

Analyse von Partikeln aus Innenraumluft mittels korrelativer Mikroskopie

Analysis of particles in indoor air by correlative microscopy

John Schumann*, Nico Dziurowitz, Carmen Thim, Asmus Meyer-Plath

John Schumann*

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), Gruppe 4.5 „Partikelförmige
Gefahrstoffe, Innovative Materialien“, Nöldnerstr. 40-42, 10317 Berlin,

Schumann.John@baua.bund.de

Nico Dziurowitz

BAuA, Dziurowitz.Nico@baua.bund.de

Carmen Thim

BAuA, Thim.Carmen@baua.bund.de

Asmus Meyer-Plath

BAuA, Meyer-Plath.Asmus@baua.bund.de

WaBoLu-Innenraumtage 2021, Sonderband

Zusammenfassung

Der Mensch ist in Innenräumen einer Vielzahl von luftgetragenen Partikeln (Feinstäuben) ausgesetzt. Aktuell ist zumeist unbekannt, welche Partikelarten in welchen Konzentrationen präsent sind. Sie variieren nicht nur im Tagesverlauf und abhängig von einer privaten oder gewerblichen Nutzung, sondern auch abhängig von der Auslegung der Räume und den Lüftungseinrichtungen. Unterhalb einer bestimmten Größe können luftgetragene Partikel bis in das tiefe Lungengewebe gelangen, wo sie schädliche Wirkungen hervorrufen können. Besondere Aufmerksamkeit ist dabei solchen Partikeln zu widmen, die aufgrund ihrer chemischen oder biologischen Zusammensetzung oder aufgrund ihrer Form und Beständigkeit toxisch wirken können. Es ist daher notwendig, das Wissen über Art und Konzentration luftgetragener Partikel zu verbessern. Im Folgenden wird die Entwicklung einer softwaregestützten automatisierten Erkennung und Klassifizierung von luftgetragenen

Partikeln beschrieben. Mit ihr werden auf Filtermembranen gesammelte Partikel quantifiziert, indem eine ein bekanntes Luftvolumen repräsentierende Filterfläche zunächst im Rasterelektronenmikroskop (REM) sowohl mit Sekundärelektronen (SE) als auch energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) abgebildet werden. Auf diese Weise können Partikel anhand ihres SE-Kontrastes und ihrer Elementzusammensetzung lokalisiert und durch ihre Gestalt und Zusammensetzung vorklassiert werden. Die Steuerung des Mikroskops und die Erfassung der Spektren erfolgt dabei mit unserer Software (Moré 2017) vollautomatisch. Sollte die so gewonnene Information nicht zur Identifizierung eines Partikels ausreichen, wird der Filter zusätzlich in einem Raman-Mikroskop optisch und spektroskopisch analysiert. Die Software ermöglicht dabei, interessierende Filterpositionen im Lichtmikroskop mit einer Genauigkeit anzufahren, die der optischen Auflösung entspricht (Meyer-Plath 2020a). Alle Bilder und Spektren zu diesen Positionen werden mit unserer digitalen Bildverarbeitung hoch genau zusammengeführt (Schumann 2019), Objekte erkannt und durch Form, Elementarzusammensetzung und chemische Charakteristika klassifiziert.

Abstract

Indoors, humans are exposed to a large number of airborne particles. Currently, it is mostly unknown what particle types are present in which concentrations. They vary not only in the course of the day and depending on private or commercial use, but also depending on the design of the rooms and ventilation systems. Below a certain size, airborne particles can reach deep lung tissues, where they may cause harmful effects. Particular attention should be paid to particles that may be toxic due to their chemical or biological composition, or due to their shape and durability. It is therefore necessary to improve knowledge about the nature and concentration of airborne particles. In the following, the development of software-supported automated detection and classification of airborne particles is described. It quantifies particles collected on filter membranes by first imaging a filter area representing a known volume of air in a scanning electron microscope (SEM) using both secondary electron (SE) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). This way, particles can be localised based on their SE contrast and elemental composition and pre-classified based on shape and composition. The microscope is controlled and the spectra are recorded fully automatically using our in-house software (Moré 2017). If the information obtained in this way is not sufficient to identify a particle, the filter is also analysed optically and

spectroscopically in a Raman microscope. The software makes it possible to approach filter positions of interest in the light microscope with a precision corresponding to the optical resolution (Meyer-Plath 2020a). All images and spectra for these locations are merged with high precision using our digital image processing (Schumann 2019), objects are recognised and classified by shape, elemental composition and chemical characteristics.

1. Einleitung

Der Mensch verbringt den Großteil seiner Zeit in Innenräumen (ca. 80-90 %), wo er verschiedensten Arten von Feinstaubpartikeln ausgesetzt ist. Der wichtigste Expositionsweg dieser luftgetragenen Feinstaub- und Ultrafeinstaubpartikel ist die inhalative Aufnahme. Um ein potentiell mögliches Gesundheitsrisiko für den Menschen abschätzen zu können, ist die Charakterisierung von luftgetragenen alveolengängigen Partikeln von großer Bedeutung.

Bisher konzentrierte sich die Charakterisierung von Feinstaubpartikeln und ihren möglichen Gesundheitsrisiken im Wesentlichen auf die Außenluft und auf industrielle Arbeitsplätze inklusive der dort auftretenden Fein- und Ultrafeinstaubexpositionen. Relativ wenig ist bislang über die Zusammensetzung von Feinstaubpartikeln in Innenräumen bekannt, was aber für die Gesamtexposition nicht außeracht zu lassen ist. Untersuchungen zufolge können sich Typ und Konzentration von Feinstaubpartikeln in Innenräumen je nach baulichen Gegebenheiten, Nutzerverhalten und den vorhandenen Quellen deutlich unterscheiden.

Es fehlt derzeit an einfachen, rasch anwendbaren Methoden, um die in einer Wohnung auftretenden Feinstaubtypen mit vertretbarem Aufwand zu klassifizieren. Verantwortlich dafür ist die große Typenvielfalt der in luftgetragenen Fein- und Ultrafeinstäuben vorkommenden Partikel.

Zur üblichen Praxis von Feinstaubmessungen gehören beispielsweise Messungen der integralen Partikelmassenkonzentration, Partikeloberflächenkonzentration, Partikelzahlkonzentration oder auch deren Größenverteilungen. Eine Klassifizierung der Partikel kann damit alleine nicht erfolgen und somit fehlen diesen Messungen die Aussagen über mögliche Gesundheitseffekte, die auf Basis individuell klassifizierter Partikel abgeleitet werden können. Eine Ausnahme bildet das Rasterelektronenmikroskopische Verfahren zum Messen anorganischer faserförmiger Partikel (VDI 3492)

Mittels mikroskopischer Verfahren ist es möglich Einzelpartikelanalysen durchzuführen, dabei müssen Informationen zu morphologischen und auch zu stofflichen Eigenschaften generiert werden. Um statistisch gesicherte Aussagen treffen zu können, ist jedoch eine hohe Zahl an Einzelpartikelanalysen mit genauer morphologischer Auswertung der REM-Abbildungen und der mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX) bestimmten Elementzusammensetzung erforderlich. Dieses bedarf eines immensen Zeit- und Personenaufwands. Hinzu kommt die Generierung von Informationen zur Partikelidentifizierung aus dem Raman-Mikroskop.

Um eine statistisch gesicherte Identifizierung und Klassifizierung von luftgetragenen Partikel aus Innenraumluft mit vertretbarem Zeit- und Personenaufwand zu ermöglichen, sind softwarebasierte Methoden für eine automatische Bildgenerierung, Erkennung, Identifizierung und Klassifizierung von Partikeln und Fasern unter Einbeziehung stofflich-chemischer Informationen erforderlich.

Nur so lässt sich das Wissen über die Art und Konzentration luftgetragener Partikel in Innenräumen verbessern und somit eine Charakterisierung vornehmen und eine Abschätzung eventueller Gesundheitsgefahren besser erkennen.

2. Das Projekt EMMI - Gesamtüberblick

Im Rahmen des Projekts *EMMI* sollen die Zusammensetzung und Konzentration auch komplexer Partikelmischungen in der Innenraumluft zukünftig detaillierter als bisher möglich untersucht und ein Beitrag zum Gesundheitsschutz von Verbrauchern und Arbeitnehmern geleistet werden. Dafür wird ein System für die Beprobung und Analyse von luftgetragenen Partikeln in Innenräumen konzipiert und erprobt. Es umfasst ein Sammelsystem, mit dem die PM-2,5-Fraktion auf elektronenmikroskopierbaren Kernporenfiltern abgeschieden wird. Durch korrelative Mikroskopie, also eine ortskorrelierte Kombination mehrerer bildgebender und spektroskopische Stoffinformationen generierender Analyseverfahren, werden die Feststoffpartikel nach dem aktuellen Stand der Technik bestmöglich charakterisiert. Die für solche Analysen notwendige Bild- und Spektrenerfassung sowie das Wiederauffinden interessierender Bildbereiche, Berechnung von Transformationsparametern und ihre pixelgenaue Orientierung wird mittels der Mikroskopsteuersoftware *TiNa* automatisiert. Die Zusammenführung aller korrelierten Bild- und Spektroskopie-Daten erfolgt über die Software *FibreDetect*. Sie bietet Möglichkeiten zur Objekterkennung, der objektbezogenen

Aggregation spektroskopischer Daten und der auf morphologischen und stofflichen Daten basierenden Objektklassifikation.

Für eine verlässliche Konzentrationsbestimmung und Grenzwertüberprüfungen von luftgetragenen Partikeln sind Mindestluftmengen zu analysieren, die im Fall von Sammelfiltern einer festen auszuwertenden Filterfläche entsprechen. Für das Ziel, zukünftig auch sehr kleine luftgetragene Partikel bis hinab in den Nanometerbereich hinein identifizieren und quantifizieren zu können, sind allerdings im Gegensatz zu z.B. Asbest etablierten Methoden mit deutlich höheren mikroskopischen Auflösungen erforderlich. Dies hat zur Folge, dass die für die Abbildung der auszuwertenden Filterfläche benötigte Bildanzahl mit abnehmender Punktauflösung quadratisch ansteigt. Während z.B. für die Asbestquantifizierung mikroskopische Auflösungen von etwa 100 nm erforderlich sind, werden für die toxikologisch kritischen rigiden mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren Punktauflösungen von etwa 10 nm benötigt. Der Analyseaufwand nimmt in diesem Fall um einen Faktor 100 zu. Er setzt sich aus der Zeit am Mikroskop für die Bilderzeugung und dem Zeitbedarf für die Analyse des Bildinhaltes, z.B. die Suche nach Fasern, zusammen. Solange noch keine vollautomatische Bildanalyse möglich ist, halten wir es für ratsam, an automatisierbaren Mikroskopen die Datenerfassung von der Datenanalyse zu trennen. Die Erfassung von Bildern und Spektren erfolgt dann kontinuierlich und ohne ständige Interaktion einer REM-Spezialistin am Gerät, die die Erfassung nach jedem Bildeinzug für einen visuellen Analyseschritt unterbricht, um zu entscheiden, ob für gefundene Partikel weitere Analysen mit z.B. EDX notwendig sind. Indem für jedes Bild SE- und EDX-Bilder standardmäßig eingezogen werden, kann auf Kosten größerer anfallender Datenmengen und längerer Messdauern bevorzugt in den Nachtstunden eine höhere Ausnutzung des Mikroskops erreicht werden. Bei einem solchen Vorgehen hat die visuelle Datenanalyse dann im Nachgang, also „offline“ zu erfolgen, wobei die Arbeitslast jedoch auf mehrere trainierte Mitarbeitende verteilt werden kann. Eine solche Vorgehensweise wird beispielsweise bei der Überprüfung von Grenzwerten für die Anzahlkonzentration luftgetragener nanoskaliger Fasern empfohlen (Meyer-Plath 2020b).

Ziel aktueller Entwicklungen auf dem Gebiet der digitalen Bildverarbeitung ist, relevante Objekte in Mikroskopbildern automatisch zu erkennen und anhand ihrer Gestalt sowie

elementarer und chemischer Informationen zu klassieren. Unsere Entwicklungsarbeiten kombinieren dazu klassische Bildverarbeitungstechniken mit Methoden des maschinellen Lernens unter Verwendung künstlicher neuronaler Netze.

Tabelle 1: Ablauf der Filteranalyse.

1. Partikel auf Filtermembran sammeln		
2a. REM-Steuerung SE-Bildeinzug Formerkennung	2b. EDX-Steuerung EDX-Mapping	3. Raman-Steuerung OM-Bildeinzug Raman-Spektren
4. Pixelgenaue Bildzuordnung		
5. Klassifikation		
6. Identifikation von Partikeln		

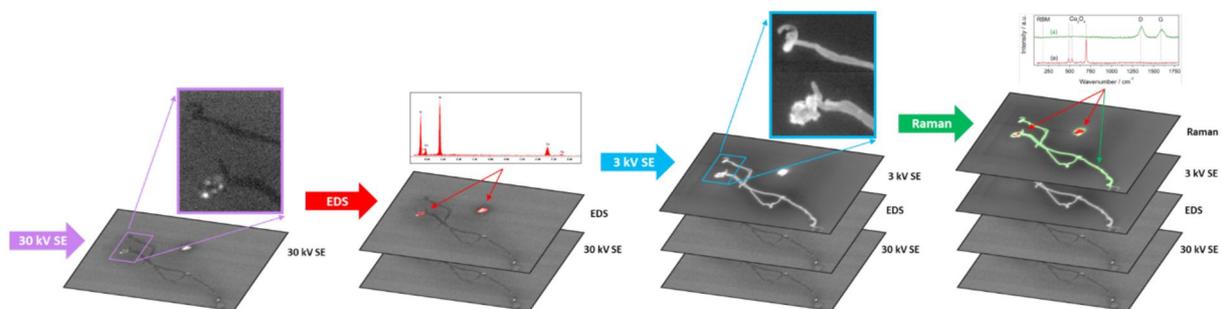


Abbildung 1: Schematische Darstellung örtlich korrelierter SE-Bilder mit Falschfarbendarstellungen spektraler EDX- und Raman-Mappings.

3. Gerätetechnik

3.1. Partikelsammler

Vor Ort werden die Feinstäube mittels Partikelsammelsystemen auf einem Kernporenfilter erfasst. Zum Sammeln luftgetragener Partikeln wird mittels eines selbst konstruierten Adapterstücks ein PM-2,5 (MiniVS-C, Sven Leckel Ingenieurbüro GmbH, Berlin) mit einem üblicherweise für die Asbestanalyse verwendeten Probenahmekopf für Filtermembranen mit einem Durchmesser von 25 mm (CRB Analyse Service GmbH, Hardegsen) kombiniert. Als Filtermembranen werden vergoldete Kernspurfilter aus Polycarbonat mit 400 nm Porengröße verwendet (Analytische Produktions-, Steuerungs- und Controllgeräte GmbH, Eschborn). Dieses System ermöglicht es uns, die feineren Partikel zu erfassen und besser zu betrachten. Die Probenahme erfolgte bei einem Volumenstrom von 4 l/min über ca. 8 Stunden.



Abbildung 2: Verwendeter Partikelsammler. Links: UBA-Impaktor, Mitte: BAuA-Sammelkopf, Rechts: Vergoldeter Polycarbonat-Kernporenfilter.

3.2. Rasterelektronenmikroskop mit EDX-Detektor

Das Rasterelektronenmikroskop mit EDX-Detektor ermöglicht die Aufnahme morphologischer Strukturen der Partikel sowie eine Erfassung der im Partikelmaterial enthaltenen chemischen Elemente. Die Filtermembran mit den gesammelten Partikeln wird mit einem hochauflösenden Mikroskop vom Typ Hitachi REM SU8200 (Hitachi High-Tech Europe GmbH, Krefeld) bei hoher Vergrößerung abgebildet. Das Mikroskop wird mit unserer hauseigenen Software *TiNa* gesteuert. Es wird zunächst eine bestimmte Anzahl von zufällig gewählten Bildfeldern innerhalb eines vordefinierten Messbereichs automatisch angefahren, fokussiert und eingezogen. Die Anzahl der für eine verlässliche Quantifizierung oder Grenzwertüberprüfung notwendigen Bilder hängt dabei von der pro Filterfläche gesammelten Luftmenge, der verwendeten Punktauflösung und der Pixelzahl eines Bildes ab (Meyer-Plath 2020b, DIN EN 689). Standardmäßig verwenden wir 2560x1960, also rund 5 Megapixeln pro Bild und eine Punktauflösung von 25 nm. Mittels eines FlatQUAD Detektors (Bruker Nano GmbH, Berlin) wird für jedes Bildfeld auch die elementare Zusammensetzung des Filters und darauf liegender Partikel im Mapping-Mode bestimmt. Die große Fläche und geringe Distanz des EDX-Detektors zur Probe resultieren im Vergleich zu unserem herkömmlich seitlich platzierten XFlash 6|60 Detektor (Bruker Nano GmbH, Berlin) in einer bis zu 30-fach höheren Zählrate. Dieser Faktor macht ein solches standardmäßiges Mapping mit vertretbaren Bildeinzugszeiten im Bereich von 240 s möglich.

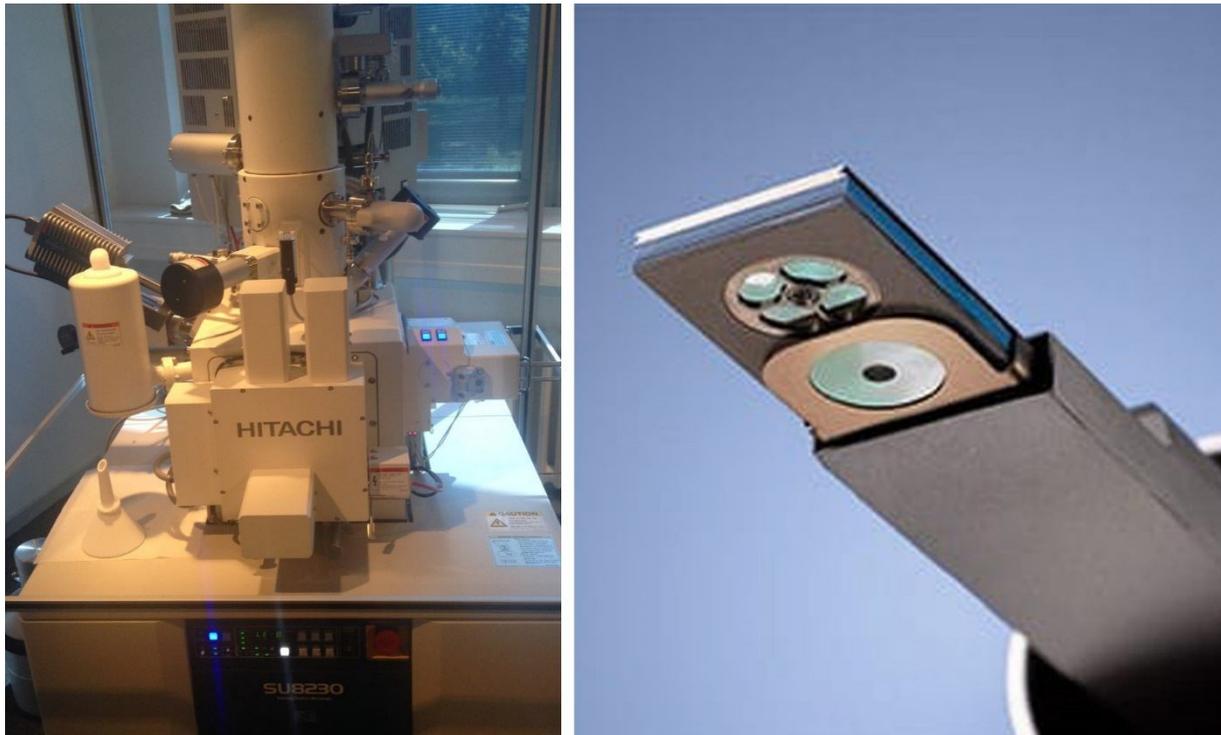


Abbildung 3: Links: Hitachi REM SU8200, Rechts: EDX FlatQUAD Detektor (Bruker Produktbroschüre).

3.3. Raman-Mikroskop

Die von einem Partikel ausgehende Raman-Streuung enthält Informationen über im Partikel vorhandene chemische Bindungen. Mittels eines hochgradig automatisierten konfokalen Raman-Mikroskops vom Typ WITec apyron 300 RA (WITec GmbH, Ulm) können für die Partikelidentifizierung zusätzlich notwendige chemische und optische Informationen gewonnen werden. Im optischen Mikroskopiebild kann die Farbe und Transparenz größerer Objekte erkannt werden und Einzelpartikel oder Filterbereiche können mittels punktwieser oder mappender Raman-Spektroskopie analysiert werden. Dabei wird bei Anregung mit einem Laser von 532 nm Wellenlänge bei Verwendung eines Objektivs mit einer numerischen Apertur von 0,9 eine konfokale Auflösung von lateral 250 nm und vertikal 1000 nm erreicht.

Für die Raman-Analyse ist ein Transfer des Filters vom REM in das konfokale Mikroskop notwendig. Die Methode zum Wiederanfahren interessierender Filterbereiche wird im Folgenden beschrieben. Bei Verwendung von Kernporenfiltern kann eine Anfahrergenauigkeit im Bereich der lateralen optischen Auflösung erreicht werden (Meyer-Plath 2020a).

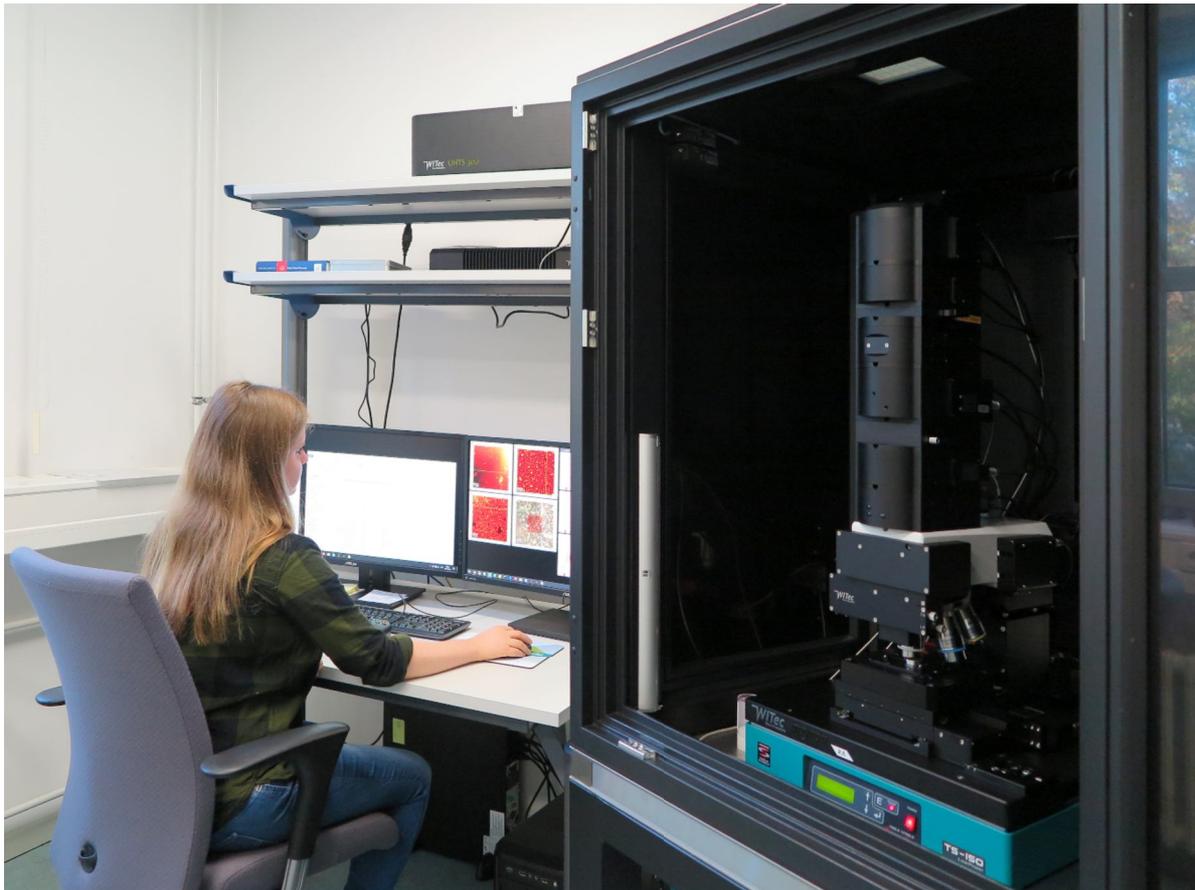


Abbildung 4: Automatisiertes konfokales Raman-Mikroskop WITec apyron 300 RA im geöffneten Licht- und Schallschutz-Gehäuse.

3.4. Automatisierte Bildaufnahme

Eine automatisierte Bildaufnahme ist wesentlich, um hohe Durchsatzraten analysierter Partikel zu erzielen. Als Besonderheit nutzt EMMI auch die wiederholte Untersuchung von Partikelproben bei unterschiedlichen Mikroskopeinstellungen. Besonders für ein späteres Wiederanfahren von bereits erfassten Bildfeldern, reicht eine Automatisierung der Bilderfassung, wie sie viele Gerätehersteller über einen programmierbar positionierbaren Probenstisch anbieten, nicht aus. Unsere Proben werden vor der ersten Analyse mit vier sowohl bei geringer als auch sehr hoher Vergrößerung erkennbaren Referenzpunkten markiert, deren Position im Koordinatensystem des Probenstisches bestimmt werden. Zur Markierung werden mit einer Nadel vier Löcher in die Filtermembran gestochen und ein Punkt mit einem Permanentmarker als linker oberer Punkt ausgewiesen. Eine markante Stelle des durch den in der Membran entstandenen Riss wird bei hoher Vergrößerung als Referenzpunkt definiert, im REM vermessen und als SE-Bild zur Dokumentation gespeichert (Abb. 5). Über die Tischkoordinaten dieser Referenzpunkte wird so ein probenbezogenes

Koordinatensystem definiert, das uns ermöglicht Relativpositionen anzugeben. Diese Festlegung eines probenbezogenen Koordinatensystems kann dann zu späterer Zeit oder an einem anderen Mikroskop wiederholt werden, sofern in diesem die Referenzpunkte mit hinreichender Genauigkeit erkennbar sind.

Zusätzlich wird ein Filterbereich ausgewählt, innerhalb dessen eine Liste zufälliger Analysepositionen generiert wird, deren Anzahl und Mindestabstand festgelegt werden kann. Die Anfahrgenauigkeit dieser Analysepositionen wird von der Genauigkeit der Probenischpositionierung begrenzt.

Nach Festlegung der Bildaufnahmeparameter (Detektoren, Arbeitsabstand, Beschleunigungsspannung, Punktauflösung, Bildgröße, Integrationsdauer etc.) erfolgt sukzessive die automatische Bilderfassung aller Analysepositionen.

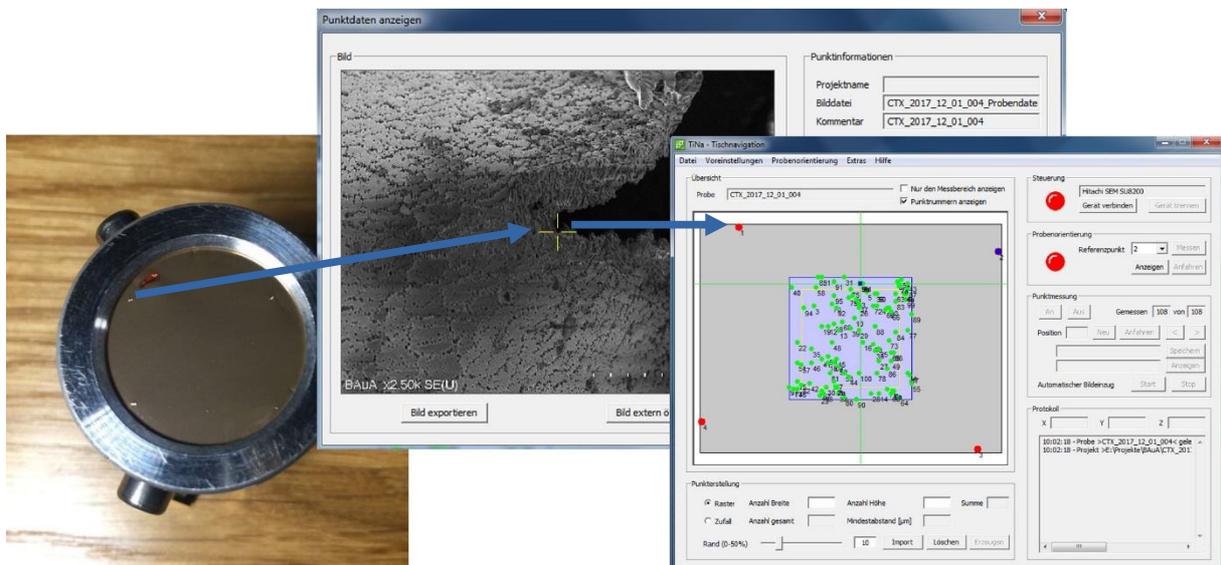


Abbildung 5: Einmessung eines Referenzpunktes mit der Software *TiNa* und Auswahl zufälliger Analysepositionen.

Der automatische Bildeinzug wird nur mit einem verlässlichen Autofokus zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Das Hitachi SU8230 verfügt, sofern er auf hinreichend kontrastreiche Bildinhalte angewendet wird, über einen sehr verlässlichen geräteseitigen Autofokus. Die verwendeten vergoldeten Kernporenfilter erfüllen diese Voraussetzung, da Goldschicht und Poren an jeder Filterposition auch unbelegt einen hohen Kontrast zeigen. Bei Aufnahmen eines schwach belegten Silizium-Wafers scheitert der Autofokus hingegen häufiger.

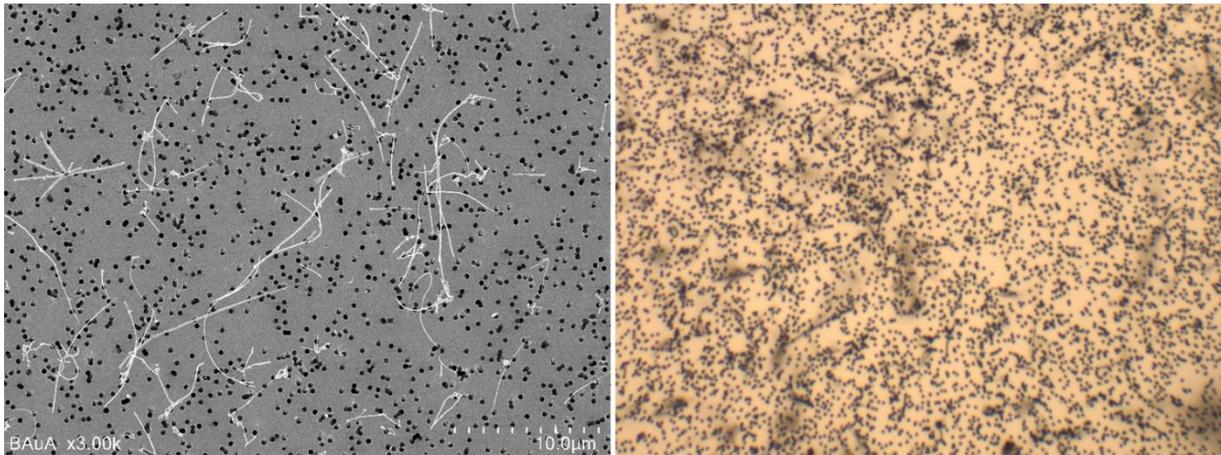


Abbildung 6: Links: REM SE-Bild mit 8,3 nm Punktauflösung, Rechts: Optisches Mikroskopiebild mit 50 nm Pixelgröße aber nur ca. 300 nm Punktauflösung. Die Größe der Filterporen beträgt 400 nm.

3.5. Automatisierte Spektrenerfassung

Die Erfassung von spektralen EDX- und Raman-Mappings erfolgt ebenfalls vollautomatisch mit der Software *TiNa*, d.h. zu jedem Bildpunkt wird ein vollständiges Spektrum abgespeichert. Da jedes dieser Spektren 1000 oder mehr Energiekanäle umfasst, sind die anfallenden Datenmengen nicht mehr ohne verlustfreie Kompressionsmethoden zu bewältigen, Details dazu in Abschnitt 3.2.

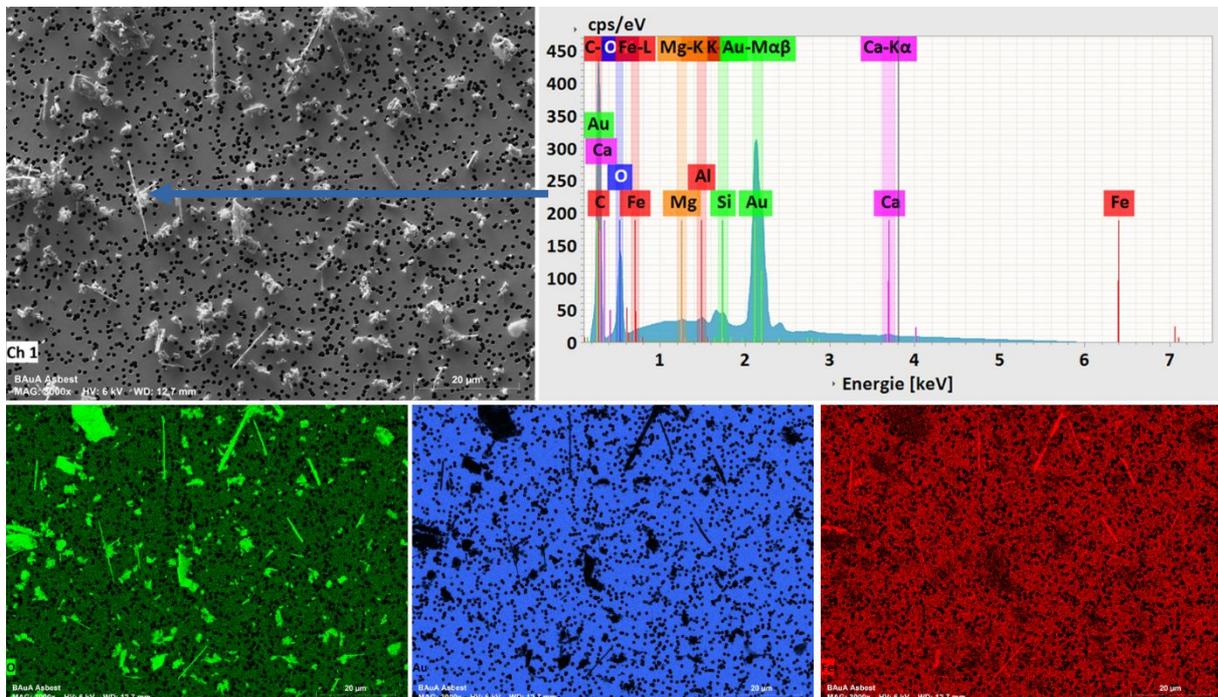


Abbildung 7: Oben: SE-Bild und EDX-Spektrum einer asbesthaltigen Probe, Unten: Falschfarbendarstellung des EDX-Mappings für die Elemente O, Au, Fe.

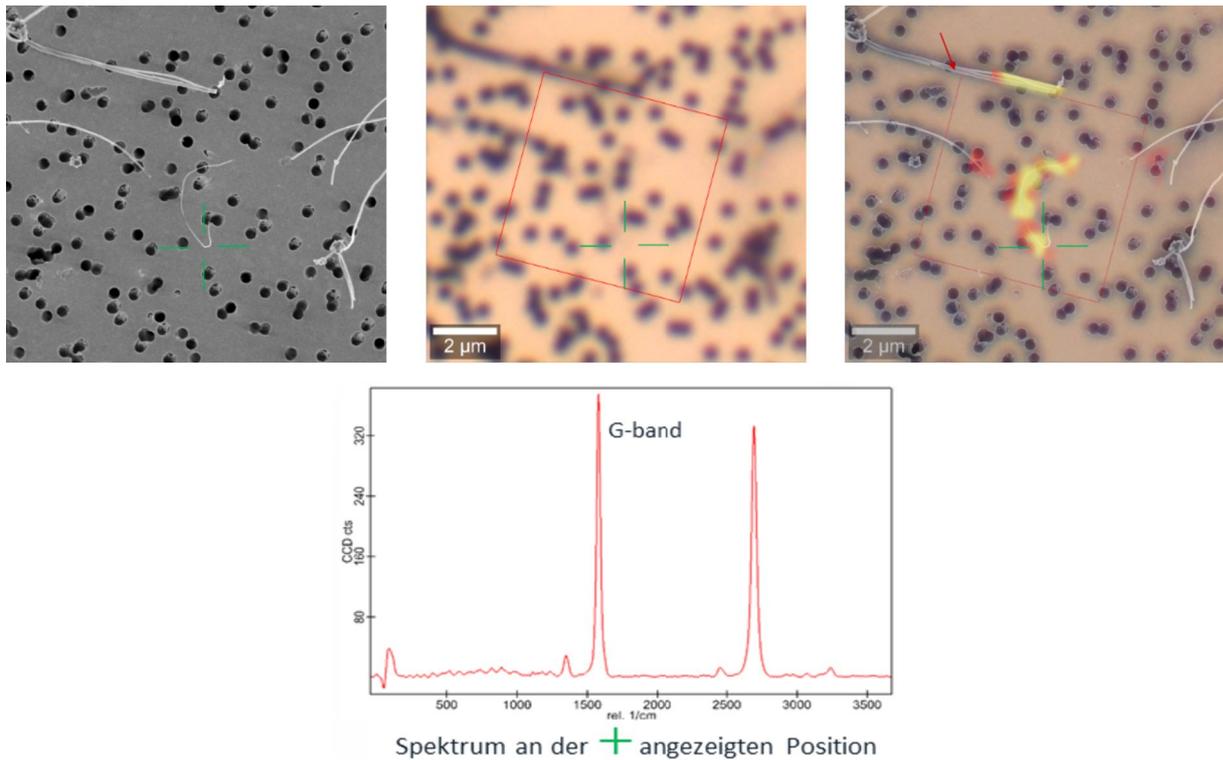


Abbildung 8: Links: Kohlenstoffnanoröhren im REM-SE-Bild. Mitte: OM-Bild desselben Filterbereichs. Rechts: Überlagerung von REM-SE-, OM- und Raman-Mapping eines Falschfarbenbildes der Intensität des G-Bandes von Kohlenstoff (Gelb: höchste Intensität). Unten: Raman-Spektrum an der mit einem grünen Kreuz ausgewiesenen Position, an der der Messlaser auf einer Kohlenstoffnanoröhre positioniert wurde, die im Lichtmikroskop nicht sichtbar war.

4. Methoden

Ziel der korrelativen Mikroskopie ist es, einen exakt überlagerten Bilderstapel zu erhalten, um zu jedem Filterbereich alle erfassten Informationen pixelgenau interpretieren zu können. Dieses Ziel unterstützt die Software *TiNa* mit Bildverzerrungs- und Bildorientierungsmethoden für die aufgenommenen Bilder und spektralen Mappings. Sofern eine Probe zwischen zwei Bildeinzügen nicht bewegt wird und die elektronenoptische Abbildung beim Umschalten der Beschleunigungsspannung vom SE- (2-3 kV) zum EDX-Mode (6-15 kV) ausreichend abbildungstreu erfolgt, ist eine punktgenaue Überlagerung allein mit Bildverzerrungsmethoden möglich.

Wird der Probenstisch jedoch zwischen zwei Messungen bewegt oder das Mikroskop gewechselt, resultieren durch den Bezug des Koordinatensystems der Probe zu dem des Mikroskops die begrenzte Anfahrergenauigkeit des Probenstischs und Ungenauigkeiten

beim Einmessen der Referenzpunkte in einer Wiederanfahrergenauigkeit einer Probenposition von im Mittel lediglich $5\ \mu\text{m}$ (Moré 2017). Darum kann in der Regel nicht davon ausgegangen werden, dass nach einem erneuten Anfahren zwei Bilder genau übereinanderliegend eingezogen werden. Bei hohen Vergrößerungen, die mit entsprechend kleinen Bildfeldgrößen einhergehen, könnte sogar das Ziel-Bildfeld verfehlt werden. Für diesen Fall wurden in *TiNa* Algorithmen zur Orientierung einer Probe anhand des Bildinhaltes entwickelt.

4.1. Korrektur durch Zuordnung des Bildinhaltes

Eine durch die limitierte Wiederanfahrergenauigkeit des Probenstisches verursachte Relativverschiebung zweier nacheinander erfassten REM- oder OM-Bilder kann von der Software *TiNa* mittels verschiedener digitaler Bildverarbeitungstechniken korrigiert werden. Zunächst wird ein Übersichtsbild mit halbiertem Vergrößerungsfaktor eingezogen und mit dem Ursprungsbild verglichen. Sind beide Bilder unter ähnlichen Aufnahmebedingungen entstanden, z.B. REM-SE-Bilder mit gleicher Beschleunigungsspannung, so werden sie ähnliche Schärfe- und Materialkontraste aufweisen. Dann werden mit einem Interest-Operator (Fürstner 1986) charakteristische Bereiche im Referenzbild identifiziert, die dann mit einem Least-Squares-Matching-Verfahren (Ackermann 1984) im zweiten Bild gesucht werden. Sind hinreichend viele ähnliche Bereiche vorhanden, können die Parameter einer Affintransformation zwischen beiden Bildern und so die relative Probenstischverschiebung berechnet werden. Sofern die Verschiebung eine gesetzte Toleranzgrenze übersteigt, wird der Probenstisch mit dem Ziel einer Positionskorrektur verfahren, um dann ein weiteres Bild einzuziehen. Je nach der mit der verwendeten Probenstischmechanik erreichbaren Positionierungsqualität kann dieser Schritt mehrfach durchgeführt werden. Das resultierende positionsoptimierte Bild wird den Bildbereich des Ursprungsbildes bestmöglich abdecken, jedoch reicht dies in der Regel noch nicht aus, um eine pixelgenaue Überlagerung zu ermöglichen. Anhand erneut berechneter Bildzuordnungsparameter wird daher eine neue Affintransformation berechnet und zusammen mit dem Bild gespeichert, um sie bei nachfolgenden Analysen für die Zuordnung der Pixel der neuen Bildebene zum Ursprungsbild zu verwenden. Dieses Verfahren funktioniert auch bei verdrehten Bildern, doch ist das gespeicherte Bild immer das zuletzt eingelesene. Es wird nicht verändert, also gedreht umgerechnet, da hierdurch Bildschärfe verloren gehen würden. Ein direktes

Übereinanderlegen ohne die Parameter der Affintransformation zu verwenden würde mit Standard-Bildverarbeitungsprogrammen wie z.B. Adobe Photoshop demnach nicht funktionieren. Die Analyse muss also mit angepasster Software erfolgen. Zur Darstellung kann übliche GIS (Geoinformationssystem) Software verwendet werden (z.B. ESRI ArcGIS), da die Orientierung ähnlich wie bei Luftbildern gespeichert wird. Da die Verdrehung der Bilder aus einer verdreht eingelegte Probe im REM resultiert, kann mit *TiNa* nach der Einmessung der Referenzpunkte die Probenverdrehung berechnet und durch Drehung des Probenstischs korrigiert werden, so dass die Bildfelder sich nach der Tischverschiebung bis auf kleine Restfehler maximal entsprechen.

Bei sehr unterschiedlichen Bildtypen, wie z.B. REM-SE-Bild und OM-Bild, scheitert diese Methode in der Regel daran, hinreichend ähnliche Bildbereiche zu identifizieren. Allerdings stellt uns die Struktur der Kernspurmembranfilter eine elegante Möglichkeit der Zuordnung bereit: Die Poren des Filters wurden mithilfe eines Ionenstrahls an zufällig verteilten Positionen erzeugt. Durch die zufällige Verteilung ist es praktisch ausgeschlossen, dass sich die Anordnung von zwei (hinreichend großen) Gruppen von Poren gleicht. Darum finden sich in jedem Bildbereich individuelle Porenmuster, die wir als Porenkonstellationen bezeichnen. Es hat sich gezeigt, dass diese Konstellationen auch bei Verwendung unterschiedlicher Bildgebungsverfahren wiedererkennbar bleiben, sofern das Verfahren Porenkontraste darstellt. Die Wiedererkennung solcher Konstellationen kann mittels Bildkorrelationsrechnungen geleistet werden (Meyer-Plath 2020b). Alternativ kommt in *TiNa* eine Kreiserkennung der Porenränder im Kantenbild (Canny 1986) zum Einsatz, bei der eine Konstellationen der Kreismittelpunkte erhalten wird. Analog zur Astronomie (Spratling 2009) bei wolkenverhangenem Himmel müssen wir eine Zuordnung zwischen zwei Bildern auch dann noch leisten können, wenn nicht alle Poren in beiden Bildern erkannt wurden, da sie z.B. außerhalb des überlappenden Bildbereiches liegen oder die Bildgebungen verschiedene Kontrastbereiche umfassen (Abb. 9). Wir haben zu diesem Zweck einen kombinatorischen Algorithmus entwickelt, der mit der Verteilung der Relativabstände einer Pore zu anderen Poren arbeitet und eine genaue und robuste Zuordnung von Konstellationen ermöglicht. Sowohl in *TiNa*, als auch in der für die nachfolgende Bildanalyse entwickelte Software *FiberDetect* (Schumann 2019) sind diese Methoden implementiert.

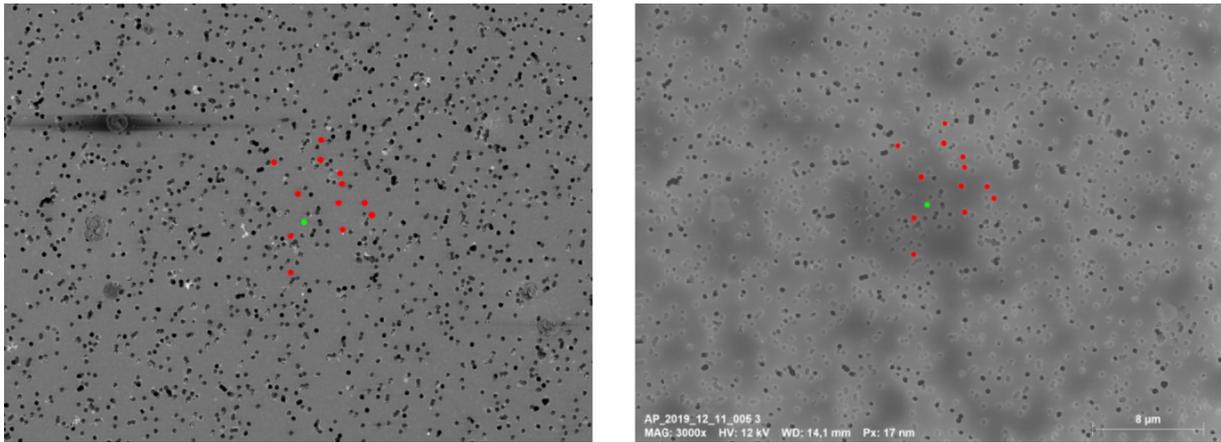


Abbildung 9: Ergebnis der Identifizierung und Lokalisierung einer Porenkonstellation in REM-SE-Bildern mit unterschiedlichen Beschleunigungsspannung von 3 kV (links) und 12 kV (rechts).

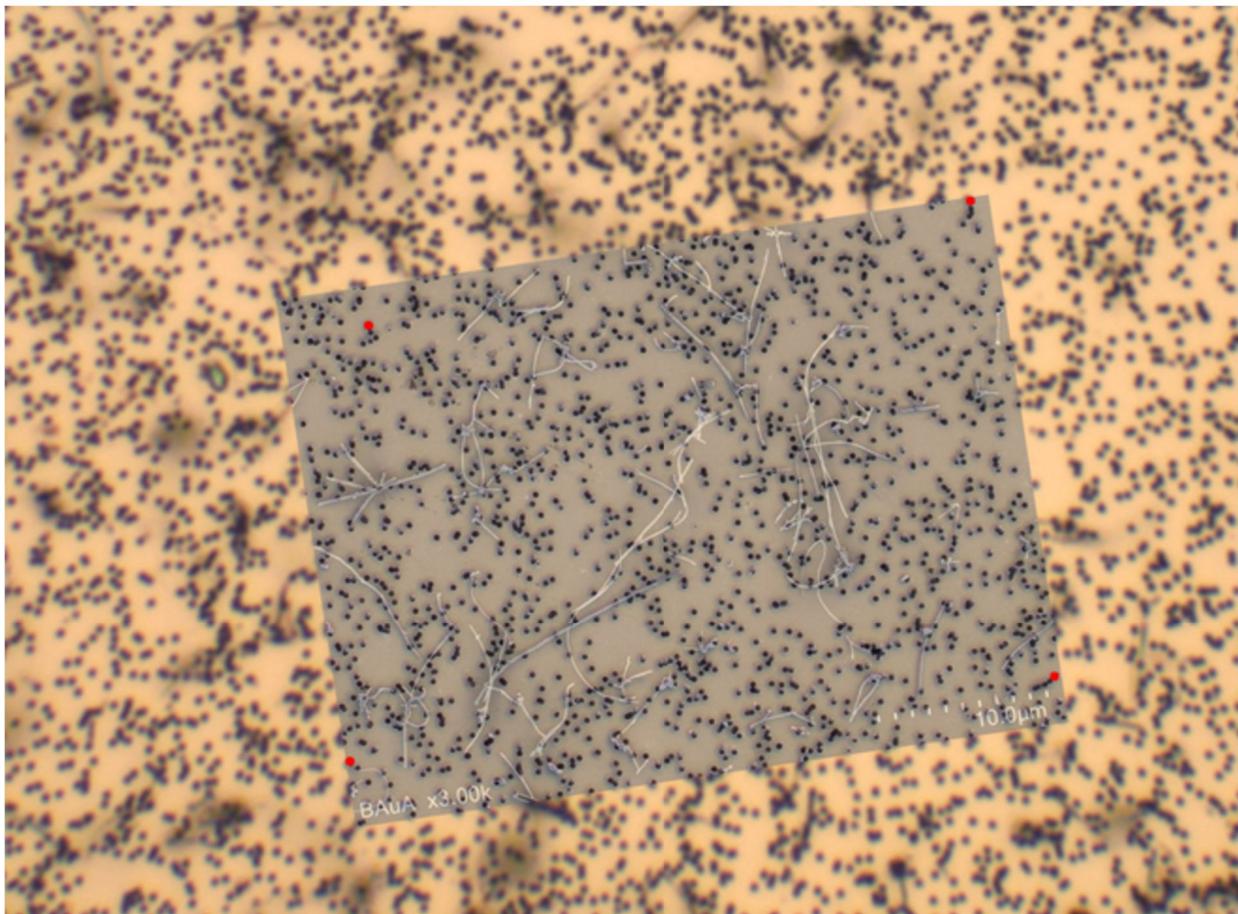


Abbildung 10: Überlagerung eines REM-SE-Bildes mit einem OM-Bild.

4.2. Datenmodell des Bilderstapels

Zur Erfassung, Orientierung und Verarbeitung ganz unterschiedlicher Bildtypen und Spektren ist ein Datenmodell nötig, das den Zugriff auf jedes Pixel und jeden spektralen Kanal in allen

denkbaren Bildkombinationen ermöglicht, um in einem mehrere Gigabyte umfassenden Datensatz zeit- und speichereffizient Intensitätsberechnungen von Bildkontrasten und Partikelzusammensetzungen durchzuführen, wie sie für eine Objektklassierung benötigt werden. Bereits die EDX-Mappings benötigen pro 2560x1960-Pixel-Bild unkomprimiert mehr als 10 GB. Darum war es nötig, ein spezielles Datenmodell auf Basis von Standardkompressionsverfahren zu entwickeln. Der Bilderstapel besteht darin aus einer Datei, in der alle Bilder, Mappings, Metadaten und ihre Bildpunkt-Zuordnungstransformationen, sowie Bildpunktkoordinaten enthalten sind.

4.2.1. Bilder

Bilder werden als TIFF-Datei gespeichert. Sie können im Bilderstapel wahlweise unkomprimiert oder mit dem LZW-Algorithmus (Lempel 1977) verlustfrei komprimiert abgelegt werden. Ein schneller Bildzugriff ohne Bildkompression hat sich als vorteilhaft herausgestellt, gegenüber den für unsere Bildinhalte typischerweise nur um ca. 10-20% kleineren komprimierten Bilddateien.

4.2.2. Spektrale Mappings

Für spektrale Mappings eines Filterbereichs, die mit ihrem Energiekanal einen dreidimensionalen Datensatz ergeben, ist eine Kompression unerlässlich, da andernfalls der enorme Speicherbedarf eine Verarbeitung auf Standardrechnern vereiteln würde. Unsere Herausforderung bestand darin, einen guten Kompromiss zwischen Dateigröße und Geschwindigkeit zu finden. Hierbei erwies sich eine zweistufige Kompression als optimal. Zu jedem Pixel gehören 1024 bis 4096 Energiekanäle, die im Fall der EDX-Daten aufgrund der geringen Integrationsdauer pro Bildpunkt zu einem großen Teil aus Nullen oder einstelligen Zahlen (counts) bestehen. Der verwendete verlustfreie Kompressionsalgorithmus wurde daher auf Geschwindigkeit und einen kleinen Zahlenraum optimiert. Auch hier kommt der LZW-Algorithmus (Lempel 1977) zum Einsatz. Dennoch ist die komprimierte Datenmenge noch recht groß. Andere Algorithmen (ZIP, 7z usw.) ermöglichen höhere Kompressionsraten, doch dauert das Komprimieren und Entpacken wesentlich länger. Nachdem alle Pixel einzeln mit LZW komprimiert wurden, wird darum das komplette Mapping nochmals mit dem BZip2-Verfahren (Seward 1996) komprimiert. Dieses Verfahren hat eine sehr hohe Kompressionsrate und kann relativ schnell entpacken. Die Kompression hingegen dauert

deutlich länger, doch wird diese lediglich bei der erstmaligen Erstellung des Bildstapels durchgeführt. So erreichen wir für eine EDX-Datei eines 2560x1960 Pixel großen Bildes bei 240 s Bildeinzugsdauer eine Kompressionsrate von ca. 99%, z.B. von 4,5 GB auf 68 MB komprimiert. Zusätzlich dazu wird ein SE-Bild separat BZip2-komprimiert gespeichert. Der Zugriff auf das SE-Bild kann somit sehr schnell erfolgen, ohne die ganze Mapping-Datei entpacken zu müssen. Zur Datenanalyse muss zunächst das komplette Mapping mit BZip2 entpackt werden. Aus 68 MB werden dabei ca. 400 MB. Nun können das komplette Mapping oder nur ein kleiner Filterbereich analysiert werden. Es werden dazu nur die zu diesen Pixeln gehörenden Spektren entpackt und analysiert. Auf diese Weise kann in einem Mapping von 2560x1920 Pixeln ein Bereich von z.B. 100x100 Pixeln ausgewertet werden, ohne die gesamte spektrale Information entpacken zu müssen.



Abbildung 11: Datenmodell für einen schnellen Zugriff auf die EDX-Spektren aus dem Mapping des Filterbereichs.

4.2.3. Metadaten und Koordinaten

Zu jedem Bild oder Mapping gehören zudem wichtige Metadaten. Diese sind neben der genauen Bezeichnung, des Ursprungsdateinamens, den Orientierungsstatus, den Dateioffset auch die Parameter der Affintransformation zwischen den Bildern und Mappings. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, werden alle Bilder des Bilderstapels pixelgenau

übereinandergelegt und die dafür benötigten Transformationsparameter gespeichert. Ohne diese Information kann keine genaue Analyse der Daten erfolgen. Da die Bildzuordnung über homologe Bildkoordinaten berechnet wird, sind auch diese Koordinaten im Bilderstapel mit ihrer Genauigkeit des Least-Squares-Matching gespeichert. Die Metadaten liegen immer unkomprimiert vor und können direkt gelesen werden.

4.2.4. Bildauswertung mit der Software FibreDetect

Das zuvor beschriebene Datenmodell wurde in der an der BAuA entwickelten Software *FibreDetect* realisiert. Bilder und Mappings können eingelesen, Bildzuordnungen, sofern dies nicht vorher in *TiNa* erfolgte, berechnet und Analysen durchgeführt werden. Laden und Speichern der Bildstapeldateien gehen sehr schnell und der Zugriff auf einzelne pixelbezogene Informationen erfolgt ohne erkennbare Zeitverzögerung. Für drei Bilder und einem Mapping ist die Datei in diesem Beispiel lediglich 56 MB klein.

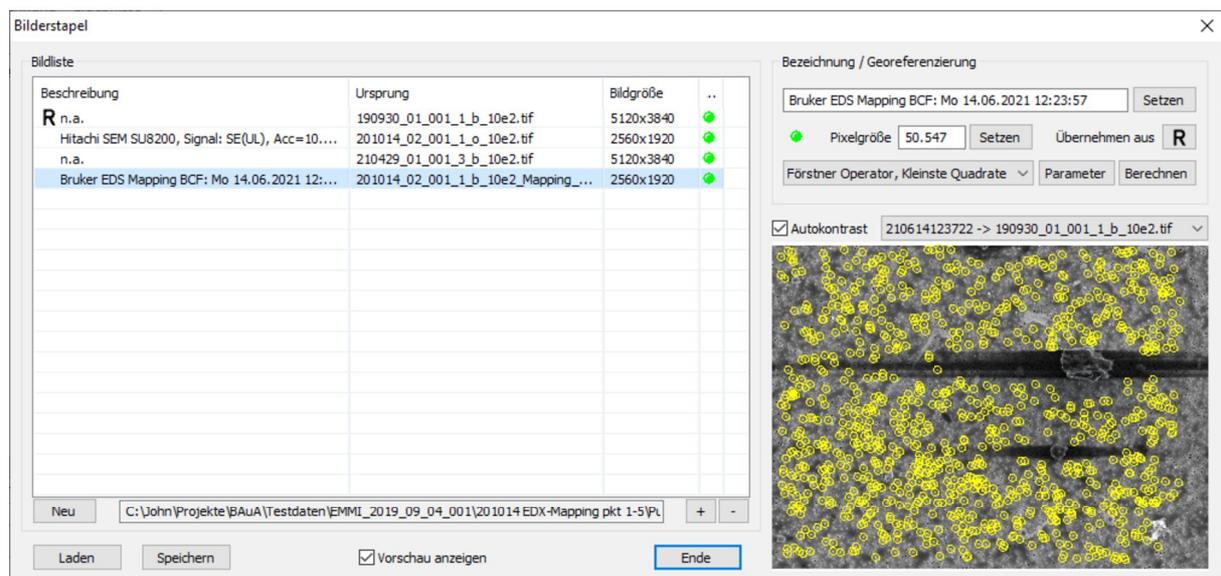


Abbildung 12: Handhabung von Bilderstapeln in der Software *FibreDetect*.

4.3. Korrelative Mikroskopie

Die im Bilderstapel übereinanderliegenden, d.h. miteinander in Korrelation gesetzten Bilder und Mappings können nun analysiert werden. Mit dem hochauflösenden REM-SE-Bild wird eine Segmentierung durchgeführt, um einzeln Objekte und deren Form (Morphologie) vor dem Filterhintergrund zu erkennen. Dies erfolgt sowohl mit klassischen Methoden der digitalen Bildverarbeitung (Zack 1977, Schumann 2019) als auch unter Verwendung von

künstlichen neuronalen Netzen mit U-Net-Topographie (Ronneberger 2015). Zu jedem Objekt kann nun im Bilderstapel entweder eine Ansicht eines Mikroskops bzw. andere Abbildungsparameter präsentiert werden, oder das Ergebnis einer EDX-Quantifizierung, aus der die elementare Zusammensetzung hervorgeht. Auf diese Weise erhält jedes Objekt eine Reihe von Eigenschaften zugeordnet, anhand derer es identifiziert werden kann.

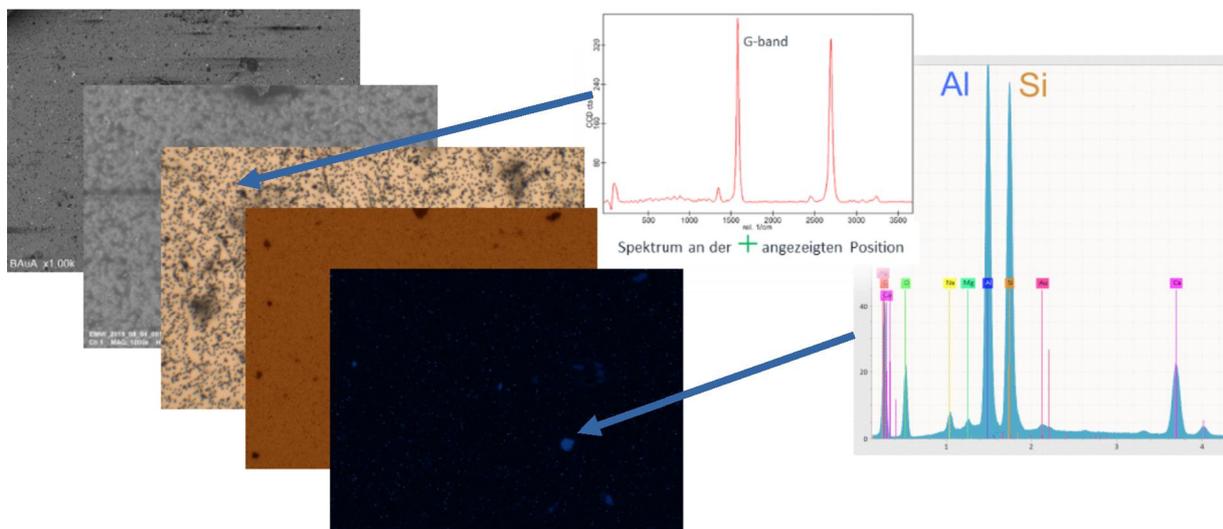


Abbildung 13: Beispiel eines mit korrelativer Mikroskopie analysierten Filterbereichs.

4.4. Klassierung von Objekten

Durch die Kombination von Formerkennung und Zuordnung der elementaren und chemischen Zusammensetzung eines Objektes wird eine Klassierung möglich. Anhand der Form allein kann z.B. bereits eine Aussage zu möglicherweise gesundheitsschädlichen faserförmigen Partikeln getroffen werden. Arbeiten an der BAuA haben sich dieser Fragestellung detailliert gewidmet und eine Klassierungsmatrix erstellt (Broßell 2020). Auch die Asbestanalytik arbeitet mit der Erkennung von faserförmigen Partikeln, auch hier muss die elementare Zusammensetzung bestimmt werden. Dies erfolgt in vielen Fällen noch händisch am REM, indem für individuell als Fasern erkannter Objekte eine punktweise EDX-Spektrenaufnahme initiiert wird und das Spektrum „online“ vom Experten am REM interpretiert wird.

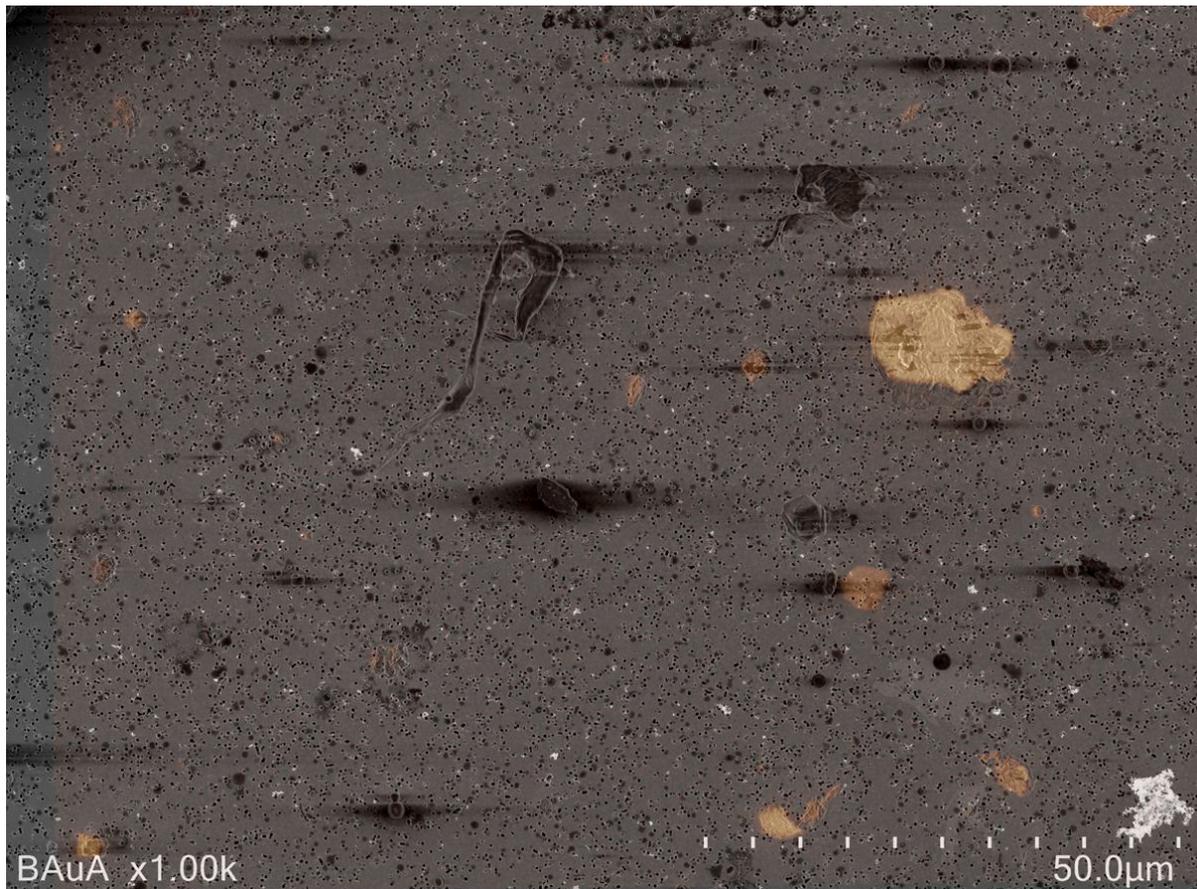


Abbildung 14: REM-SE-Bild überlagert von mit einem Falschfarbenbild der Konzentration des Elements Silizium (orange).

5. Ausblick

Bislang erfolgt die Klassierung von uns analysierter Partikel noch nicht automatisch. Unser Ziel ist jedoch eine vollautomatische oder zumindest computerunterstützte Zuordnung zu vorher festgelegten Materialklassen. Hierfür müssen auf Basis von Reihenuntersuchungen an bekannten Materialien Analyseergebnisse akkumuliert werden, um trennscharfe Klassierungsparameter zu identifizieren. Hierfür ist die Erstellung einer Partikeldatenbank notwendig, in der die Gestalt, Oberflächentextur sowie Informationen zur chemischen und elementaren Zusammensetzung zusammengetragen werden. In nachfolgenden Arbeiten wird dann die Verlässlichkeit der Klassierung durch klassische algorithmische Methoden mit Methoden künstlicher neuraler Netze studiert werden.

6. Fazit

Im Rahmen des Projekts *EMMI* wurde ein System für die Beprobung und Analyse von luftgetragenen Partikeln in Innenräumen konzipiert und erprobt. Es umfasst ein

Sammelsystem, mit dem die PM-2,5-Fraktion auf elektronenmikroskopierbaren Kernporenfiltern abgeschieden wird. Durch korrelative Mikroskopie, also eine ortskorrelierte Kombination mehrerer bildgebender und spektroskopische Stoffinformationen generierender Analyseverfahren, werden die Feststoffpartikel nach dem aktuellen Stand der Technik bestmöglich charakterisiert. Die für solche Analysen notwendige Bild- und Spektrenerfassung sowie das Wiederauffinden interessierender Bildbereiche, Berechnung von Transformationsparametern und ihre pixelgenaue Orientierung wurde mittels der Software *TiNa* automatisiert. Die Software ermöglicht derzeit Rasterelektronenmikroskope der Hitachi SU8000er- und SU8200er-Serie sowie REMs verschiedener Hersteller, die mit dem DISS5-System der Firma point electronic GmbH kontrolliert werden, zu steuern. Zum REM korrelierte automatisierte Spektroskopie ist mit QUANTAX-EDX-Systemen der Firma Bruker Nano GmbH sowie Raman-Mikroskopen vom Typ Apyron 300 der Firma WITec GmbH möglich. Die Integration weiterer Systeme wird angestrebt, erfordert jedoch geeignete und von den Geräteherstellern freigegebene Softwareschnittstellen.

Die Zusammenführung aller korrelierten Bild- und Spektroskopie-Daten erfolgt über die Software *FibreDetect*. Sie bietet Möglichkeiten zur Objekterkennung, der objektbezogenen Aggregation spektroskopischer Daten und der auf morphologischen und stofflichen Daten basierenden Objektklassifikation.

Mit unseren Software- und Methodenentwicklungen sollen die Zusammensetzung und Konzentration auch komplexer Partikelmischungen in der Innenraumlufte zukünftig detaillierter als bisher möglich untersucht und ein Beitrag zum Gesundheitsschutz von Verbrauchern und Arbeitnehmern geleistet werden.

7. Literatur

Ackermann F (1984): High Precision Digital Image Correlation. Schriftenreihe Institut für Photogrammetrie, Universität Stuttgart, Heft 9, Stuttgart 1984.

Broßell D, Meyer-Plath A, Kämpf K, Plitzko S, Wohlleben W, Stahlmecke B, Wiemann M, Haase A (2020). A Human risk banding scheme for high aspect-ratio materials. In: Synthetic Nano- and Microfibers; Wagterveld RM, Hrg. WETSUS: Leeuwarden, Niederlande, 2020; Seiten 55-80.

Canny J (1986): A computational approach to edge detection, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, PAMI-8(6): 679-698, DOI: 10.1109/TPAMI.1986.4767851.

DIN EN 689 „Exposition am Arbeitsplatz- Messung der Exposition durch Einatmung chemischer Arbeitsstoffe- Strategie zur Überprüfung der Einhaltung von Arbeitsplatzgrenzwerten“

Förstner W (1986): A Feature Based Correspondence Algorithm for Image Matching. Proceedings of the Symposium "From Analytical to Digital", ISPRS Band 26(3/3): 150-166, Rovaniemi, Finland 1986.

Lempel A, Ziv J (1977): A universal algorithm for sequential data compression, IEEE Transact.Information Theory 23(3): 337-343, DOI: 10.1109/TIT.1977.1055714.

Meyer-Plath A (2020a): Correlating SEM and Raman Imaging of Nucleopore Filter Sampled Nanofibers. Virtual Raman Imaging Poster Summit 2020, DOI: 10.13140/RG.2.2.11130.72641.

Meyer-Plath A (2020b): A Practicable Measurement Strategy for Compliance Checking Number Concentrations of Airborne Nano-and Microscale Fibers. Atmosphere 11(11): 1254, DOI: 10.3390/atmos11111254.

Moré J, Dziurawitz N, Thim C, Hemmleb M, Berger D (2017): Relocation of defined sample positions with an automated stage navigation tool for SEM. Poster auf der MC2017 Conference in Lausanne 2017, Proceedings mc2017: 481-483.

Ronneberger O, Fischer P, Brox T (2015): U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. In: Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention - MICCAI 2015: 234-241, ISBN 978-3-319-24574-4.

Schumann J, Bäger D, Dziurawitz N, Thim C, Meyer-Plath A (2019): Retrieving SEM sample positions under limited relocation accuracy using digital image processing, Poster auf der MC2019 Conference in Berlin 2019, Proceedings mc2019: 391-392.

Schumann J, Kämpf K, Meyer-Plath A, Plitzko (2019): Automated Detection, Tracking and Characterization of Toxicologically Relevant Nanoscale Fibres in Scanning Electron Microscope Images, Poster auf dem ISBI2019 IEEE International Symposium, April 2019, Venedig, Italien, Proceedings TuP2O-05.9.

Seward J (1996): <https://github.com/dsnet/compress/blob/master/doc/bzip2-format.pdf>.

Spratling BB, Mortari D (2009): A Survey on Star Identification Algorithms. Algorithms 2(1): 93-107, DOI: 10.3390/a2010093.

VDI 3492:2013-06 : Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Messen von Immissionen - Messen anorganischer faserförmiger Partikel - Rasterelektronenmikroskopisches Verfahren. Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN - Normenausschuss. Beuth Verlag

Zack G, Rogers W, Latt S (1977): Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. J Histochem Cytochem 25:741 –753.