beschrieben. Dieser Ablauf beinhaltet:

- Herstellung von Laborpapier,
- Strategie für die Auswahl von Fluorophoren,
- Laborarbeiten für die Vorbereitung zur Messung und Justierung der Messparameter,
- Qualitative und quantitative Bewertung der Messergebnisse, und
- Behandlung der Artefakte in den einzelnen Arbeitsschritten.

4.2.1. Herstellung von Laborpapier

Bei der Entwicklung der Fluoreszenzmethoden sollte genau bekannt sein, welche Rohmaterialien in den getesteten Papierproben vorkommen. Die Schwerpunkte für die Adaption von Fluoreszenztechniken sind in der Messung der 3D Struktur der Fasern und in der Verteilung der Füllstoffe zu finden. Aufgrund der unterschiedlichen Fasereigenschaften wurde gebleichter Eukalyptus - Sulfatzellstoff und ungebleichter, fraktionierter TMP Faserstoff als Basis verwendet.

Der Eukalyptuszellstoff wurde mit 2000 Umdrehungen in der PFI-Mühle gemahlen, um eine bessere Retention des Füllstoffs zu gewährleisten. Hergestellt wurden:

- Standardlaborblätter ($80\text{g}/\text{m}^2$) aus Eukalyptus - Sulfatzellstoff (2,4g), und
- Standardlaborblätter ($80\text{g}/\text{m}^2$) aus Eukalyptus - Sulfatzellstoff (ca. 1,68g) mit 30% Füllstoff CaCO_3 (0,72g) und Retentionsmittel Percol (ca. 1mg).

Der TMP Faserstoff wurde vor der Blattbildung im Bauer McNett Fraktionator mit den Sieben Nr. 30, 50, 100 und 200 fraktioniert. Für die Blattbildung wurde der Rückstand der Siebe 30 und 50 verwendet. Hergestellt wurden:

- Standardlaborblätter ($80\text{g}/\text{m}^2$) aus TMP Faserstoff (2,4g), und
- Standardlaborblätter ($80\text{g}/\text{m}^2$) aus TMP Faserstoff (1,68g) mit 30% Füllstoff CaCO_3 (ca. 0,72g) und Retentionsmittel Percol (ca. 1mg).

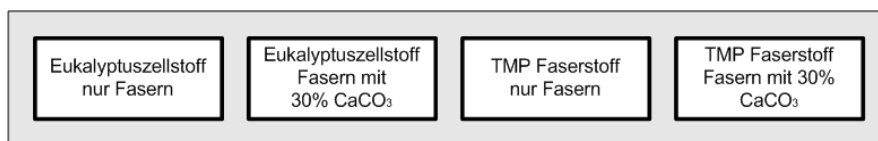


Abb. 4.1. Hergestellte, ungefärbte Laborpapiersorten

Die oben aufgezählten Sorten Papier sind in kurzer Schreibweise in Abbildung 4.1 dargestellt.

Von diesen Blättern wurden Proben für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Messungen der primären Fluoreszenz, siehe Abschnitt 4.3, und für ungefärbte Referenzproben bei den sekundären Fluoreszenzmessungen verwendet. Diese waren die Harzfärbung, siehe Abschnitt 4.4.1, und die Papierfärbung, siehe Abschnitt 4.4.4. In der Massefärbung, siehe Abschnitt 4.4.2, wurden Laborblätter aus denselben Faserstoffen hergestellt, die Färbung erfolgte aber vor der Blattbildung.

4.2.2. Strategie für die Auswahl von Fluorophoren und Färbemethoden

Werden Papierstrukturen gemessen, die keine primäre Fluoreszenz (Autofluoreszenz) aufweisen, müssen diese zuerst gefärbt werden. Die in diesem Abschnitt erläuterten Punkte sind also für die sekundäre Fluoreszenz relevant.

Papier oder Papierbestandteile sollen mit Fluorophoren gefärbt werden, um interessante Strukturen mit dem Mikroskop besser visualisieren zu können. Da Papier aus einer Vielzahl von Einzelteilen besteht und zu der Zeit, in der die vorliegende Arbeit verfasst wurde, keine speziellen Fluorophore für die Papieranalyse existieren, ist eine Strategie für die Auswahl passender Fluorophore und deren Parameter notwendig. In folgender Abbildung ist eine Graphik dargestellt, die aus VALEUR (2001) entnommen und für die papiertechnische Analyse adaptiert wurde.

Dieses Diagramm ist eigentlich auf spezielle Fluorophore, wie z.B. das in der vorliegenden Arbeit verwendete ionenselektive Fluorophor *Calcium Green*, anzuwenden. Startpunkt für die Auswahl ist der *Parameter X* in Abbildung 4.2. Dieser Parameter ist z.B. die Konzentration von Calciumionen. Da eine Vielzahl solcher Kalziumionensensitiver Fluorophore erhältlich ist, kann das Diagramm sukzessive durchlaufen werden, bis ein, für diese Anwendung bzw. diesen Parameter optimales Fluorophor gefunden ist. Weitere relevante Punkte für eine Auswahl sind eine ungewollte Sensitivität zu anderen Parametern, Störungen durch Umgebungseinflüsse (perturbation), Genauigkeit der Lokalisierung, Photostabilität und Lebensdauer. Primärer Faktor für die Auswahl ist die chemische Struktur des Fluorophores. Diese gibt die spektralen Eigenschaften (λ_{abs} , λ_{em} und $\Delta\bar{\nu}$) und somit die Detektierbarkeit durch das Mikroskop vor. Die Quantenausbeute ist für die Dosierung bei der Färbung wichtig. Wie bereits erwähnt, hat die Lebensdauer der Fluoreszenz (die mittlere Verweildauer der

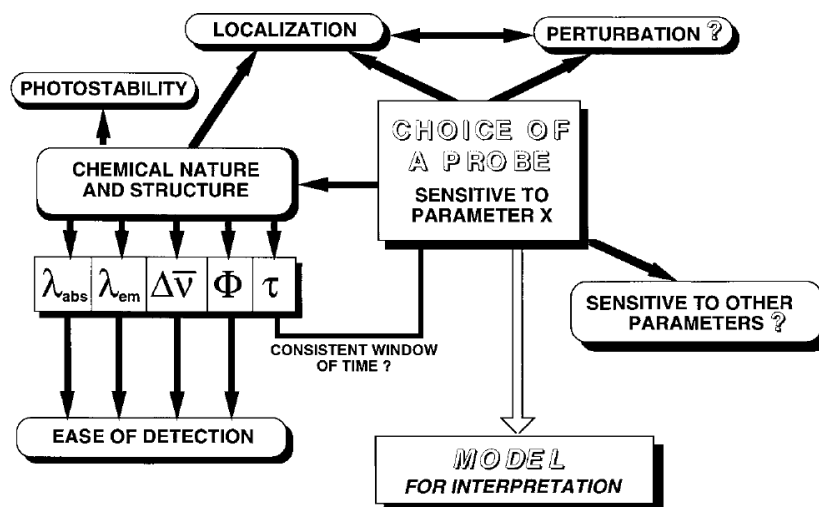


Abb. 4.2. Methode zur Auswahl eines Fluorophores. (λ_{abs}) Maximum des Absorptionsspektrums, (λ_{em}) Maximum des Emissionsspektrums, ($\Delta\bar{\nu}$) Stokescher Shift, (Φ) Quantenausbeute, (τ) Lebensdauer. VALEUR (2001)

angeregten Elektronen im höheren Energiezustand) in der vorliegenden Arbeit keine Relevanz, da die Beleuchtung kontinuierlich ist.

Bei weniger spezialisierten Anwendungen kann der Auswahlvorgang in der Abbildung 4.2 vereinfacht verwendet werden. Beispielsweise wurde das Färbemittel *Macrolex Fluoreszenzgelb 10G* für eine unspezifische Färbung des Einbettmittels ausgewählt. Die primären Faktoren für die Wahl waren die spektralen Eigenschaften, die durch das Fluoreszenzmikroskop (Filterwürfel) vorgegeben sind.

Adaption von Färbemethoden für die Messung der sekundären Fluoreszenz

Wie bereits im allgemeinen Teil der Literaturrecherche in Abschnitt 2.3.5 erwähnt, werden Fluoreszenzfärbungen mit Fluorophoren durch drei Färbetheorien aus dem Standardwerk von MULISCH UND WELSCH (2010) erklärt. Diese sind den Färbetheorien für Papierfärbungen mit nicht-fluoreszierenden Chromophoren sehr ähnlich (siehe CORNELLY (1951)).

Für die vorliegende Arbeit musste aus einer sehr großen Anzahl von kommerziell verfügbaren Fluorophoren repräsentativ eine kleine Anzahl ausgewählt werden, um diese mit der μ STRUCSCOP Messmethoden evaluieren zu können. Bei der Auswahl wurde darauf Wert gelegt möglichst viele prinzipiell unterschiedliche Ansätze zu evaluieren. D.h. in der vorliegenden Arbeit wurde nicht eine Fluoreszenzmethode zu einer Standardmethode entwickelt, sondern ein Überblick über die Möglichkeiten der Adaption von üblichen Fluoreszenzfärbungen für die Papiertechnik.

Daher sind Färbemittel nach folgenden Kriterien, basierend auf den drei folgenden Färbetheorien zusammengestellt worden:

- 1) Physikalische Färbung:** Hierfür wurden Fluorophore gewählt, die aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaft, der Größe des Moleküls, verwendet werden. Zum Einen ist das *Fluoresbrite FY 100nm*¹, das sind Polystyrene Kugeln mit einem Durchmesser von 100nm, in denen ein Fluorophor eingeschlossen ist. Zum Anderen wurde ein, mit *Fluorescein* markiertes Dextran von Molecular Probes² verwendet. Mit diesen Fluorophoren soll nur der Raum zwischen den Fasern (Einbettmittel), nicht aber die Fasern, gefärbt werden. Dadurch soll die 3D Struktur des Fasernetzwerks visualisiert werden. Für die unspezifische Harzfärbungen wurden Fluorophore verwendet die nur einige Nanometer groß sind.
- 2) Physio-chemische Färbung:** Diesem Bereich werden Färbungen mit beispielsweise optischen Aufhellern (wie der gewählte Aufheller *Tinopal UP*³), deren Färbemechanismen auf verschiedenen Prinzipien beruhen (z.B. Coulomb'sche Kräfte, Hydrophobe Wechselwirkungen, u.a.) zugeordnet. Ein weiteres Fluorophor, das zu dieser Färbung gehört, ist Rhodamine 123, welches kationische geladen ist und durch elektrostatische Bindungskräfte an die Fasern bindet. Mit diesen Fluorophoren sollen gezielt die Fasern der Papierprobe gefärbt werden um die 3D Struktur des Fasernetzwerks zu visualisieren.
- 3) Chemische Färbung:** Bei der chemischen Färbung reagieren die Fluorophore mit den zu färbenden Elementen in der Probe. Erst dadurch entstehen Moleküle, die fluoreszieren können. Ein Beispiel aus der medizinischen Analyse ist das nicht fluoreszierende *Fluorescein Diacetate*, das erst nach der Esterase in einer lebenden Zelle, zu fluoreszierendem *Fluorescein* wird. Diese Färbungen ermöglichen eine sehr genaue Lokalisierung der zu färbenden Zielstruktur, sind aber sehr aufwendig und erfordern die chemische Reaktionsfähigkeit der Zielstruktur. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu die indirekten Färbung vom Füllstoff CaCO_3 mit dem ionenselektiven Fluorophor *Calcium Green 1*⁴ evaluiert. Mit diesem Fluorophor soll die 3D Füllstoffverteilung visualisiert werden.

Nach Auswahl der prinzipiellen Methoden der Färbung aus den Theorien, wurden die praktischen Aspekte der Laborarbeit zur Papieranalyse bewertet. Es waren geeignete Stellen im Ablauf der Papierherstellung zu finden um die oben genannten Färbetheorien einzusetzen. Im Folgenden ist eine Aufstellung von drei Färbemethoden für die gezielte Fluoreszenzfärbung von Papier zur Ermittlung der 3D Struktur angegeben. Diese sind dem Ablauf der Laborarbeit bei der Vorbereitung von Papierproben für die Mikrotomie, sowie dem Ablauf der Papierherstellung angepasst.

¹Polysciences, Inc. www.polysciences.com

²Molecular Probes - Invitrogen detection technologies www.invitrogen.com

³BASF - The Chemical Company www.basf.com

⁴Molecular Probes - Invitrogen detection technologies www.invitrogen.com

1) Harzfärbung: Hierbei erfolgt die Färbung der flüssigen Infiltrationslösung des Einbettmittels vor dem Polymerisieren. Diese Färbung ist unspezifisch, also nicht auf eine Zielstruktur des Papiers ausgerichtet. Diese wird z.B. bei medizinischen Proben (im Fall von Eosin in der Arbeit von WENINGER ET AL. (2006)) u.a. für eine Kontrastierung mit einem gefärbten Embryo verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Fluorophore und nicht-fluoreszierende Chromophore für diese Art der Färbung getestet.

2) Massefärbung: Diese Färbung ist üblich in der Papierherstellung, da die Faserstoffsuspension in der Nasspartie gefärbt wird. In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls die Faserstoffsuspension bei der Papierherstellung im Labor gefärbt (daher die Bezeichnung Massefärbung). Ein Vorteil ist, dass der Suspension bereits separat gefärbte Papierrohmaterialien beigemischt werden können. Ein Nachteil ist die große Menge an Rohmaterial, die gefärbt werden muss. Eine spezielle Variante der Massefärbung wurde bei der Analyse von Einzelfaserbindungen in der Arbeit von THOMSON (2007) angewendet. Dieser hat zwei unterschiedlich gefärbte Fasergruppen hergestellt und im kleinen Maßstab Bindungen hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde Laborpapier aus Suspensionen hergestellt, die zuvor mit einem Fluorophor gefärbt wurden.

3) Papierfärbung: Diese Färbung ist die Methode der Wahl, da unabhängig von der Papierherstellung, also das fertige Papier gefärbt wird. Nachteil bei dieser Färbung ist, dass alle Papierrohmaterialien bereits in der zu färbenden Papierprobe vorhanden sind, d.h. die Färbung nur eines Rohmaterials muss sehr spezifisch ablaufen, um keine anderen Materialien mitzufärben. Daher sind für diese Verfahren speziellere Fluorophore und/oder Arbeitsschritte notwendig. Basierend auf den oben genannten Färbetheorien, wurden in der vorliegenden Arbeit einige wenige, da sehr teure, Fluorophore getestet.

Bei der Färbung mit Fluorophoren sind **Angaben zur Dosierung** notwendig. Da in der vorliegenden Arbeit z.B. Zellstoff in einer Suspension oder die Fasern in einer fertigen Papierprobe gefärbt wurden, ist in folgender Liste die verwendete Terminologie angegeben:

- **% Gew. Harz:** Fluorophorgewicht (wie vom Hersteller geliefert) in % des Gewichts des unpolymerisierten Harzes,
- **% Gew. HW** oder **% Gew. HW atro:** Fluorophorgewicht (wie vom Hersteller geliefert, HW) in % des Gewichts des absolut-trockenen Zellstoffs,
- **% Vol. Susp.:** Volumen des (flüssigen) Fluorophors in % des Volumens der Faserstoffsuspension, und

- **% Gew. Susp.:** Fluorophorgewicht (wie vom Hersteller geliefert) in % des Gewichts der Faserstoffsuspension.

4.2.3. Laborarbeiten für die Vorbereitung zur Messung und Justierung der Messparameter

Nach der Färbung müssen die Proben für die Messung mit dem μ STRUCSCOP Messsystem vorbereitet werden. Üblicherweise wurden die Proben mit dem Mehrkomponenteneinbettmittel *Technovit 7100*⁵ eingebettet. In wenigen Ausnahmefällen, wenn Referenzmessungen notwendig waren, wurde auch mit dem Mehrkomponenteneinbettmittel *JB4*⁶ gearbeitet.

Vor dem Einbetten der Papierproben, wurden die Proben in einer Vakuumm Glocke mit einer Infiltrationslösung infiltriert. Üblicherweise wird an dieser Stelle die reine Infiltrationslösung verwendet. Für den Fall einer Harzkontrastierung, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, wird an bereits dieser Stelle das jeweilige Fluorophor der Lösung beigemischt.

Schließlich werden die Papierproben in Gelatine kapsel eingebettet. Auch wird abhängig davon ob eine Harzkontrastierung verwendet wird oder nicht, die reine oder gefärbte Infiltrationslösung mit dem Härter vermischt. Nach der Polymerisation wurden die Proben für die Mikrotomklinge zugefeilt und grob mit einer Glasklinge vorgeschnitten. Die Schnitte für die Messung erfolgten in der Regel mit einem Diamantmesser. Bei medizinische Proben wurde ein Stahlmesser verwendet.

Abhängig vom verwendeten Fluorophor, müssen das Filtersystem und die Lichtquelle des Fluoreszenzmikroskops (μ STRUCSCOP Gen.2) justiert werden (siehe Kapitel 3). Die Dimensionen der Papierprobe und die geforderte Detailgenauigkeit geben die Objektivauswahl vor. Feinjustierungen werden letztlich in der Benutzeroberfläche durchgeführt. Dazu gehören vor allem die Kameraparameter (Belichtungszeit, Gamma und Sättigung) und die Auswahl einer Region, die für das Aligning verwendet wird.

4.2.4. Qualitative und Quantitative Bewertung von Fluoreszenzbildern

Jede Fluoreszenzfärbung hat das Ziel, den Bildkontrast von gefärbten Regionen oder Strukturen zu erhöhen - siehe Kapitel 2. Nach Färbung der Proben und Messung mit dem μ STRUCSCOP Messsystem, sind Fluoreszenzbilder vorhanden, die bewertet werden können. Wieder sind dafür, Methoden aus der medizinischen Analyse vorhanden, die in vereinfachter Form, für die Papiertechnik adaptiert wurden. BOLTE UND CORDELIÈRES (2006) und MULISCH UND WELSCH (2010) erklären die häufig eingesetzte Methode zur Kolo kalisierung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfärbungen.

⁵Heraeus Kulzer GmbH www.Kulzer-Technik.de

⁶Polysciences Europe GmbH <http://www.polysciences.com>

Durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzbilder, wird eine qualitative Analyse, durch einen pixel-basierenden automatisierten Vergleich der Bilder, wird eine quantitative Analyse ermöglicht.

Prinzipiell wird das optimale, also manuell segmentierte Binärbild einer Schnittebene (Querschnittsaufnahme) der Papierprobe, als Referenz definiert und mit dem Fluoreszenzbild derselben Probe verglichen. Da hierbei binäre Bilder verwendet werden, entfällt der in der Literatur beschriebene Fluoreszenzintensitätsvergleich.

Die Querschnittsaufnahme kann z.B. ein Bild sein, in dem nur die Fasern zu sehen sind bzw. nur die Fasern durch die Färbung zu sehen sein sollten. Nach der Schwellwertbildung des Fluoreszenzbildes kann das manuell segmentierte Binärbild mit dem binären Schwellwertbild aus der Fluoreszenzmessung verglichen werden - siehe Abbildung 4.3. Die Bilder zeigen gefärbtes Standardlaborpapier ($80\text{g}/\text{m}^2$), das nur aus Eukalyptusfasern besteht. Die Fasern wurden mit 2000 Umdrehungen in einer PFI-Mühle gemahlen. Die nach der Blattbildung entnommene Papierprobe wurde vor dem Einbetten in Kunstharz durch die *Papierfärbung* mit dem optischen Aufheller *Tinopal UP* von BASF⁷ behandelt. Weitere Details sind in Abschnitt 4.4.4 zu finden.

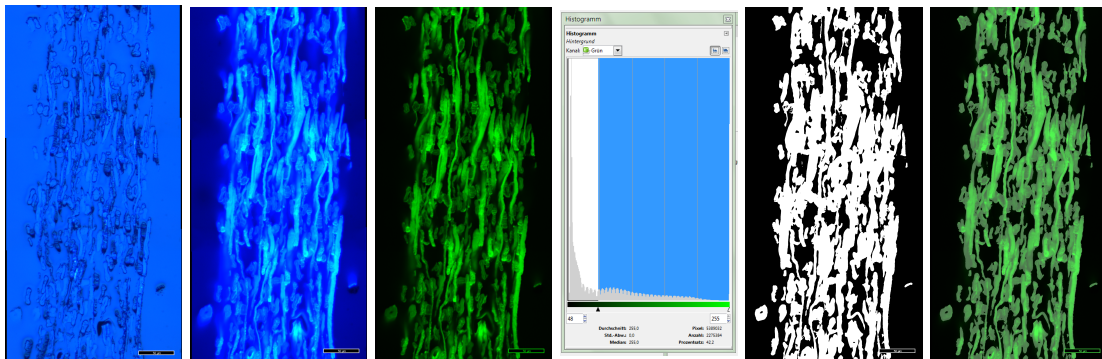


Abb. 4.3. Schwellwertfindung einer Papierfärbung mit dem OBA Tinopal UP. (von links) BF Bild, Fluoreszenzbild, Grünkanalbild des Fluoreszenzbildes, Schwellwert im Histogramm, Schwellwertbild des Grünkanalfluoreszenzbildes, und eine Überlagerung des Schwellwertbildes mit dem Grünkanalfluoreszenzbild.

Das Bild links außen ist das Bild der Papierprobe im Normallichtbetrieb (Filterwürfel BF) des Mikroskops. Rechts davon ist das Fluoreszenzbild (Färbung mit OBA und Verwendung Filterwürfel A) derselben Stelle zu sehen, wenn diese mit der Lichtquelle EL6000 (UV und VIS) angeregt wird. Wird dieses Bild in die RGB Kanäle geteilt, zeigt sich, dass die Reduzierung des Fluoreszenzbildes auf den Grünkanal einen deutlichen Gewinn an Bildqualität mit sich bringt. Bei einer deutlich geringeren Belichtungszeit oder Beleuchtungsstärke ist das Blaukanalbild gleich dem RGB Bild (also keine messbaren Signale im Grün- und Rotkanal vorhanden). Dieses Bild ist mit dem Auge fast nicht zu erkennen, kann aber ebenfalls zur Schwellwertbildung verwendet werden,

⁷BASF The Chemical Company, Österreich www.basf.at

da es in ähnlicher Qualität vorliegt - siehe Kapitel 2 spektrale Kamerasensitivität. In dieser Erklärung zur quantitativen und qualitativen Qualitätsanalyse ist die (hier abgebildete) Bildserie mit höherer Belichtungszeit gewählt worden.

Im nächsten Schritt erfolgt eine Schwellwertbildung, um ein binäres Bild zu erhalten. Das 4. Bild von links in Abbildung 4.3 zeigt das Histogramm des Grünkanalbildes. Ein optimaler Schwellwert wurde durch Probieren (siehe Überlagerung Bild ganz rechts) gefunden und war letztlich links von einem lokalen Maximum, in einem lokalen Minimum, festgelegt worden. Das Resultat ist das zweite Bild von rechts. Die Festlegung des Schwellwertes mit Hilfe des Histogramms wurde schon von CHINGA (2002) bei Messungen mit einem REM durchgeführt und lieferte sehr schmale Histogrammaxima (Häufigkeit) des Hintergrunds und der Fasern. In dieser Arbeit konnten Strich, Fasern und Hintergrund durch Schwellwertbereiche für die Segmentierung festgelegt werden. Auch in der Arbeit von AXELSSON (2009) sind Histogramme bei Messungen mit vorwiegend μ CT und Synchrotronen verwendet worden. Hier zeigt sich eine deutliche Trennbarkeit von Fasern und Hintergrund durch lokale Maxima und Minima im Histogramm nur bei den Synchrotongeräten.

Im Bild rechts der Abbildung 4.3 ist die Überlagerung des Grünkanalfluoreszenzbildes mit dem Schwellwertbild dargestellt. Die qualitative Beurteilung zeigt, dass nicht alle Fasern detektiert werden, bzw. auch Stellen im Bild fluoreszieren, an denen keine Fasern vorkommen. Daher werden folgende Vergleichszustände, basierend auf einen Algorithmus zum Vergleich von Realität und Modell (siehe Arbeit von FEIER (2012)), definiert:

- 1) **FRE** Die Faser wurde richtig erkannt, d.h. das Referenzbild und das Fluoreszenzbild zeigen eine Faser an der verglichenen Stelle.
- 2) **FFE** Die Faser wurde falsch erkannt, d.h. das Referenzbild hat an dieser Stelle keine Faser, das Fluoreszenzbild aber schon.
- 3) **FNE** Die Faser wurde nicht erkannt, d.h. das Referenzbild hat an dieser Stelle eine Faser, das Fluoreszenzbild aber nicht.
- 4) **HRE** Der Hintergrund wurde richtig erkannt, d.h. weder das Referenzbild noch das Fluoreszenzbild haben an dieser Stelle eine Faser, sondern nur Hintergrund bzw. Einbettmittel.

D.h. ein Fluoreszenzbild, das mit dem binären Bild identisch ist, hat 100% der Fasern und 100% des Hintergrundes richtig erkannt. Fluoreszieren Stellen im Bild, an denen keine Fasern vorkommen, ist ein FFE-Typ Fehler, usw.

Zur quantitativen Beurteilung der überlagerten Bilder wurde ein Matlab Programm verwendet. Die Eingabedaten sind das manuell, also optimal segmentierte binäre Bild des Echtlichtbildes (Bild links in Abbildung 4.3) und das ebenfalls binäre Schwellwertbild. Das Programm vergleicht jeden Pixel der Bilder untereinander und liefert die oben genannten Vergleichszustände in Pixel ausgewertet - siehe Abbildung 4.4.

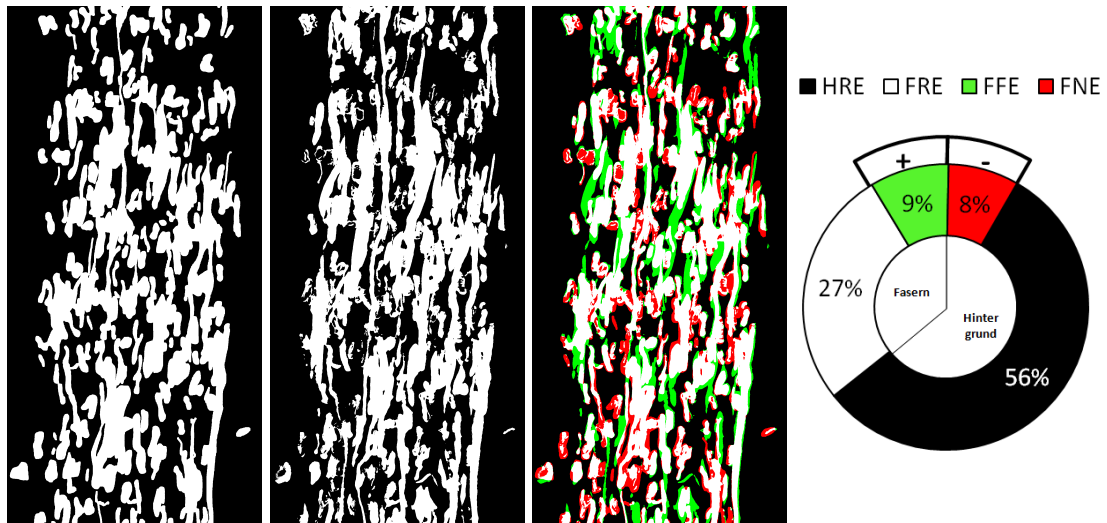


Abb. 4.4. Qualitative und quantitative Bewertung des Fluoreszenzbildes. Von links nach rechts: manuell, also optimal segmentiertes BF Bild (binär), Schwellwertbild des Grünkanalfluoreszenzbildes (binär), Überlagerung dieser beiden Bilder und die quantitative Auswertung als Kreisdiagramm.

Für die qualitative, also optische Bewertung durch das Auge, wurde das manuell segmentierte binäre Bild abgebildet (linkes Bild). Das ergibt im Überlagerungsbild (Bild Mitte rechts) weiße Stelle bei FRE, schwarze Stellen bei HRE, rote Stellen bei FNE und grüne Stellen bei FFE. Das zweite Bild von links ist das Schwellwertbild der Fluoreszenzaufnahme und im Bild rechts außen ist das Ergebnis in einem Kreisdiagramm zu sehen. Idealerweise sind die Vergleichszustände FNE und FFE gleich groß, da sich diese beiden Fehler z.B. bei der automatischen Bestimmung der Porosität aus dem Schwellwertbild aufheben. In dieser exemplarisch dargestellten Messung der Porosität wäre der Messfehler also $9\% - 8\% = 1\%$. Leider kann die Bestimmung des optimalen Schwellwertes ($FFE = FNE$) nicht vollständig automatisiert werden, da ein manuell segmentiertes Bild als Referenz vorhanden sein muss.

Auf die hier vorgestellte Weise kann ein Schwellwert aus dem ersten Bild eines 3D Stapel berechnet und bewertet werden. In weiterer Folge kann ein optimaler Schwellwert, automatisiert, für den restlichen 3D Stapel angewendet werden um die digitalisierte Papierstruktur der Fluoreszenzaufnahmen des kompletten 3D Bilddatensatz zu segmentieren.

4.2.5. Behandlung der Artefakte in den einzelnen Arbeitsschritten

Für die Entwicklung und den Betrieb des Forschungsprototypen (μ STRUCSCOP Generation 1) wurden von WILTSCHKE (2006) verschiedene Labortechniken für Echtlichtanwendungen mit einem Mikroskop getestet und für die Papiertechnik evaluiert. In der Arbeit von KRITZINGER (2010) wurden einige dieser Techniken für die Analyse von

Papier übernommen und optimiert - siehe auch WILTSCHKE ET AL. (2010). Für die vorliegende Arbeit mussten diese Methoden erneut für die Anwendung mit Fluoreszenzfärbungen getestet werden. Die möglichen Artefakte, die während der Vorbereitung und durch die Messung auftreten können, werden in diesem Abschnitt erläutert. Folgende Abbildung 4.5 zeigt die prinzipiellen Arbeitsschritte einer mikrotomie-basierenden Methode zur 3D Digitalisierung und die Artefakte, die in den einzelnen Schritten auftreten können.

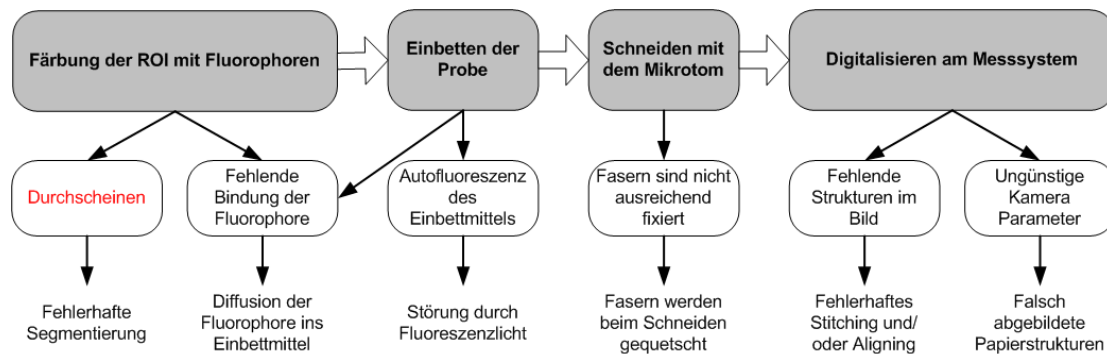


Abb. 4.5. Mögliche Artefakte (weiße Blöcke) und deren Folgen in den Arbeitsschritten (graue Blöcke) bei einer mikrotomie-basierenden Methode zur Digitalisierung von Materialstrukturen mithilfe von Fluoreszenztechniken.

Im Folgenden sind diese Artefakte detailliert beschrieben.

Artefakte bei der Färbung der ROI mit Fluorophoren (Durchscheinen) Ein Artefakt, das prinzipiell beim Färben der ROI verursacht wird, ist das Durchscheinen von Fluoreszenzlicht von unter der Probenoberfläche. Dadurch entsteht beim Digitalisieren am Messsystem ein dreidimensionaler Eindruck der Probe, da die Kamera auch Strukturinformation der Papierprobe abbildet, die eigentlich unter der Probenoberfläche liegen. Was hier für das Auge (und für Animationen durch den Bilderstapel) eine eindrucksvolle Einsicht in die Papierstruktur gibt, ist für die weitere, automatisierte Bildverarbeitung ein wesentliches Problem, da der Bildkontrast der an der Oberfläche liegenden Strukturen durch diese zusätzlichen diffus erscheinenden Bereiche vermindert wird. Die Intensität des durchscheinenden Fluoreszenzlichts ist abhängig von:

- der Dosierung der Fluorophore,
- der Lage bzw. dem Winkel der Papierfaser bzw. der gefärbten Struktur in Relation zur Probenoberfläche,
- der Transparenz des Einbettmittels,
- der Kontrastierung des Harzes mit Chromophoren,
- der Intensität der Lichtquelle, und

- den Kameraparametern.

In Abbildung 4.6 ist das Durchscheinen bei gefärbtem Eukalyptusfaserlaborpapier dargestellt. Die Fasersuspension wurde mit 1% Vol. Susp. Tinopal UP gefärbt (siehe auch Abschnitt 4.4.2). Das Einbettmittel wurde mit 0,1% Gew. Harz Sudan Schwarz gefärbt (kontrastiert, siehe auch Abschnitt 4.4.1). Die Messung des 3D Bildstapels umfasste 50 Bildebenen mit einer Schnittdicke von $4\ \mu\text{m}$ je Bildebene. Von dieser Messung sind in Abbildung 4.6 und 4.7 Ausschnitte der Bildebenen 38 bis 44 dargestellt. Der Effekt des Durchscheinen soll an einer Faser hervorgehoben werden (gelbe Markierungen). Der gelbe Kreis wurde zentral am Lumen der Faser aus Ebene 38 platziert. Der zweite gelbe Kreis, wieder zentral am Lumen der Faser aus Ebene 44, wurde ebenfalls in Ebene 38 eingezeichnet, da das Durchscheinen der Faser bis zu Ebene 44 zu sehen ist.

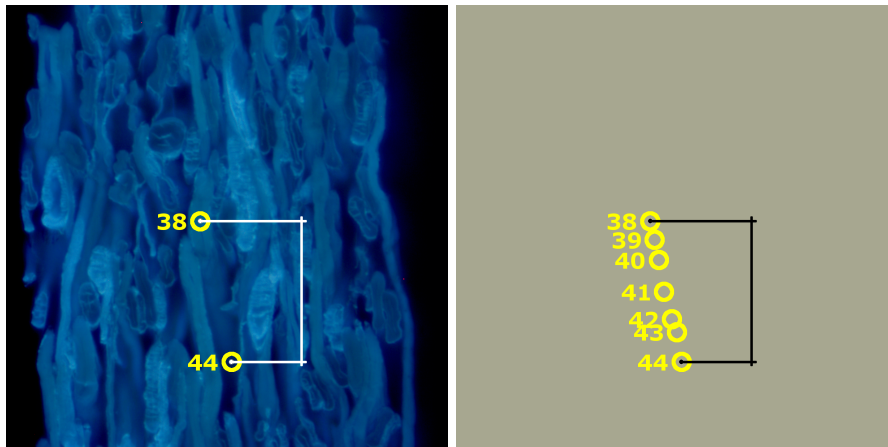


Abb. 4.6. Durchscheinartefakte durch Fluoreszenzlicht. (links) Fluoreszenzaufnahme der Ebene 38. Markiert ist die Position der Faser in der aktuellen Schnittebene und die Ebenen bis zu der das Durchscheinen zu sehen ist (Schnittebene 44). (rechts) Die Markierungen zeigen den Verlauf der Faserquerschnitte von Ebene 38 bis 44.

Im linken Bild der Abbildung ist das ineinander verschachtelte Fasernetzwerk gut zu erkennen. Durch die Überlagerung verschiedener Bildebenen ist aber eine automatische Segmentierung mit aktuellem Wissenstand unmöglich, da die Bildverarbeitung keine Informationen darüber hat, welches Fluoreszenzlicht aus welcher Ebene ist. In der Abbildung 4.6 im rechtem Bild dargestellt, sind die Markierungen der 7 überlagerten Schnittebenen. Bei einer Schnittdicke von $4\ \mu\text{m}$ je Ebene reicht das Durchscheinen, bei dieser Lage der Faser in Relation zur Schnittebene, von etwa $24\ \mu\text{m}$ unter der Probenfläche nach vorne. Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, kann dieses Durchscheinen durch Harzkontrastierung verringert werden. Folgende Abbildung 4.7 zeigt den sequentiellen Ablauf der Faser beim Schneiden der 7 Ebenen.

Die Faser hat etwa eine Neigung von ca. 45 Grad zur Schnittebene. Je nach Winkel und Form der Faser werden auch die Durchscheineffekte größer oder kleiner sein.

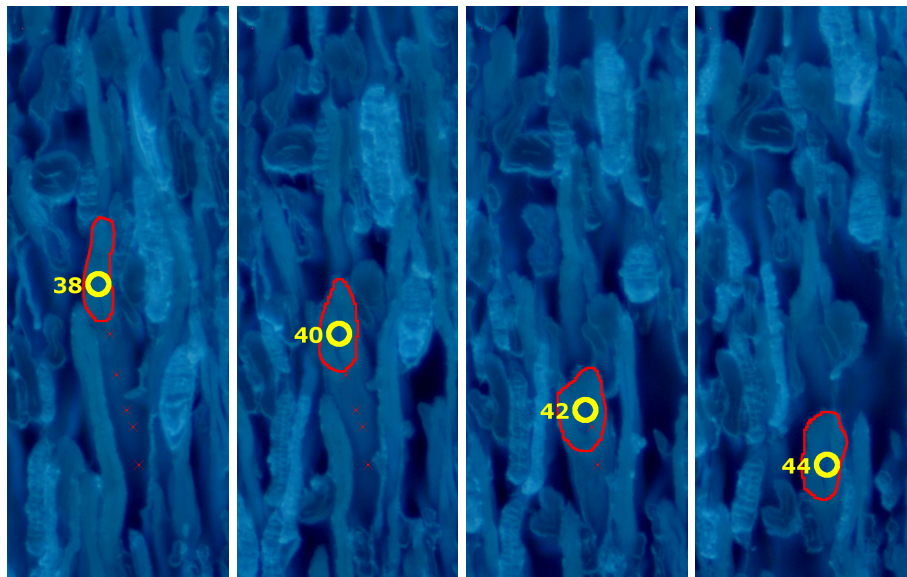


Abb. 4.7. Durchscheinartefakte durch Fluoreszenzlicht. Die gemessene Faser ist rot umrandet und der gelbe Kreis zentral am Lumen platziert. Beginnend bei Schnittebene 38 verläuft das Durchscheinen dieser Faser bis zur Ebene 44.

Durchscheinartefakte sind ein prinzipielles Problem der Wide-Field (konventionelle) Lichtmikroskopie. Da keine räumliche Eingrenzung des Anregungslichts und des emittierten Fluoreszenzlichts durch das Mikroskop vorhanden ist, wird das Durchscheinen immer auftreten. Gegenmaßnahmen auf Seite der Probe bzw. des Einbettmittels sind in Abschnitt 4.4.1 beschrieben.

Bei einem CLSM wird die Probe durch eine Punktlichtquelle (meist ein LASER) angeregt. Das bewirkt eine Eingrenzung der Anregung in der (x,y) Ebene. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird zusätzlich durch eine spezielle Lochblende vor dem Detektor räumlich begrenzt (siehe Grundlagenliteratur von PAWLEY (1995) und MULISCH UND WELSCH (2010)). Dadurch wird die Fokusebene signifikant geringer und damit auch das Durchscheinen.

In Abbildung 4.8 ist ein, mit dem OBA Tinopal UP gefärbtes, Eukalyptuslaborpapier ohne Harzkontrastierung dargestellt. Gemessen wurde mit einem Leica CLSM im Auflichtbetrieb, dem Fluoreszenzfilterwürfel A und einem 10x Objektiv, das Luft als Immersionsmedium verwendet. Die Eukalyptusfasern wurden in einer 1% Vol. Susp. Lösung massegefärbt (siehe auch Abschnitt 4.4.2). Bei dem für die Aufnahme verwendeten Objektiv, ist die korrespondierende Fokalebene ca. $7,3 \mu\text{m}$. Bei Objektiven mit höherer Apertur wird die Fokusebene weiter verringert. Dabei wird allerdings Immersionsöl notwendig und das wiederum verursacht deutlich mehr Aufwand bei der Probenpräparation und Messung.

Anzumerken sei noch, dass Durchscheinen auch in der Echtlichtmikroskopie auftritt. Hierbei wird das einfallende Licht in tiefere Schichten geleitet und von den Fasern

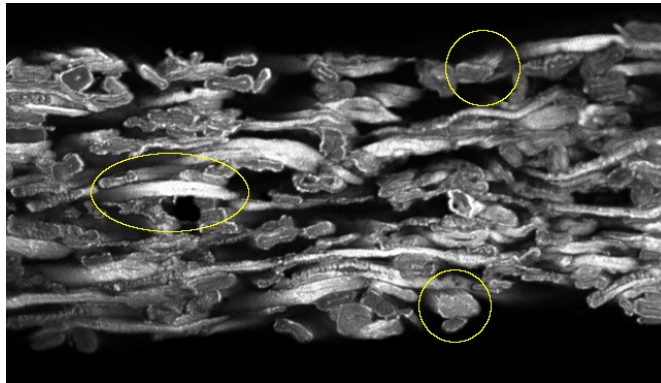


Abb. 4.8. Vergleichsmessung der Durchscheinartefakte mit einem CLSM mit optischer Vergrößerung 10x und zusätzlicher digitalen Vergrößerung. Obwohl keine Harzkontrastierung verwendet wurde, ist durch die Einschränkung der Fokalebene das Durchscheinen nur im Bereich von einigen μm zu sehen (gelbe Markierungen).

reflektiert. In Abbildung 4.9 ist ein Ausschnitt einer Aufnahme eines mit dem OBA Tinopal ABP-E gefärbtem Eukalyptusfaserlaborpapier dargestellt. Dieses wurde in einer 10% HW Lösung gefärbt (Massefärbung, siehe Abschnitt 4.4.2).

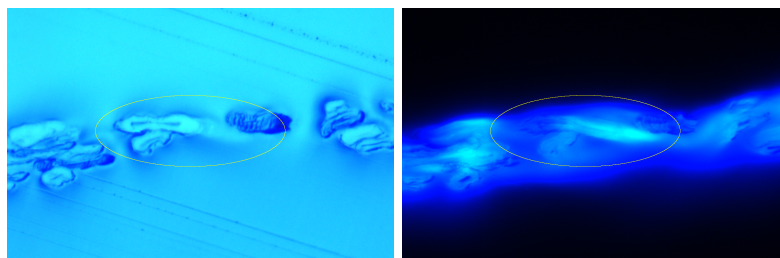


Abb. 4.9. Durchscheinen bei Echtlichtaufnahmen. Der Unterschied zwischen der scheinbaren Farbe des Harzes und den durchscheinenden Fasern (linkes Bild) ist weniger relevant als bei Fluoreszenzbildern mit mit dem scheinbaren schwarzen Harz (rechts Bild).

Dieses Durchscheinen bei Echtlichtaufnahmen ist aber in der Regel selten. Außerdem wird die Bildqualität von Echtlichtaufnahmen durch das Durchscheinen weniger beeinträchtigt als bei Fluoreszenzbildern. Der Grund dafür ist, dass bei Echtlichtaufnahmen die Farbe der Durchscheinartefakte der Farbe des umgebenden Harzes sehr ähnlich ist.

Artefakte bei der Färbung der ROI mit Fluorophoren (Bindungskräfte) Dieses Artefakt hat seine Ursache in der Färbung einer Struktur (ROI) mit einem Chromophor bzw. Fluorophor. Wie oben erwähnt, wurden verschiedene Färbetechniken aus anderen wissenschaftlichen Bereichen für die Papiertechnik adaptiert. Dabei wurden auch Chromophore verwendet, die keine feste Bindung (z.B. mechanisch, elektrostatisch oder kovalent) mit den gefärbten Papierrohmaterial eingehen und daher ihre Posi-

tion im Papier ändern können. Beim Einbetten in ungefärbtes Kunstharz lösen sich diese Farbstoffe daher mehr oder weniger stark und verteilen sich in den umliegenden Bereichen. In Abbildung 4.10 ist dieses Artefakt bei der Färbung mit dem nicht fluoreszierenden Chromophor *Sudan Schwarz* zu sehen.

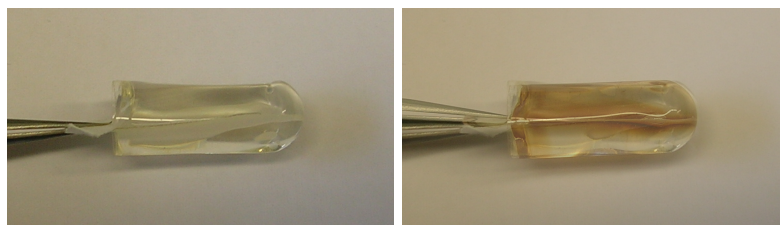


Abb. 4.10. Verteilen von Färbemittel beim Einbetten der Probe. Die mit dem Chromophor *Sudan Schwarz* gefärbte Papierprobe im rechten Bild (gebleichte Eukalyptusfasern) zeigt, dass sich der Farbstoff beim Einbetten in das Harz in den umliegenden Regionen verteilt. Das linke Bild zeigt eine ungefärbte Referenzprobe.

Das für diesen Versuch verwendete Chromophor *Sudan Schwarz* hat keine von den oben erwähnten Bindungseigenschaften zu den Papierrohmaterialien. Da es außerdem eine Molekülgröße im Bereich von nm hat, ist dieses Färbemittel gut für Färbungen der gesamte Probe samt Harz geeignet. Für spezifische Färbungen einer Struktur ist dieses Chromophor aufgrund der hier erläuterten Gründe nicht geeignet. Bei Färbungen, die zum Beispiel auf elektrostatischen Kräften basieren, (z.B. bei *Rhodamine 123* in Abschnitt 4.4.4) ist die Diffusion der Fluorophore in das Harz deutlich geringer.

Artefakte beim Einbetten der Probe (Autofluoreszenz) Artefakte, die durch unzureichende Polymerisation des Einbettmittels beim Aushärten nicht gefärbter Proben auftreten, wurden schon von WILTSCHKE (2006) bei verschiedenen Kunstharzen beschrieben und konnte auch in der vorliegenden Arbeit experimentell beobachtet werden. KRITZINGER (2010) verwendete das Einbettmittel *TechnoVit 7100*⁸ auf HEMA Basis für die Papieranalyse mittels Mikrotomie und Auflichtmikroskopie aufgrund der mehrheitlichen Vorteile gegenüber anderer Einbettmittel.

Für die Messungen in der vorliegenden Arbeit war ein Einbettmittel notwendig, dass keine Eigenfluoreszenz aufweist. Diese Lichtemissionen würden das Fluoreszenzlicht der gefärbten Struktur möglicherweise stören oder sogar überdecken. Daher wurde die Autofluoreszenz des polymerisierten Einbettmittels mit dem Fluoreszenzspektrographen Hitachi F7000⁹ im Wellenlängenbereich von 400nm bis 750nm untersucht. Aufgrund der zu geringen primären Fluoreszenz des Einbettmittels konnten nur Raman Spitzen gemessen werden, die normalerweise durch Fluoreszenzlicht überdeckt

⁸Heraeus Kulzer GmbH <http://www.kulzer-technik.de/>

⁹Hitachi High-Technologies Corporation. <http://www.hitachi-hitec.com/global/science/fl/f7000.html>

werden. Eine weitere Messung mit einem Leica CLSM bestätigte das Ergebnis - siehe Abbildung 4.11.

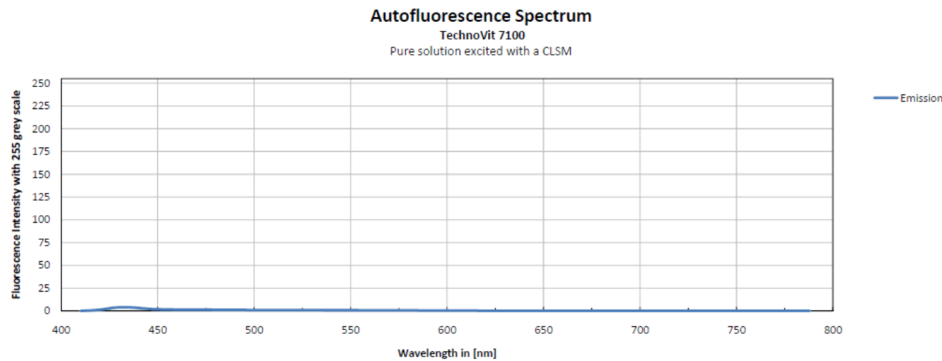


Abb. 4.11. Primäre Fluoreszenz des Einbettmittels TechnoVit 7100 bei Anregung mit einem Leica CLSM bei 405nm. Es ist bei voller Empfindlichkeit des Sensors (0-255 Graustufen auf der y-Achse) nur eine sehr geringe Fluoreszenzemission bei etwa 430nm zu sehen.

Weiters wurde die Autofluoreszenz des verwendeten Einbettmittels mit dem μ STRUCSCOP System gemessen. Dazu wurde die maximale Lichtleistung der beiden Lichtquellen (KL6000 und KL2500) mit den entsprechenden Filterwürfeln (A und GFP) kombiniert, und die Belichtungszeit der Kamera auf Maximalwert 999ms eingestellt. Dennoch konnte kaum das farbige Fluoreszenzlicht der Emission festgestellt werden. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit dem, in der biomedizinischen Analyse häufig verwendeten Einbettmittel JB4¹⁰, durchgeführt, mit dem selben Ergebnis einer sehr geringen und damit nicht störenden Eigenfluoreszenz.

Artefakte beim Schneiden mit dem Mikrotom (Fixierung der Probe) Diese Artefakte werden durch Quetschungen der Papierfasern beim Schneiden mit dem Mikrotommesser bzw. der Mikrotomklinge verursacht. Dabei werden die Fasern teilweise, je nach Schnitt- und Faserrichtung, aus der rigiden Harzmatrix herausgelöst. Diese Artefakte wurden bereits im wesentlichen von KRITZINGER (2010) behandelt und evaluiert und sind, je nach geforderter Anwendung, störend oder vernachlässigbar. In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Färbung des Einbettmittels mit Chromophoren keine Zu- oder Abnahme dieser Effekte beobachtet werden.

Artefakte beim Digitalisieren im Messsystem (Stitching und/oder Aligning) Die Algorithmen der Bildverarbeitung, die beim Stitching und Aligning ablaufen, sind prinzipiell ähnlich. Es werden die vorhandenen Strukturen in bestimmten Bildbereichen verglichen. Beim Stitching sind das Bereiche innerhalb derselben Bildebene, beim Aligning sind das Bereiche in Bildern von verschiedenen Ebenen. Wie in Abschnitt 3.5.1

¹⁰Polysciences Europe GmbH <http://www.polysciences.com>

gezeigt, sind beim Online Stitching mit dem μ STRUCSCOP Messsystem überlappende Bildbereiche von etwa 15% je Bild notwendig, um Einzelbilder wieder zu einer Matrix zusammenzufügen. Ist in diesen relevanten Bereichen die Strukturinformation zu gering, kann das Stitching fehlerhaft sein. Erst beim Vergleich zweier ähnlicher, aufeinander folgender Ebenen kann ein fehlerhaftes Stitching erkannt werden. Folgende Abbildung 4.12 zeigt dieses Artefakt anhand eines Beispiels mit zu geringer und ausreichend vorhandener Information im, für die Bildverarbeitung relevanten, Bildbereich (rot schraffiert).

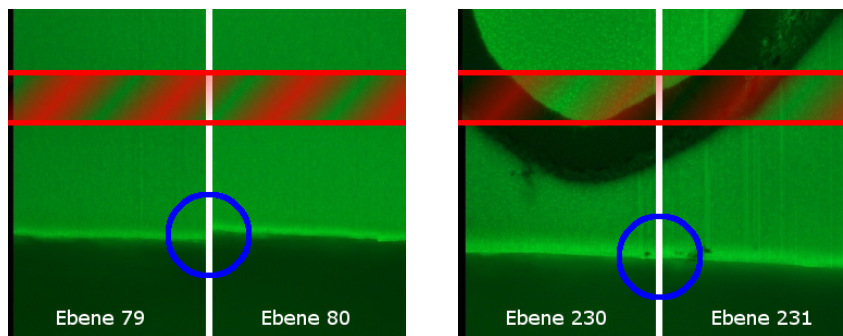


Abb. 4.12. Artefakte beim Stitching durch fehlende Bildstrukturen. Im rot schraffierte Bereich werden die Bildinformationen verglichen. Ein fehlerhaftes Zusammenfügen der Einzelbilder konnte innerhalb der blauen Markierung anhand des Sprungs der Probenkante beobachtet werden.

Zwischen Ebene 79 und Ebene 80 zeigt sich ein Versatz der Probenkante unten im Bild (blauer Kreis). Zum Vergleich sind in Abbildung 4.12 zwei weitere Ebenen dargestellt, in denen ausreichend Struktur im relevanten Bereich vorhanden ist. Die Probenkanten sind in diesem Fall genau aneinander platziert (rechtes Bild, blauer Kreis). Einfach zu finden ist dieser Fehlertyp bei Animationen der 3D Bilderstapel.

Dieser Fehler kann ebenfalls beim Aligning auftreten. Daher wird, wie in Abschnitt 3.5.3 erläutert, ein variabler Bildbereich vor der Messung festgelegt, der für die Bildverarbeitung verwendet wird. Wenn in diesem Bildbereich genügend Strukturinformation vorhanden ist, wird der hier erläuterte Fehler beim Aligning nicht auftreten.

Anzumerken ist noch, dass, auch bei für das Auge offensichtlich ausreichend vorhandener Struktur, die Bildverarbeitung dennoch zu geringe Information vorfinden kann, um korrekt zu arbeiten. Vor allem scharfe Strukturen im Bild ermöglichen die korrekte Funktion. Mögliche Erweiterungen des Messsystems μ STRUCSCOP sollten auch in der Labortechnik bzw. Probenvorbereitung ansetzen. Wie schon in Abschnitt 2.3 mit der Arbeit von STREICHER ET AL. (1997) für Aligning beschrieben, kann das Setzen von Markierungen bzw. Markern die Bildverarbeitung verbessern und robuster machen.

Artefakte beim Digitalisieren am Messsystem (Kameraparameter) Die Bildqualität wird unmittelbar durch die eingestellten Kameraparameter beeinflusst. Die über die

grafische Benutzeroberfläche variierbaren Parameter des Messsystems sind Belichtungszeit, Kontrast/Gamma und die Farbsättigung. Alle diese Parameter verändern auch die Strukturen, die im Bild zu sehen sind, und müssen daher sorgfältig justiert werden. Besonders bei der Einstellung der Parameter der Kamera während Fluoreszenzlichtanwendungen ist eine Änderung der Strukturen der Probe im Bild erkennbar. Vermutlich ist die Einschränkung der spektralen Bandbreite des Lichts dafür verantwortlich, denn bei Echtlichtanwendungen mit Bandbreiten von 400nm bis 750nm sind nur bei extremen Parametereinstellungen (z.B. Belichtungszeit fast 0) Änderungen in den Bildstrukturen erkennbar.

Die **Belichtungszeit** ist ein Parameter, der am häufigsten und intuitiv verwendet wird. Bei Echtlichtanwendungen ist dieser Parameter am unkritischsten. Bei Fluoreszenzlicht kann eine ungünstige Wahl der Belichtungszeit Artefakte verursachen, bzw. auch umgekehrt, kann eine günstige Wahl der Belichtungszeit z.B. die weiter unten erwähnten Durchscheinartefakte verringern.

Der Parameter **Farbsättigung** stellt die Empfindlichkeit der Kamera auf Farben ein. Bei minimaler Farbsättigung entsteht, in Echtlicht- und Fluoreszenzbetrieb des Mikroskops, ein Graustufenbild. Mit höherer Farbsättigung werden die starken Farbtöne zusätzlich verstärkt. Das kann z.B. bei einem Bild den grünen Farbton so intensiv hervorheben, dass das Kamerabild einem Grünkanalbild des originalen RGB Bildes gleicht. Da in der vorliegenden Arbeit RGB Farbkanaltrennung der Kamerabilder fast nur offline erfolgten, wurde dieser Parameter vorwiegend auf dem Default - Wert 1 belassen. Bildstrukturen ändern sich bei diesem Parameter erst bei hohen Werten.

Der Parameter **Gamma** hat den deutlichsten Einfluss auf die digitalisierten Strukturen des Kamerabildes. Eine sorgfältige Wahl kann die Bildqualität verbessern, dabei sollte allerdings immer das Echtlichtbild als Referenz dienen. In der Abbildung 4.13 ist der Effekt der Änderung des Parameters dargestellt.

Der Default - Wert des Parameters Gamma ist 1. Wird der Wert verringert, werden mehr Bildstrukturen sichtbar (Abbildung 4.13 oben rechts zeigt das Kamerabild bei Gamma 0). Das Bild wird allgemein heller und die Faserkonturen sind deutlicher erkennbar (grün markierte Fasern). Bei schwacher Fluoreszenzemission (z.B. Autofluoreszenz von Holzstofffasern) einer Probe kann damit das Signal verstärkt werden. Bei ausreichend starker Fluoreszenz (wie in der hier gezeigten Probe) wird aber auch das Durchscheinen von Fasern unter der Probenoberfläche verstärkt und es entsteht ein Eindruck von Dreidimensionalität der Probe. Mit steigendem Gammawert wird das Durchscheinen wieder geringer da diese Bildbereiche in der Regel dunkler sind als die Bildbereiche, die an der Oberfläche liegen. Allerdings werden dadurch auch immer mehr Bildstrukturen abgedunkelt. Das verursacht schließlich inkorrekt digitalisierte Fasern bzw. Faserkonturen, wie es in der Abbildung 4.13 unten rechts bei Gammawert 2 an den rot markierten Fasern zu sehen ist. Dieser Parameter sollte daher, wie bereits erwähnt, sorgfältig gewählt werden.

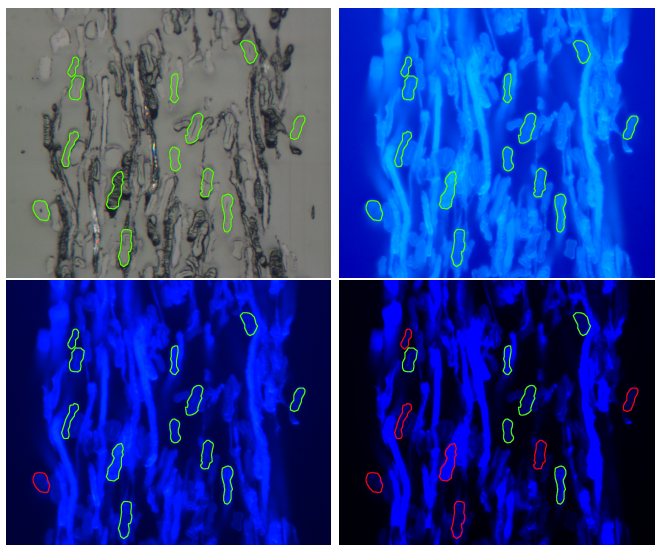


Abb. 4.13. Einfluss des Kameraparameters *Gamma* auf die digitale Bildqualität von Eukalyptuslaborpapier, das mit *Tinopal UP* gefärbt wurde. Die grün markierten Fasern zeigen korrekt abgebildete Konturen und dienen als Referenz. Rot markierte Fasern zeigen nicht korrekt digitalisierte Fasern aufgrund eines zu hohen *Gamma*/Kontrast Parameters. (oben links) Echtlichtaufnahme zur Referenz (oben rechts) Fluoreszenzaufnahme bei *Gamma* 0. (unten links) Fluoreszenzaufnahme bei *Gamma* 1. (unten rechts) Fluoreszenzaufnahme bei *Gamma* 2.

4.3. Messung von Papier durch primäre Fluoreszenz

In diesem Abschnitt wird die strukturelle Messung der Fasern in Papier aufgrund von vorhandenen, primären Fluoreszenzeigenschaften der ligninhaltigen Fasern beschrieben. Das Messsystem μ STRUCSCOP wurde dafür, basierend auf den Ergebnissen der Literaturrecherche in Abschnitt 2.3, mit dem Filterwürfel A und der UV Lichtquelle EL6000 ausgerüstet (siehe auch Abschnitt 3.3), um die erforderlichen Lichtspektren des Lignins anregen und messen zu können. Die in Abschnitt 5.2 skizzierte Methode zur Messung der Porosität von Papier basiert auf den Ergebnissen dieses Abschnitts.

4.3.1. Evaluierung der primären Fluoreszenz der Papierproben

Wie in der Literatur bekannt, absorbiert Lignin im Bereich von unter 280 nm bis über 450 nm Licht, mit den in der Arbeit von POLCIN UND RAPSON (1971) gemessenen Maxima bei 280 nm und 350 nm. Der Filterwürfel A besteht u.a. aus einem Anregungsbandpass (BP 360/40 nm), der das Anregungslicht der UV Lichtquelle (280 nm - ca. 800 nm) in diesem Bereich durchlässt und damit den Bereich des oberen Absorptionsmaximums des Lignins anregt.

Aufgrund der unterschiedlichen Formen der Emissionsspektren bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen, wurde in der Arbeit von ZHU UND GRAY (1993) auf das

Vorhandensein mehrerer Ligninkomplexe in den untersuchten TMP Faserstoffen geschlossen. Ansonsten wäre das Emissionsspektrum bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen nur in der Intensität anders - siehe Abschnitt 2.3.3. Diese Variationen sind durch den im Filterwürfel A vorhandenen Langpassfilter (LP 425nm) vernachlässigbar. D.h. auch bei unterschiedlichen Ligninkomplexen werden Fluoreszenzemissionen bei einer μ STRUCSCOP Messung ab 425nm detektiert. Blauverschiebungen der Spektren, die durch Bleichen der Faserstoffe entstehen können und durch Änderungen der chromogenen Gruppen im Lignin verursacht wird, sind in ihrer spektralen Größenordnung nach den Arbeiten von POLCIN UND RAPSON (1971) und ZHU UND GRAY (1993) vernachlässigbar, da bei den 3D Bilddatenmessungen der Filterwürfel A verwendet wird. Dieser beinhaltet einen Langpassfilters im Emissionsband und lässt daher auch verschobenen Spektren zur Kamera durch. Weitere Details zur primären Fluoreszenz von Lignin sind in Abschnitt 2.3 zu finden.

Da die μ STRUCSCOP Methode zur 3D Bilddatengenerierung entwickelt wurde, ist eine optische Kamera zur Digitalisierung der Daten in Verwendung. Die bei Fluoreszenzspektrographen eingesetzten Detektoren (photo multiplier tube - PMT) sind deutlich sensitiver. D.h. für die Festlegung der Parameter für eine Messung mit dem μ STRUCSCOP Messsystem, ist vor allem die Fluoreszenzintensität der primären Fluoreszenz der Faser- oder Zellstoffe wichtig. In den Arbeiten von OLMSTEAD UND GRAY (1993), ZHU UND GRAY (1993) und TYLLI ET AL. (1992) wurde u.a. die Fluoreszenzintensitäten verschiedener Zellulose- und Holzfaserstoffsorten mit und ohne Peroxidbleiche mittels Spektrographie gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die angewandten Bleichverfahren die Intensitäten der Fluoreszenzemission in der Regel verringert. In der Arbeit von TYLLI ET AL. (1992) wurde nach der Bleiche von Holzschliff-faserstoffen eine stärkere Fluoreszenzintensität mit einem rotverschobenem Spektrum gemessen. Es wurde vermutet, dass durch die angewandten Bleichmethoden, in den jeweiligen Wellenlängenbereichen, neue Ligninkomplexe entstehen, die stärker fluoreszieren und für die Rotverschiebung verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die 2D bzw. 3D Messung der Papierstruktur durch Autofluoreszenz Papierproben aus den, in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Laborblättern, verwendet. Zusätzlich wurde Laborpapier aus ligninhaltigem Langfaserstoff angefertigt, und weitere Proben mit fertigem Sackpapier verwendet. Es wurden also folgende Papiersorten für die Messung vorbereitet:

- Eukalyptus - Sulfatzellstoff (gebleicht, gemahlen),
- TMP Faserstoff (ungebleicht, fraktioniert, UPM Steyrermühl),
- Langfaser - Sulfatzellstoff (Monopol X, ungebleicht, Mondi Frantschach), und
- Kraftsackpapier (Mondi Frantschach).

Daraus wurden Proben entnommen und mit dem Fluoreszenzspektrographen *Hitachi F7000* gemessen. Dieser verwendet, im Gegensatz zu den in den oben angeführten

Arbeiten, eine Xenon Lampe mit geringerer Leistung (150W, anstelle einer 450W Xenon Lampe). Bei keiner der Proben konnte, aufgrund der zu geringen Emissionen, ein Fluoreszenzspektrum gemessen werden (Anregungswellenlängen 360nm und 380nm). Daraus wurde geschlossen, dass nur sehr geringe Lichtemissionen bei dem getesteten Papierrohmaterial vorhanden sind, und die Parameter des μ STRUCSCOP Messsystems in der Messung daher auf hohe Empfindlichkeit gestellt werden müssen.

4.3.2. Messung und Ergebnisse

Für die Evaluierung der Anwendbarkeit von strukturellen 2D und 3D Messungen in Papier wurden die Messparameter bei der Verwendung der Autofluoreszenz auf hohe Empfindlichkeit eingestellt. Demnach wurde die Belichtungszeit der Kamera hoch und der Gammawert niedrig voreingestellt (siehe auch Abschnitt 4.2.5). Die Lichtquelle EL6000 wurde im Fluoreszenzbetrieb auf maximale Blendengröße, also maximale Lichtintensität eingestellt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Messung der TMP Faserstoffproben mit dem μ STRUCSCOP Messsystem dargestellt (Ergebnisse der Messung von Langfaserproben und Kraftpapierproben sind diesen sehr ähnlich). Bei der gebleichten Eukalyptuszellstoffprobe konnte keine Fluoreszenzemission detektiert werden.

Laborpapier aus TMP Fasern Nach den üblichen Laborvorarbeiten (siehe Abschnitt 4.2.1) wurde die Probe mit den folgenden Parametern gemessen:

- Belichtungszeit = 999ms (Maximalwert),
- Gammawert = 1 (default Wert), und
- Lichtquelle = Stufe 4 (maximale Öffnung der Blende).

Ein geringerer Gammawert hat zwar zur Folge, dass die detektierte Fluoreszenzemission heller ist, aber, wie schon im Abschnitt 4.2.5 erläutert, sinkt damit auch der Bildkontrast, da mehr Durchscheinen auftritt. In Abbildung 4.14 ist die Auswertung der Fluoreszenzmessung einer Bildebene dargestellt.

Die in der Abbildung 4.14 dargestellt Folge an Bildern stellt die in Abschnitt 4.2 beschriebene Methode zu qualitativen und quantitativen Bewertung der Fluoreszenzbilder dar. Das Echtlichtbild (oberes Bild in der Abbildung) wird immer als Referenzbild digitalisiert. Die binären Bilder der manuellen Segmentierung und der Schwellwertbilder des Fluoreszenzbilds werden im unteren Bild der Abbildung überlagert und mit einem Matlab Programm verarbeitet. Bei der Bewertung dieser primären Fluoreszenz des TMP Faserstoffes ist der Schwellwert so gesetzt worden, dass sich die Fehlerarten FFE (Faser Falsch Erkannt) und FNE (Faser Nicht Erkannt) beinahe aufheben. Wie schon in Abschnitt 4.2 festgestellt, ist damit auch das Schwellwertbild qualitativ optimal. Das RGB Fluoreszenzbild ist nicht abgebildet, da die Intensität sehr gering

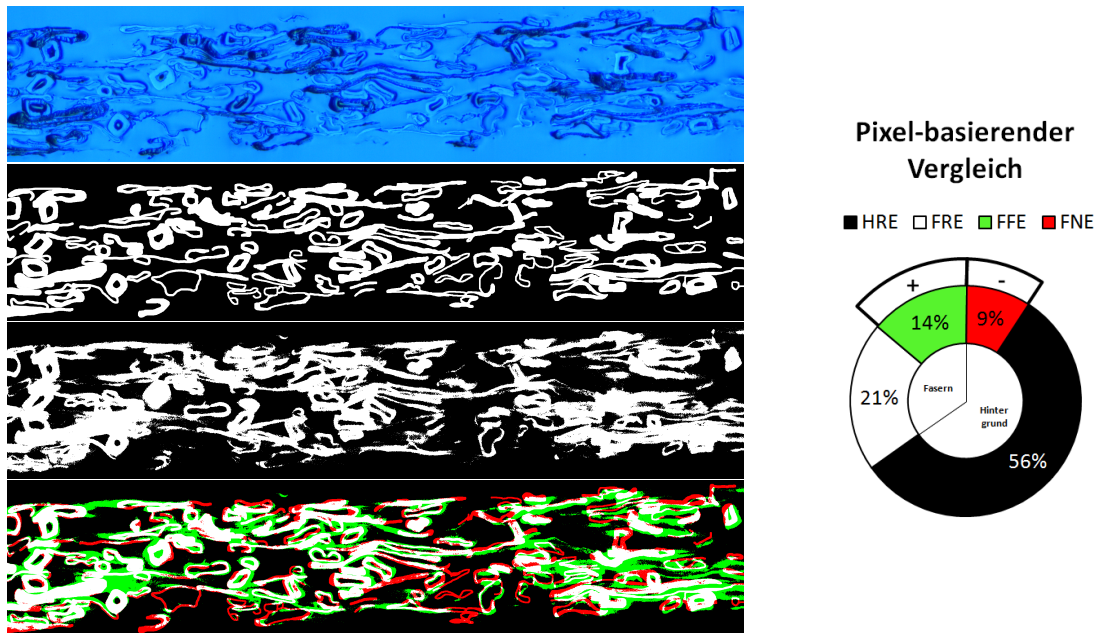


Abb. 4.14. Autofluoreszenz bei Laborpapier aus TMP Faserstoff. (von oben nach unten) Echtlichtaufnahme, Binärbild der manuell segmentierten Echtlichtaufnahme, binäres Schwellwertbild der Fluoreszenzaufnahme, Überlagerungsbild der binären Bilder mit Farbcodierung der Fehlertypen.

ist. Im Überlagerungsbild ist zu sehen, dass dünne bzw. kleine Fasern am Rand der Probe nicht gut detektiert werden. Auf der anderen Seite sind bei besonders dichten Fasernetzwerkstellen zuviele Fasern detektiert worden. Das ist auf das Durchscheinen der Fasern zurückzuführen. Bei der Schwellwertbildung wird damit zuviel detektiert. Diese Fehler sind also gegenläufig mit dem Schwellwert verbunden. Prinzipiell kann zur primären Fluoreszenz gesagt werden, dass die Signalintensitäten gerade noch für die Bildverarbeitung ausreichen. Eine höhere Signalintensität wäre von Vorteil.

Wie schon im Abschnitt 2.3 in Abbildung 2.15 dargestellt, wird ein Teil der einfallenden Lichtleistung durch das, in der vorliegende Arbeit verwendete Objektiv beschränkt. Wird das Objektiv durch ein spezielles UV Objektiv ausgewechselt, steigt die Intensität des zur Probe durchgelassenen Anregungslichts. Auch eine Lichtquelle mit höherer Leistung wird die Fluoreszenzemission der primären Fluoreszenz erhöhen. Das kann in Folge die Bildqualität bzw. den Bildkontrast verbessern und damit die Schwellwertbildung verbessern.

4.4. Messung von Papier durch sekundäre Fluoreszenz

Für Messungen mit sekundärer Fluoreszenz werden der Probe bzw. der interessanten Papierstruktur (region of interest - ROI) Fluorophore beigemischt. Wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, werden diese Fluorophore mithilfe von Filtersystemen angeregt und

deren Fluoreszenzemission mit einer Kamera detektiert. In diesem Abschnitt werden die Typen von Färbemittel, die Färbemethode und deren Resultate beschrieben.

4.4.1. Ablauf und Ergebnisse der Harzfärbung

Bei der Harzfärbung werden der Infiltrationslösung des Einbettmittels Färbemittel beigemischt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Einbettmittel TechnoVit 7100 von Heraeus¹¹ gefärbt (für Referenzversuche auch das Einbettmittel JB4 von Polysciences¹²). Diese Kunstharze sind Mehrkomponenten Systeme, die nach Zugabe eines Härters polymerisieren. Zuvor wird, in der Regel, die Probe in einer Vorbereitungslösung unter einer Vakuumglocke infiltriert, um die Polymerisation des Harzes durch die ganze Probe zu gewährleisten. Bei der Harzfärbung wird die Probe in der Harz-Farbstoff Lösung infiltriert.

Gewählt wurden einige einfache Färbemittel die keine speziellen Bindungseigenschaften (z.B. kovalente Bindung) aufweisen. Die Färbung passiert damit ausschließlich auf physikalischen Prinzipien (wie Molekülgröße und Probendichte). Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Farbstoffe waren die vorhandenen Licht- und Filtersystemen des Messsystems μ STRUCSCOP. Für die Färbung verwendet wurden die in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Laborpapiersorten.

In Abbildung 4.15 sind die Tests der Harzfärbung dargestellt.

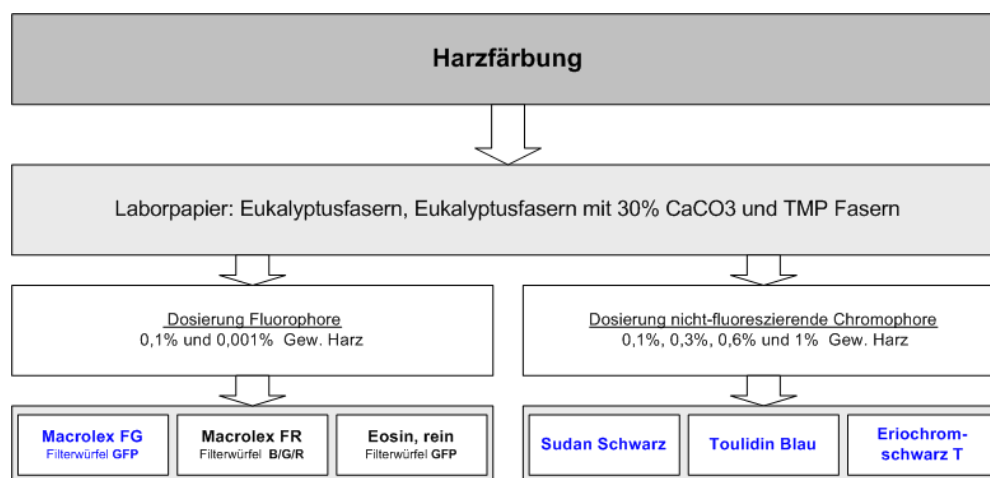


Abb. 4.15. Ablauf der Harzfärbung mit fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Chromophoren.

Harzfärbung mit Fluorophoren

Wie in Abbildung 4.15 dargestellt, wurden 3 Fluorophore zur Harzfärbung evaluiert. Wie vermutet sind keine Papierbestandteile bevorzugt gefärbt worden. Die Bilder der

¹¹Heraeus Kulzer GmbH www.Kulzer-Technik.de

¹²Polysciences, Inc. www.polysciences.com

Papierquerschnitte zeigen eine unspezifische Fluoreszenzemission über die gesamten Probenfläche. Vereinzelte Fasern wurden besonders stark oder gar nicht gefärbt, was auf die besonderen Eigenschaften dieser Fasersorte und der damit verbundenen Adsorptions- und Absorptionseigenschaften zurückgeführt wurde.

Durchscheinartefakte wurden durch die Lichtemission der Fluorophore in den Poren der Papierprobe und an der Probenoberfläche überdeckt. Diese Eigenschaft wird auch in der Arbeit von WENINGER ET AL. (2006) für die Harzfärbung mit dem Fluorophor *Eosin,sprit* verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Art der Harzkontrastierung mit dem Fluorophor *Macrolex FG* im Abschnitt 4.4.3 und mit dem optischen Aufheller *Tinopal UP*, im Abschnitt 4.4.4, bei Messungen getestet und evaluiert.

Harzfärbung mit nicht-fluoreszierenden Chromophoren

Zur Abdeckung von Durchscheinartefakten (siehe Abschnitt 4.2.5) direkt in der Probe, also dort wo sie entstehen, wurden verschiedene, nicht fluoreszierende, Chromophore getestet. Nach Recherche für die Mikrotomie üblicher Chromophore wurden die drei Färbemittel *Sudan Schwarz*, *Toluidinblau*, und, zu Testzwecken, *Eriochromschwarz T* gewählt. Diese Färbemittel sind bei Chroma¹³ und Sigma-Aldrich¹⁴ erhältlich. Folgende Tabelle 4.1 listet die wichtigsten Eckdaten dieser Chromophore.

Bezeichnung	Sudan Schwarz	Toluidinblau O	Eriochromschwarz T
Molekulargewicht	456,54 g/mol	305,83 g/mol	461,38 g/mol
Lösbarkeit in H ₂ O	unlöslich	30 g/l	50 g/l
..in TechnoVit 7100	über 0,3% Gew. Harz	über 1% Gew. Harz	über 1%Gew. Harz
Summenformel	C ₂₉ H ₂₄ N ₆	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ S	C ₂₀ H ₁₂ N ₃ NaO ₇ S
CAS Nummer	4197-25-5	92-31-9	1787-61-7

Tabelle 4.1. Kenndaten der nicht fluoreszierenden Chromophore *Sudan Schwarz*, *Toluidinblau* und *Eriochromschwarz T* die für die passive Harzkontrastierung evaluiert wurden.

Die in Tabelle 4.1 dargestellten, nicht fluoreszierenden, Chromophore wurden mit den Dosierungen 0,3% Gew. Harz ,0,6% Gew. Harz und 1% Gew. Harz getestet. Dazu wurde gefärbtes Laborpapier aus der Massefärbung (Abschnitt 4.4.2) verwendet. Dieses, mit dem OBA Tinopal UP gefärbte, Eukalyptus- und TMP Faserstoffpapier wurde, wie in Abschnitt 4.2.1 erklärt, eingebettet. Die Infiltrationslösung wurde zuvor mit den angeführten Chromophoren vermischt.

Die Laborarbeiten und die Messung zeigten, dass Toluidinblau und Eriochromschwarz T zwar im Einbettmittel besser löslich sind als Sudan Schwarz, die Deckkraft bei gleicher Dosierung aber bei Sudan Schwarz deutlich besser ist. Daher wurde zur passiven Harzkontrastierung in den weiteren Färbungen der folgenden Abschnitte

¹³Waldeck GmbH & Co.KG Division Chroma www.chroma.de

¹⁴Sigma-Aldrich Ca. LLC. www.sigmaaldrich.com

das Färbemittel Sudan Schwarz verwendet. Folgende Abbildung 4.16 zeigt die Überdeckung der Durchscheinartefakte durch Sudan Schwarz. In den Bildern der Abbildung sind von oben nach unten die Echtlichtaufnahmen, die Fluoreszenzaufnahmen mit denselben Systemeinstellungen und dem Filterwürfel A, die eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit manuell segmentierten Fasern, sowie die Ergebnisse der quantitativen Bewertung dargestellt. Von links nach rechts ist die Kontrastfärbemittel-Konzentration mit 0% Gew. Harz, 0,3% Gew. Harz und 0,6% Gew. Harz Sudan Schwarz gereiht.

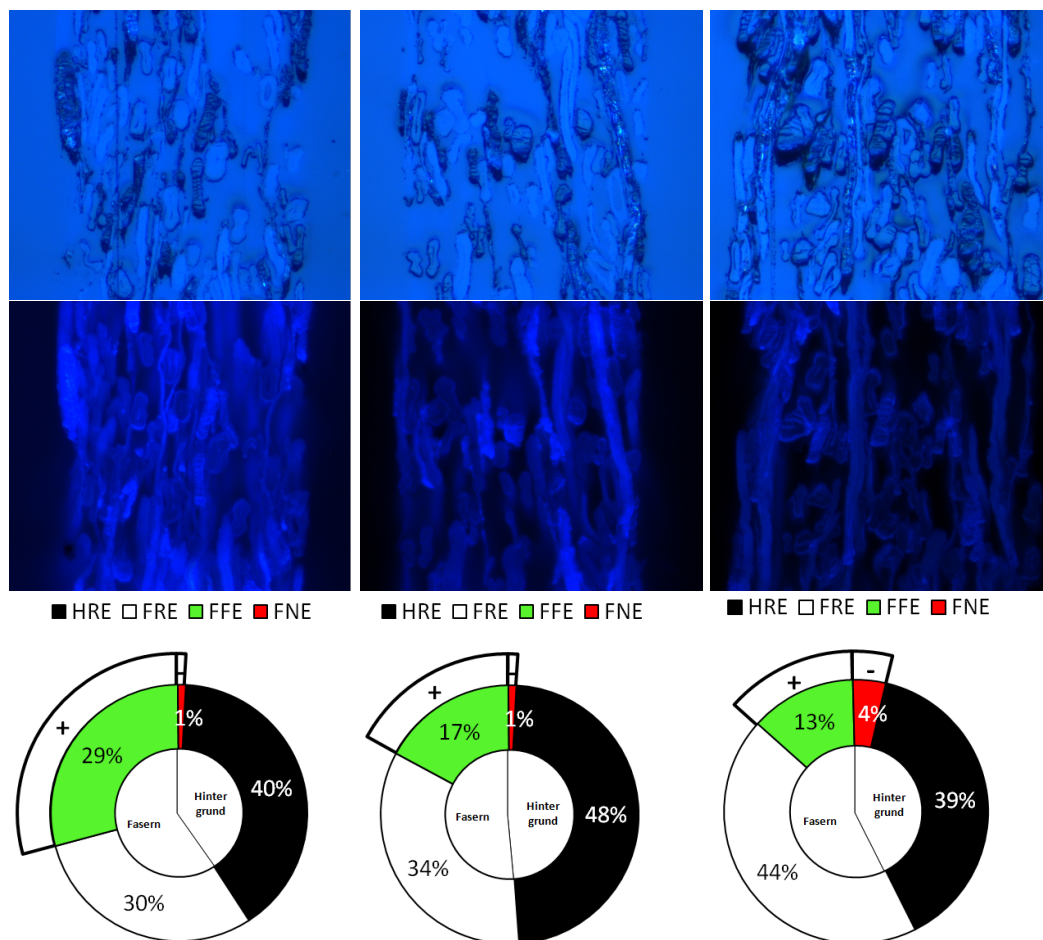


Abb. 4.16. Harzfärbung bzw. Harzkontrastierung mit nicht-fluoreszierenden Chromophoren. (von oben nach unten) Echtlichtaufnahmen, Fluoreszenzlichtaufnahmen bei gleichen Einstellungen, Überlagerung der Binärbilder der manuell segmentierten Echtlichtaufnahmen mit den helligkeitsangepassten Fluoreszenzbildern und pixelbasierender Vergleich. (von links nach rechts) Harzkontrastierung mit 0%, 0,3% und 0,6% Gew. Harz Sudan Schwarz.

An den Fluoreszenzbildern ist die Abnahme der Lichtintensität der Fluoreszenz mit steigender Chromophordosierung zu erkennen. Bei gleicher Belichtungszeit deckt das Chromophor auch Fluoreszenzlicht der Fasern ab. Der Grund dafür ist vermutlich,

dass das Fluoreszenzlicht der Faser unterhalb der Oberfläche generell gedämpft wird. Dennoch sind, auch bei durch nachträglicher Bildverarbeitung angepasster Helligkeit der Fasern auf dasselbe Niveau wie bei den Bildern ohne Kontrastierung, weniger Durchscheinartefakte im Zwischenraum der Fasern zu sehen. Das kann in der Abbildung 4.16 in der unteren Bildreihe erkannt werden. Mit steigender Dosierung, von links nach rechts, wird weniger blaues Fluoreszenzlicht von unter der Oberfläche detektiert. Wie schon erwähnt, sind die Lichtintensitäten der Fasern dazu vorher nachträglich mit einem Bildbearbeitungsprogramm auf gleiche Helligkeit gespeichert worden. Die Abdeckung erfolgt also deutlich besser außerhalb der Fasern (es wurde auch nur das Harz gefärbt, wobei aber ein geringer Teil des Chromophors in die Fasern penetrieren dürfte).

Folgende Abbildung 4.17 zeigt die Ergebnisse der Harzfärbung.

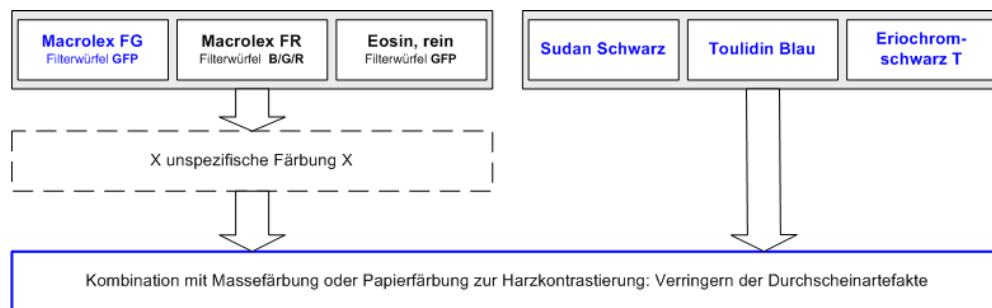


Abb. 4.17. Ergebnisse der Harzfärbung. Effektiv nutzbar war die aktive Kontrastierung des Harzes mit dem Fluorophor *Macrolex FG* und die passive Kontrastierung des Harzes mit den nicht-fluoreszierenden Chromophoren *Sudan Schwarz* und *Toluidinblau*.

Wie bereits erwähnt, wird diese Kontrastierung in der Regel bei den weiteren Färbungen eingesetzt, um die Bildqualität zu erhöhen.

4.4.2. Ablauf und Ergebnisse der Massenfärbung

Wie bereits erwähnt, kann bei der Massenfärbung Papierrohmaterial vor bzw. direkt in der Faserstoffsuspension gefärbt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das in Abschnitt 4.2.1 beschriebene Laborpapier nur aus Eukalyptusfasern und Holzstofffasern hergestellt. Die gefärbte Suspension wurde im Desintegrator aufgeschlagen und mit einer vorgegebenen Einwirkzeit, entweder über den Verteiler und den Blattbilder (Rapid Köthen), oder mit einem Messglas und Magnetprüher und die Nutsche weiter zu Laborpapier verarbeitet.

Folgende Abbildung 4.18 zeigt den prinzipiellen Ablauf der Massenfärbung mit den verwendeten Fluorophoren und den entsprechenden Filterwürfeln.

Im Folgenden sind der Ablauf und die Ergebnisse dieser Färbungen im Detail beschrieben.

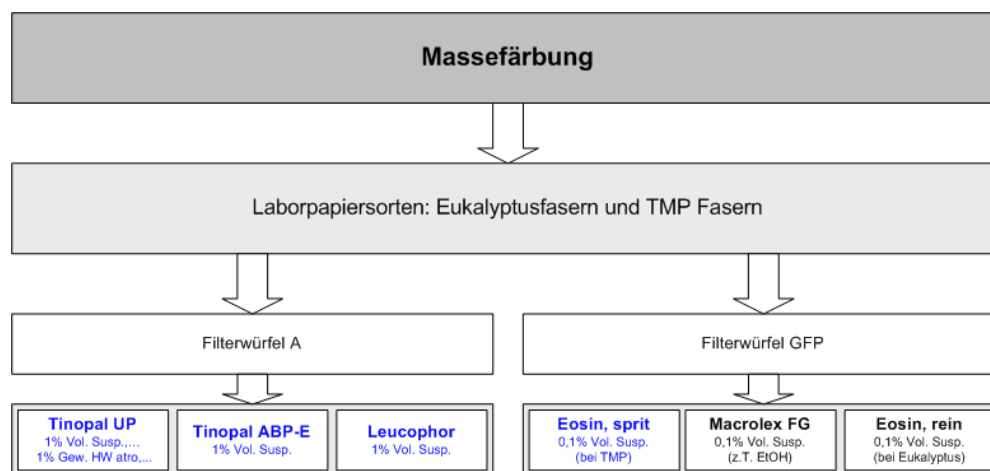


Abb. 4.18. Ablauf der Massefärbung.

Massefärbung mit optischen Aufhellern

Die Eigenschaften der für die Massefärbung verwendeten optischen Aufheller sind in Tabelle 4.2 gelistet.

Bezeichnung	Tinopal UP	Tinopal ABP-E	Leucophor
Stilbene mit	Disulfo	Tetrasulfo	Triazine
Dichte	1,15 g/cm ³	1,11 g/cm ³	1,25 g/cm ³
Lösbarkeit in H ₂ O	optimal	optimal	optimal
Spektrum	350/430nm	420/460nm	350/430nm
Filterwürfel	A	A	A
Dosierung	bis 2% Gew. HW	bis 1,5% Gew. HW	-
Hersteller	BASF	BASF	Clariant

Tabelle 4.2. Kenndaten der optischen Aufheller *Tinopal UP*, *Tinopal ABP-E* und *Leucophor* für die Massefärbung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dosierung der optischen Aufheller von sehr hoch (weit über den Werten der Datenblattempfehlung in Tabelle 4.2) bis sehr niedrig (unter den Werten der Datenblattempfehlung) getestet. Die verwendeten optischen Aufheller *Tinopal UP*, *Tinopal ABP-E* und *Leucophor*, binden aufgrund von physiochemischen Effekten an die Faser und werden beim Einbetten in das Kunstharz in einer nicht für die Messung relevanten Menge von den Fasern gelöst. Alle optischen Aufheller zeigen bei sehr hoher Dosierung eine hohe Bildqualität. Folgende Abbildung 4.19 zeigt Eukalyptuspapier, das mit Tinopal UP 1% Vol. Susp. gefärbt wurde. Die Laborpapierherstellung erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, wobei die Zugabe des OBAs zum Faserstoff vor dem Desintegrator erfolgte. Danach wurde der gefärbte Faserstoff ca. 1h im Verteiler belassen und anschließend im Blattbildner (Rapid Köthen) Laborpapier hergestellt. Bei diesen ersten Versuchen wurde keine Harzkon-

trastierung vorgenommen. Aufgrund der hohen Dosierung hatte das trockene Papier einen deutlichen Grünstich. Das deutete, wie bei dieser hohen Dosierung zu erwarten, auf den Sättigungsbereich des Aufhellers hin.

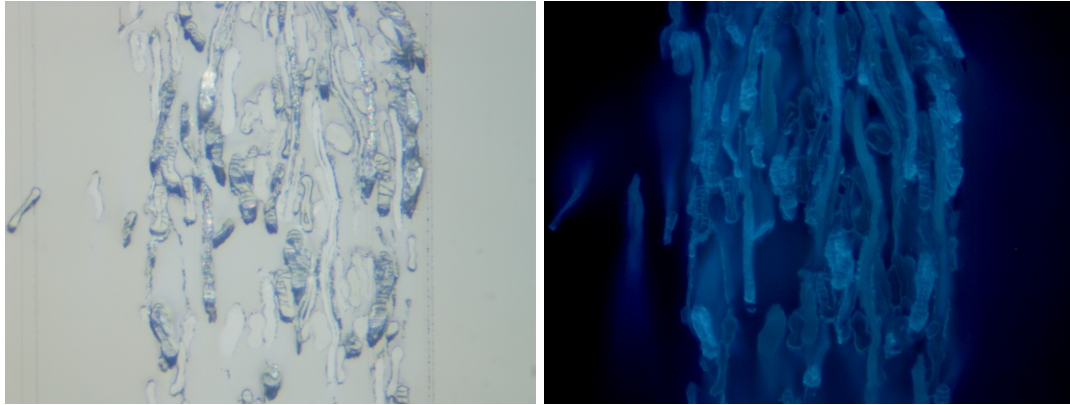


Abb. 4.19. Massefärbung von Eukalyptuslaborpapier mit Tinopal UP 1% Vol. Susp. ohne Harzkontrastierung. (links) Echtlichtaufnahme (rechts) Fluoreszenzlichtaufnahme mit dem Filterwürfel A.

Das Fluoreszenzbild zeigt eine gute Bildschärfe. Faserlängsschnitte und Faserquerschnitte sind für das Auge gut erkennbar. Bei den meisten Faserquerschnitten und Lumen sind die Ränder deutlich heller als die umliegenden Regionen, was auf eine höhere Dosierung in Faserrändern hinweist. Das Phänomen einer höheren Konzentration der OBAs an den Faserrändern bei der Färbung mit OBAs ist auch in der Arbeit von ZHANG ET AL. (2011) beobachtet worden. Auch die Poren des Laborpapiers in Abbildung 4.19 sind für das Auge eindeutig erkennbar, obwohl dort zusätzliche diffuse Lichtemissionen von der Kamera detektiert werden. Diese sog. Durchscheinartefakte werden in Abschnitt 4.2.5 detailliert erklärt. Diese Artefakte verschlechtern den Bildkontrast wesentlich. Prinzipiell kann das Durchscheinen nicht vermieden, aber verringert werden z.B. durch eine Kombination dieser Methode mit der Harzkontrastierung - siehe Abschnitt 4.4.1. Die hier erläuterten Ergebnisse zeigten sich mit den drei gelisteten optischen Aufhellern auch bei der Massefärbung von Holzstofflaborpapier. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse zwischen den Aufhellern wurde in weiteren Versuchen nur mehr der Aufheller Tinopal UP verwendet.

Massefärbung mit einfachen Fluorophoren

Für die Färbung der Faserstoffsuspension sind wesentlich größere Mengen an Fluorophoren notwendig, als bei einer gezielten Färbung im z.B. fertigem Papier. Es wurden in der vorliegenden Arbeit die Fluoresceinderivate *Eosin,sprit* und *Eosin,rein*, sowie das für Färbung von Plastik verwendete Fluorophor *Macrolex FG* getestet. Diese Fluorophore sind kostengünstig erhältlich. Aus Arbeiten von histologischen Bereichen wie bei WENINGER ET AL. (2006) wurde Eosin für die unspezifische Färbung des Harzes

und des Gewebes verwendet. Da, wie bereits erwähnt, in der papiertechnischen Analyse mit Methoden der sekundären Fluoreszenz nur wenige Arbeiten vorhanden sind (siehe Abschnitt 2.3), wurde dieses Fluorophor in der vorliegenden Arbeit für die Färbung der Faserstoffsuspension getestet. Weiters wurde das Fluorophor *Macrolex FG* evaluiert. Bei diesen drei Fluorophoren basiert die Färbung nur auf dem physikalischen Prinzip der Diffusion, da keine anderen Eigenschaften wie molekulare Größe oder physio-chemische Bindungskräfte wie Coulomb'sche Kräfte wirken (daher der Zusatz "einfach"). Einige Kenndaten der Fluorophore sind in Tabelle 4.3 gelistet.

Bezeichnung	Eosin,sprit	Macrolex FG	Eosin,rein O
Molekulargewicht	714,03 g/mol	368,81 g/mol	691,86 g/mol
Lösbarkeit in H ₂ O	schwer löslich	unlöslich	300 g/l
Spektrum	530/550nm	452/484nm	515/540nm
Filterwürfel	GFP	GFP	GFP
Summenformel	$C_{22}H_{11}Br_4KO_5$	$C_{20}H_{17}ClN_2O_3$	$C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$
CAS Nummer	6359-05-3	35773-43-4	17372-87-1

Tabelle 4.3. Kenndaten der Fluorophore *Eosin,sprit*, *Macrolex FG* und *Eosin,rein* die für die Massefärbung verwendet wurden.

Wie erwartet, zeigt die Massefärbung von Eukalyptus- bzw. Holzstofflaborpapier mit den Fluorophoren Macrolex FG, sowie die Färbung von Eukalyptuslaborpapier mit Eosin,rein keine spezifische Färbung der Fasern bzw. Bindung der Farbstoffe an die Fasern. Wie in den (nicht abgebildeten) Bilddaten erkennbar, lösen sich die Fluorophore beim Einbetten in Kunstharz wieder von der Faseroberfläche oder penetrieren mit dem Harz aus dem Inneren der Fasern in die umliegenden Regionen. Somit entsteht eine unspezifische Färbung und die Bilddaten sind für weitere automatisierte Bildverarbeitung nicht verwendbar.

Bei der Färbung von Laborpapier aus Holzfaserstoff mit Eosin,sprit zeigte sich diese Diffusion des Fluorophors beim Einbetten nicht. Wie bei den optische Aufhellern mit unüblich hoher Dosierung ist die Bildqualität hoch. Gründe für die offensichtlich auftretenden Bindungskräfte konnten keine gefunden werden. Möglicherweise liegt es auch an der Kombination Holzfaserstoff mit Eosin,sprit. Da Holzfaserstoff nicht mit Eosin,rein und vice versa Eukalyptuspapier nicht mit Eosin,sprit gefärbt wurde, kann darüber keine eindeutige Aussage getroffen werden. Eosin,sprit kann mit beiden Filterwürfeln A und GFP angeregt werden. Folgende Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen Laborpapier aus TMP Faserstoff, das mit 0,1% Gew. Susp. Eosin,sprit gefärbt wurde ohne die Harzkontrastierung zu verwenden.

Auch bei diesen Bildern treten natürlich Durchscheinartefakte auf. Das Eosin,sprit in den Faserquerschnitten fluoresziert vorwiegend in einem Gelb/Rotton (bei Verwendung des Filterwürfels A). Stellenweise wird auch blaues Licht detektiert. Das liegt daran, dass bei den Messungen mit dem Filterwürfel A nur sehr geringe sekundäre

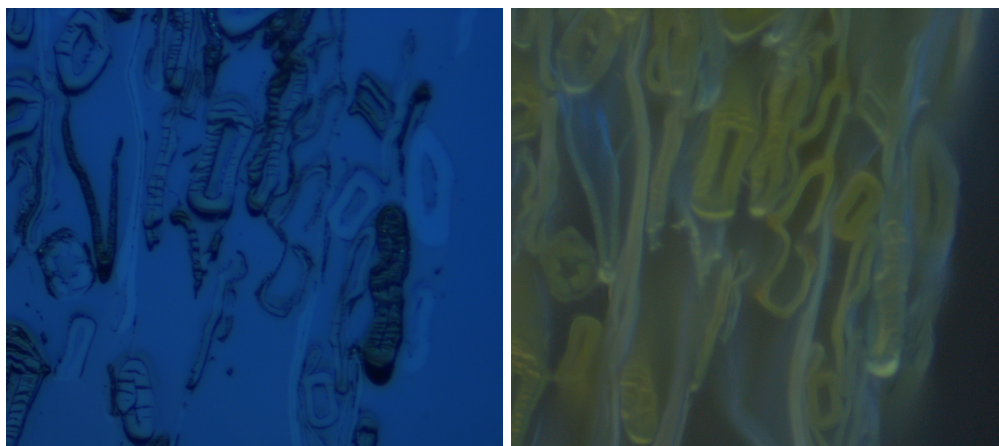


Abb. 4.20. Massefärbung von Laborpapier aus TMP Faserstoff mit 0,1% Gew. Susp. Eosin,sprit ohne Harzkontrastierung. (links) Echtlichtaufnahme (rechts) Fluoreszenzaufnahme mit dem Filterwürfel A. (Beide Bilder wurden zur Ansicht in der vorliegenden Arbeit in einem Bildverarbeitungsprogramm nachträglich aufgehellt.)

Fluoreszenzsignale detektierbar (das Absorptionsmaximum von Eosin,sprit ist normalerweise bei 530nm) sind, die Belichtungszeit also hoch gewählt werden musste. Damit werden auch Autofluoreszenzsignale des Lignins sichtbar, und diese fluoreszieren im blauen Lichtband. Eine Harzkontrastierung ist hier schwierig, da durch den abdunkelnden Effekt auch die Fluoreszenzintensität von Eosin,sprit geringer wird. In Abbildung 4.21 ist ein Ausschnitt einer Bildebene abgebildet die mit dem Filterwürfel GFP gemessen wurde. Bei dieser Messung des ebenfalls mit 0,1% Gew. Susp. Eosin,sprit gefärbten Papiers wurde die Harzkontrastierung mit Sudan Schwarz 0,3% Gew. Harz verwendet. Die Fluoreszenzintensität ist deutlich stärker, da die Anregung beim GFP Würfel nahe des optimalen Absorptionsbereichs von Eosin,sprit stattfindet.

Das Fluoreszenzbild in Abbildung 4.21 zeigt eine gute Bildschärfe. Eine Verteilung von Farbstoffdosierungen über den Faserquerschnitt, wie bei den optischen Aufhellern, kann nicht erkannt werden. Faserlängsschnitte und Faserquerschnitte sind für das Auge dennoch gut erkennbar, wenn auch die Faserwände einen deutlich geringeren Kontrast zeigen wie bei den OBAs. Aufgrund der großen Abstände zwischen den Fasern, und der offensichtlich senkrechten Position zur Bildebene, sind einige Fasern besonders gut für eine Schwellwertbildung geeignet. Bei einer stärkeren Anhäufung von Fasern ist in der Regel das Durchscheinen störend, da das diffuse Fluoreszenzlicht umliegende Fasern überdeckt und damit den Bildkontrast verschlechtert.

Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse zwischen Eosin,sprit und den optischen Aufhellern, wurden in den weiteren Färbemethoden nur noch optische Aufheller verwendet, da diese einfacher handzuhaben sind.

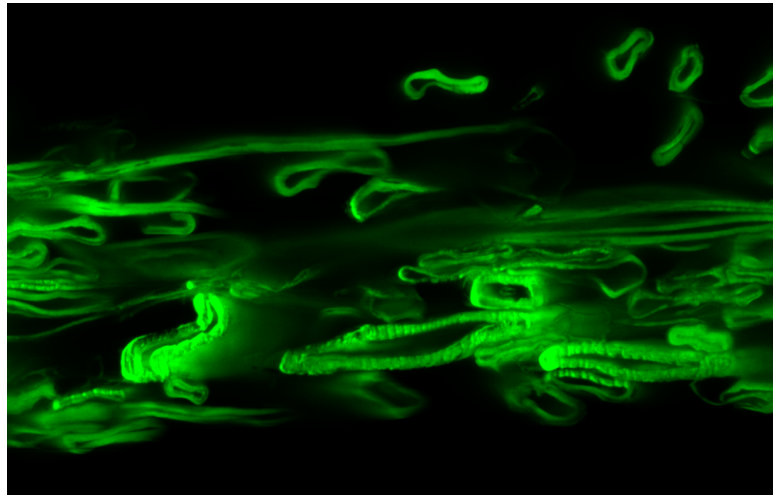


Abb. 4.21. Massefärbung von Laborpapier aus TMP Faserstoff mit 0,1% Gew. Susp. Eosin,sprit ohne Harzkontrastierung. Die Fluoreszenzlichtaufnahme wurde mit dem Filterwürfel GFP aufgenommen. (Eine Echtlichtaufnahme fehlt zu diesem Bild.)

Dosierungsversuche

Die Abbildungen 4.19 und 4.20 zeigen eine hohe Bildqualität bei unüblich hohen Dosierungen der OBAs und des Fluorophors Eosin,sprit. Um den Zusammenhang zwischen Dosierung und Bildqualität zu evaluieren wurde eine Reihe von Dosierungsversuchen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen dieser Dosierungsversuche sind in Tabelle 4.4 gelistet.

Dazu wurde Eukalyptuszellstoff und Holzfaserstoff, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, hergestellt. Diese wurden mit den Dosierungen 1% Vol. Susp. bzw. 0,1% Gew. Susp., sowie mit 100%, 10% , 5%, 1%, 0,1%,0,01% und 0,001% Gew. HW atro gefärbt. Diese Mengen wurden dem Faserstoff zugetropft, 10 Minuten im Aufschläger desintegriert und ca. 50 Minuten stehengelassen. Im Anschluss wurde die Suspension 2 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen um Färbereste zu entfernen und danach nochmals 2 Minuten aufgeschlagen. Zuletzt erfolgte die Blattbildung über eine Nutsche und teilweise, für Vergleichszwecke, über den Blattbilder.

Nach der Trocknung wurden die Papierproben im Klimaraum gelagert und Proben für die Mikrotomie entnommen. Dazu wurden für jede Dosierung und für jedes Färbemittel je 2 Proben verwendet. Eine davon wurde in einer 0,3%-igen Sudan Schwarz - TechnoVit Lösung 4h infiltriert und danach in eine 0,3%-ige Sudan Schwarz - TechnoVit Lösung eingebettet (siehe auch Abschnitt 4.4.1). Die andere Probe wurde ohne Zugabe von Sudan Schwarz infiltriert und eingebettet. Nach dem Aushärten der Proben wurden diese für die Messung am μ STRUCSCOP Messsystem zugefeilt und vorgeschnitten.

Da alle Proben mit der Sudan-Schwarz-Kontrastierung deutlich weniger Durchscheinartefakte hatten und deren Bildqualität damit in allen Fällen besser war, wurden nur

Dosierung	Eukalyptusfasern mit Tinopal UP Filterwürfel A	TMP Fasern mit Eosin,sprit Filterwürfel GFP
1%Vol. Susp. bzw. 0,1%Gew. Susp.	hohe Bildqualität deutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich	hohe Bildqualität deutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich
100%Gew. HW atro	hohe Bildqualität deutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich	mittlere Bildqualität deutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich
10%Gew. HW atro	mittlere Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich	mittlere Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich
5%Gew. HW atro	mittlere Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild möglich	-
1%Gew. HW atro	niedrige Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild unmöglich	niedrige Bildqualität Fluoreszenz zu gering Schwellwertbild unmöglich
0,1%Gew. HW atro	niedrige Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild unmöglich	hohe Bildqualität* deutliche Faserquerschnitte* Schwellwertbild möglich*
0,01%Gew. HW atro	niedrige Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild unmöglich	niedrige Bildqualität Fluoreszenz zu gering Schwellwertbild unmöglich
0,001%Gew. HW atro	niedrige Bildqualität undeutliche Faserquerschnitte Schwellwertbild unmöglich	niedrige Bildqualität Fluoreszenz zu gering Schwellwertbild unmöglich

Tabelle 4.4. Ergebnisse Dosierungsversuche bei der Massefärbung. (* Bei dieser Messung wurden sehr wahrscheinlich Proben verwechselt.)

diese Proben bewertet. Wie erwartet, wird bei gleichen Kameraparametern und niedrigerer Dosierung der Farbstoffe, auch die Fluoreszenzintensität geringer. D.h. umgekehrt, um Bilddaten zu erhalten, die eine ähnliche Fluoreszenzintensität zeigen, ist bei niedrigeren Dosierungen eine längere Belichtungszeit notwendig.

Es konnte eine Abnahme der Bildqualität mit sinkender Dosierung festgestellt werden. Folgende Abbildung 4.22 zeigt den Vergleich zweier Papieraufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Filterwürfel A. Beide Papierproben aus Eukalyptusfasern wurden, wie oben beschrieben, mit Tinopal UP gefärbt und den Dosierungen 5% Gew. HW atro und 1% Vol. Susp.) und mit dem μ STRUCSCOP Messsystem digitalisiert. Anschließend wurde durch Trennung der RGB Kanäle der Grünkanal mit deutlich geringerem Durchscheinen extrahiert. In der Abbildung 4.22 sind die Graustufenbilder dieser extrahierten Grünkanäle dargestellt. Eingebettet wurden die-

se Proben mit der üblichen Sudan Schwarz Harzkontrastierung von 0,3% Gew. Harz.

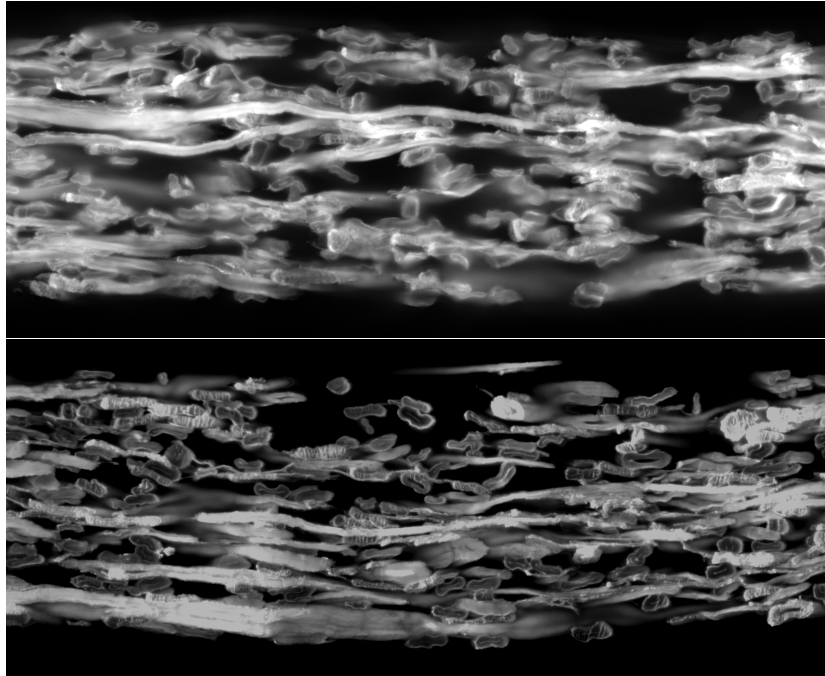


Abb. 4.22. Massefärbung von Eukalyptuspapier, gefärbt mit Tinopal UP und den Dosierungen 5% Gew. HW atro (oberes Bild), und 1% Gew. Susp. (unteres Bild). Dargestellt sind die Graustufenbilder der digitalisierten Grünkanäle. Beide Proben wurden mit 0,3% Gew. Harz Sudan Schwarz harzkontrastiert.

Es konnten keine Erklärungen für die Abnahme der Bildqualität mit sinkender Dosierung der Fluorophore gefunden werden. In einer Arbeit zur Verteilung von OBAs in Fasern (ZHANG ET AL. (2011)) wird die Verteilung der Aufhellern bei Hochausbeutefaserstoff und Kraftfasern mit einem Durchlichtmikroskop in Kombination mit DIC untersucht. Generell konnte festgestellt werden, dass bei jeder Dosierung mehr Aufheller in den Faserwänden, also der äußeren Faserwand und in den Wänden des Lumens, vorhanden sind. Bei den getesteten unterschiedlichen Dosierungen zeigte sich ab einer genügend hohen Dosierung deutlichere Faserkonturen als bei niedrigeren Dosierungen. Bei niedrigen Dosierungen ist der Aufheller in den Faserquerschnitten nur undeutlich zu sehen bzw. Teile der Faser gar nicht sichtbar. Die Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Bildqualität bei höheren Dosierungen besser ist (wie oben in der Arbeit von (ZHANG ET AL. (2011)) erwähnt). Der Grund dafür liegt vermutlich in der besseren Bildqualität der digitalisierten Fasern. Bei höheren Dosierungen sind mehr Farbtintensitäten und viel deutlichere Verteilungen des OBA innerhalb der Faser sichtbar, als im Vergleich zu den Fasern bei niedrigen Dosierungen.

Anzumerken ist noch, dass die Dosierungen in der oben zitierten Arbeit innerhalb der üblichen Grenzen zu finden ist, während in der vorliegenden Arbeit diese Phänomene

erst bei unüblich hohen Dosierungen detektierbar waren. Das ist vermutlich auf den besseren Kontrast des Durchlichtmikroskops mit dem speziellen Kontrastverfahren DIC (siehe Abschnitt 2.3.1) zurückzuführen.

In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse der Massefärbung dargestellt.

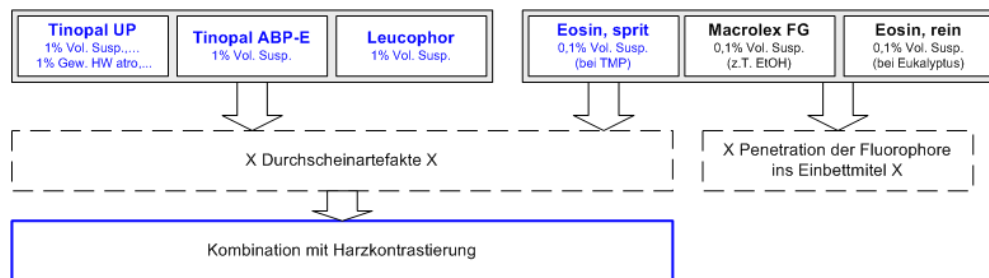


Abb. 4.23. Ergebnisse der Massefärbung. Effektiv nutzbar war dabei die Verwendung der optischen Aufheller *Tinopal UP*, *Tinopal ABP-E* und *Leucophor* und das Fluoresceinderivat *Eosin, spiritlöslich*.

Aufgrund der Ergebnisse der Massefärbung wurde diese unüblich hohe Dosierung (1% Vol. Susp.) in den weiteren Versuchen mit der Kombination aus Masse- und Harzfärbung weiterverwendet.

4.4.3. Ablauf und Ergebnisse der Kombination aus Massefärbung mit Harzkontrastierung

In den beiden vorherigen Abschnitten wurde die Harzfärbung (Abschnitt 4.4.1) und die Massefärbung (Abschnitt 4.4.2) erklärt und deren Ergebnisse dargestellt. Wie bei der Harzfärbung erläutert, wird eine passive Harzkontrastierung mit dem nicht-fluoreszierenden Chromophor Sudan Schwarz permanent eingesetzt, da in allen Fällen das Durchscheinen geringer und die Bildqualität damit besser wird.

In diesem Abschnitt wird eine weitere Kombination aus Massefärbung mit der Harzfärbung bzw. Harzkontrastierung erläutert. Neben der passiven Kontrastierung mit Sudan Schwarz, die insgesamt die Fluoreszenzintensität, vor allem in den Faserzwischenräumen dämpft, wird im Folgenden auch die Möglichkeit beschrieben, Durchscheinen durch Fluoreszenzlicht zu verringern. Wurden Fasern mit einem Fluorophor gefärbt, entstehen bei der Messung prinzipiell auch Durchscheinartefakte (siehe 4.2.5). Damit werden die Zwischenräume der Fasern ungleichmäßig hell sein (an manchen Stellen scheint Emissionslicht der Fasern durch, an manchen Stellen nicht). Um diesen Effekt des Durchscheinens von emittierten Fluoreszenzlicht zu verringern, wird ebenfalls ein Fluorophor verwendet und dem Harz beim Einbetten der Probe beigemischt. Bei passender Dosierung, wird das so entstehende Fluoreszenzlicht gleich hell genug sein um das Licht der Durchscheinartefakte zu überdecken.

Für die Färbung der Papierfasern wurde der optische Aufheller *Tinopal UP*, für die

Färbung der Harzes das Fluorophore Macrolex FG und das nicht-fluoreszierenden Chromophor Sudan Schwarz verwendet. Folgende Abbildung 4.24 zeigt den prinzipiellen Ablauf der Färbung.

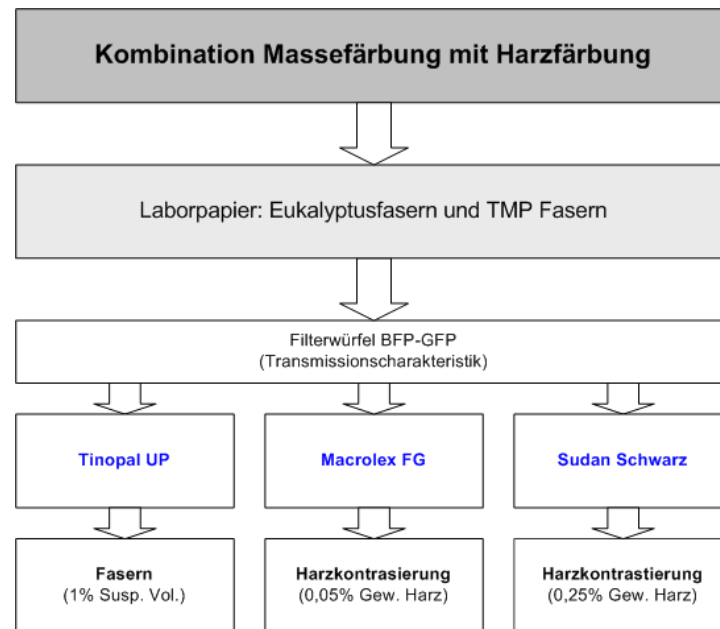


Abb. 4.24. Ablauf der Kombination von Massefärbung mit passiver und aktiver Harzkontrastierung.

Evaluiert wurden zwei Laborpapiersorten, bestehend nur aus Fasern, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Ein spezieller Dualband-Filterwürfel (Leica *BFP-GFP*, siehe Anhang C) ermöglicht die simultane Anregung beider Fluorophore und damit die Digitalisierung beider Fluoreszenzemissionen in einem Bild. Falls nötig, können die einzelnen Fluoreszenzkanäle durch eine RGB Farbkanaltrennung in den Blau- und Grünkanal wieder hergestellt werden.

Zur Auswahl der Dosierung der Farbstoffe ist es erforderlich, diese an die Transmissionseigenschaften des Filterwürfels anzupassen. Folglich müssen die spektralen Eigenschaften der Einzelkomponenten verglichen werden. Folgende Abbildung 4.25 zeigt die Spektren des Filterwürfels und der verwendeten Fluorophore.

Wie in Abbildung 4.25 zu sehen ist, ist das Spektrum von Tinopal UP optimal mit den beiden Bandpässen (linke schwarze Spitze und linkes rotes Rechteck) kombinierbar. Das Spektrum von Macrolex FG passt nicht optimal zu den beiden Bandpässen des Anregungsfilters und des Sperrfilters (BP 385/15 und BP 485/20). Die Transmissionsmaxima liegen oberhalb der Spektramaxima von Macrolex FG, es ist aber genügend Anteil des Spektrums im Durchlassbereich der Filter vorhanden. Das bedingt aber eine höhere Dosierung, da beide Fluorophore mit derselben Lichtquelle angeregt werden.

Im Gegensatz zu den Durchlassbereichen des Filterwürfel sind Spektren der Fluoro-

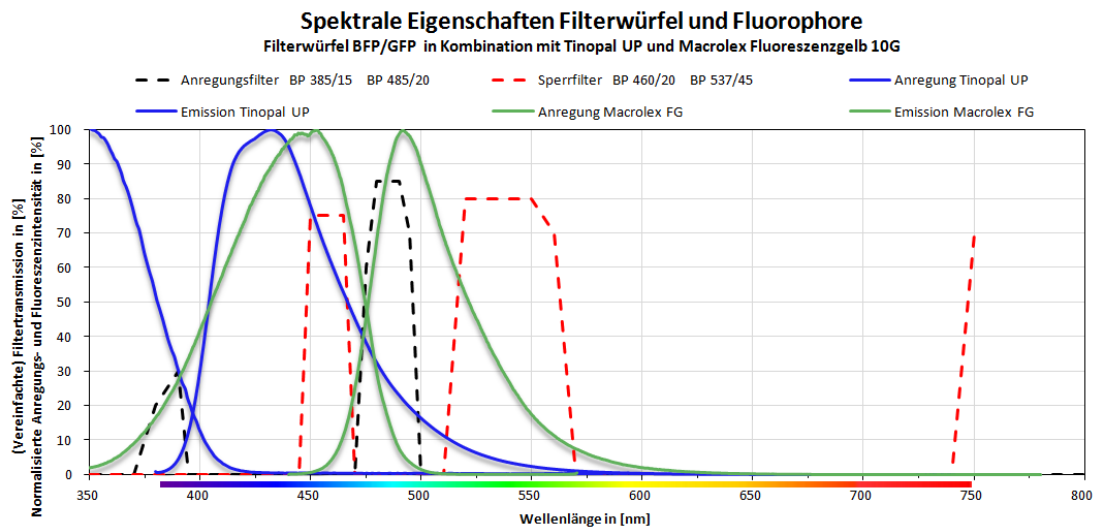


Abb. 4.25. Spektrale Eigenschaften Filterwürfel BFP/GFP und der verwendeten Fluorophore *Tinopal UP* und *Macrolex Fluoreszenzgelb 10G*.

phore auf ihr Maximum normiert. Für eine geeignete Kombination der Dosierungen, passend nur für diesen Filter, wurden eine Reihe von Dosierungen getestet. Bei zu hoher aktiver Kontrastierung mit Macrolex FG sind die Papierfasern zum Teil transparent geworden, da die Fluoreszenzemissionen von hinter der Faser zu groß waren (auch eine Art von Durchscheinartefakten). Bei zu geringer Dosierung wiederum ist der Kontrast zwischen blauer Fluoreszenzemission der Fasern und grüner Emission des Harzes zu undeutlich. Folgende Dosierung hat sich als zweckmäßig erwiesen:

- Tinopal UP: 1% Vol. Susp.,
- Macrolex FG: 0,05% Gew. Harz, und
- Sudan Schwarz: 0,25% Gew. Harz.

Weitere (sekundäre) Einflussparameter für die Wahl der Dosierungen sind die Transmissionskennlinien der Objektive für den UV Bereich (siehe Abbildung 2.15) und die Detektionsempfindlichkeit der Kamera (muss groß genug sein um ein Fluoreszenzsignal detektieren zu können).

Folgende Abbildung 4.26 zeigt die Einzelkanäle der Bilddaten von gefärbtem Holzstofflaborpapier. Die bereits angesprochene Trennung des digitalisierten RGB Bildes in die einzelnen Farbkanäle liefert in diesem Fall die Bilder der Fluoreszenzkanäle der beiden Filtersysteme BFP (für Tinopal UP) und GFP (für Macrolex FG).

Wie erwartet wird durch die passive Harzkontrastierung mit Sudan Schwarz auch das Durchscheinen geringer. Außerdem, wie diese Färbung zeigen soll, wird auch, durch die aktive Kontrastierung mit Macrolex FG, das Durchscheinen der Tinopal UP Fluoreszenz geringer. Durch diese Kombination verschiedener Fluoreszenzfarben

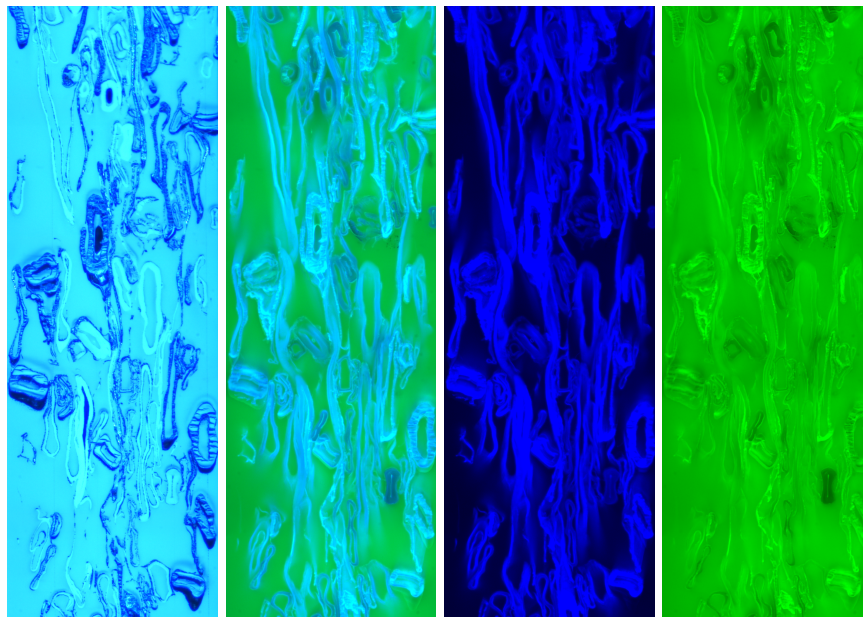


Abb. 4.26. Mehrfachfärbung von TMP Faserstofflaborpapier mit *Tinopal UP*, *Macrolex FY* und *Sudan Schwarz*. (von links nach rechts) Echtlichtaufnahme, Fluoreszenzaufnahme mit Filterwürfel *BFP-GFP*, Blaukanal der Fluoreszenzaufnahme (*Tinopal UP* Fluoreszenz), Grünkanal der Fluoreszenzaufnahme (*Macrolex FG* Fluoreszenz).

konnte eine farblich deutliche Abgrenzung zwischen Fasern und Harz (entspricht den Papierporen) erreicht werden.

Interessant sind auch die Daten aus den Einzelkanälen. Wie ebenfalls in Abbildung 4.26 zu sehen ist, ist im Blaukanal deutlich weniger Strukturinformation, wie die Ränder der Fasern oder der Strukturen im Faserquerschnitt, zu sehen als im Grünkanal. Dennoch liefert das RGB Bild, also die Überlagerung der beiden Kanäle, eine zusätzliche farbliche Abgrenzung der Faser vom grün gefärbten Harz. Eventuell kann diese zusätzliche Farbinformation auch für eine zukünftige Bildverarbeitung (z.B. automatische Segmentierung) verwendet werden. Auch die Überlagerung mit dem Echtlichtbild könnte zusätzliche Strukturinformation für die Bildverarbeitung bringen.

Für die folgende qualitative und quantitative Bewertung (siehe auch 4.2.4) wurde Eukalyptuspapier verwendet. Bei der Bildverarbeitung hat sich gezeigt, dass eine Auswahl von Strukturen nach Farbe genauere Binärbilder ergeben als durch einfache Schwellwertbildung der Fluoreszenzbildes. Da die Fasern im überlagerten Bild eine andere Farbe haben als in den Einzelkanälen (B und G Kanal) bzw. den Einzelwürfeln (A oder GFP) ist hier eine Auswahl nach Farbe sinnvoll (d.h. die gefärbten Fasern werden nach ihrem Farbton selektiert und nicht nach der Helligkeit, wie bei der Schwellwertbildung).

Folgende Abbildung 4.27 zeigt diese, mit Matlab durchgeführte, Bewertung. Dargestellt sind (von oben nach unten) die Echtlichtaufnahme, das Fluoreszenzbild mit dem

Filterwürfel BFP-GFP, und die pixelbasierende Fehleranalyse (Überlagerungsbild und Kreisdiagramm). Das manuell segmentierte Binärbild und das binäre Bild der Farbauswahl sind nicht dargestellt.

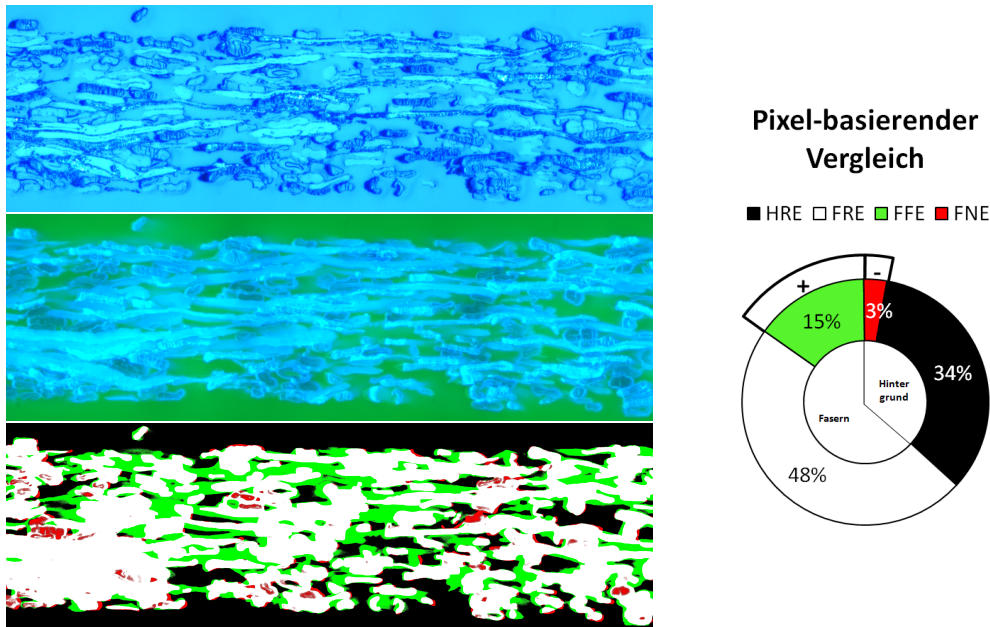


Abb. 4.27. Mehrfachfärbung von Eukalyptuszellstofflaborpapier mit *Tinopal UP*, *Macrolex FY* und *Sudan Schwarz*. (links oben) Echtlichtaufnahme, (links Mitte) Fluoreszenzaufnahme mit Filterwürfel BFP-GFP, (links unten) qualitative Fehleranalyse der 4 Fehlertypen, (rechts) quantitative Fehleranalyse der 4 Fehlertypen.

Trotz des dichten Fasernetzwerks des Eukalyptuslaborpapiers (vgl. andere Abbildungen in der Autofluoreszenz und der Papierfärbung) werden, prozentuell gesehen, weniger Fasern falsch erkannt. Etwas mehr als 10% der Papierstruktur wird falsch erkannt (15% - 3%). Die Poren sind durch den Farbunterschied zwischen Fasern und Harz, im Vergleich zur Echtlichtaufnahme, deutlich kontrastreicher zu sehen.

Außerdem liefern die hohen Signalintensitäten im Bild genügend Bildstrukturen für die Bildverarbeitung und machen dadurch das Stitching und Aligning zuverlässiger. Anzumerken sei, dass ein Vergleich zwischen den Färbemethoden auf rein quantitativer Ebene sehr schwer ist, da lokale Variationen der Papiernetzwerkdichte (Robustheit der Segmentierung einzelner Fasern) und der, in erster Näherung zufälligen Natur der Faserorientierung (Intensität des Durchscheinens), die Bewertung stark beeinflussen. Daher sind diese Vergleiche zwischen den Färbemethoden in der vorliegenden Arbeit auch auf Basis der Überlagerungsbilder und der Fluoreszenzbilder gemacht worden.

In Abbildung 4.28 sind die Ergebnisse dieser Färbemethode dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Art der Färbung eignen sich prinzipiell zur Erstellung von Vi-

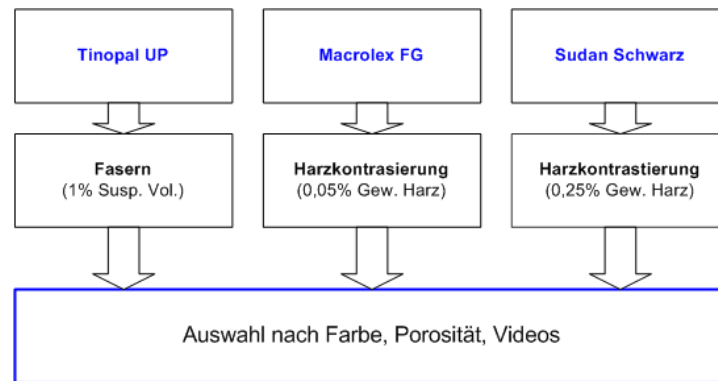


Abb. 4.28. Ergebnisse der Kombination von Massefärbung mit passiver und aktiver Harzkontrastierung.

deos, für eine Segmentierung basierend auf der Farbinformation und zu einer automatisierten Messung der Porosität.

Es konnten in weiteren Messungen beobachtet werden, dass bei Verwendung derselben Fluorophore für die Färbung der Fasern und für die Harzkontrastierung ebenfalls eine Verringerung der Durchscheinartefakte auftritt. Um z.B. blaues Fluoreszenzlicht zu verringern, wird dasselbe Fluorophor verwendet und dem Harz beim Einbetten der Probe beigemischt. Bei passender Dosierung, ist das so entstehende Fluoreszenzlicht gleich hell wie das Licht der Durchscheinartefakte. Damit kann eine die ungleichmäßige Lichtemission in den Papierporen verringert werden. Das führt einerseits zu einer besseren Bildqualität (Faser werden nicht mit Durchscheinartefakten vermischt abgebildet), aber andererseits wird auch der Kontrast zwischen Fasern und Poren bzw. Harz geringer. Diese Methode wird im Abschnitt 4.4.4 bei der Färbung mit Tinopal UP angewendet.

4.4.4. Ablauf und Ergebnisse der Papierfärbung

Naheliegender für die Wahl der Färbemittel sind wieder optische Aufheller aus der Papiererzeugung. Da ein Disulfo- Typ OBA besonders gut für den Einsatz in der Nasspartie (eng. Wet End) geeignet ist, wurde z.B. der Aufheller *Tinopal UP* schon für die Färbemethode *Massgefärbung* in Abschnitt 4.4.2 verwendet. Auch für die Papierfärbung wurde dieses Fluorophor verwendet.

Weiters wurde in diesem Abschnitt das geladene Fluorophor *Rhodamin 123* evaluiert. Dieses Molekül ist kationisch, sollte also durch elektrostatische Kräfte gut an den negativ geladenen Faseroberflächen binden.

Da Eigenschaften wie die Porengröße von Papierfasern bekannt sind (z.B. in der Arbeit von STONE UND SCALLAN (1968)), wurden in diesem Abschnitt auch die speziellen (und teuren) Färbemittel *Fluoresbrite FY* und *Fluorescein Dextrane* getestet, deren Molekülgröße genau spezifiziert ist.

Zur Evaluierung der Füllstoffverteilung in Laborpapier mit 30%CaCO₃ wurde das ionenselektives Fluorophor *Calcium Green 1* verwendet. Bei diesem Molekül steigt die Intensität der Fluoreszenzemission, wenn freie Kalziumionen Ca²⁺ in der gefärbten Region vorhanden sind.

In Abbildung 4.29 ist die verwendete Evaluierungsprozedur abgebildet.

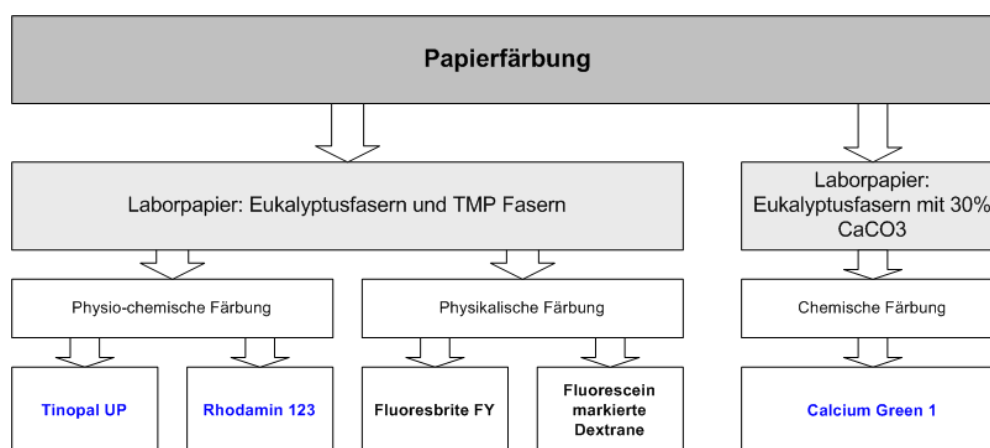


Abb. 4.29. Ablauf der Papierfärbung. Effektiv nutzbar waren die Fluorophore *Tinopal UP*, *Rhodamin 123* und das Kalziumionen-sensitive Fluorophor *Calcium Green*.

Färbung mit dem optischen Aufheller *Tinopal UP*

Aufgrund der guten Färbereigenschaften des Aufhellers *Tinopal UP* (siehe Abschnitt 4.4.2) wurde dieses Fluorophor auch für die Papierfärbung evaluiert. In Tabelle 4.5 sind einige Kenndaten des Aufhellers gelistet.

Bezeichnung	Tinopal UP
Derivat	Diamino-Stilben-Disulfonsäure
Basis	disulfoniert
Dichte	1,15 g/cm ³
Lösbarkeit in H₂O	optimal
Spektrum	350/430nm
Filterwürfel	A
empfohlene Dosierung	0,05 bis 2% Gew. HW
Hersteller	BASF

Tabelle 4.5. Kenndaten des optischen Aufhellers *Tinopal UP*.

Für die Papierfärbung wurden den Laborpapierblättern aus Abschnitt 4.2.1 Proben entnommen und anschließend in einer Lösungsmittel-Fluorophor Lösung für 5 Minuten gefärbt. Da keine Referenzwerte für die Färbedauer von OBAs für diese Art der Färbung in der Literatur vorhanden sind, wurde auf eine Färbedauer von Laborpapier in der Arbeit von OZAKI ET AL. (2006A) zurückgegriffen, die mit Acridine

Orange Papierfaser von fertigem Papier für 3 Minuten in der Lösung färben, anschließend mit destilliertem Wasser auswaschen und anschließend lufttrocknen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Lösungsmittel Wasser verwendet, obwohl Wasser bekanntlich die Papierstruktur ändert. Die hier gezeigte Färbemethode soll zeigen, ob eine Papierfärbung mit OBAs prinzipiell möglich ist, daher wurden Komponenten verwendet, die sich leicht handhaben lassen. Weiters wurde eine passive und aktive Harzkontrastierung verwendet (siehe Abschnitt 4.4.1 und Abschnitt 4.28). Da

Es wurde eine 1:10 Vol. OBA:H₂O Lösung vorbereitet und die Papierproben für 5 Minuten darin gefärbt. Danach wurde eine Hälfte der Papierproben mit destilliertem Wasser gewaschen und alle Proben im Anschluss luftgetrocknet. Danach wurde eine Hälfte der Proben in eine reine Technovit Lösung eingebettet, und die andere identische Hälfte der Proben wurde, zusätzlich zur passiven Harzkontrastierung, mit einer 1:50 Vol. OBA:TechnoVit Lösung zur aktiven Kontrastierung eingebettet. Wie in Abschnitt 4.28 erwähnt, werden auf diese Weise Durchscheinartefakte durch Fluoreszenzlicht gleichen Spektrums das Harzes verringert. Die passive Kontrastierung wurde wieder mit 0,3% Gew. Harz Sudan Schwarz durchgeführt.

Die Messergebnisse zeigen deutliche Ähnlichkeiten bzgl. der Bildqualität zur Massefärbung mit demselben OBA in der Dosierung 1% Vol. Susp.. Die aktive Harzkontrastierung bewirkte, wie erwartet, weniger Durchscheinen, da das Harz mit derselben Fluoreszenzfarbe wie die durchscheinenden Fasern emittieren. Das hat aber auch zur Folge, dass der Bildkontrast (vor allem der Kontrast zwischen Fasern und Harz) sinkt. In Abbildung 4.30 sind Kamerabilder und binäre Schwellwertbilder dargestellt. Das Fluoreszenzbild (Grünkanal des RGB Bildes) wurde mit MATLAB aus dem RGB Bild extrahiert und als Grauwertbild abgespeichert. Das linke Binärbild wurde durch manuelle Segmentierung der Fasern erstellt, das rechte Binärbild ist eine Schwellwertbildung aus dem Grünkanalfluoreszenzbild.

Der Grünkanal des Fluoreszenzbilds zeigt geringes Durchscheinen und gute Bildschärfe. Wie bereits im Abschnitt 4.4.2 erwähnt, sind bei dieser hohen Konzentration des Aufhellers deutlich mehr Farb- bzw. Graustufen vorhanden, die vermutlich zu der besseren Bildschärfe führen.

Der Schwellwert zur Generierung des binären Bildes in Abbildung 4.30 wurde nach der bereits beschriebenen Methode in Kapitel 4.2.4 ausgewählt. Demnach sollte der Schwellwert so gewählt werden, dass sich Fehler durch falsch erkannte Fasern und nicht erkannte Fasern aufheben. Für eine 3D Messung einer Papierprobe, die mit dieser Technik gefärbt wurde, könnte der so gefundene Schwellwert zur automatischen Bildverarbeitung der restlichen Bilder des Bildstapels verwendet werden. In Abbildung 4.31 ist die Prozedur zur Schwellwertfindung exemplarisch dargestellt. Im oberen Teil sind die quantitativen Bewertungen, im unteren Teil sind die Überlagerungsbilder zur qualitativen Bewertung der Fluoreszenzfärbung abgebildet. Wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, wurde die pixelbasierende Analyse der binären Bilder mit Matlab durchgeführt.

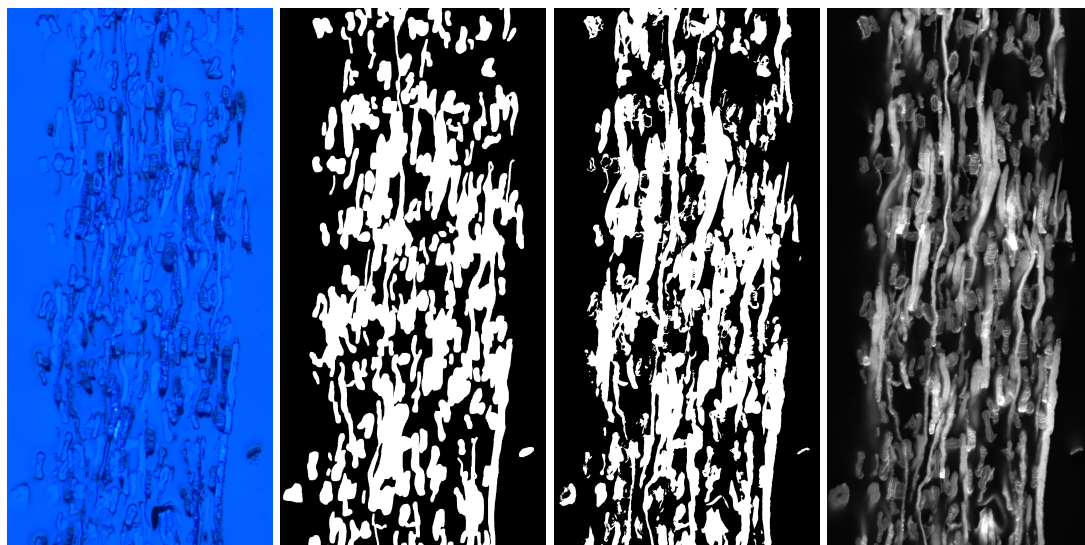


Abb. 4.30. Papierfärbung mit Tinopal UP. (von links nach rechts) Echtlichtaufnahme, manuell segmentiertes Binärbild, binäres Schwellwertbild aus dem Grünkanal der Fluoreszenzaufnahme, Graustufenbild des Grünkanals der Fluoreszenzaufnahme (erstellt mit MATLAB).

Das Bild in der Mitte zeigt den optimalen Fall für eine automatische Analyse. Artefakte in der Fluoreszenzmessung, die bei der Schwellwertbildung fälschlicherweise als Fasern erkannt werden, und Fasern bzw. Faserbestandteile, die beim Schwellwerten nicht erkannt wurden, heben sich zahlenmäßig auf. Auch bei der qualitativen Analyse des Binärbildes ergibt sich, wenn sich die Fehlertypen aufheben, die beste Übereinstimmung zum manuell segmentierten Bild.

Generell ist bei der Schwellwertbildung der Fluoreszenzbilder dieser Färbung zu bemerken, dass diese Art der Bildverarbeitung nicht optimal ist. Eine qualitative Beurteilung des Fluoreszenzbildes in Abbildung 4.30 zeigt sehr gute Bildqualität und geringes Durchscheinen. Für die Segmentierung dieses Bildes sollte eine etwas weiterentwickelte Segmentierungssoftware deutlich bessere Ergebnisse zeigen, als die Schwellwertbildung.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten weitere Versuche, eventuell auch Dosierungsversuche (wie in Abschnitt 4.4.2), zur Papierfärbung mit dem optischen Aufheller Tinopal UP und anderen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Färbung mit dem kationischen Fluorophor Rhodamine 123

Die Papierfärbung mit dem Fluorophor *Rhodamine 123* basiert, wie bei der Färbung mit optischen Aufhellern, auf physio-chemischen Prozessen. In der Arbeit von OZAKI ET AL. (2006A) wurde das Fluorophor *Sulforhodamine 101 acid chloride* verwendet um über elektrostatische Bindungskräfte Nassfestmittel in fertigem Papier zu färben. Da die Faseroberfläche, bedingt durch die Carboxylgruppen, negativ geladen ist, wird

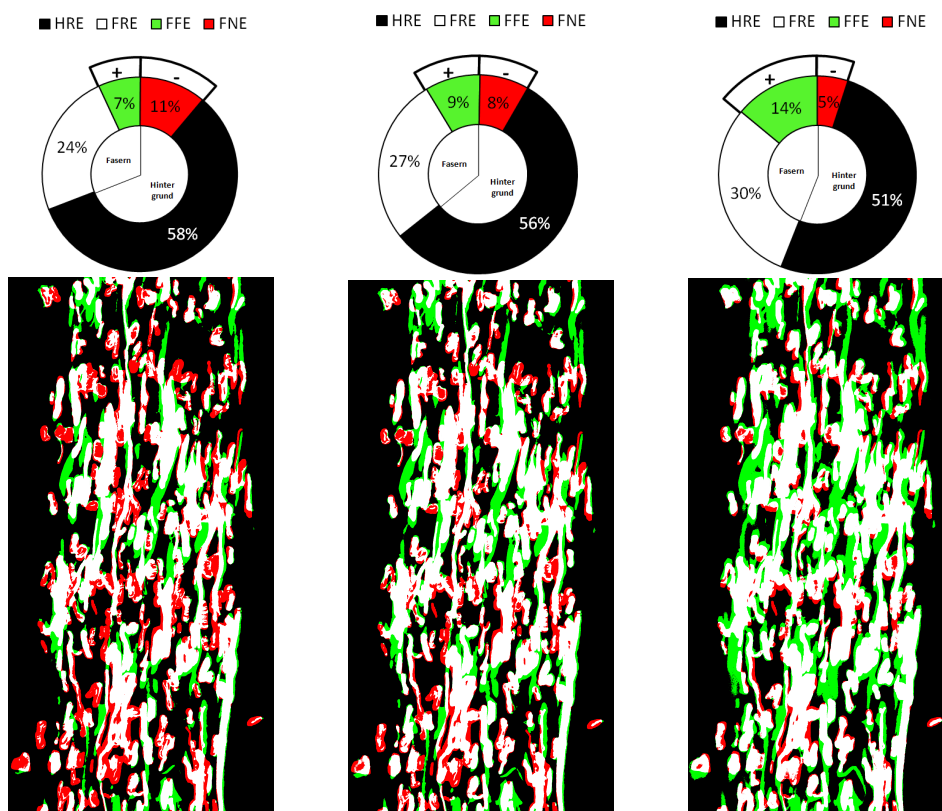


Abb. 4.31. Einfluss verschiedener Schwellwerte in der Papierfärbung auf die Fehlertypen. (links) Schwellwert 81, (mittig) Schwellwert 71, (rechts) Schwellwert 51. Beim optimalen Schwellwert heben sich die Fehler auf (Bild in der Mitte).

in diesem Färberversuch positiv geladenes *Rhodamine 123* verwendet. Kenndaten des Fluorophors sind in Tabelle 4.6 gelistet.

Bezeichnung	Rhodamin 123
Molekulargewicht	380,82 g/mol
Lösbarkeit in H ₂ O	1 mg/ml
Lösbarkeit in EtOH	1 mg/ml
empfohlene Dosierung	k.A.
Spektrum	512/531nm
Filterwürfel	GFP
Summenformel	$C_{21}H_{16}N_2O_3 \cdot HCl$
CAS Nummer	62669-70-9

Tabelle 4.6. Kenndaten des Fluorophors Rhodamine 123.

Dieses Fluorophor ist ein Derivat von Fluorescein, wie in Abbildung 4.32 zu sehen ist. Durch Abgabe von Chlor wird das Fluorophor positiv geladen. Dazu wurde bei der Färbung das polare Lösungsmittel EtOH verwendet.

Zur Färbung wurden, die in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen, ungefärbten Laborpapier-

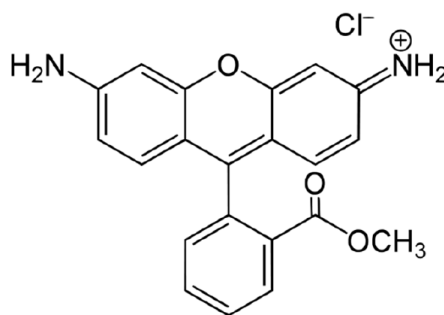


Abb. 4.32. Strukturformel Rhodamine 123.

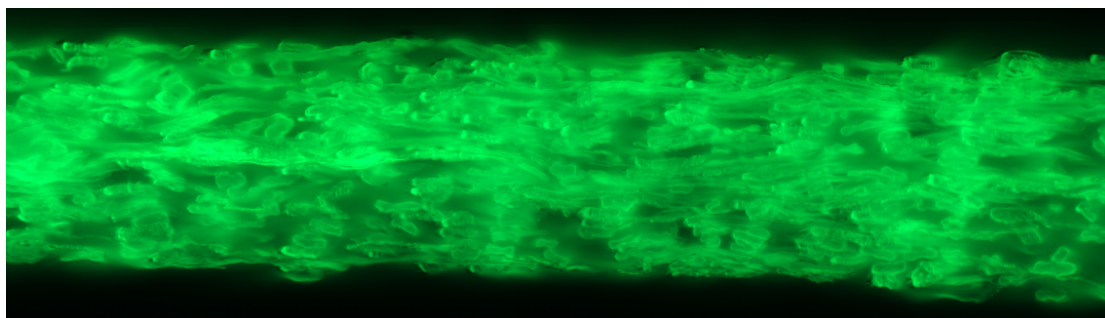


Abb. 4.33. Eukalyptuszellstoffpapier gefärbt mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rhodamine 123

sorten verwendet. Da keine Literatur für die Färbung mit Papier gefunden wurde, sind die Parameter der Arbeit von DARZYNKIEWICZ ET AL. (1981) zur Zellfärbung mit Rhodamine 123 als Richtwert für die Papierfärbung verwendet worden. Es wurden Papierproben entnommen und in drei unterschiedlich dosierten Lösungen für 20 Minuten gefärbt. Die EtOH - Rhodamine 123 Dosierungen waren 5, 50 und 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nach diesen 20 Minuten wurde ein Teil der Proben in einer reinen EtOH Lösung ausgewaschen, um Färbemittelreste aus dem Papier zu entfernen. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet, mit passiver Harzkontrastierung (0,3% Gew. Harz Sudan Schwarz) in TechnoVit 7100 eingebettet und für die Messung am $\mu\text{STRUCSCOP}$ Messsystem vorbereitet.

Die Messergebnisse der nicht ausgewaschenen Proben zeigten bei der höchsten Dosierung die bessere Bildqualität. Folgende Abbildung 4.33 zeigt mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gefärbtes Eukalyptuslaborpapier. Die Messung erfolgte mit dem Filterwürfel GFP.

Wie vermutet, wurden die Faserwände deutlich besser gefärbt, als die restliche Faserbestandteile. Neben dem Durchscheinen zeigte sich auch eine unspezifische Färbung des Harzes zwischen den Fasern. Vermutlich haben sich beim Einbetten Farbstoffmoleküle von den Fasern gelöst. Entweder wurde das durch nicht gebundenes Färbemittel verursacht, oder das Einbettmittel ist polar genug um die elektrostatischen Bindungen zu trennen.

Für eine automatische Bildverarbeitung ist diese Färbung nicht verwendbar. Auf-

grund der deutlichen Färbung der Faserwände sollte diese Art der Faserfärbung aber weiter untersucht werden. Eventuell liefern andere Dosierungen, kürzere Färbezeiten oder bestimmte Lösungsmittel für das Auswaschen, bessere Bildqualität.

Färbung mit Fluorophoren spezifizierter Molekülgröße

Nach der Arbeit von STONE UND SCALLAN (1968) sind die Poren der Faserwände von in Wasser gequollener Zellulose, hergestellt nach dem Sulfit- und Sulfatverfahren, kleiner als 60nm. Die Hypothese für die Färbung ist, dass die Fluorophore aufgrund ihrer Molekülgröße nicht in die Faser penetrieren können. Die Färbung der Papierprobe würde sich damit ausschließlich auf die Faserzwischenräume beschränken.

Die Besonderheiten, der bei dieser Färbetechnik verwendeten Fluorophore, sind ihre genau spezifizierte Größe von 100nm bei *Fluoresbrite FY* und die spezifizierte molekulare Masse von $2 \cdot 10^6$ g/mol bei *Fluorescein markierte Dextrane*. Diese molekulare Masse kann in den hydrodynamischen Durchmesser (auch Stoke'schen Radius) von 85,3nm umgerechnet werden - siehe auch HORVATH (2008).

Wie Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop zeigten, legten sich die Mikrokugeln gleichmäßig an die Oberflächen der Fasern an. Diese Mikrokugeln sind aus Polystyrene aufgebaut und werden beim Einbetten in das Kunstharz TechnoVit 7100 und JB4 beschädigt. Infolge dessen tritt das in den Kugeln eingeschlossene Fluorophor aus den beschädigten Kugeln aus und diffundiert in die Fasern. Die Messergebnisse der μ STRUCSCOP Methode zeigen Stellen an denen Fasern dunkel sind und von dem grünen Fluoreszenzlicht der Mikrokugeln umgeben sind. Größtenteils sind die Kugeln aber soweit beschädigt worden, dass eine unspezifische Färbung der Fasern und des Harzes die Folge waren. Nach Rückfrage der Hersteller der fluoreszierenden Mikrokugeln, Polysciences, konnte ein Einbettmittel gefunden werden, das mit diesen Polystyrene Kugeln kompatibel ist. Dieses Einbettmittel ist aber nur in kleinem Maßstab für die Durchlichtmikroskopie zwischen Objektträgern einsetzbar.

Auch die Messergebnisse der Fluorescein markierten Dextrane zeigte eine unspezifische Färbung. Auch hierbei sind die Fluorophore durch das Einbettmittel beschädigt worden, sodass diese keine definierte Molekülgröße mehr aufgewiesen haben. Vermutlich sind die Dextrane (Biopolysaccharide) nicht robust genug, um die Polymerisierung des Kunstharzes zu überdauern.

Färbung mit dem inonenselektiven Fluorophor Calcium Green 1

Bei dieser Färbetechnik soll der Füllstoff Kalziumkarbonat in Laborpapier durch Fluoreszenzmethoden lokalisiert und visualisiert werden. Bei künftigen Entwicklungen mit weiterer Bildverarbeitung könnte diese Methode die automatische Messung der 3D Füllstoffverteilung ermöglichen.

Als Papierprobe wurde, das in Abschnitt 4.2.1 hergestellte Eukalyptuslaborpapier, mit 30% CaCO_3 Füllstoffanteil verwendet. Es wird angenommen, dass genügend freie

Kalziumionen im Bereich des Füllstoffs vorhanden sind, um diese mit speziellen ionenselektiven Fluorophoren zu detektieren. Folgende Abbildung zeigt die Strukturformel von Kalziumkarbonat (CaCO_3).

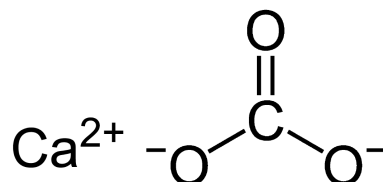


Abb. 4.34. Strukturformel CaCO_3

Kalziumkarbonat ist mit nur 14 mg/l schlecht wasserlöslich. Wird es gelöst, entstehen freie Kalziumionen. Da sich im Laborpapier nur Eukalyptusfasern bzw. Holzstofffasern und das Kalziumkarbonat befinden, sollten theoretisch keine freien Kalziumionen vorhanden sein. Das detektierende Fluorophor muss also eine hohe Sensitivität aufweisen. Es ist eine große Anzahl an verschiedenen Kalziumindikatoren bei dem Hersteller *Life Technologies*¹⁵ kommerziell verfügbar - siehe auch INVITROGEN (2010). Die Signalisierung der Detektion passiert u.a. durch Änderung der Fluoreszenzwellenlänge oder durch eine Änderung der Fluoreszenzintensität. Gewählt wurde der Indikator *Calcium Green 1*. Verglichen mit anderen verfügbaren Produkten (Fura, Indo, Fluo oder Oregon), bietet dieses Fluorophor die höchste Sensitivität mit Änderung der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Ca^{2+} Konzentrationen. Die Wellenlänge der Emission bleibt konstant. Folgende Tabelle 4.7 listet wichtige Parameter des Fluorophors.

Bezeichnung	<i>Calcium Green 1 dextran, Potassium Salt</i>
Molekulargewicht	70.000 g/mol (Dextralgewicht)
Stoke's Radius	5.8 nm
Lösbarkeit (Dextrane)	H_2O , Glycerin, Ethylenglycol, u.a.
Spektrum	506/531nm
Filterwürfel	GFP
$F_{\text{Ca}}/F_{\text{free}}$	~ 14
Detektionsgrenze Kalzium k_d	190nM(Datenblatt) / 238nM(Etikett)

Tabelle 4.7. Kenndaten des Fluorophors Calcium Green 1. Besonders der Parameter k_d ist zu beachten, da dieser die Sensitivität auf Kalziumionen kennzeichnet.

Die beiden wesentlichen Kennwerte sind die Detektionsgrenze k_d und der Unterschied der Fluoreszenzintensität bei Detektion $F_{\text{Ca}}/F_{\text{free}}$. Die Detektionsgrenze k_d ist eine der geringsten der verfügbaren Kalziumindikatoren (anzumerken ist hier, das am Etikett des Produkts ein anderer k_d Wert angegeben ist wie im Datenblatt). Die Signalisierung einer Kalziumdetektion ist bei einigen anderen Fluorophoren besser (z.B. ist

¹⁵Life Technologies Corporation www.lifetechnologies.com

F_{Ca}/F_{free} Oregon Green 488 BAPTA-2 gleich 100 bei). Das führt zu besserem Bildkontrast und folglich zu einer effektiveren Bildverarbeitung bzw. einer automatisierbaren Schwellwertbildung.

Messungen von Kalzium durch Fluoreszenzmethoden werden normalerweise in lebenden Zellen angewendet, daher ist die Verfügbarkeit von Parametern für Papieranwendungen gering, bis nicht vorhanden. Zwar sind in EtOH lösliche Fluorophore lieferbar, diese fluoreszieren aber erst nach der Esterase. Unmittelbar für die Messung vorbereitetes *Calcium Green 1* ist nur gekoppelt an Dextranen verfügbar. Diese wiederum lassen sich, wie in Tabelle 4.7 gelistet, nur in für Papier schlecht geeigneten Lösungsmitteln, wie Wasser oder Glycerin, lösen. Für detailliertere Daten siehe Fluorophorhersteller¹⁶ und Dextranhersteller Pharmacosmos¹⁷.

Eine funktionelle Eigenschaft von *Calcium Green 1* ist der lineare Zusammenhang zwischen der Ca^{2+} Ionenkonzentration und der Fluoreszenzintensität. Die empfohlene Dosierung für einen linearen Messbereich ist ($0.1 * k_d \leq \text{Dosierung} \leq 10 * k_d$). Für die Evaluierung einer Ca^{2+} Verteilung in der vorliegenden Arbeit, war diese Funktion sekundär, und wie sich herausstellte, waren diese niedrigen Dosierungen, aufgrund der zu geringen Kamerasensitivität, nicht realisierbar.

Zuerst wurde eine Basislösung in hochreinem H_2O angesetzt. Die Konzentration dieser Basislösung war $75 * k_d$ (ca. 18nmol/ml). Die zur Färbung verwendeten Dosierungen waren k_d , $10 * k_d$, $75 * k_d$ und $150 * k_d$. Die Lösungen wurden in Küvetten mit hochreinem Wasser vorbereitet. Die Proben wurden kurz in die Lösung eingetaucht. Bei den großen Dosierungen wurde die Färbelösung mit der Mikropipette aufgetropft. Nach Lufttrocknung wurden die Proben in reinem TechnoVit eingebettet und einen Tag nach dem Aushärten mit dem μ STRUCSCOP Messsystem gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die Dosierungen k_d und $10 * k_d$ eine zu geringe Fluoreszenzintensität für die Kamera haben. Bei den höheren Dosierungen war ein deutliches Fluoreszenzsignal messbar. Folgende Abbildung 4.35 zeigt gefärbtes Eukalyptuspapier mit der Dosierung $75 * k_d$.

Wie bereits erwähnt, ist eine quantitative Bewertung hier nicht möglich, da keine Schwellwertbildung des Fluoreszenzbildes möglich ist. Das mittlere Bild in Abbildung 4.35 dient der qualitativen Bewertung. Dazu wurde der Füllstoff aus dem Echtlichtbild und die hellen Stellen im Fluoreszenzbild manuell segmentiert und überlagert.

Die Linearität ist zwischen Fluoreszenzintensität und Kalziumionenkonzentration, wie oben erwähnt, bei diesen hohen Dosierungen nicht mehr gegeben. Die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 4.35 (Bild rechts) wurde mit größerer Farbsättigung aufgenommen, kann also geringfügig Artefakte in der Bildstruktur enthalten (siehe Abschnitt 4.2.5). Das Überlagerungsbild in der Mitte zeigt eine eindeutige Korrelation zwischen Füllstoffposition und helleren Fluoreszenzsignalen. Wie zu erwarten, sind

¹⁶Life Technologies Corporation www.lifetechnologies.com

¹⁷Pharmacosmos A/S. www.dextran.net

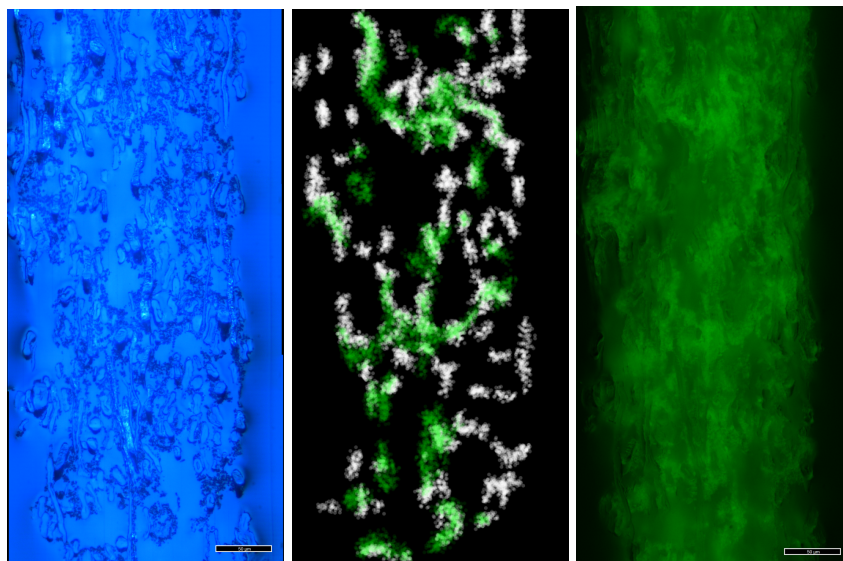


Abb. 4.35. Papierfärbung mit *Calcium Green 1* von Laborpapier aus Eukalyptuszellstoff und 30% CaCO_3 als Füllstoff. Das Bild (links) zeigt die Echtlichtaufnahme, das Bild (rechts) zeigt das Fluoreszenzbild. Das Bild in der Mitte zeigt die Überlagerung der manuell segmentierten Positionen der Füllstoffe. Weiße Bereiche sind dem Echtlichtbild zugeordnet, die grünen Bereiche sind dem Fluoreszenzbild zugeordnet.

Stellen mit mehr Füllstoff sicherer detektierbar als vereinzelte Füllstoffstellen (siehe einzelne weiße Bereiche im Überlagerungsbild). Prinzipiell können ebenfalls Durchscheinartefakte auftreten. Daher sollten auch diese Messungen künftig ebenfalls mit passiver Harzkontrastierung erfolgen. Anzumerken ist noch, dass bei Messungen derselben Probe, nach einer Woche die Fluoreszenzintensität, trotz lichtgeschützter Lagerung, deutlich abgenommen hat. Daher ist zu empfehlen, diese Messungen kurz nach dem Einbetten durchzuführen oder einen Indikator zu verwenden, der photostabiler ist, wie z.B. *Fluo-3*.

Problematisch bei dieser Färbung ist die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel. Einerseits wird die Papierstruktur damit verändert, und andererseits werden durch die Färbung mit der wässrigen Lösung auch zusätzlich freie Kalziumionen entstehen, die, wenn sie ihre Lage verändern, auch die Lokalisierung der Füllstoffe verschlechtern.

Wie sich Kalziumkarbonat beim Einbetten mit Technovit verhält ist unklar. Vermutlich löst sich ebenfalls ein geringer Anteil des Füllstoffs im Einbettmittel, das konnte aber nicht nachgewiesen werden und ist für eine reine Lokalisierungsmessung auch unkritisch.

Kalziumionen können auch bei der Laborblattbildung durch das Leitungswasser in das Papier eingebracht werden. Diese sind durch den Herstellungsprozess bedingt gleichverteilt im ganzen Papier und werden den gemessenen Unterschied der Fluo-

reszenzintensitäten verringern. Für Referenzzwecke sollte daher, bei künftigen Messungen mit diesem Fluorophor, die Blattbildung mit destilliertem Wasser erfolgen, um den Einfluss der Kalziumionen, aus dem Leitungswasser, zu bestimmen.

4.5. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden verschiedene Möglichkeiten für die Messung von Papier mittels Fluoreszenzmethoden vorgestellt, adaptiert, durchgeführt und evaluiert. Einige ausgewählte Methoden können in weiterer Folge für die automatisierte Messung von 3D Bilddaten verwendet werden. Der dabei erreichbare Bildkontrast zwischen Fasern und Poren ist deutlich besser als in den konventionellen Echtlichtaufnahmen. Zur Vorgehensweise einer Auswahl von Färbemitteln zur Markierung von Proben wurde eine etablierte Methode aus der medizinischen Analytik bzw. Histologie prinzipiell dargestellt. Es zeigte sich, dass besonders die spektralen Eigenschaften eines Färbemittels mit den vorhandenen Hardwareressourcen des Messsystems abgestimmt werden müssen.

Weiters wurden mögliche Artefakte, die während der Vorbereitung und durch die Messung auftreten können, erläutert. Diese Artefakte sind zum Teil akzeptabel bzw. können für die jeweilige Anwendung vernachlässigt werden. Artefakte, die durch Durchscheinen von Fluoreszenzlicht von unter der Probenoberfläche auftreten und so u.a. den Bildkontrast verringern, haben sich als das derzeit störendste Problem erwiesen.

Zur Evaluierung der Qualität einer Fluoreszenzfärbung, und damit auch als Parameter für die Strategie der Auswahl der Fluorophore verwendbar, ist die dargestellte Überlagerungsmethode und die Methode zum pixelbasierenden Vergleich. Diese kann nicht völlig automatisiert werden, kann aber zur gezielten Schwellwertfindung für 3D Bilddaten von Papier eingesetzt werden.

Die primäre Fluoreszenz zeigte nur bei den Holzfaserstoffen ausreichende Intensität für eine Messung. Da eine Schwellwertbildung möglich ist, wird die primäre Fluoreszenz in Kapitel 5 zur automatisierten Messung der Porosität verwendet. Laborpapier aus gebleichten Zellstoff hatte für den vorhandenen Messaufbau zu geringe Fluoreszenzemissionen.

Bei der Probenvorbereitung und Messung der gefärbten Proben können eine Reihe von Artefakte auftreten, die größtenteils vermieden werden können. Ein prinzipiell nicht verhinderbares Artefakt ist das Durchscheinen von Fluoreszenzlicht von unter der Oberfläche. Dieses diffuse Licht verringert deutlich den Bildkontrast zwischen Papierfasern und den Poren (Harz). Bei dichten Stellen im Fasernetzwerk wird dadurch, aufgrund der Durchscheinartefakte, eine Segmentierung der Einzelfasern unmöglich. Die vorgestellte passive und aktive Harzkontrastierung verringert diese Artefakte deutlich.

Der Einsatz von Methoden zur sekundären Fluoreszenz wurde anhand einer Auswahl prinzipiell verschiedener Chromophore und Fluorophore evaluiert. Es sind zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Arbeit nur wenig andere Arbeiten zur Färbung von Papier und Papierstrukturen vorhanden. Daher wurde eine Reihe von bekannten Färbetheorien aus der Literatur mit drei Färbemethoden für die Papierfärbung kombiniert. Diese vorgestellten Methoden sind die unspezifische Färbung des Einbettmittels (Harzfärbung), die Färbung der Fasersuspension (Massefärbung), die Färbung von fertigem Papier (Papierfärbung) und Kombinationen dieser Methoden. Bei der Massefärbung wurde eine hohe Bildqualität nur mit unüblich hohen Dosierungen mit OBAs und dem Fluorophor Eosin,spirit festgestellt. Da die Färbung hierbei während der Papierherstellung passiert, ist die Färbung mit diesen Mengen nur im Labormaßstab sinnvoll.

Aufgrund der geringeren Durchscheineffekte bei der Kombination von Massefärbung und Papierfärbung mit passiver und aktiver Harzfärbung wird eine passive Kontrastierung mit Sudan Schwarz ständig durchgeführt. Eine zusätzliche aktive Kontrastierung mit dem Fluorophor Macrolex FG zeigte ebenfalls eine Verringerung der Durchscheinartefakte. Zusätzlich wurde bei dieser Mehrfachfärbung die Möglichkeit skizziert die Segmentierung der Fasern basierend auf der Farbinformation durchzuführen.

Einige Ergebnisse der Papierfärbung zeigten sehr ähnliche Ergebnisse wie in der Massefärbung. Da hier nur kleine Papierproben gefärbt werden, sind unüblich hohe Dosierung bzgl. der Menge der zu färbenden Fasern unkritisch. Durch den Einsatz von Wasser als Lösungsmittel, für den optischen Aufheller Tinopal UP, wird jedoch die Papierstruktur verändert.

Zur Lokalisierung der Füllstoffe in Laborpapier wurden ein Kalziumionen Indikator getestet. Eine eindeutige Korrelation zwischen Füllstoffen in der Echtlichtaufnahme und dem Fluoreszenzlicht wurde festgestellt. Auch war nur ein wasserlöslicher Indikator beim Hersteller verfügbar.

Anwendungsbeispiele für die Messung von 3D Strukturen

5.1. Einleitung

Nach einer Evaluierung verschiedener adaptierbarer Methoden mittels Fluoreszenz für die Papiertechnik, im Kapitel 4, werden in diesem Kapitel drei mögliche Anwendungen der μ STRUCSCOP Messmethode für die 3D Analyse vorgestellt. Diese sind:

- 1) Messung der Porosität von Papier** (Nutzung der primären Fluoreszenz von TMP Faserstoff zur Bestimmung der Porosität von Papier.)
- 2) Erstellung von 3D Modellen des Fasernetzwerks in Papier** (Durch die erreichbare Kontraststeigerung der Bilddaten durch die Färbung der Fasern mit Fluorophoren können, aus den gemessenen 3D Bilddaten, 3D Renderings der Fasernetzwerke erstellt werden.)
- 3) Erstellung von 3D Modelle tierischer Embryos** (Die Messung und Erstellung eines tierischen Embryos zeigt, dass das μ STRUCSCOP Messsystem auch in anderen wissenschaftlichen Gebieten, wie z.B. in der medizinischen Analyse, eingesetzt werden kann.)

5.2. Messung der Porosität von Papier

In diesem Abschnitt wird die Messung der Porosität unter Nutzung der primären Fluoreszenz von TMP Faserstoff mit der μ STRUCSCOP Methode skizziert und evaluiert.

5.2.1. Einleitung

Das Netzwerk aus Zellstoff- bzw. Holzstofffasern verschiedener Form bedingt Luftzwischenräume in Papier. Das Verhältnis dieses Porenvolumens zum Gesamtvolumen des Papiers wird nach FRANKE ET AL. (1978) als Porosität bezeichnet. In LEVIN UND SÖDERHJELM (1999) wird die Porosität daher als eine strukturelle, physikalische Eigenschaft von Papier definiert.

Gegenwärtig stehen ältere, teils normierte, und neuere Messmethoden zur Bestimmung der Porosität zur Verfügung. Die zugrunde liegenden Messprinzipien ermöglichen eine direkte oder indirekte Messung. Diese erfordern unterschiedlichen Aufwand, liefern unterschiedliche Genauigkeiten und geben unterschiedlich detailliert Information über die Porenstruktur. Für die indirekte Messung werden üblicherweise folgende Methoden verwendet:

- Messung der Permeabilität zur Bewertung der Porosität in Basispapier (z.B. die standardisierten Methoden der Norm DIN 5636 wie Schopper, Bendtsen, Sheffield und Gurley, oder die Methode nach Bekk),
- Quecksilberporosimetrie für Strich und Basispapier.

Direkte Messverfahren bilden Papier, und damit auch Porenstrukturen, hingegen visuell bzw. bildgebend ab. Das Messergebnis ermöglicht unmittelbar die Bestimmung der Porosität und gibt Einblick in die Porengeometrie. Zu diesen Messgeräten zählen das CLSM, die Elektronenmikroskopie (SEM), Mikrotomographen (μ CT), und die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte μ STRUCSCOP Methode (siehe auch Literaturrecherche in Abschnitt 2.1).

Folgende Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung der Positionierung von verschiedenen Messverfahren zur Bestimmung der Porosität.

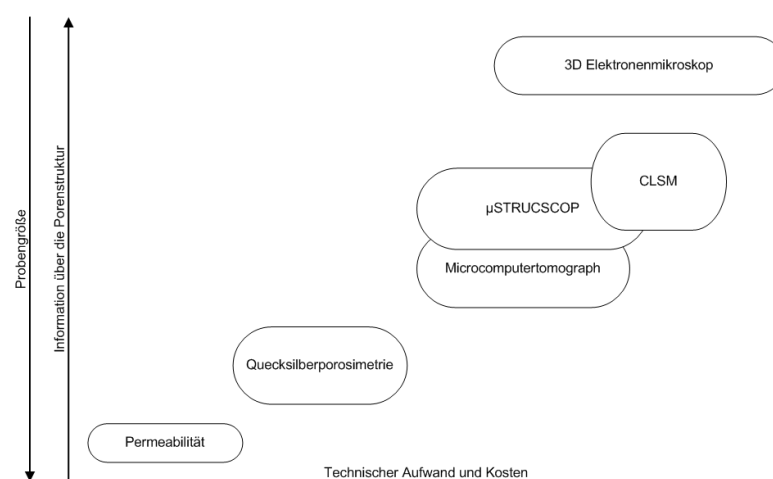


Abb. 5.1. Vergleich verschiedener Messmethoden zur Bestimmung der Porosität in Papier.

Die gegenläufigen Parameter Probengröße und Auflösung sind in der Abbildung 5.1 über technischen Aufwand, Probenvorbereitung und Kosten aufgetragen. Gegenwärtig sind bzgl. statistisch relevanter Probengrößen und Auflösung die Messverfahren CLSM, μ CT und μ STRUCSCOP sehr nahe aneinander platziert.

Die Poren werden prinzipiell in die Poren des Basispapiers (im Bereich ab $1\mu\text{m}$) und die Poren des Strichs (im Bereich unter $1\mu\text{m}$) geteilt. In der vorliegenden Arbeit werden aufgrund der physikalischen Grenze von optischen Mikroskopen nur Poren im Basispapier betrachtet.

Eine Methode, die Porosität von Papier automatisiert mit einem CLSM und Fluoreszenztechniken zu messen, wurden von JANG ET AL. (2011) vorgestellt - siehe Abschnitt 2.3. In dieser Arbeit berechnete die Bildverarbeitung aus den optisch geschnittenen Querschnittsbildern des Papiers den Anteil an Fasern und Poren. Wie bereits erwähnt ist die Anwendung eines CLSM auf optisch dünne Proben beschränkt. In der Arbeit von KOIVU ET AL. (2010) wurden Messungen der Poren mittels der Quecksilber Porosimetrie und dem in der Arbeit vorgestellten μ CT System kombiniert. Die verfügbaren Bilddaten lassen zwar keine Einzelfasern erkennen, eine eigens entwickelte Bildverarbeitung segmentierte aber die Poren und berechnete u.a. die mittlere Porengröße. Ein Vergleich zur Quecksilberporosimetrie zeigte Abweichungen der Messergebnisse bis zu 30% der mittleren gemessenen und berechneten Porengröße.

In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden eine mögliche Anwendung zur automatisierten Messung der Porosität mit dem μ STRUCSCOP Messsystem vorgeschlagen und detailliert erläutert.

5.2.2. Papierproben

Bei der Auswahl der Fluoreszenzmethode für die Porositätsmessung wurden die Ergebnisse aus Kapitel 4 verwendet. Diese Fluoreszenzmethode kann auch bei anderen ligninhaltigen Papierproben angewendet werden, sofern die Intensität der Fluoreszenzemission ausreichend groß ist (siehe Abschnitt 4.3).

In der vorliegenden Arbeit wurden aus der Langfaserfraktion TMP Faserstoff Laborblätter angefertigt (siehe Abschnitt 4.2.1). Vor der Blattbildung wurde der Faserstoff unterschiedlich lange mit der PFI-Mühle gemahlen und anschließend der Mahlgrad ($^{\circ}\text{SR}$) bestimmt. Mit standardisierten Methoden zur Messung der Permeabilität (siehe Abschnitt 5.2.1) wurden Referenzmessungen durchgeführt. Folgende Tabelle 5.1 zeigt die Parameter der untersuchten Laborblätter.

Wie zu erwarten zeigen alle Messungen die Abnahme der Permeabilität der Laborblätter bei steigendem Mahlgrad des TMP Faserstoffes. Dies lässt bekanntlich den Schluss zu, dass die Porosität mit steigendem Mahlgrad abnimmt. Aus den getesteten Stellen der Laborblätter wurden anschließend Papierproben entnommen und für die Messung am μ STRUCSCOP Messgerät vorbereitet - siehe Abbildung 5.2.

Um Messfehler durch lokale Dichteschwankungen des Fasernetzwerks zu verringern,

PFI Mahlung	Mahlgrad	Bendtsen	Gurley	BEKK
Umdrehungen	[°SR]	[ml/min]	[Gurley s]	[s]
0	14,8	>5000	0,8	2
8000	24,1	1368	9,2	7,7
12000	38,9	531	23,8	10,5

Tabelle 5.1. Parameter der Papierproben zur Porositätsmessung. Die unterschiedlich gemahlten Papiere wurden mit 3 üblichen Permeabilitätsmessungen zu Vergleichszwecken gemessen.

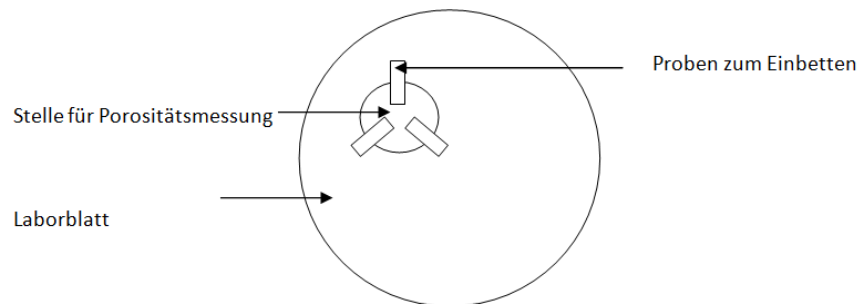


Abb. 5.2. Schematische Darstellung der Papierprobenentnahme aus den Laborblättern für die Messung mit den indirekten Messmethoden (Bendtsen, Gulrey und Bekk) und der direkten Messmethode μ STRUCSCOP.

wurden je Mahlgrad 3 Proben von den Laborblättern entnommen. Folgende Abbildung 5.3 zeigt die Echtlichtaufnahmen der 4 gemessenen Papierproben.

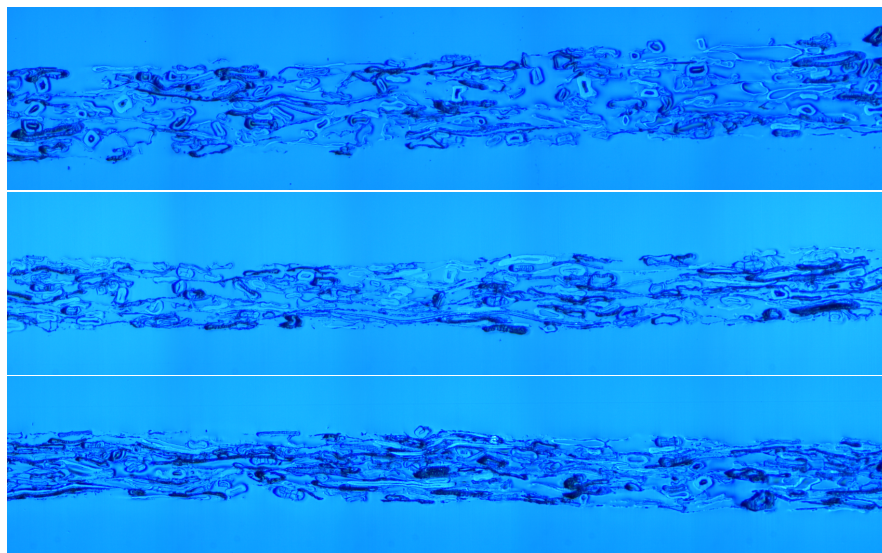


Abb. 5.3. Echtlichtaufnahmen der TMP Faserstoffproben für die Porositätsmessung. (von oben nach unten) PFI-Mühle ungemahlen, 8000 und 12000 Umdrehungen. Die Abmessung eines Bildes ist $(1,7 \times 0,3) \text{ mm}^2$.

Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der Papierdichte mit zunehmender Mahlung bei gleichbleibendem Flächengewicht von $80\text{g}/\text{m}^2$. Das Fasernetzwerk in den dargestellten Papierquerschnittsbildern wird mit zunehmenden Mahlgrad dichter.

5.2.3. Messung mit der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode und automatische Berechnung der Porosität in Matlab

Wie bereits erwähnt, wurden die Proben mittels der primären Fluoreszenz gemessen. Von jeder Mahlung wurden 3 Proben entnommen, die jeweils mit einer Schnittdicke von 12μ über 50 Ebenen gemessen wurden. Der Querschnitt der Papierprobenfläche (x,y) war $0,2 \times 1,7\text{ mm}^2$. In z-Richtung beträgt die Abmessung bei dieser Konfiguration der Messparameter $1,7\text{ mm}$. Die Belichtungszeit wurde auf den Maximalwert von 999 ms , die weiteren Kameraparmeter Gamma und Sättigung auf den default Wert 1 belassen. Verwendet wurde die UV Lichtquelle in Kombination mit dem Filterwürfel A (siehe Anhang D und C).

Die so gemessenen Bilddatensätze wurden anschließend mit einem Matlab Programm weiterverarbeitet. Die Schwellwertbildung erfolgte für jeden Datensatz individuell, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben. D.h. es wurde ein Schwellwert gesucht, der ein Binärbild generiert, in dem sich die Fehlertypen FNE (Faser nicht erkannt) und FFE (Faser falsch erkannt) gegenseitig aufheben. Mit diesem Schwellwert wurde ein Matlab Programm zur Abarbeitung der 50 Ebenen eingesetzt - siehe folgende Abbildung 5.4.

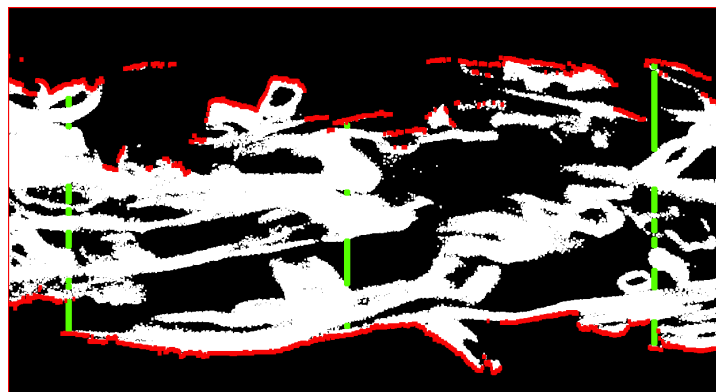


Abb. 5.4. Berechnung der Porosität mit Matlab (abgebildet ist ungemahltes Papier). (weiß) Binärbild des Fluoreszenzbildes, (rot) automatisch festgelegte Papieroberfläche, (grün) jedem Pixel entlang der exemplarisch dargestellten Linien innerhalb des Papiers wird eine Faser oder eine Pore zugeordnet. Die Abmessung des Bildes ist $(0,5 \times 0,2)\text{mm}^2$.

Dieses Programm generierte die Binärbilder aus den Fluoreszenzbildern und vermaß pixelbasierend entlang von Linien senkrecht zur Papieroberfläche die Porosität der Papierproben über den digitalisierten Querschnitt. Der für die Berechnung verwendete Rand der Papierprobe wurde, wie in Abbildung 5.4 dargestellt, einfach durch

den tatsächlich äußeren Rand des Papiers festgelegt. Wie in der Abbildung 5.4 links oben zu sehen ist, generiert das teilweise unrealistisch starke Sprünge der so definierten Oberfläche. Für weitere Untersuchungen wird zumindest eine Tiefpass Bildung der Ränder empfohlen, oder auf die bestehende Systeme in der Literatur hingewiesen (z.B. die "rolling ball method" siehe STERNBERG (1983)). Für jede Schnittebene wurde der Mittelwert aus den Einzelporositäten jeder Linie berechnet. Somit ergeben sich aus jeder Messung (bzw. für jede Probe) 50 Messwerte der Porosität (da 50 Schnittebenen). Insgesamt sind das schließlich 150 Messwerte für jede Mahlung (da 3 Proben entnommen wurden).

Zur Visualisierung der Streuung der gemessenen Porosität bei jeder Mahlung, wurden die Messergebnisse jeder Schnittebene in einem Histogramm dargestellt - siehe Abbildung 5.5.

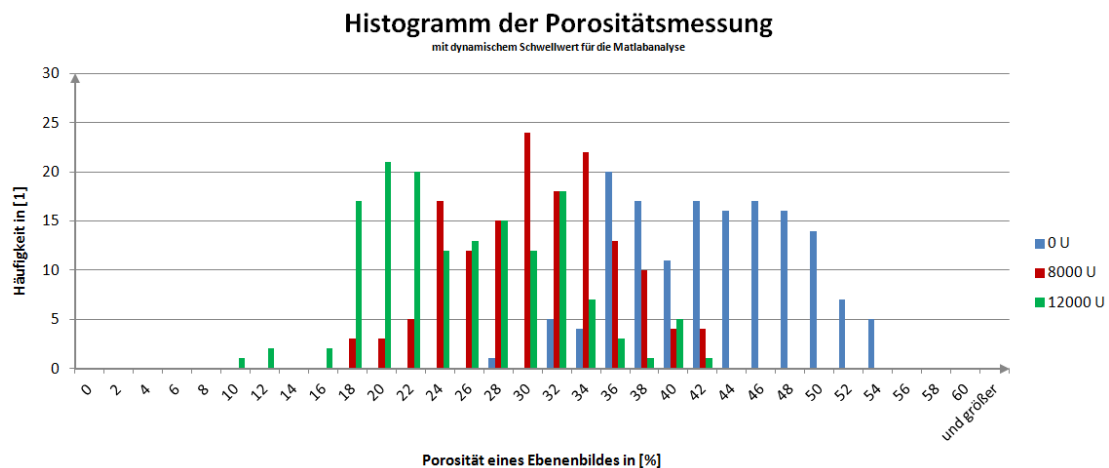


Abb. 5.5. Histogramme der gemessenen Porosität der Ebenenbilder von Holzstofflaborpapier mit unterschiedlichen Mahlgraden. Dargestellt sind ungemahlener TMP Faserstoff, und mit der PFI-Mühle (8000 und 12000 Umdrehungen) gemahlener TMP Faserstoff.

Alle drei Histogramme zeigen deutlich den Unterschied zwischen den Mahlungen. Beim ungemahlenem TMP Faserstoff ist die Verteilung relativ breit, von etwa 36 bis 50 zu finden. Der resultierende Mittelwert liegt bei ca. 42. Beim TMP Faserstoff, der mit 8.000 Umdrehungen gemahlen wurde, sind 3 Maxima zu sehen, bei 24, 30 und 34. Ansonsten fällt die Verteilung zu beiden Seiten hin stetig ab. Der Mittelwert der Porosität dieser Mahlung wurde mit ca. 30 berechnet. Auch beim TMP Faserstoff mit der größten Mahlung von 12.000 Umdrehungen sind wiederum 2 Maxima zu erkennen, bei 20 und 32, und die beiden Seiten der Verteilung fallen stetig ab. Der Unterschied zwischen den Mahlgraden bei 8.000 Umdrehungen ($24,1^\circ\text{SR}$) und 12.000 Umdrehungen ($38,9^\circ\text{SR}$) ist aus den Histogrammen nicht so deutlich zu erkennen wie der Unterschied zwischen ungemahlenem TMP Faserstoff und mit 8.000 Umdrehungen gemahlenem Holzstoff. Dies liegt zum Einen daran, dass mit 8.000 Umdrehungen

gemahlener Holzstoff schon stark zerkleinert ist und dadurch bei der Fluoreszenzmessung schwieriger zu handhaben ist (Schwellwertbildung, Durchscheinartefakte). Mit 12.000 Umdrehungen gemahlener Holzstoff ist mit seinem dichten Fasernetzwerk bei der Schwellwertbildung sehr schwierig handzuhaben. Deutliche Unterschiede zeigen sich zwischen wenig und stark gemahlenen Holzstoffen.

In folgender Abbildung 5.6 sind die Porositäten der gemessenen Papierproben dargestellt. Diese Ergebnisse sind die Mittelwerte aller gemessenen Porositäten für jede Mahlung.

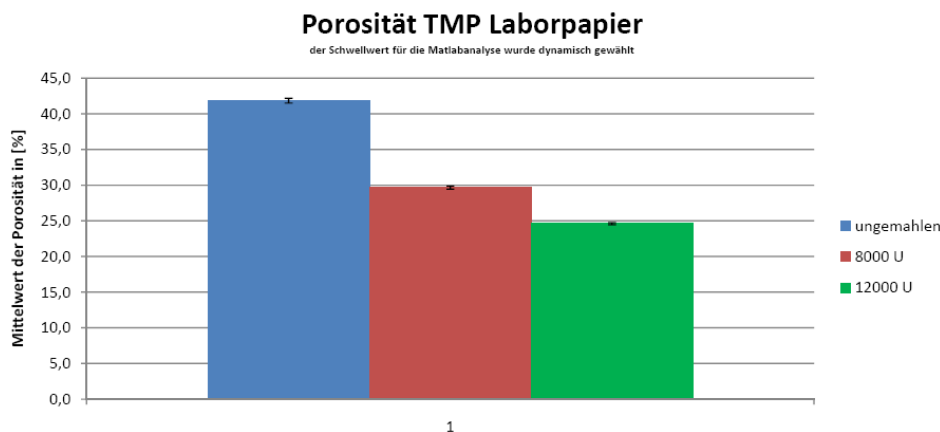


Abb. 5.6. Mittelwerte der gemessenen Porosität in TMP Faserstofflaborpapier unterschiedlicher Mahlung.

Aufgrund der hohen Anzahl von gemessenen Bildern bzw. Porositäten (150 je Mahlgrad) ist das Konfidenzintervall sehr klein. Damit sind alle Mittelwerte der Porosität der unterschiedlichen Mahlgrade hoch signifikant unterschiedlich. Der Mittelwert der Porosität des ungemahlenen TMP Laborpapiers ist in folgender Tabelle 5.2 zusammengefasst.

PFI Mahlung	Mahlgrad	Bendtsen	Gurley	BEKK	Porosität
Umdrehungen	[°SR]	[ml/min]	[Gurley s]	[s]	[%]
0	14,8	>5000	0,8	2	41,9
8000	24,1	1368	9,2	7,7	29,7
12000	38,9	531	23,8	10,5	24,6

Tabelle 5.2. Ergebnisse der Porositätsmessung. Mit steigendem Mahlgrad und sinkender Permeabilität sinkt, wie zu erwarten, die Porosität.

5.2.4. Diskussion

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich die Porosität durch das Messsystem μ STRUCSCOP zu digitalisieren und für weitere Bildverarbeitung zur Verfügung zu stellen. Die Genauigkeit aller gezeigten Messungen in Bezug aufeinander ist hoch, da

die Messparameter bei jeder Probe und Mahlung dieselben sind. Da sämtliche bildgebende Messverfahren (CLSM, μ CT und EM) zur Bestimmung der Porosität bis dato in Entwicklung sind, können Referenzmessungen der Porosität nur durch indirekte Messungen, wie z.B. der Permeabilität, durchgeführt werden.

Die Schwellwertbildung in den bildgebenden Messverfahren ist ein wichtiges Kriterium. In der vorliegenden Arbeit wurde für das erste Bild ein dynamischer Schwellwert gebildet, d.h. ein optimaler Schwellwert ermittelt und für den restlichen Bilderstapel verwendet. Das erfordert nur geringen Eingriff des Nutzers in die Analyse der Messergebnisse. Zusätzlich werden Einflüsse durch nicht konstant zu haltende Systemparameter (z.B. Lichtquellenintensität) auf diese verringert. Für eine größere Anzahl an Schnittebenen könnte der dynamische Schwellwert auch z.B. alle 50 Ebenen neu vergeben werden. Andererseits ermöglichen einmal festgelegte Parameter für die gesamte Messung einen einfacheren Vergleich zwischen den Messwerte (z.B. ein Schwellwert für alle Fluoreszenzbilder).

Ein weiterer Einflussfaktor ist die lokale Dichteschwankung der Fasernetzwerke. Um statistisch relevantere Aussagen zu bekommen, sollten mehrere mm^2 große Papierflächen auf ihre Porosität untersucht werden. Technisch möglich sind gegenwärtig mit dem μ STRUCSCOP System mind. $(5 \times 5)mm^2$ bei Probendicken bis über 2 mm.

5.3. Evaluierung einer 3D Rekonstruktion von gefärbten Laborpapier

3D Modelle von Papier ermöglichen theoretisch die gesamte geometrische Information der Papierrohmaterialien zu bestimmen. Wie schon im Kapitel 1 angesprochen sind allerdings bis heute nur unzureichend geeignete Messmethoden verfügbar.

Sehr gute Auflösung, bis in den nm Bereich, wird durch die Elektronenmikroskopie (EM) erreicht. In der Arbeit von ARONSSON (2002) wurden u.a. Segmentierungsalgorithmen von Fasern aus 3D Bilddatensätzen evaluiert. Weiters wurden Ansätze entwickelt, um innerhalb der 3D Modelle Distanzmessungen durchführen zu können, sowie die Porenverteilung zu bestimmen. Die Datensätze wurden ebenfalls mit einem Volumen Rendering Programm visualisiert. In den Arbeiten von CHINGA (2002) und CHINGA ET AL. (2004) wurden zusätzlich zu den 3D Modellen auch stereoskopische 3D Modelle bearbeitet. Diese hochaufgelösten Modelle zeigen Strichsegmente oder Papierproben die einige Fasern beinhalten. Zur Ausrichtung der Bildebenen untereinander wurden teilweise Kugeln als Marker verwendet, anhand derer, nach dem Schneiden mit dem Mikrotom, der 3D Bilderstapel aligned wurde. Wie bereits erwähnt, wird mit steigender Auflösung im SEM der Arbeitsaufwand größer und die Probengröße kleiner.

Kommerzielle μ CT Systeme erfordern wenig Arbeitsaufwand und bieten große Probenvolumina an. In der Arbeit von AXELSSON (2009) wurden monochromatische und

kommerzielle polychromatische Mikrotomographen zur 3D Messung von Karton evaluiert. Die kommerziellen Systeme sind zwar schon bei Auflösungen unter $1\text{ }\mu\text{m}$, der geringe Kontrast durch die Papierrohmaterialien basierend auf dem Messprinzip verringert aber die Bildqualität. In der Arbeit wurden u.a. einige 3D Volumenrenderings präsentiert, die, da mit Synchrotron aufgenommen, sehr gute Bildqualität lieferten. Basierend auf diesen Daten wurden verschiedene Methoden zur Poren- und Fasersegmentierung evaluiert. In der Arbeit von KOIVU ET AL. (2010) wurde mit einem kommerziellen, polychromatischen μCT System gemessen, und im Anschluss eine automatische Segmentierung der Poren durchgeführt. Die angegebenen 3D Volumen Renderings sind $(700 \times 700 \times \text{Papierdicke})\text{ }\mu\text{m}^3$ groß.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus zwei 3D Datensätzen, die im Folgenden vorgestellten 3D Volumen Rendering, mit dem Softwarepaket Amira rekonstruiert. Dazu sind mit dem Messsystem $\mu\text{STRUCSCOP}$ 3D Bilddatensätze erstellt worden. Die so gewonnen Fluoreszenzbilder wurden im Anschluss mit Irfan View in Graustufenbilder umgewandelt und in Amira eingelesen. Es wurden die Funktionen *Voltex* und *Orthogonal Segmentation* verwendet, um die 3D Renderings zu erstellen.

5.3.1. 3D Rekonstruktion von massegefärbtem Eukalyptuspapier

Von den vorgestellten Färbemethoden in Kapitel 4 wurden Proben aus der Massefärbung gewählt, die mit passiver Harzkontrastierung von 0,3% Gew. Harz Sudan Schwarz bearbeitet wurden. Die Messdaten der Kombination der passiven und aktiven Harzkontrastierung mit der Massefärbung würden, aufgrund der besseren Bildqualität, auch bessere Renderings liefern. Es stand aber keine Bildverarbeitung zur Verfügung, die eine Auswahl nach Farbe (wie in Abschnitt 4.4.3 vorgeschlagen) ermöglichte. Weiters können bzgl. Bildqualität auch 3D Papierdatensätze aus den Proben der Papierfärbung verwendet werden.

Für die Rekonstruktion wurden 2 verschiedene massegefärbte Papierproben aus Eukalyptuszellstoff verwendet. Zur Färbung wurde das Fluorophor Tinopal UP mit der Dosierung 1% Vol. Susp., zur Harzkontrastierung Sudan Schwarz mit der Dosierung 0,3% Gew. Harz verwendet - siehe auch Abschnitt 4.1 und 4.4.2.

Folgende Abbildung 5.7 zeigt ein Rendering mit 4 unterschiedlich schneidenden (y,z) Ebenen.

Für die Erstellung der 3D Daten wurden 200 Ebenen mit einer Schnittdicke von $2\text{ }\mu\text{m}$ gemessen. Für das 3D Rendering wurden nur die ersten 100 eingelesen. Das Bildfeld besteht aus 1×4 Bildern und hat damit eine Probenoberfläche (x,y) von $(0,2 \times 0,7)\text{ mm}^2$ bzw. ein Probenvolumen (x,y,z) von $(0,2 \times 0,7 \times 0,2)\text{ mm}^3$. Verwendet wurde ein $50\times$ Objektiv und mit der numerischen Apertur ergibt das eine Voxelgröße von $(124 \times 124 \times 2000)\text{ nm}^3$. Für die Fluoreszenzfilterung wurde der Filterwürfel A verwendet. Der RGB Fluoreszenzbilddatensatz wurde nach der Messung in den Grünkanal zerlegt, in Grauwertbilder umgewandelt und anschließend in Amira eingelesen.

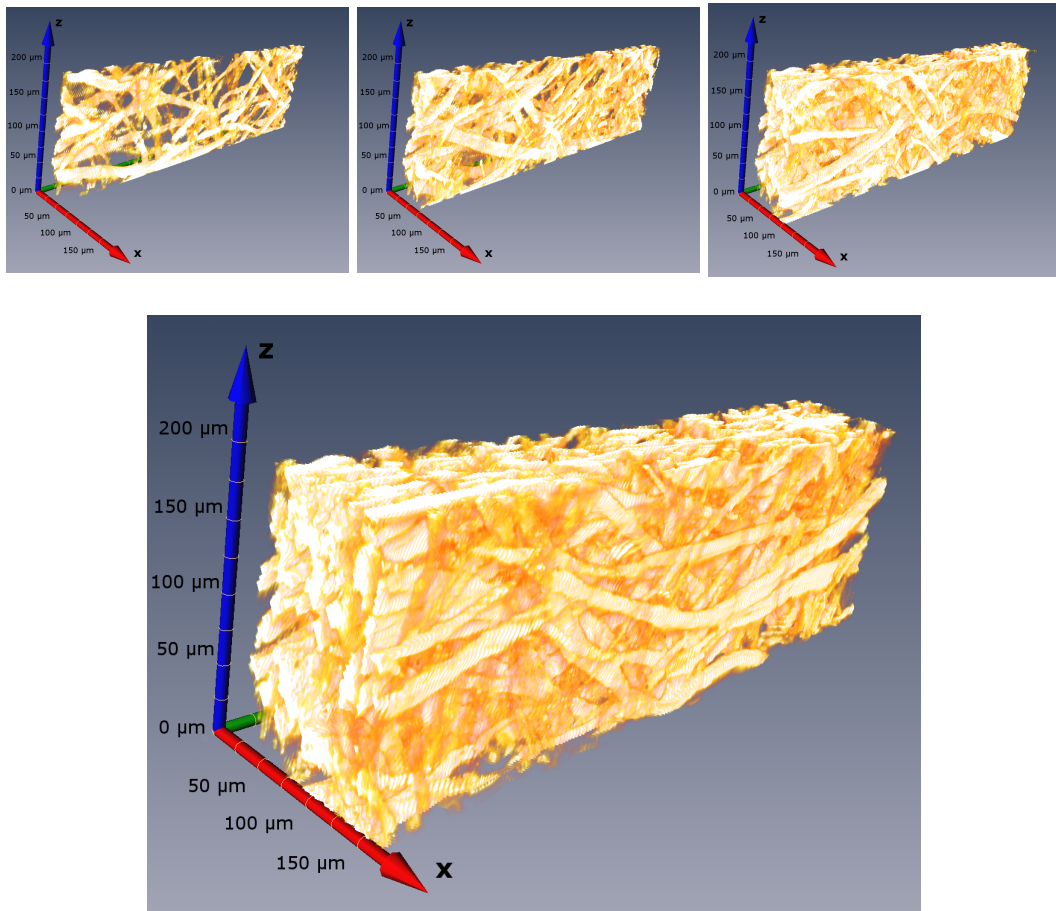


Abb. 5.7. 3D Volumenrekonstruktion einer Eukalyptuspapierprobe. Die obere Bildreihe stellt virtuelle Schnitte in der (y,z) Ebene dar. Das untere Bild zeigt die Hälfte der gemessenen Probe dar.

Für die zweite Probe wurde gleich gefärbtes Papier verwendet. Es wurden 30 Ebenen mit einer Schnittdicke von $4\mu\text{m}$ angefertigt. Wie sich zeigte ist das Rendering trotz halber Auflösung in z-Richtung nicht merklich schlechter. Die Probenoberfläche beträgt $(0,2 \times 0,2) \text{ mm}^2$ (ist 1 Bild). Verwendet wurde ein 50x Objektiv und mit der numerischen Apertur ergibt das eine Voxelgröße von $(124 \times 124 \times 4000) \text{ nm}^3$. Für die Fluoreszenzfilterung wurde der Filterwürfel A verwendet. Bei dieser Probe wurde die Kamerasättigung soweit erhöht bis der Blaukanal nicht mehr angezeigt wurde (Kamera zeigt nur noch den Grünanteil des Fluoreszenzbildes, siehe auch Abschnitt 3.3 RGB Kanäle der Kamera). Folgende Abbildung 5.8 zeigt die Amira Rekonstruktion.

5.3.2. Diskussion

Wie schon in Abschnitt 4.2.5 erwähnt, verringern Durchscheineartefakte die Bildqualität der 3D Bilddatensätze, und damit auch der 3D Renderings, maßgeblich.

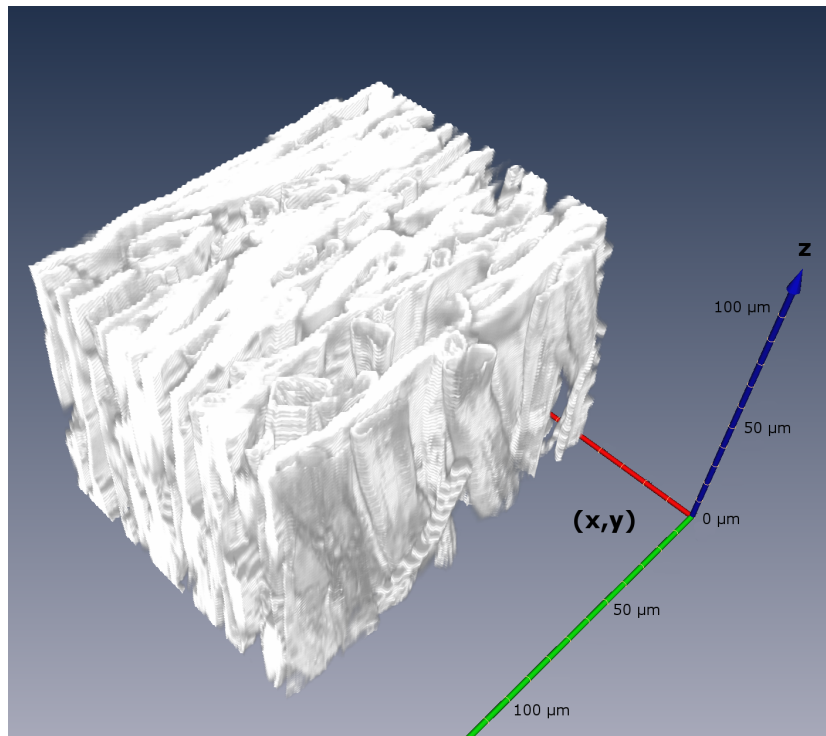


Abb. 5.8. 3D Volumenrekonstruktion einer weiteren Eukalyptuspapierprobe.

Das Programm Amira ermöglicht die dynamische Änderung eines Schwellwertes für die eingelesenen Graustufenbilder, sodass das Rendering laufend optimiert werden kann. Trotzdem wird die Bildqualität der Renderings in erster Linie durch geringeres Durchscheinen verbessert werden.

Abhängig von der Bildqualität sind Proben mit mehr oder weniger dichtem Fasernetzwerk für die 3D Rekonstruktion geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden Kurzfasern (Eukalyptus) verwendet. Proben mit weniger dichtem Fasernetzwerk (z.B. Karton) aus TMP Faserstoff verursachen zwar ebenfalls Durchscheinartefakte, diese sind aber, aufgrund der größeren Poren, beim Rendern weniger störend.

Wie bereits erwähnt, sind auch die Ergebnisse der Papierfärbung (Abschnitt 4.4.4) und der Mehrfachfärbung (Abschnitt 4.4.3) für diese Art der Volumenrekonstruktion geeignet. Ein 3D Modell der Füllstoffverteilung visualisiert mit dem Fluorophor *Calcium Green*, wie in Abschnitt 4.4.4, sollte ebenfalls möglich sein. Aufgrund der geringen Änderung der Fluoreszenzintensität bei Kalziumdetektion wurde dieser Rekonstruktion nicht durchgeführt. Ebenfalls möglich sollten 3D Modelle der Penetration von OBAs in das Papier sein.

Je nach Anwendung ermöglicht die μ STRUCSCOP Methode auch Probengrößen bis einige 100 mm^3 . Anzumerken sei, dass eine Volumenrekonstruktion keine Segmentierung von Papierrohmaterialien darstellt. Eine automatische Segmentierung der Roh-

materialien ist deutlich aufwendiger und befindet sich gegenwärtig in mehreren Forschungsgruppen in Entwicklung.

5.4. Evaluierung einer 3D Rekonstruktion eines tierischen Embryos

Im Folgenden wird eine Anwendung vorgestellt, die zeigt, dass das μ STRUCSCOP Messsystem auch in der medizinischen Analyse verwendet werden kann. Dieser Abschnitt entstand in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Anatomie und Zellbiologie der medizinischen Universität Wien.

5.4.1. Histologische Probe

Es wurden ein gentechnisch veränderter Stamm eines Mäuseembryos von Biomodels Austria zu einer 3D Rekonstruktion verwendet. Dieser Embryo wurde in einer 4%igen Paraformaldehyde Lösung, gepuffert mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), geliefert. Der Embryo wird vor dem Einbetten in einer aufsteigenden Ethanol Reihe von 70%, 80%, 90% und 96% für jeweils 2 Stunden entwässert. Danach wird der Embryo in einer gefärbten Infiltrationslösung (JB4) für 24h gefärbt. Die Dosierung beträgt 0,4g/100ml Eosin,spritlöslich. Abschließend wird der Embryo in dieses Kunstharz mit derselben Dosierung eingebettet.

5.4.2. Messung und 3D Rekonstruktion

Es wurden 1000 Ebenen mit einer Schnittdicke von $3\mu\text{m}$ gemessen. Verwendet wurde ein 10x Objektiv und mit der numerischen Apertur ergibt das in Amira eine Voxelgröße von $(618 \times 618 \times 3000) \text{ nm}^3$. Für die Fluoreszenzfilterung wurde der Filterwürfel GFP verwendet. Das Probenvolumen (x,y,z) ist mit 3x4 Bilder (2D Stitching) ca. $(2,8 \times 2,8 \times 3) \text{ mm}^3$. Im Folgenden ist die 3D Rekonstruktion dargestellt, die mit der Amira Funktion *Voltex* in Kombination mit einer virtuellen Schnittebene (y/z) durch den Embryo (Abbildung 5.9) dargestellt ist.

Der Messbereich wurde etwas zu klein definiert, daher sind am linken und am unteren Rand Teile des Embryos abgeschnitten. Ein anderer virtueller Schnitt (Abbildung 5.10) durch den Embryo zeigt Artefakte aufgrund unzureichender Struktur beim Stitching (siehe Abschnitt 4.2.5). Innerhalb des grünen Rahmens sind einzelne Segmente einiger Ebenen nach rechts verschoben, innerhalb des roten Rahmens sind einige Segmente nach links verschoben.

5.4.3. Diskussion

Wie oben erwähnt, treten Artefakte beim Stitching auf. Die Gründe dafür sind in Abschnitt 4.2.5 erläutert worden. Um die Robustheit der Bildverarbeitung zu erhö-

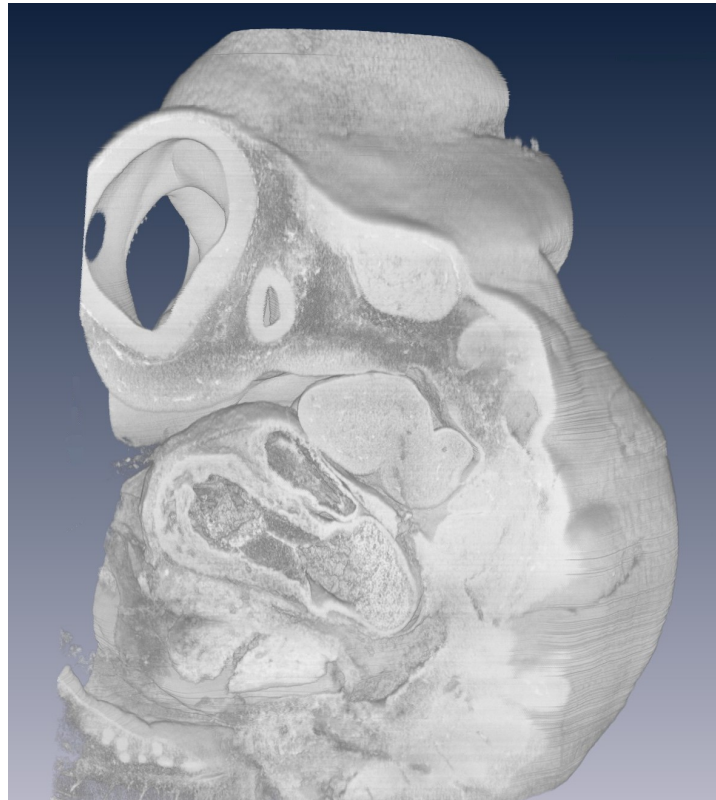


Abb. 5.9. 3D Rekonstruktion eines Mäuseembryos. Im Bildvordergrund ist eine virtuelle Schnittebene zu sehen, die z.B. im linken, mittleren Teil des Schnittes das Herz zeigt. Die Abmessungen des dargestellten Bildes sind $(2,7 \times 3) \text{ mm}^2$.

hen, werden extern in die Probe eingebrachte Marker vorgeschlagen. Die Arbeit von WENINGER ET AL. (1998) beispielsweise verwendet Marker, um die komplette Registrierungsprozedur der Bildverarbeitung abzuwickeln.

Ein weiterer Punkt ist die Wahl einer optimalen Vergrößerung. Für Strukturen, deren Dimensionen im Bereich von einigen $100 \mu\text{m}$ liegen, reicht eventuell auch ein Einzelbild aus, wenn keine Details digitalisiert werden müssen.

Das Aligning per Software ist hier prinzipiell stabiler, da bei der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode der relevante Bildbereich vom Benutzer definiert werden kann. Außerdem steht für große Strukturen die schnellere Variante von nur Hardware Aligning zur Verfügung, da die korrigierten Bildebenenversätze im Bereich von wenigen μm liegen.

Es konnte also mit diesen Messergebnissen der Einsatz der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode auch für histologische Proben bestätigt werden.

5.5. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden drei mögliche Anwendungen der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode skizziert und evaluiert.

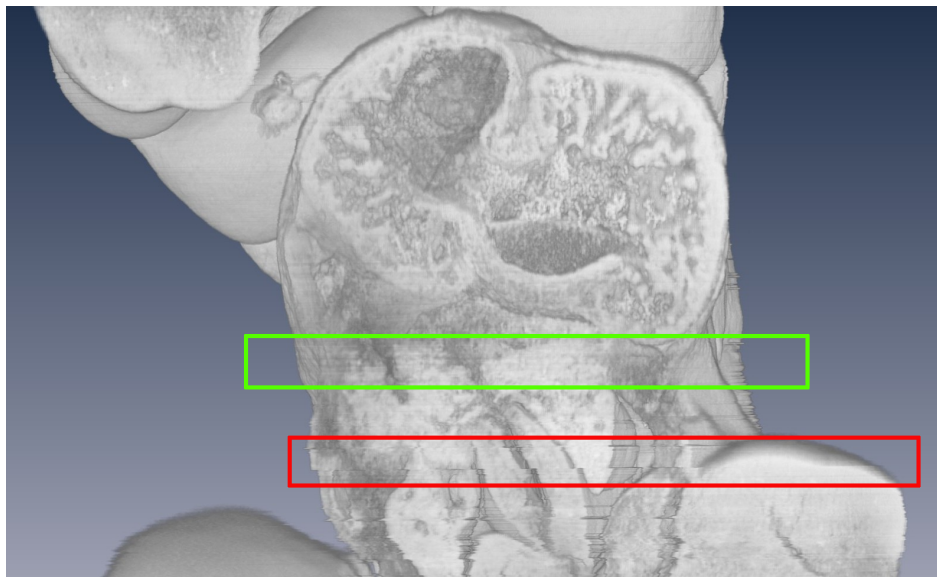


Abb. 5.10. Artefakte bei der 3D Rekonstruktion des Mäuseembryos. Der grüner und rote Balken zeigt versetzte Segmente der Bildebene die nur teilweise verschoben sind. Die Artefakte entstehen daher aufgrund von Stitching Problemen. Die Abmessungen des dargestellten Bildes sind $(1,5 \times 1) \text{ mm}^2$.

Mit der Messung von autofluoreszierenden Papieren kann die Porosität mit Auflösungen kleiner $1 \mu\text{m}$ und Probenvolumen von mehreren 100 mm^3 gemessen und anschließend mit einem MATLAB-Programm automatisch berechnet werden. Die Wahl des Schwellwertes hat sich dabei als kritischer Faktor ergeben und sollte in künftigen Messung eventuell nicht nur für die erste Ebene der 3D Bilddatensätze optimiert werden.

Weiters konnten 3D Rekonstruktionen von Papier und histologischen Proben gezeigt werden. Mit dem Bildverarbeitungsprogramm Amira wurden virtuelle Schnitte durch die Proben angefertigt. Diese Methode ist in der medizinischen Analyse Standard. In der Papiertechnik ist der Zugang zu Papierstrukturen mittels 3D Techniken erst einige Jahre alt. Damit ist der Zugang zu geometrischen Informationen von Papierproben möglich. Anzumerken ist, dass die Rekonstruktion der 3D Bilddaten keine Segmentierung der Papierrohmaterialien darstellt. Diese Anwendung ist ein eigener Bereich der Forschung und seit mehreren Jahren in verschiedenen Forschungsgruppen in Entwicklung.

Aufgrund der hohen Auflösung bei großer Probengröße des Messsystems $\mu\text{STRUCSCOP}$ sind weitere Anwendungsfelder in den Materialwissenschaften, z.B. Kunststoffindustrie, denkbar.

Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit reiht sich in einen langjährigen Innovationsprozess am Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik. Vorherige Dissertationen von WILTSCHKE (2006) und KRITZINGER (2010) lieferten die Basis für die vorliegende Arbeit.

Mit der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Papier bzw. der Kenntnis der Lage und der geometrischen Eigenschaften von Papierrohmaterialien können Rückschlüsse auf wichtige Papiereigenschaften gezogen werden. Bei geeignetem Bildkontrast sind verschiedene Methoden der Bildverarbeitung möglich. Diese Disziplin ist mittlerweile auf allen wichtigen verfügbaren bildgebenden Messsystemen in Entwicklung.

6.1. Die μ STRUCSCOP Methode

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte μ STRUCSCOP Methode stellt bzgl. Hardware und Software des Messsystems eine Weiterentwicklung dar. Die Anwendung von Fluoreszenzmethoden bei lichtmikroskopischen Analysen bewirken eine Kontraststeigerung in Bilddaten. Damit sind eine Reihe von zusätzlichen Möglichkeiten bei künftigen Entwicklungen in der Bildverarbeitung (z.B. Segmentierung von Papierrohmaterial) verfügbar.

Wie im Kapitel 3 beschrieben, ist zusätzliche Hardware und Software für eine online Bildverarbeitung in das Messsystem eingefügt worden. Dadurch konnte die wichtige Kombination aus Auflösung und Probengröße optimiert werden. Eine speziell entwickelte Steuerungssoftware mit grafischer Benutzeroberfläche macht eine Vermarktung, des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Verfahrens, durch einen Messgerätehersteller möglich.

Mit der μ STRUCSCOP Methode kann damit eine wichtige Lücke in den kommerziell

verfügbaren Messsystemen für die Papiertechnik geschlossen werden. Im Vergleich zu SEM und CLSM sind höhere Probengrößen (einige 100 mm^3) messbar. Die Auflösung ist dabei entkoppelt, also ändert sich nicht mit der Probengröße. Diese Probengrößen können nur mit einem μCT erreicht werden. Der mit Tomographen erreichbare Bildkontrast ist aber bei Anwendungen im Papierbereich geringer. Handhabung und Zeitaufwand sind bei der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode im Vergleich zu CLSM und SEM ebenfalls geringer. Der finanzielle Aufwand, des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Systems, ist jedenfalls geringer als bei anderen vergleichbaren Messsystemen.

6.2. Adaption von Fluoreszenztechniken für die Papieranalyse

In Kapitel 2 wurden Ergebnisse zu einer Literaturrecherche über Fluoreszenztechniken, angewendet auf die 3D Analyse von Papierstrukturen, dokumentiert. Aufgrund der geringen Zahl von Anwendungen, die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren, wurden in Kapitel 4 drei prinzipielle Färbemethoden für die Papieranalyse vorgestellt. Zur Auswahl von Fluorophoren zur Färbung der Papierfasern (Langfaser und Kurzfaser) wurde auf bestehende Färbetheorien zurückgegriffen. Dennoch ist eine Adaption von Fluoreszenzmethoden für die Papiertechnik ein sehr weites Feld, das auch weiterhin untersucht werden wird. Aus der Vielzahl an Fluorophoren wurden für die vorliegende Arbeit einige einfache bis sehr spezielle Fluorophore ausgewählt und evaluiert. Während den Messungen mit dem $\mu\text{STRUCSCOP}$ Messsystem konnten einige mögliche Artefakte beim Betrieb des Fluoreszenzmikroskops klassifiziert werden.

Die vorgestellten Methoden zur Messung der 2D und 3D Struktur von Papier mittels Fluoreszenz ermöglicht:

- die Auswahl von geeigneten Fluorophoren basierend auf verschiedenen Färbetheorien adaptiert für die drei vorgestellten Färbemethoden,
- die Anwendung von Labortechniken für die Färbung und Kontrastierung von Proben, sowie die Justierung der Hardware und Software angepasst für die Messungen bei Fluoreszenz,
- eine objektive Beurteilung zur qualitativen und quantitativen Bewertung der Färberesultate im Vergleich zu den manuell segmentierten (also idealen) Binärbildern der Echtlichtaufnahmen.

6.3. Anwendungsbeispiele

In Kapitel 5 wurden drei Anwendungsbeispiele der $\mu\text{STRUCSCOP}$ Methode vorgestellt. Die, mit der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Messmethode, generierten

3D Bilddaten können für weitere Anwendungen in der Bildverarbeitung verwendet werden. Ein kleiner Teil der möglichen Anwendungsfelder wurde in der vorliegenden Arbeit evaluiert. Diese waren die automatische Messung und Analyse der Porosität von TMP Faserstoffpapier, die Rekonstruktion von 3D Papiermodellen und die Rekonstruktion von histologischen Proben.

Der vorgestellte Ansatz zur **Messung der Porosität** von Papier wurde mittels der primären Fluoreszenz von TMP Faserstoffpapier durchgeführt. Dazu wurde der resultierende 3D Bilddatensatz des μ STRUCSCOP Messsystems mit einem dafür entwickelten Matlab Programm bearbeitet. Eine ausreichende Fluoreszenzintensität und ein geeigneter Schwellwert zur Generierung der Binärbilder sind ausschlaggebende Punkte bei dieser Anwendung. Als Vergleichswerte wurde die Messergebnisse standardisierter Messverfahren (Bendtsen, Gurley und Bekk) verwendet. Der Einfluss der Mahlung auf die Porosität konnte damit auch für das vorgestellte Messsystem μ STRUCSCOP bestätigt werden. Die verwendeten Probengrößen können mit dem bestehenden System um ein Vielfaches vergrößert werden. Damit sind, bei Auflösungen bis unter $1\ \mu\text{m}$, statistisch relevante Papierprobenflächen bis zu $100\ \text{mm}^2$ möglich.

Mit dem 3D Bildverarbeitungsprogramm Amira wurde eine **3D Rekonstruktionen von Papierproben** vorgestellt. Diese Eukalyptusproben wurden mit optischem Aufheller massegefärbt und liefern damit sekundäre Fluoreszenzemissionen. Prinzipiell können 3D Rekonstruktionen auch für andere Papiersorten durchgeführt werden. Aufgrund der unüblich hohen Dosierung der Fluorophore ist diese Anwendung nur für Laboruntersuchungen sinnvoll. Die besser handzuhabende Färbemethode der Papierfärbung kann zwar auch für Rekonstruktionen verwendet werden, diese sind aber bisher in einer OBA - Wasser Lösung gefärbt worden, was zu einer unerwünschten Veränderung der Struktur führt. Durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Rekonstruktionen sind qualitative Aussagen über das Fasernetzwerk möglich. Diese Anwendung ist aber klar von einer Segmentierung zu unterscheiden bei der die geometrische Information vollständig zur Verfügung steht. Die Bildqualität wird auch hier durch Durchscheinartefakte wesentlich begrenzt.

Das gezeigte Verfahren zur **3D Rekonstruktion histologischer Proben** ist ein Standard in den Messmethoden der medizinischen Analyse. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen Auflösungen bis unter $1\ \mu\text{m}$ die notwendigen Probengrößen gemessen werden können. Das vorgestellte 2D Stitching ermöglicht hier die hohe Auflösung, beinhaltet aber teilweise noch technische Schwierigkeiten in der Robustheit der Bildverarbeitung.

6.4. Ausblick

Erweiterungen des μ STRUCSCOP Messsystems

Die Ergebnisse der Messungen mit primärer Fluoreszenz zeigen die Anwendbarkeit für ligninhaltige Papiersorten. Für die Messung ist nur geringer Aufwand notwendig. Sinnvolle Erweiterungen können daher in der Hardware, in Form von UV Objektiven und leistungsstärkeren Lichtquellen, zu finden sein.

In der Software sind, je nach Anwendung, Erweiterungen sinnvoll. In der vorliegenden Arbeit wurden während den Laborarbeiten mit dem lauffähigen Messsystem ständig Steuerungselemente hinzugefügt oder angepasst. Der Programmcode wurde so entworfen, dass für weitere Anwendungsfelder einfach zusätzlicher Code eingefügt werden kann.

Adaption von Fluoreszenzmethoden für die Papieranalyse

Die primäre Fluoreszenz erfordert, wie oben beschrieben, für bessere Bildqualität Änderungen in der Hardware. Der geringfügige Eingriff in die Papierstruktur bei der Vorbereitung zur Messung spricht für diese Methode.

Allein die unüberschaubare Menge an Fluorophoren macht den Ausblick schwierig. Idealerweise sollten eigene Fluorophore für die chemische Struktur von Papierrohmaterial (z.B. von Zellstoffen oder Füllstoffen) entworfen werden. Teilweise sind solche Fluorophore in anderen Anwendungsfeldern bereits im Einsatz (z.B. in der Cellulosechemie). Inwieweit diese für eine geometriebasierende Bildanalyse adaptiert werden können muss letztlich im Labor getestet werden.

In weiterer Folge sollten auch andere Papierrohmaterialien gefärbt werden, um deren Position im Papier zu visualisieren. Vorstellbar sind hierbei z.B. die Füllstoffverteilung, die Latexverteilung oder die Verteilung eines Leimungsmittels im Papier.

Jedenfalls sollten, für eine optimale Bildqualität, weitere Entwicklungen bezüglich der Verringerung der Durchscheinartefakte durchgeführt werden. Wie in Kapitel 4 erwähnt sind diese Artefakte prinzipiell nicht zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurden bereits verschiedene Methoden evaluiert diese aber zu verringern. Interessant ist auch die Möglichkeit von undurchsichtigen Einbettmitteln, das das Durchscheinen zusätzlich verringert. Ebenfalls denkbar sind Fluorophore die erst dann fluoreszieren, wenn eine chemische Reaktion an der Oberfläche der Probe stattgefunden hat (z.B. nach der Esterase von speziellen Fluorophoren).

Anwendungen

Die Anwendungsfelder für diese Messmethode sind vielfältig. Begrenzungen sind die Härte der Probe (muss mit einer Diamantklinge schneidbar sein) und die maximale Auflösung lichtmikroskopischer Methoden. Neben dem Hauptanwendungsgebiet der

Papieranalyse werden auch weitere Anwendungen in der medizinischen Analyse (z.B. Blutgefäße, die in ähnlicher Größenordnung wie Papierfasern liegen) oder in den Materialwissenschaften (z.B. Kunststoffe, Verbundstoffe) zu finden sein.

Kenndaten der Fluorophore

A.1. Materialbezugsquellen der verwendeten Färbemittel

Folgende Tabelle zeigt verschiedene Lieferanten von Fluorophoren. Teilweise sind Datenblätter zu bekommen, größtenteils nur Sicherheitsdatenblätter.

Lieferant	Fluorophore	Webadresse
invitrogen	Calcium-Green-1 Fluorescein Dextran	www.invitrogen.com
sigma aldrich	Rhodamine 123	www.sigmaaldrich.com
chroma	Sudan Schwarz Eosin, spritlöslich Eosin, rein	www.chroma.de
BASF	Macrolex Fluoreszenzgelb 10G Tinopal UP Tinopal ABPE	www.basf.at

A.2. Strukturformeln und Spektren

Im Folgenden sind die Strukturformeln und die korrespondierenden Spektren, sofern vorhanden oder gemessen, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluorophore abgebildet. Zu den OBAs Tinopal UP und Tinopal ABP-E wurden keine Strukturformeln gefunden. Gemessen wurde mit den Fluoreszenzspektrographen Hitachi F7000.

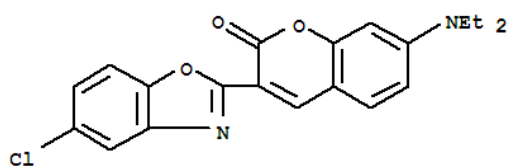


Abb. A.1. Strukturformel von Macrolex Fluoreszenzgelb 10G (siehe Webseite GUIDECHEM - CHEMICAL TRADING GUIDE. www.guidechem.com, Eingesehen im Oktober 2011).

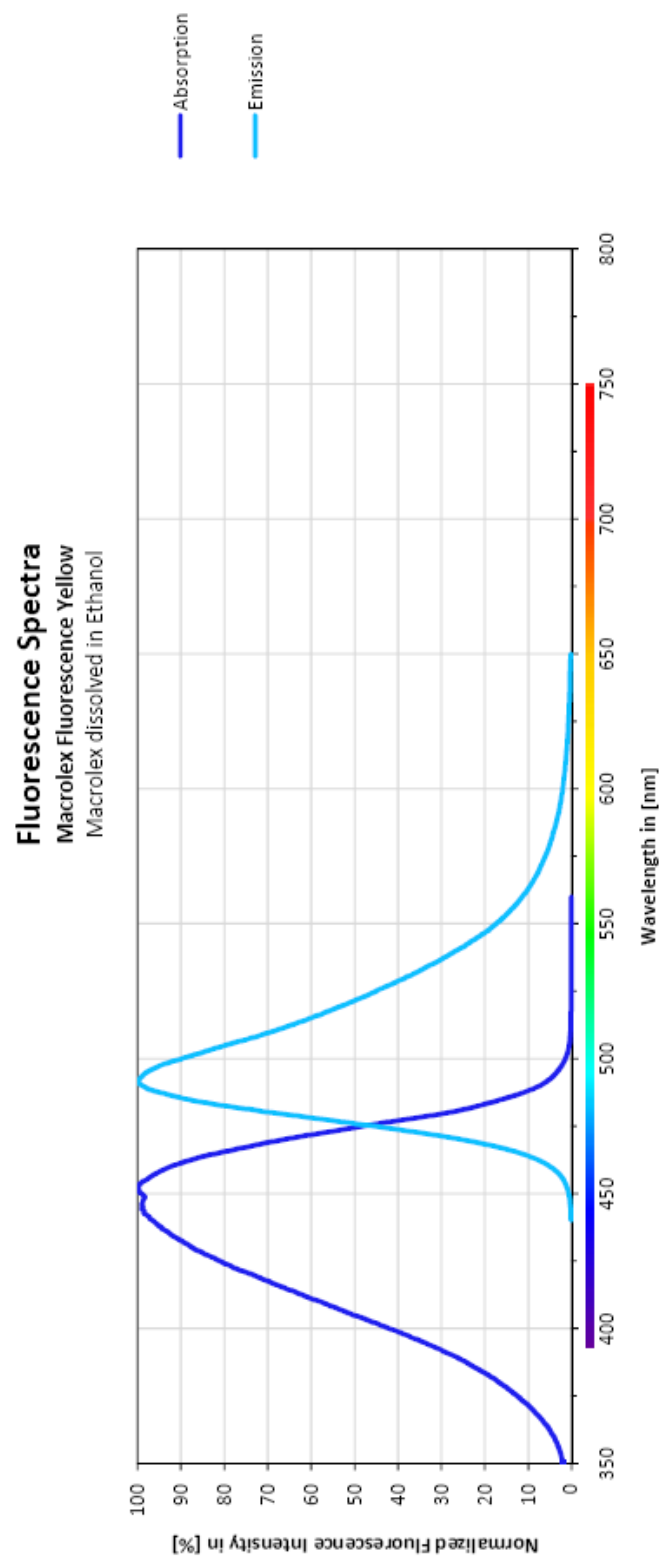


Abb. A.2. Fluoreszenzspektrum des Coumarin-typ Fluorophore Macrolex Fluoreszenzgelb 10G. Zu sehen ist das Absorptionsspektrum bzw. Anregungsspektrum und das längerwelligere Emissionsspektrum. Beide Kurven wurden auf 1 normiert.

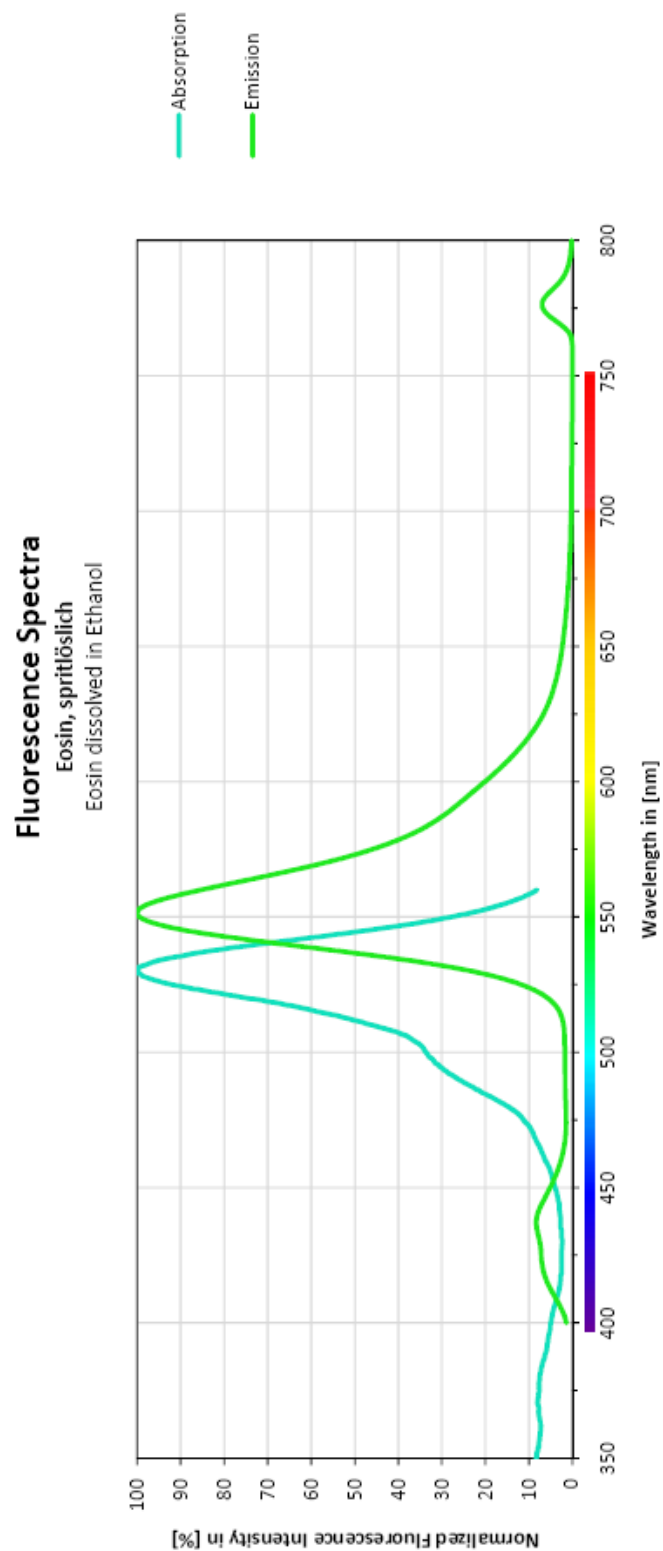


Abb. A.3. Fluoreszenzspektrum des Fluorescein-typ Fluorophore Eosin, spritlöslich. Zu sehen ist das Absorptionsspektrum bzw. Anregungsspektrum und das längerwelligere Emissionsspektrum. Beide Kurven wurden auf 1 normiert.

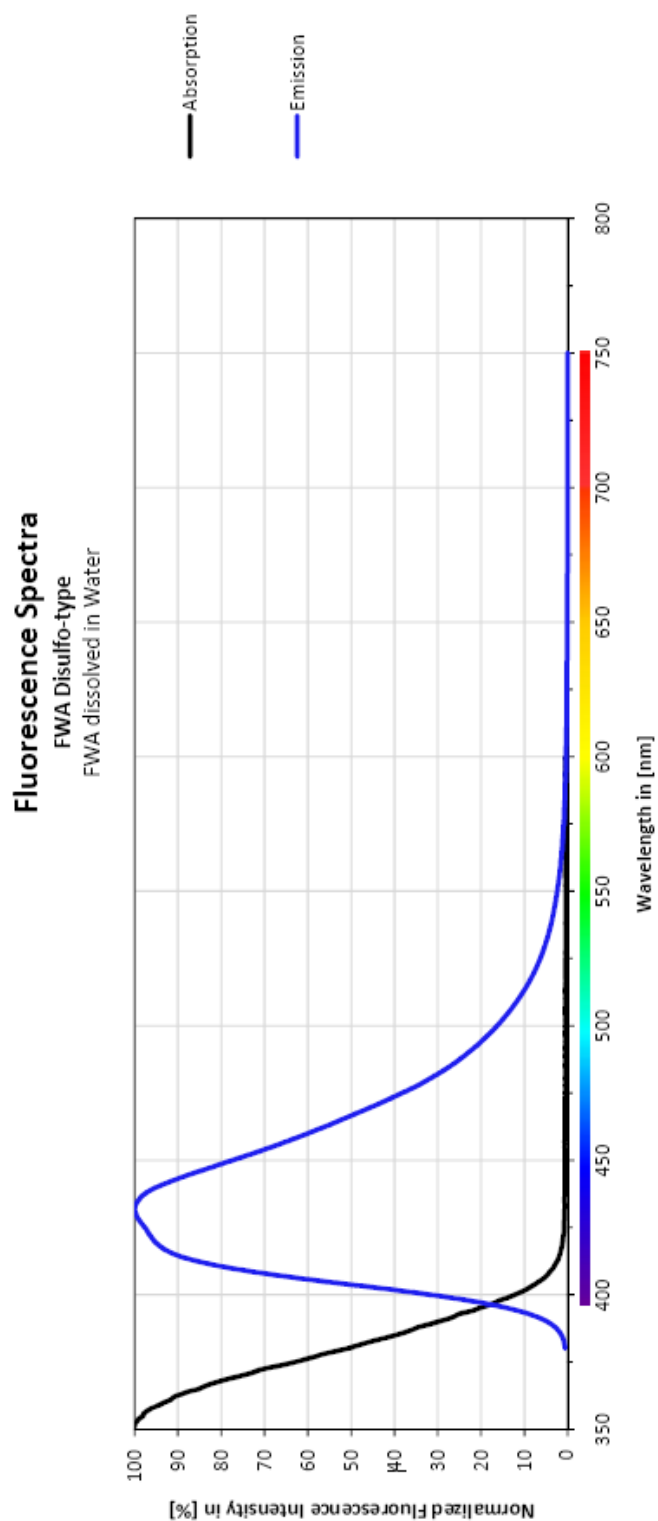


Abb. A.4. Fluoreszenzspektrum des disulfonierten Fluorophors Tinopal UP (optischer Aufheller). Zu sehen ist das Absorptionsspektrum bzw. Anregungsspektrum und das längerwelligere Emissionsspektrum. Beide Kurven wurden auf 1 normiert.

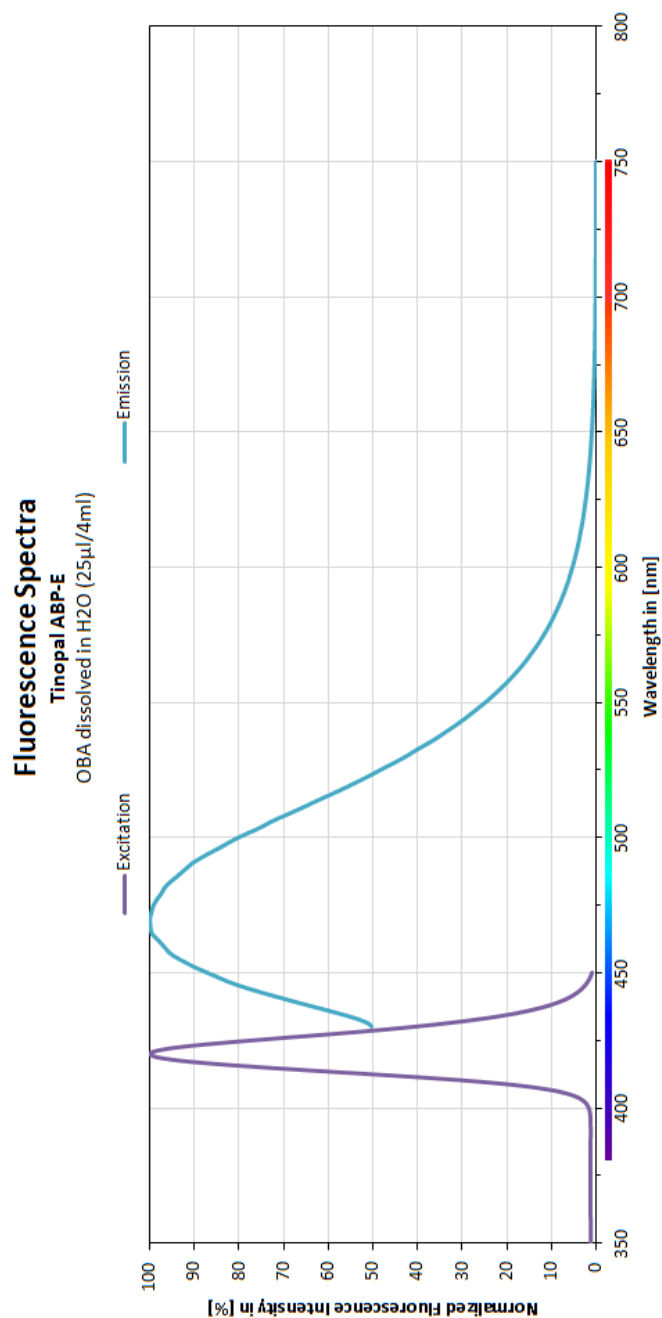


Abb. A.5. Fluoreszenzspektrum des tetrasulfonylierten Fluorophors Tinopal ABP-E (optischer Aufheller). Zu sehen ist das Absorptionsspektrum bzw. Anregungsspektrum und das längerwelligere Emissionsspektrum. Beide Kurven wurden auf 1 normiert.

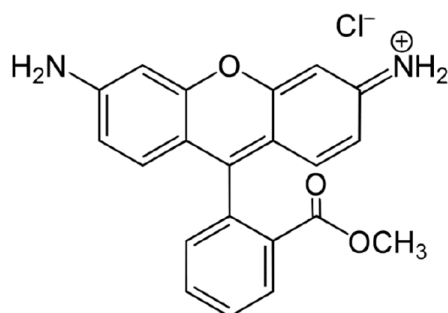


Abb. A.6. Strukturformel von Rhodamine 123 (siehe Webseite SIGMA-ALDRICH, www.sigmaaldrich.com, Eingesehen im Mai 2011.).

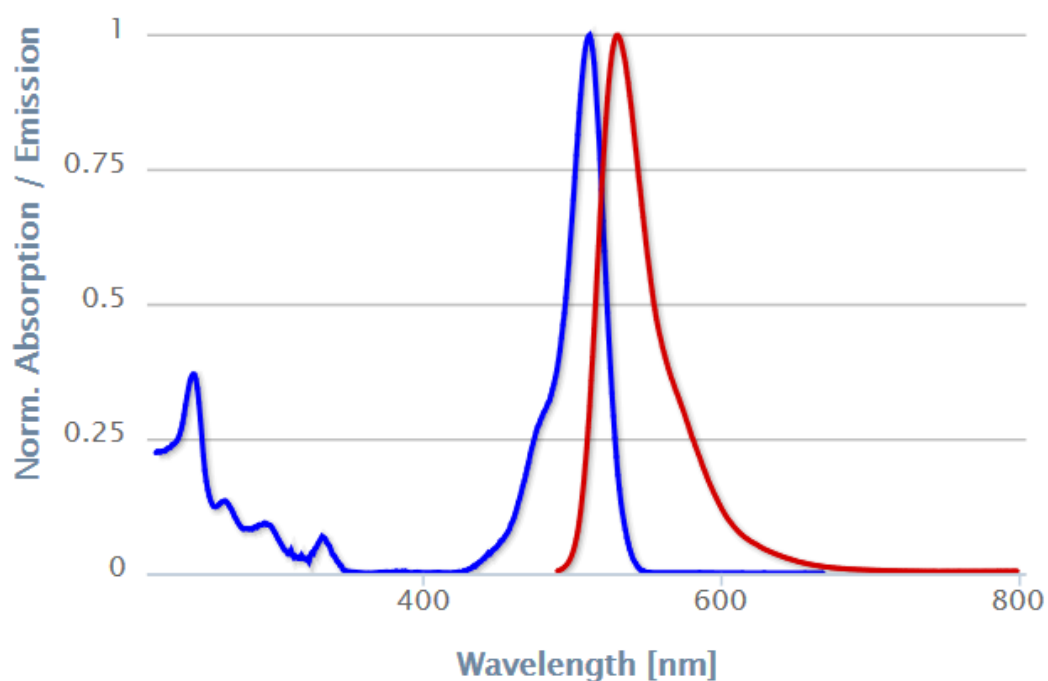


Abb. A.7. Spektrum von Rhodamine 123.(siehe Webseite FLUOROPHORES.ORG, www.fluorophores.org, Eingesehen im Mai 2011.)

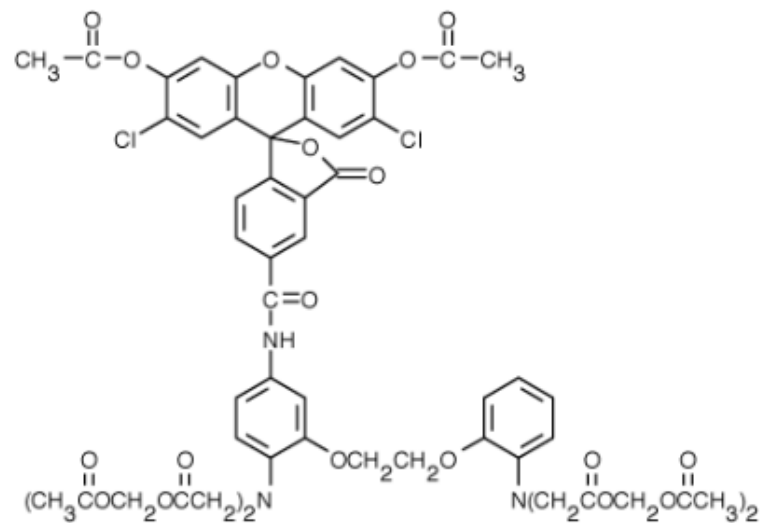


Abb. A.8. Strukturformel von Calcium Green 1. (siehe Webseite FLUOROPHORES.ORG, www.fluorophores.org, Eingesehen im Juni 2011.).

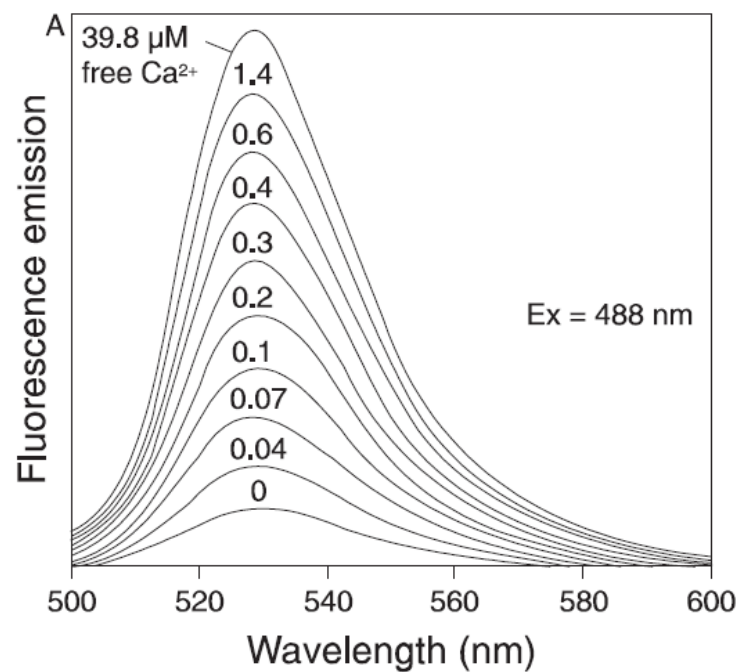


Abb. A.9. Spektrum von CalciumGreen1 (INVITROGEN (2010)).

Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf das Spektrum

Der Einfluss des Lösungsmittels auf die spektralen Eigenschaften von Fluorophoren wurde anhand von Eosin, spritlöslich exemplarisch getestet. Für andere, in der vorliegenden Arbeit, verwendete Färbemittel wurde immer das empfohlene Lösungsmittel verwendet.

Im Folgenden ist das Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum von Eosin, spritlöslich dargestellt.

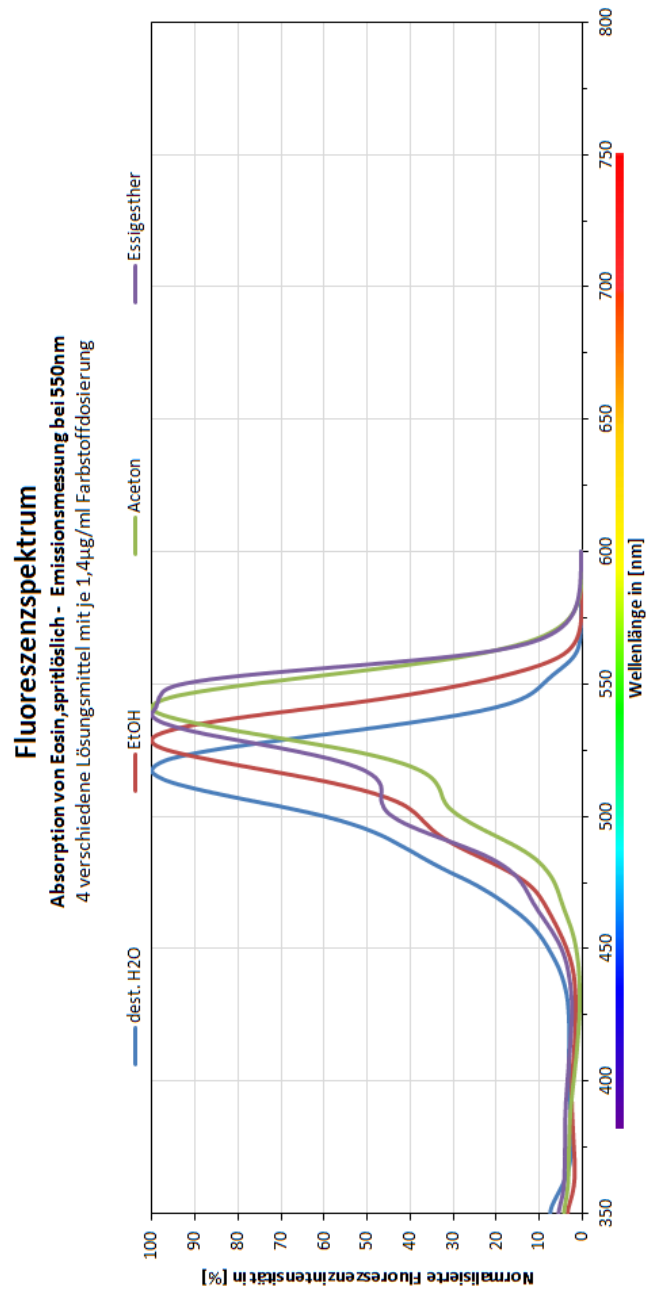


Abb. B.1. Absorptionsspektrum Eosin,spritlöslich bei verschiedenen Lösungsmitteln.

B. Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf das Spektrum

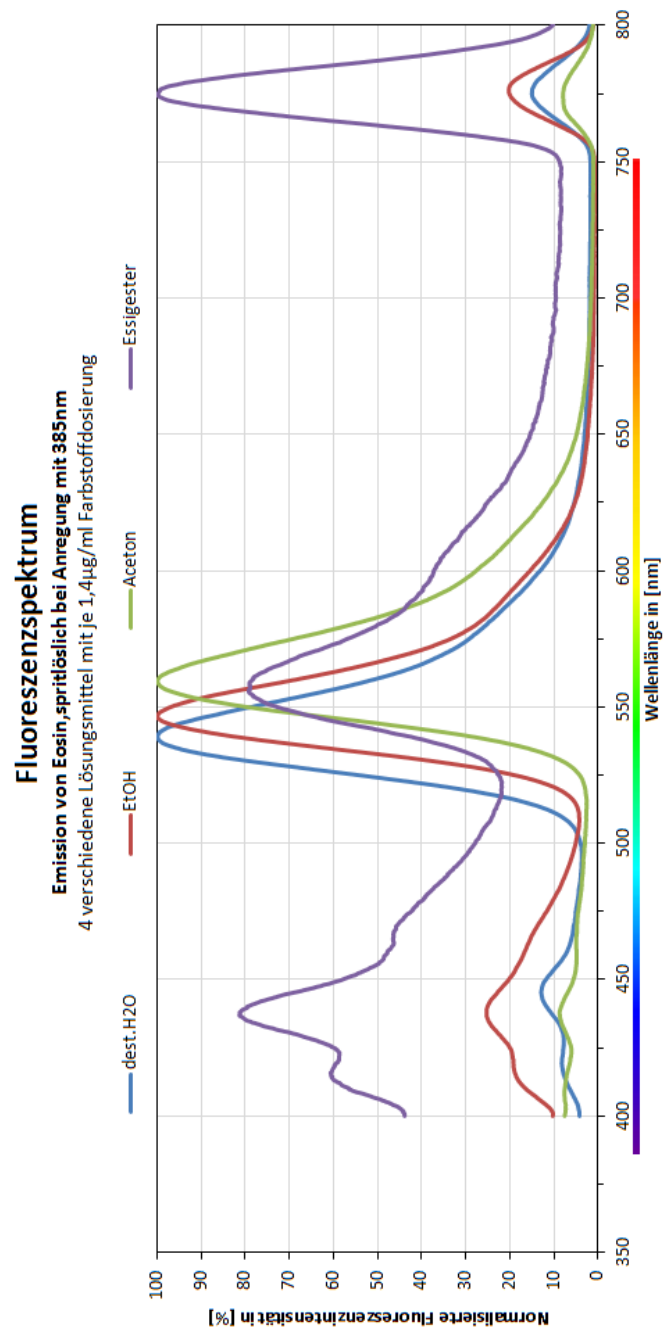


Abb. B.2. Emissionsspektrum Eosin, spritlöslich bei verschiedenen Lösungsmitteln.

Kenndaten der Filterwürfel

C.1. Filterwürfel A

Folgende Kenndaten des Filterwürfels in Tabelle wurden dem Datensatz der Webseite www.leica-microsystems.com entnommen. In folgender Abbildung C.1 ist das

Bezeichnung	Filterwürfel A
Hersteller	Leica Mikrosysteme
Bestellnummer	11513873
Anregungsfilter	BP 360/40
halbdurchlässiger Spiegel	BS 400
Sperrfilter	LP 425

Tabelle C.1. Kenndaten des Filterwürfels A.

Spektrum des Filterwürfels dargestellt. Diese Abbildung zeigt den idealisierten Verlauf da keine Messdaten von Leica verfügbar waren. Die Übertragungseigenschaften sind daher sicher schlechter (Filterflanken und Welligkeiten in den Durchlass- bzw. Sperrbereichen).

C.2. Filterwürfel GFP

Folgende Kenndaten des Filterwürfels in Tabelle wurden dem Datensatz der Webseite www.leica-microsystems.com entnommen. In folgender Abbildung C.2 ist das Spektrum des Filterwürfels dargestellt. Diese Abbildung zeigt einen geglätteten Verlauf. Die Übertragungseigenschaften sind daher geringfügig anders (Filterflanken und Welligkeiten in den Durchlass- bzw. Sperrbereichen).

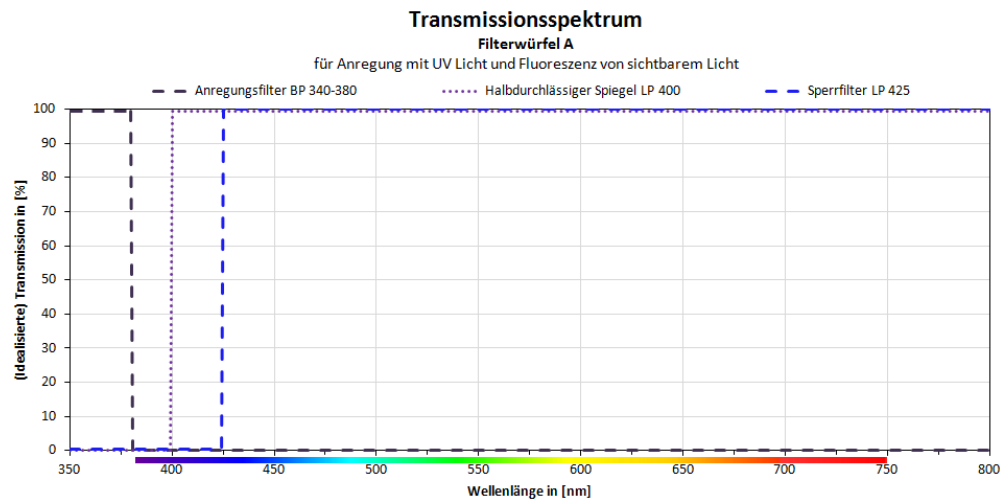


Abb. C.1. Transmissionsspektrum des Filterwürfels A

Bezeichnung	Filterwürfel GFP
Hersteller	Leica Mikrosysteme
Bestellnummer	11513890
Anregungsfilter	BP 470/40
halbdurchlässiger Spiegel	BS 500
Sperrfilter	BP 525/50

Tabelle C.2. Kenndaten des Filterwürfels GFP.

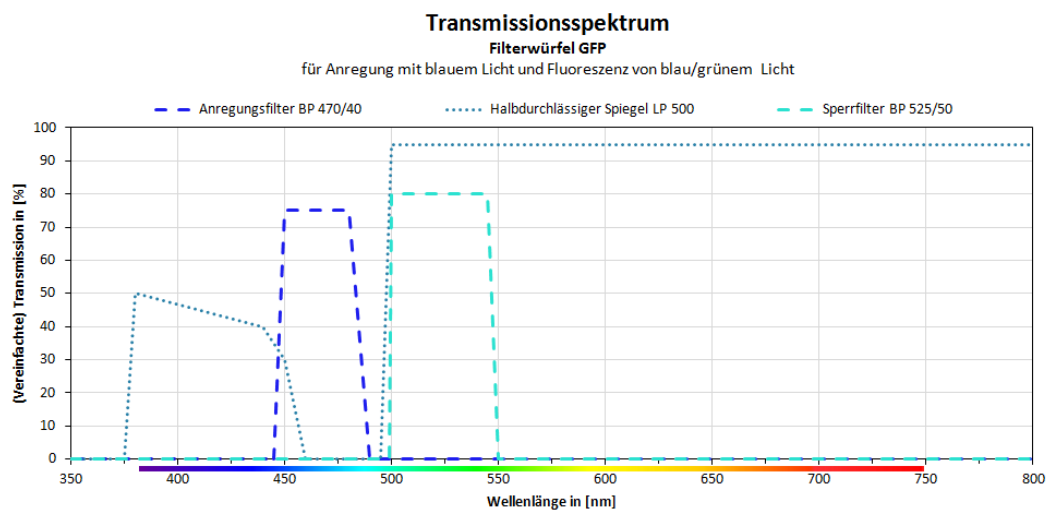


Abb. C.2. Transmissionsspektrum des Filterwürfels GFP

C.3. Filterwürfel BFP/GFP

Folgende Kenndaten des Filterwürfels in Tabelle wurden dem Datensatz der Webseite www.leica-microsystems.com entnommen. In folgender Abbildung C.3 ist das

Bezeichnung	Filterwürfel BFP/GFP
Hersteller	Leica Mikrosysteme
Bestellnummer	11513895
Anregungsfilter	BP 385/15 und BP 485/20
halbdurchlässiger Spiegel	420 und 510
Sperrfilter	BP 460/20 und BP 537/45

Tabelle C.3. Kenndaten des Filterwürfels BFP/GFP.

Spektrum des Filterwürfels dargestellt. Diese Abbildung zeigt einen geglätteten Verlauf. Die Übertragungseigenschaften sind daher geringfügig anders (Filterflanken und Welligkeiten in den Durchlass- bzw. Sperrbereichen).

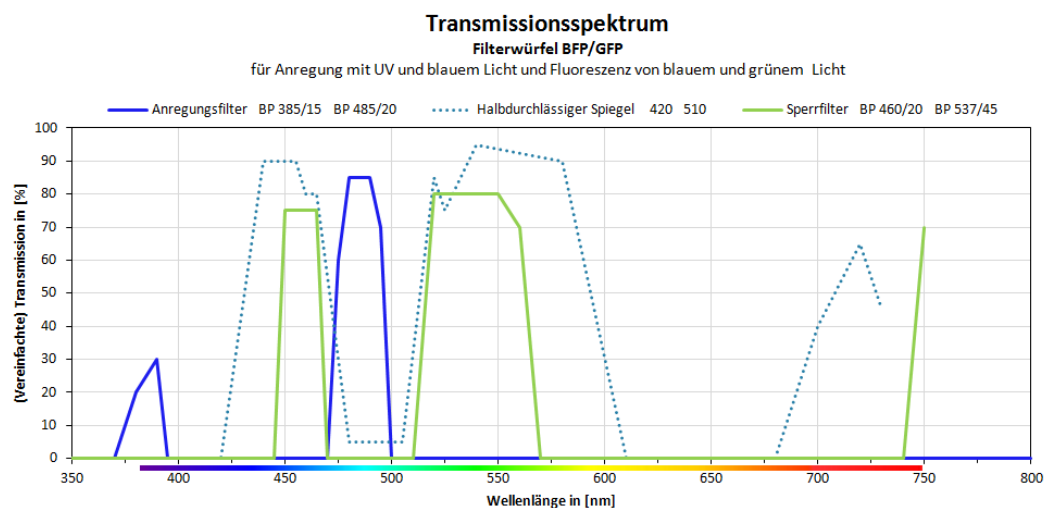


Abb. C.3. Transmissionsspektrum des Filterwürfels BFP/GFP. Der Anregungsfilter hat zwei, in der Transmissionsintensität unterschiedliche Durchlassbereiche. Anzumerken ist, dass das Spektrum des halbdurchlässigen Spiegels etwas mit dem Anregungsfilter überschneidet.

μSTRUCSCOP Hardware

D.1. Kenndaten und Spektren der Lichtquellen

Die Kenndaten in Tabelle D.1 der Lichtquelle **Leica KL 2500 LCD** wurden dem Produktfolder entnommen. Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder. Die Ab-

Lampenart	Halogen
Lampenleistung	250 W
Schnittstelle	RS232
Filter	Filterscheiben einlegbar, D = 28 mm

Tabelle D.1. Kenndaten der VIS Lichtquelle.

bildung D.1 zeigt das Spektrum der VIS Lichtquelle (Halogen) von Leica KL2500LCD.

Die Kenndaten in Tabelle D.2 der Lichtquelle **Leica EL 6000 (LQ-HXP 120 LEJ)** wurden dem Produktfolder entnommen. Für detailliertere Information siehe Produktfol-

Lampenart	Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampe
Lampentyp	HXP-R120W/45C VIS
Lampenleistung	150 W
Hersteller	OSRAM
mittlere Lebensdauer	2000 h
Schnittstelle	9-polige D-Sub Buchse
Filter	nein

Tabelle D.2. Kenndaten der UV Lichtquelle.

der. Die Abbildung D.2 zeigt das Spektrum der Quecksilberdampfampe in der Leica Lichtquelle EL6000. Dieses Spektrum zeigt UV und VIS Anteile von 280nm bis 830nm.

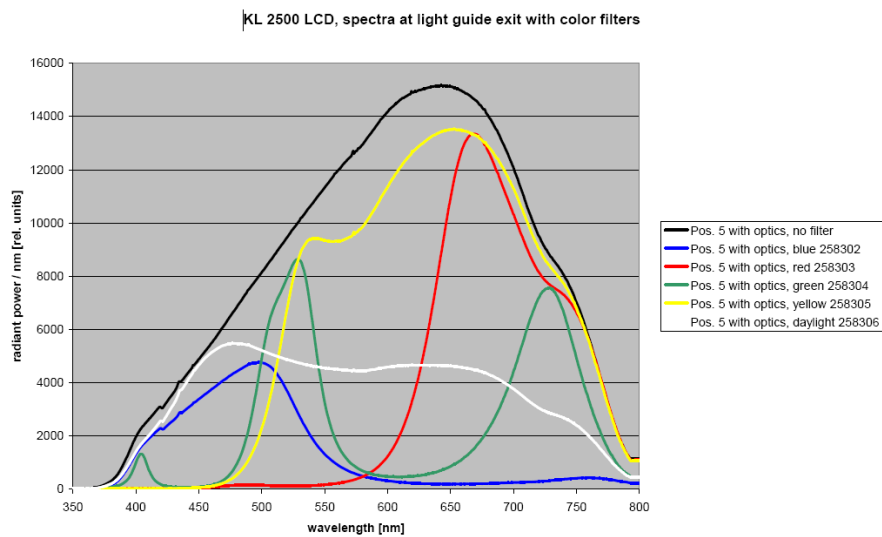


Abb. D.1. Spektrum Lichtquelle KL2500LCD

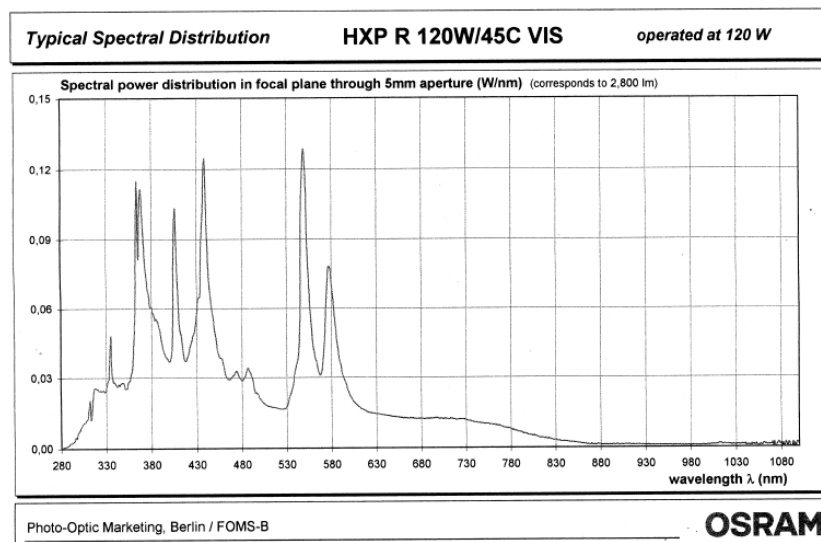


Abb. D.2. Wellenlängenspektrum EL6000

Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder, und Leica Mikrosysteme www.leica-microsystems.com.

D.2. Kenndaten des Fluoreszenzmikroskops DM2500 MH

Folgende Kenndaten in Tabelle D.3 wurden dem Produktfolder entnommen. Für das μ STRUCSCOP Messsystem wurde nur ein Teil des DM2500 MH verwendet. Das Stativ, das Lampenhaus und das Okular wurde nicht verwendet. Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder, und Leica Mikrosysteme www.leica-microsystems.com.

Auflichtkontrastverfahren	Hellfeld(BF), Dunkelfeld(DF), Pol, DIC, FLUO
Objektivrevolver	5-fach
Gewicht	8 kg
Filter	wechselbar
Blende	eingebaut
Filterrad	Filterwürfel wechselbar

Tabelle D.3. Kenndaten Fluoreszenzmikroskop.

D.3. Kenndaten Lineartische

Folgende Kenndaten in Tabelle D.4 wurden dem Angebot des Lieferanten alicona entnommen. Die Alicona hat auch die Montage der Tisch und die Verbindung zur Programmbibliothek durch die IFM Software geliefert. Für detailliertere Informatio-

Achsenart	Präzisionslineartische
Auflösung optische Achse (z)	0,1 μm
Reproduzierbarkeit optische Achse (z)	2 μm
Garantierte Belastbarkeit optische Achse (z)	5 kg (8 kg lt. alicona)
Verfahrweg optische Achse (z)	10 mm
Auflösung Achsen (x/y)	2 μm
Reproduzierbarkeit Achsen (x/y)	2 μm
Verfahrweg Achsen (x/y)	5 mm

Tabelle D.4. Kenndaten der Lineartische.

nen siehe Alicona Imaging GmbH www.alicon.at.

D.4. Kenndaten Mikrotom Leica RM 2255

Folgende Kenndaten des Rotationsmikrotoms in Tabelle wurden dem Produktfolder entnommen. Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder, und Leica Mikrosys-

Einstellbereich Schnittdicke	0,5 bis 100 μm
Maximale Probengröße (B x H x T)	50 x 60 x 40 mm
Schneidegeschwindigkeit	0,5 - 420 mm/s
Vertikalhub	70 mm

Tabelle D.5. Kenndaten des Rotationsmikrotoms.

teme www.leica-microsystems.com.

D.4.1. Schaltplan für die Ansteuerung des Mikrotoms

Für die Verschaltung der externen Schnittstelle zur Ansteuerung des Mikrotoms wurde folgender Schaltplan erstellt - siehe Abbildung D.3. Die in der Abbildung gezeigte

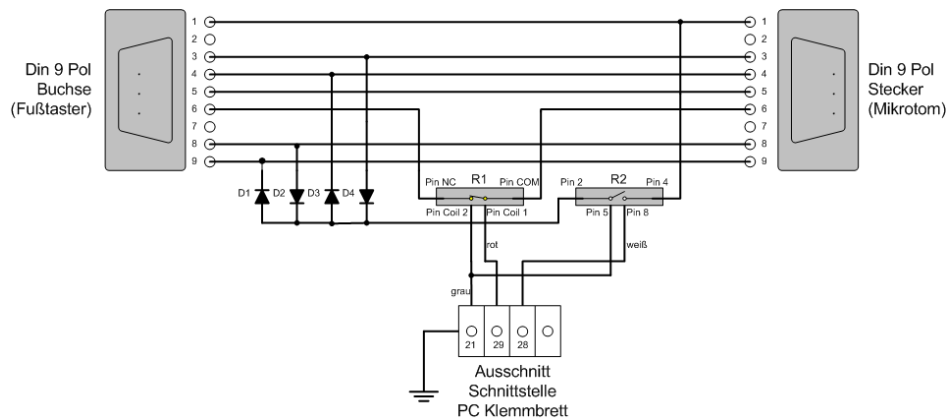


Abb. D.3. Schaltplan der Mikrotomelektronik. Mit dieser Schaltung werden Schnitte am Mikrotom durch das Steuerungsprogramm ausgelöst.

elektronische Schaltung wird zwischen den 9-poligen DIN Steckern des Mikrotoms und des Fußschalters zwischengesteckt. Dadurch kann jede Komponenten ohne Einfluss auf die andere gewechselt werden.

D.4.2. Elektronische Bauteile

Kleine elektronische Bauelemente wurden bei rs components (<http://at.rs-online.com>) gekauft. Folgende Tabelle D.6 listet alle verwendeten Bauteile mit deren Bestellnummer auf.

Schaltplan	Bezeichnung	Lieferant	Bestellnummer
R1	Relais Öffner	rs components	493-6745
R2	Relais Schließer	rs components	457-0840
D1-D4	Dioden	rs components	271-735
-	Gehäuse	rs components	513-5369
Din 9 Pol (Buchse)	Buchse	rs components	259-2472
Din 9 Pol (Stecker)	Stecker	rs components	259-2416
-	9 Pol Kabel	rs components	777-621
N1	Netzteil 12V/1A	rs components	425-3876

Tabelle D.6. Liste der elektronischen Bauteile für die Mikrotomelektronik.

D.5. Schaltplan für die Verdrahtung der externen Schnittstelle mit dem Mikrotom und der Pneumatik

In folgender Abbildung D.4 ist ein Blockschaltbild gezeigt mit dem alle elektronischen Bauteile an die externe Schnittstelle des Steuerungscomputers angeschlossen werden.

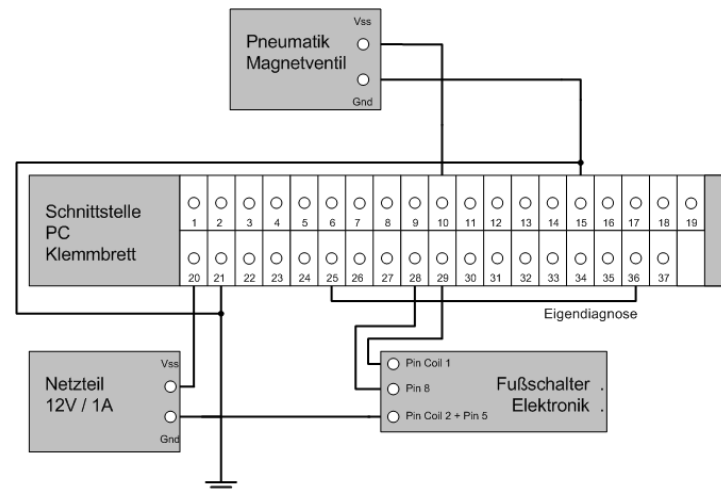


Abb. D.4. Blockschaltbild externe Schnittstelle. Die separaten Schaltkreise sind Pneumatik und Mikrotom. Die Stromversorgung erfolgt durch ein Netzteil.

D.6. Kerndaten Positionssensors

Folgende Kerndaten in Tabelle des **taktilen Positionssensors** wurden dem Produktfolder entnommen. Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder, und Dr. Johan-

Bezeichnung	Heidenhain MT 12x1
Lieferant	alicon
Systemgenauigkeit	$\pm 0,2 \mu m$
Messweg	12 mm
Betriebslage	beliebig
Mech. zul. Verfahrgeschwindigkeit	$\leq 30 m/min$

Tabelle D.7. Kerndaten Positionssensor

nes Heidenhain GmbH www.heidenhain.at.

D.7. Kerndaten Pneumatiksystem

Folgende Kerndaten in Tabelle D.8 des **magnetischen Pneumatikventils** wurden dem Produktfolder entnommen. Für detaillierte Informationen siehe Produktfolder, und

Wirkungsweise	2/2-Wege, in Ruhestellung geschlossen
Nennweite	2,4 mm
Spannung	12 V _{DC}
Leistungsaufnahme	4 W

Tabelle D.8. Kenndaten Pneumatiksystem

Bürkert Contromatic GmbH Austria www.buerkert.at.

D.8. Kenndaten Kamera

Folgende Kenndaten in Tabelle D.9 der Kamera **Baumer FWX20c** wurden dem Datenblatt entnommen. In folgenden Abbildungen D.5 und D.6 zu sehen sind die spektralen

Bezeichnung	1/1.8" interline progressive scan CCD
Lieferant	alicon
Sensortyp	CCD
Sensorexel	1624 x 1236 Px
Pixelgröße	4,4 μ m x 4,4 μ m
Chipgröße	7,15 mm x 5,44 mm
Bilder pro Sek.	bis zu 24
Filter	Baader

Tabelle D.9. Kenndaten Kamera

Eigenschaften der Farbkanäle der Kamera sowie der in der vorliegenden Arbeit für das Messsystem verwendete Kamerafilter Baader.

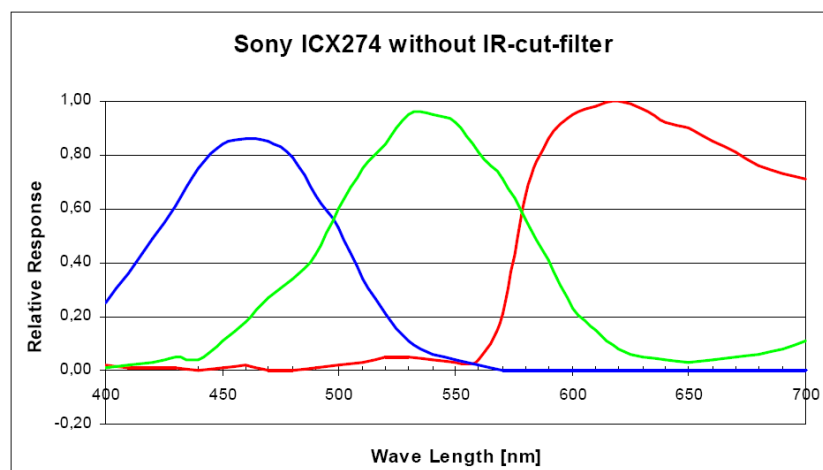


Abb. D.5. Spektrale Daten der Kamera. Spektrale Empfindlichkeit der Kamerakanäle R, G und B.

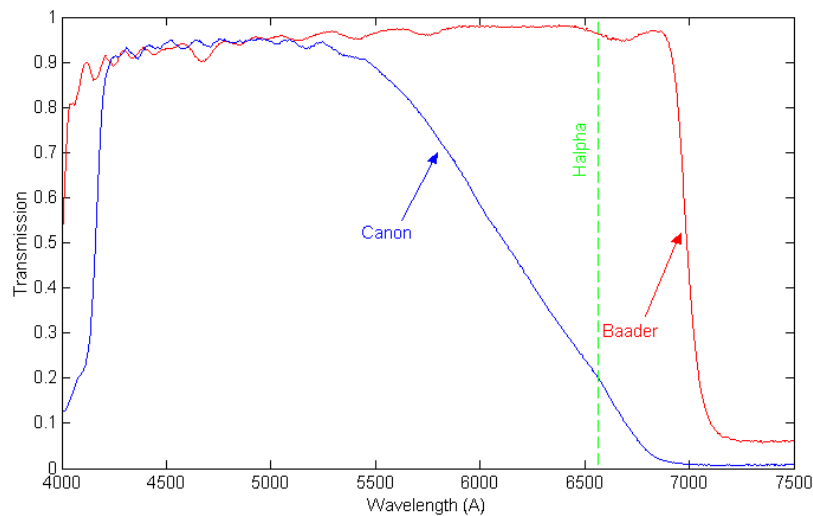


Abb. D.6. Spektrale Eigenschaften des Kamerafilters. Zu sehen ist die Kennlinie des verwendeten Baader Filters (10 nm = 1 Å).

Für detaillierte Informationen siehe Datenblatt und Baumer Optronik GmbH www.baumeroptronic.com.

D.9. Kenndaten schwingungsgedämpfter Tisch

Folgende Kenndaten in Tabelle D.10 wurden dem Produktdatenblatt entnommen. Für

Bezeichnung	Labortisch der Serie 63
Lieferant	Linios bzw. Qioptiq Group
Größe	750 x 1200 x 100 mm
Arbeitsplatte	M6 Gewinde im 25 mm Raster
Arbeitsplatte	magnetischer Edelstahl
Belastbarkeit	650 kg
Schwingungsisolation	passiv
Betriebsdruck Pneumatik	max, 7 bar

Tabelle D.10. Kenndaten schwingungsgedämpfter Tisch

detailliertere Informationen siehe Datenblatt und QIOPTIQ www.qioptiq.de.

D.10. Kenndaten Steuerungs-PC

Die folgenden Kenndaten in Tabelle D.11 wurden der Systemsteuerung des Betriebssystems entnommen. Für detailliertere Informationen siehe Systemsteuerung und Alicona Imaging GmbH www.alicon.at.

Betriebssystem	MS Windows Vista Ultimate
Taktfrequenz	2,66 GHz
Arbeitsspeicher	8 GB
System	64 Bit
Updates	Service Pack 1
Festplatten	2 Wechselfestplatten
DVD	1 DVD RAM
USB	4 USB Schnittstellen

Tabelle D.11. Kenndaten Steuerungscomputer

μSTRUCSCOP Software

In diesem Teil des Anhangs sind die Softwarekomponenten beschrieben.

E.1. Steuerungssoftware

Die lauffähige Version der Steuerungssoftware muss in einer vorgegebenen Verzeichnisstruktur gespeichert werden. Die während der Entwicklung verwendeten Programmbibliotheken der IFM G4 Software sind im Release Ordner gespeichert. Ebenso sind dort ältere und lauffähige Versionen gespeichert. Sämtliche Programmversionen sind mit den MS Visual C++ Codes gespeichert und können weiterentwickelt werden.

E.2. ICG Software

Die Softwaremodule für die Bildverarbeitung sind kleine command line Programme die verwendet werden für:

- Aligning, und
- Zuschneiden der Einzelbilder.

Es sind 2 Versionen der Aligning Software am PC installiert. Aktiviert ist die Version die ausschließlich vertikales Versätze in den Bilddaten aligned. Zur Aktivierung des Programms das in horizontale und vertikale Richtung aligned, sind die entsprechenden Programmteile in den korrespondierenden Ordner zu kopieren - siehe auch "Liesmich.txt" Datei.

E.3. Unit Test Software

Diese Software Module sind unabhängige Programme die zur Ansteuerung der Hardwarekomponenten während der Entwicklung geschrieben wurden. Diese können nach wie vor zur Diagnose der Funktion einzelner Komponenten verwendet werden. Gestartet werden können diese als EXE File oder von der MS Visual C++ Entwicklungsumgebung. (Für den korrekten Ablauf des Unit Tests für das Mikrotom muss eine ältere Version der IFM Programmbibliotheken verwendet werden - siehe Bibliotheken im entsprechenden Ordner).

E.4. Alicona IFM Software

Die IFM Software G4 ist auf der Festplatte C: des Steuerungscomputers installiert. Vor dem Start des μ STRUCSCOP Steuerungsprogramms (Festplatte E:) muss der IFM Server gestartet werden (Link am Desktop). Bei Programmupdates der Alicona sollten zur Sicherheit die alten Programmbibliotheken gesichert werden.

Literaturverzeichnis

- Ardenne, M., Musiol, G. & S.Reball. (1997). *Effekte der Physik und ihre Anwendungen* (2. Aufl.). Verlag Harri Deutsch.
- Aronsson, M. (2002). *On 3d fibre measurements of digitized paper - from microscopy to fibre network*. Phd thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Arthur, B., Smith, R., Lavrykov, S. & Ramarao, B. (2011). Ink penetration in uncoated paper using immuno-gold labeling: Intra-fiber diffusion and wicking. In U. Hirn (Hrsg.), *Progress in paper physics seminar 2011 - conference proceedings*.
- Axelsson, M. (2009). *Image analysis for volumetric characterisation of microstructure*. Phd thesis, Swedish University of Agricultural Sciences - Center for Image Analysis.
- Barsberg, S. & Nielsen, K. (2003). Oxidative quenching of spruce thermomechanical pulp fiber autofluorescence monitored in real time by confocal laser scanning microscopy - implications for lignin autofluorescence. *Biomacromolecules*, 4, 64-69.
- Bolte, S. & Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy (optical basics review). *Journal of Microscopy*, 224, 213-232.
- Capek, M., Tomori, Z., J.Michalek, J.Janacek, Kubinova, L. & Hozman, J. (2009). A system for automated acquisition of 3d biomedical images using confocal microscopy. In G. Kothleitner & M. Leisch (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 2, S. 415 - 416).
- Chinga, G. (2002). *Structural studies of lwc paper coating layers using sem and image analysis techniques*. Phd thesis, Norwegian University of Science and Technology - Department of Chemical Engineering.
- Chinga, G., Johnson, P. & Diserud, O. (2004, April). Controlled serial grinding for high-resolution three-dimensional reconstruction. *Journal of Microscopy*, 214, 13-21.
- Cornely, B. (1951). *Das Färben von Papier*. Springer Verlag Berlin.
- Darzynkiewicz, Z., Staiano-Coico, L. & Melamed, M. (1981). Increased mitochondrial uptake of rhodamine-123 during lymphocyte stimulation. In *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america-biological sciences* (Bd. 78, S. 2383-2387). Natl Acad Sciences, 2101 Constitution Ave NW, Washington, DC 20418.
- Denk, W. & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to

- reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*, 2(11), 329ff.
- Donoser, M., M.Wiltsche & H.Bischof. (2005). A new automated microtomy concept for 3d paper structure analysis.
- Engstler, M. & Mücklich, F. (2009). Fib-tomography and 3d image analysis for quantitative characterization of microstructures. In G. Kothleitner & M. Leisch (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 1, S. 75-76).
- Erzen, I., Janacek, J. & Kubinova, L. (2009). 3d visualisation and analysis of capillaries in human muscles using confocal microscopy. In M. Pabst & G. Zelling (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 2, S. 190-191).
- Feier, V. (2012). *Generalisierte Binomialverteilungen zur statistischen Modellierung von unbedruckten Stellen auf Papier*. Phdthesis, Technische Universität Graz - Institut für Papier-, Zellstoff- und Fasertechnik.
- Forsström, U., Fagerholm, K. & Saharinen, E. (2003). The role of base paper porosity in msp coating. *Paperi ja Puu - Paper and Timber*, Vol. 85, pp. 454-459.
- Franke, Petermann, Schempp, Töppel & Volk. (1978). *Größen und Einheiten für die Papier- und Zellstoffindustrie auf der Grundlage des Internationalen Einheitensystems (SI)*. Verein der Zellstoff- und Papier-Chemiker und -Ingenieure. (ISBN 3-92 1906 028)
- Gründler, P. (2004). *Chemische Sensoren: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. Springer Verlag Berlin.
- Henkel, K. (2003). *Die Mikrofibel* (Bericht). Die Mikrobiologische Vereinigung München e.V. Verfügbar unter <http://www.mikroskopie-muenchen.de>
- Horvath, A. (2008). *Chemical methods for improving the fracture toughness of paper*. Phd thesis, Royal Institute of Technology - Department of Fibre and Polymer Technology.
- invitrogen. (2010). *The molecular probes handbook - a guide to fluorescent probes and labeling technologies* (11th Aufl.). Life Technologies Corporation. (ISBN 978-0-9829279-0-8)
- Jang, Lawrence, Watson & Bradley. (2011). Confocal/two-photon microscopy: a powerful technique for structural analysis, quantification and development. *ipw*, 3-4, 11-15.
- Kappel, L. (2010). *Development and application of a method for fiber-fiber bonded area measurement*. Phd thesis, Graz University of Technology - Institute for Paper, Pulp and Fiber Technology.
- Kazakia, G., Lee, J., Singh, M., bigley, R., Martin, R. & Kraveny, T. (2006). Automated high-resolution three-dimensional fluorescence imaging of large biological specimens. *Journal of Microscopy*, Vol. 225, pp. 109-117.
- Kern, M. (2003). *Mikroskopische Technik für die industrielle Anwendung*. Brünne-Verlag Berlin.

- Koivu, V., Seppänen, R., Turpeinen, T., Mattila, K., Hyväluoma, J. & Kataja, M. (2010). Combining x-ray micro-tomography and image analysis to study imbibition and void space in liquid packaging board. *Journal of Pulp and Paper Science*, 36 (3-4), 170-176.
- Kritzinger, J. (2010). *Automated serial sectioning applied to the analysis of coating layer structures and fiber cross section properties*. Phd thesis, Graz University of Technology - Institute for Paper, Pulp and Fiber Technology.
- Kritzinger, J., Wiltsche, M., Donoser, M. & Bauer, W. (2009). *Application of a novel automated serial sectioning technique in the 3d analysis of paper structures* (Bd. Volume 1).
- Lakonicz, J. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd edition Aufl.). Verlag Springer.
- Levin & Söderhjelm. (1999). *Pulp and paper testing*. Fapet Oy. (ISBN 952-5216-17-9)
- Li, K. & Reeve, D. W. (2004). Fluorescent labeling of lignin in the wood pulp fiber wall. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, Vol. 24, pp. 169-181.
- Mulisch, M. & Welsch, U. (2010). *Romeis Mikroskopische Technik* (18.Auflage Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag.
- Olmstead, J. & Gray, D. (1993). Fluorescence emission from mechanical pulp sheets. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73, 59-65.
- Ozaki, Y., Bousfield, D. W. & Shaler, S. M. (2006a). The characterization of polyamide epichlorhydrin resin in paper - relationship between beating degree of pulp and wet strength. *Appita Journal*, Vol. 59, pp. 326 - 329.
- Ozaki, Y., Bousfield, D. W. & Shaler, S. M. (2006b). Three-dimensional observation of coated paper by confocal laser scanning microscope. *TAPPI Journal*, 5 (2), 3-8.
- Papiertechnische Stiftung. (2011). Neue Methoden zur Strukturanalyse von Papierstrichen. *Aktuelle Papier-Rundschau*, 9, 28.
- Pavia, Lampman & Kriz. (2001). *Introduction to spectroscopy - a guide for students of organic chemistry* (3. Aufl.). Brooks, Cole Thomson Learning.
- Pawley, J. B. (Hrsg.). (1995). *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science+Business Media Inc.
- Polcin, J. & Rapson, W. (1971, March). Effects of bleaching agents on the absorption spectra of lignin in groundwood pulps: Part 1. reductive bleaching. *Pulp and Paper Mag. Can.*, 72, 69.
- Quackenbush, D. (1984). Using ultraviolet fluorescence microscopy in analyzing coated paper. *Tappi Journal*, 67 (5), 72-75.
- Robertson, A., Jang, H. & Seth, R. (1992). Three-dimensional visualization of confocal images of wood pulp fibres. *Journal of Material Science Letters* 11, 1416-1418.
- Rost, F. (1995). *Fluorescence microscopy - volume ii*. Cambridge University Press.
- Sasov, A., Liu, X. & Bruyndonckx, P. (2009a). Compact laboratory micro-ct/micro-xrf scanner for non-destructive 3d imaging of internal chemical composition. In

- G. Kothleitner & M. Leisch (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 1, S. 91-92).
- Sasov, A., Pauwels, B., Bruyndonckx, P. & Liu, X. (2009b). X-ray microscopy with 100nm resolution and 3d imaging of the objects internal microstructure by microt attachment fpr sem. In G. Kothleitner & M. Leisch (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 1, S. 93-94).
- Schäffner, H., Kritzinger, J. & Bauer, W. (2010). 3 dimensional fluorescence microscopy applied to paper structure analysis. In C. Loderer (Hrsg.), *Tagungsband Minisymposium Verfahrenstechnik* (S. 249-254).
- Schmied, F. J., Teichert, C., Kappel, L., Hirn, U., Schennach, R. & Schröttner, H. (2009). Comperative afm and sem investigations on kraft pulp fiber surfaces. In G. Kothleitner & M. Leisch (Hrsg.), *Mc 2009 graz - microscopy conference - first joint meeting of dreiländertagung & multinational congress on microscopy* (Bd. 1, S. 299-300).
- Schneider, W. (2008). *Ergonomische Gestaltung von Benutzungsschnittstellen - Kommentar zur Grundsatznorm DIN EN ISO 9241-110* (D. D. I. für Normung e.V., Hrsg.). Beuth.
- Shakespeare, T. & Shakespeare, J. (2011). Effect of moisture on paper color. In U.Hirn (Hrsg.), *Progress in paper physics seminar 2011 - conference proceedings*.
- Stemmer. (2010). *Handbuch der Bildverarbeitung*. Stemmer Imaging GmbH.
- Sternberg, S. (1983). Biomedical image processing. *IEEE Computer*, 16, 22-34.
- Stone, J. & Scallan, A. (1968). The effect of component removal upon the porous structure of the cell wall of wood. *Pulp and Paper Mag. Can.*, 69, 69-74.
- Streicher, J., Weninger, W. & Müller, G. (1997). External marker-based automatic congruencing: A new method of 3d reconstruction from serial sections. *The Anatomic Record*, 248, 583-602.
- Thomson, C. (2007). *Probing the nature of cellulosic fibre interfaces with fluorescence resonance energy transfer*. Phd thesis, Georgia Institute of Technology.
- Thomson, C., Lowe, R., Page, D. & Ragauskas, A. (2008). Exploring fibre-fibre interfaces via fret and fluorescence microscopy. *Journal of Pulp and Paper Science*, 34/2.
- Thomson, C., Lowe, R. & Ragauskas, A. (2007). Imaging cellulose fibre interfaces with fluorescence microscopy and resonance energy transfer. *Carbohydrate Polymers*, 69, 799-804.
- Tylli, H., Forsskåhl, I. & Olkkonen, C. (1992). A fluorescence spectroscopic study of chemically and photochemically treated high-yield pulps. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 67, 117-131.
- Valeur, B. (2001). *Molecular fluorescence - principles and applications*. VCH Verlag GmbH.
- Weninger, W., Geyer, S., Mohun, T., D.Rasskin-Gutman, Matsui, T., Ribeiro, I. et al. (2006). High-resolution episcopic microscopy: a rapid technique for high detailed 3d analysis of gene activity in the context of tissue architecture and morpho-

- logy. *Anatomy and Embryology*, Vol. 211, pp. 213-221.
- Weninger, W., Meng, S., Streicher, J. & Müller, G. (1998). A new episcopic method for rapid 3-d reconstruction: applications in anatomy and embryology. *Anat Embryol*, Vol.197, 341-348.
- Weninger, W. & Mohun, T. (2002). Phenotyping transgenic embryos: a rapid 3-d screening method based on episcopic fluorescence image capturing. *Nature Genetics*, Vol. 30, 59-65.
- Whipple, W. L. & Maltesh, C. (2000). Visualizing flocculation and adsorption processes in papermaking using fluorescence microscopy. *Langmuir*, 16, 3124-3132.
- Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M. & Heinz, H. (2009). *Grundlagen - Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie* (Bericht). Carl Zeiss Jena GmbH.
- Wilsche, M. (2006). *Three dimensional analysis of paper structure using automated microscopy*. Phd thesis, Graz University of Technology.
- Wilsche, M. & Donoser, M. (2004). Dreidimensionale Strukturanalyse in Papier. *Papier aus Österreich*, Vol.6, 30-31.
- Wilsche, M., Donoser, M., Kritzinger, J. & Bauer, W. (2010). Automated serial sectioning applied to 3d paper structure analysis. *Journal of Microscopy*, 242, 197-205.
- Wind, E. (2011). *Untersuchung der Ursache für kleinräumige Druckbildstörungen im Heat-set Web Offset Druck an ungestrichenen Papieren*. Phd thesis, Graz University of Technology - Institute for Paper, Pulp and Fiber Technology.
- Zhang, Y., NI, Y., Wong, D., Schmidt, J., Heitner, C. & Jordan, B. (2011). Distribution of optical brightening agent (OBA), in the fibre wall of high-yield and kraft pulps. *Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes*, 1, 21-26.
- Zhu, J. & Gray, D. (1993). Fluorescence emission from mechanical pulp sheets II. Estimation of quantum yields. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73, 67-74.