

Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität Frankfurt am Main –

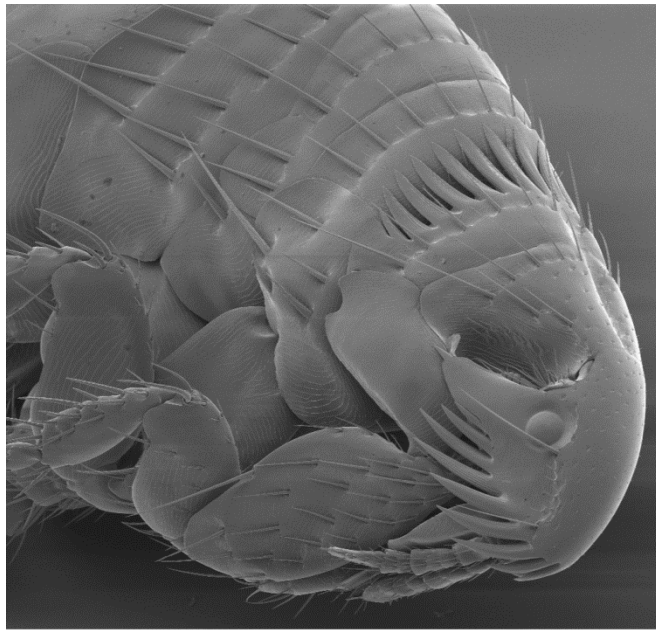
Rasterelektronenmikroskopie

Manfred Ruppel

Elektronenmikroskope und Elektronenmikroskopie

- Diese Texte sollen Anfängern und Interessierten die Welt der EM eröffnen : Entstanden, um Schülern und Studierenden, heranwachsenden Wissenschaftlern und dem interessierten Publikum, einen Einblick zu verschaffen.
- Wiederholungen sind möglich – zum Teil beabsichtigt!

Wie kommt man zu solchen Fotos?
Gar nicht so schwer! Oder?



Katzenloh

300 μm



Mikroskopie: So fing es im 17 Jahrhundert an --- und das ist das Ende?

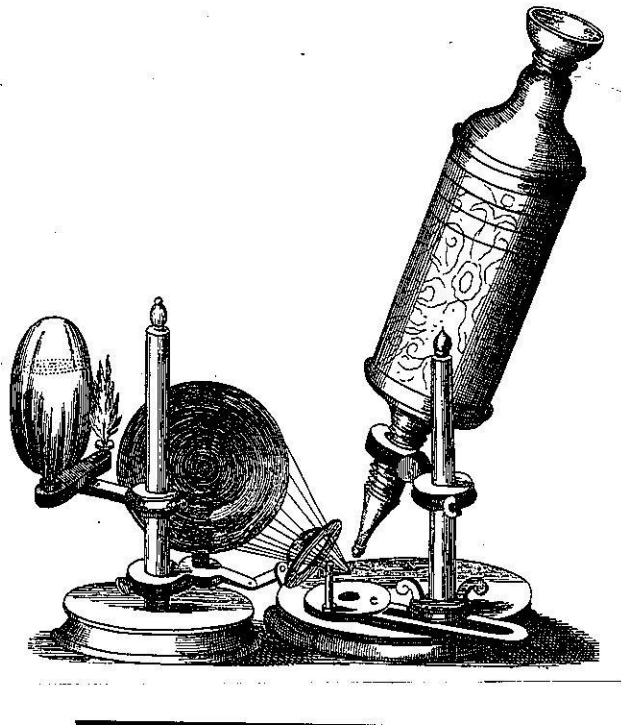


Fig. 1 A general view of the 3 MV ultra-high voltage electron microscope

Das Elektronenmikroskop : *Weshalb, warum und wie?*

- Wenn das Lichtmikroskop (LM) nicht mehr für eine höhere Auflösung ausreicht, wird ein Elektronenmikroskop (EM) benötigt.
Warum? Vergrößerungen sind von der Auflösungsmöglichkeit abhängig. Ein **LM** arbeitet mit Licht und Glaslinsen, und Licht hat eine sehr „große“ Wellenlänge (380 nm). Elektronen dagegen, aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus, eine viel kürzere (5 nm), außerdem werden elektromagnetische Linsen eingesetzt. *Deshalb kann ein Mikroskop mit Elektronenstrahlquelle erheblich stärker vergrößern.*
- Die Entwicklung selbst stammt schon aus den 1930er Jahren. Außer einer Elektronenkathode (Wolframdraht) benötigt man auch noch in einer Säule (für den Elektronenstrahl) ein sehr hohes Vakuum: Mehrere Grundbedingungen sind technisch zu erfüllen.
- „Das EM an sich“ gibt es nicht, wichtig sind aber zwei Haupttypen:
- Transmissions-EM (TEM) und Raster-EM (REM).
- Das **TEM** durchstrahlt ein Präparat (übliche eingebaute Blendengröße von ca. 30 bis 90 Mikrometer) *im oberen Bereich der Säule* auf einem wenige Millimeter großen Kupfernetz und bildet *unten im Gerät das Objekt ab*. Die eintreffenden Elektronen werden beim Durchstrahlen vom Objekt (einem Schnitt) absorbiert, meist aber gestreut: Es entsteht eine Art grafische Strichzeichnung als Ganzbild.
- Für das TEM müssen bei biologischen oder medizinischen Proben stets Ultradünn-Schnitte hergestellt werden (Ultramikrotom! Vorher werden die Proben fixiert, kontrastiert und nach einer Entwässerung in flüssigem Kunststoff eingebettet).
- Ein TEM kann extrem hohe Vergrößerungen erzeugen (sofern das Präparat das hergibt).

...Fortsetzung

Das **REM** tastet mit einem sehr eng gebündelten Elektronenstrahl (10 bis 50 Nanometer) das Präparat ab –
meist mit feinstem atomarem Goldstaub überzogen: gegen elektrische Aufladungen! -,
was unten im Gerät sitzt und neue Elektronen von der Oberfläche reflektiert.

Diese herausgeschlagenen Sekundär-Elektronen senden distinkte Signale aus, zeichnen Höhen und Tiefen, Kanten und Löcher des Objektes nach. Es wird so ein quasi „dreidimensionales“ Bild der abgetasteten Oberfläche, Zeile für Zeile, Punkt für Punkt, erzeugt.

Von einem Detektor aufgefangen und von einem Verstärker weitergeleitet, werden diese Signale auf eine Fernsehrohr / einen Monitor übertragen und dem Betrachter auf einem Bildschirm präsentiert.

- Alle Präparate für das REM (Ausnahme: feste Stoffe, etwa Kieselalgen, Foraminiferen, Implantatschrauben) müssen auf irgendeine Art fixiert und getrocknet werden
- Die Proben selbst werden anschließend auf einen etwa zwei Zentimeter großen Aluminiumhalter aufgeklebt und mit nur wenigen Ausnahmen mit Gold überzogen.

Für Einsteiger: **Wie stark vergrößert was ?**

Lichtmikroskop: wir sehen durch einen Glas-Objekträger - mit Hilfe einer Lichtquelle - durch das Objekt ...

Die Auflösung von einem Mikrometer (Tausendstel Millimeter) ist erreichbar
(höchste Vergrößerung am LM 1500 – 2000 fach).

- **Raster-Elektronenmikroskop:** wir beschließen eine Probe mit einem gebündelten Elektronenstrahl, tasten damit die Oberfläche im Vakuum ab (wie ein Nichtsehender ein Objekt abtastet...).
- Die Auflösung von 50 Nanometer (1000 nm: 1 µm) ist erreichbar
- (höchste Vergrößerung am REM zwischen 50.000 bis 150.000fach und mehr).

- **Transmissions-Elektronenmikroskop:** wir durchstrahlen Ultradünnschnitte oder Mikropartikel mit dem Elektronenstrahl
- Die Auflösung von 1 Nanometer (Tausendstel Mikrometer) ist erreichbar
- (höchste Vergrößerung hierbei zwischen 100.000 und 300.000fach und mehr).

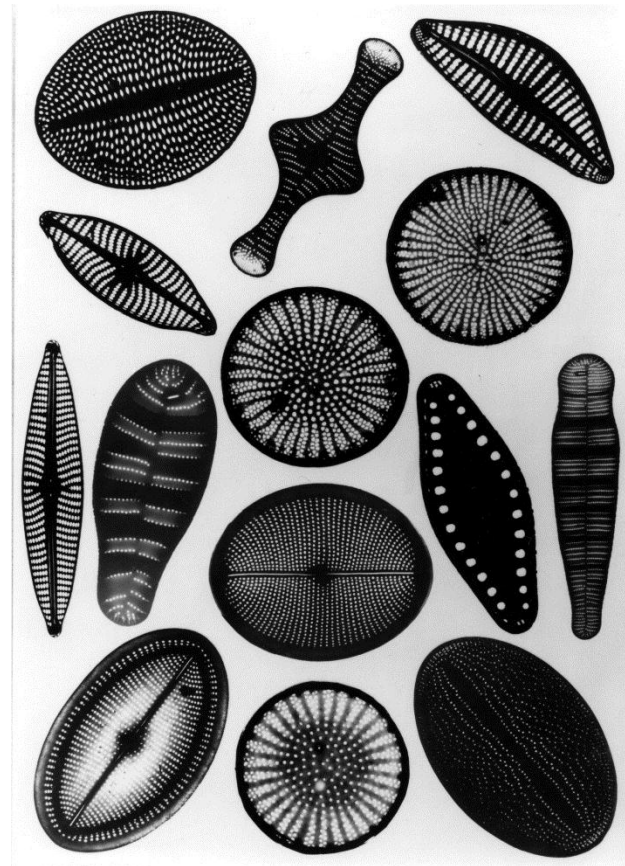
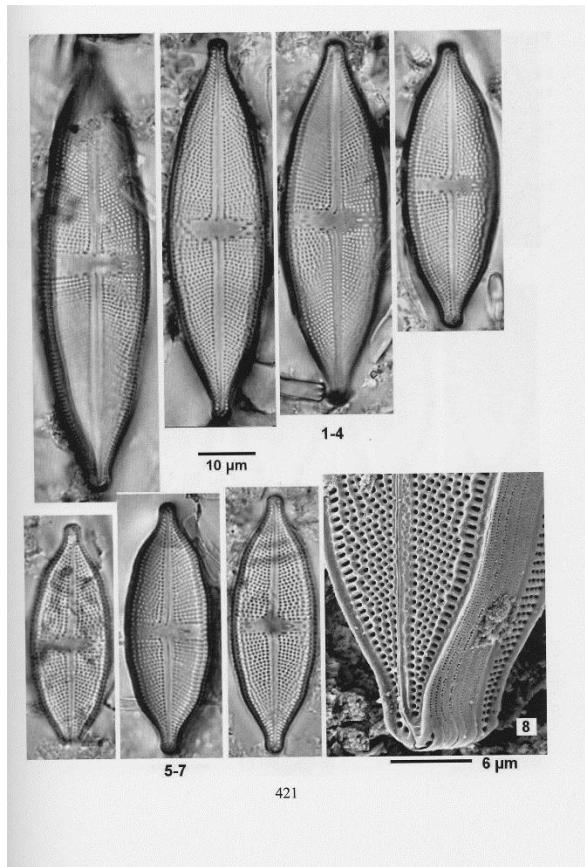
- (Wichtig: nur die echte Auflösung von Strukturen hat Bedeutung. Alle Angaben sind Durchschnittswerte.)

Man stelle sich vor,
eine 1 €-Münze mit dem Lichtmikroskop zu
betrachten:

- Das hochqualitative Durchstrahlungs-Lichtmikroskop schafft es bei allerbesten Optiken auf 2000fache Vergrößerung. Dann läge der Durchmesser dieser Münze bei rund 50 m.
- Schon unvorstellbar...
- (Abgesehen davon, dass man eine Münze nur mit dem schwächeren Auflicht-LM oder einer Stereolupe von oben betrachten kann.)
- ... doch bei einem Raster-EM und einer Vergrößerung von 100.000fach (was jedes gute Gerät heute schaffen kann), läge aber der Durchmesser dieser Münze bei 2,5 km.
- Fußweg gemütlich: eine halbe Stunde...

(Abgewandelt nach dem bekannten Elektronenmikroskopiker A.W.Robards, 1974)

Schon bei den Algen sofort erkennbar: links Tafel mit Lichtmikroskop-Aufnahmen (nebst einem REM-Foto) und rechts Tafel mit TEM-Aufnahmen.



weiter: was kann ich noch sehen?

- Am LM können die „Streifen“ der Kieselalgen mit 1.000fach aufgelöst, zur Erkennung der Arten dienen, und an einem REM wird man allenfalls bis ca. 50.000fach vergrößern, denn dann erscheint bereits die Grundsubstanz der Kieselschale.
- Wir können aber bei einer eher geringen (5.000fachen) Vergrößerung an einem TEM die Feinstruktur eines Chloroplasten bereits scharf trennend darstellen;
- Zellmembranen, Nanopartikel oder etwa Feinstrukturen auf einem Insektenauge (wenn vorhanden) hingegen, kann und will man noch am hochauflösenden REM von 50.000 bis 100.000fach vergrößern. (Achtung: das Sputtergold kann sichtbar werden!)

Nicht die Vergrößerung
ist maßgebend,
sondern die Wahl der
Gerätschaft, hier TEM!

*Das kann nur ein
Transmissions-EM.
Ultradünn geschnitten
und vorher gut fixiert:
Ein sauber getroffener
Chloroplast!*



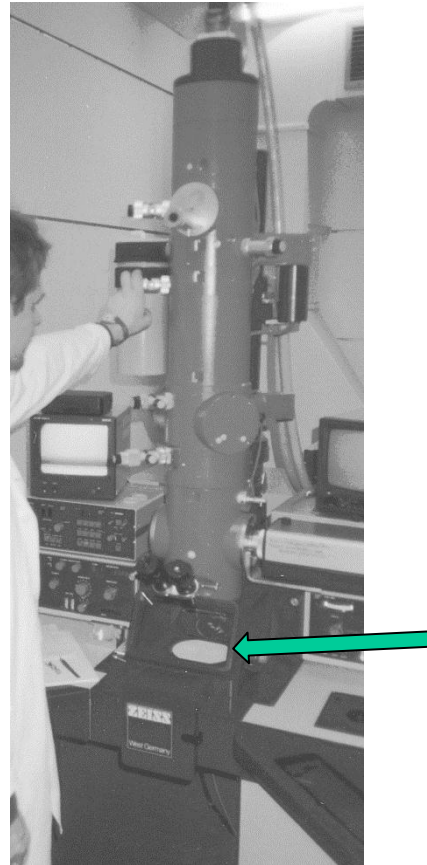
Nochmals: Warum EM ?

Höhere Auflösung- stärkere Vergrößerung

- Große *Wellenlänge* des Lichts:
 - ca. 380 nm
- Kleine *Wellenlänge* des Elektronenstrahls
 - ca. 5 nm
- (Vakuum nötig! Keine Gasatome, sie behindern sonst den E-Strahl – Pumpen!!!
 - & getrocknete Proben)
- **Auflösung des LM rund 0,2 Mikrometer**
- **Auflösung eines starken REMs rund 10 Nanometer**
 - 1mm – 1000 Mikrometer
 - 1 Mikrometer – 1000 Nanometer

Das Durchstrahlungs-EM
TEM
Transmissions-
Elektronenmikroskop

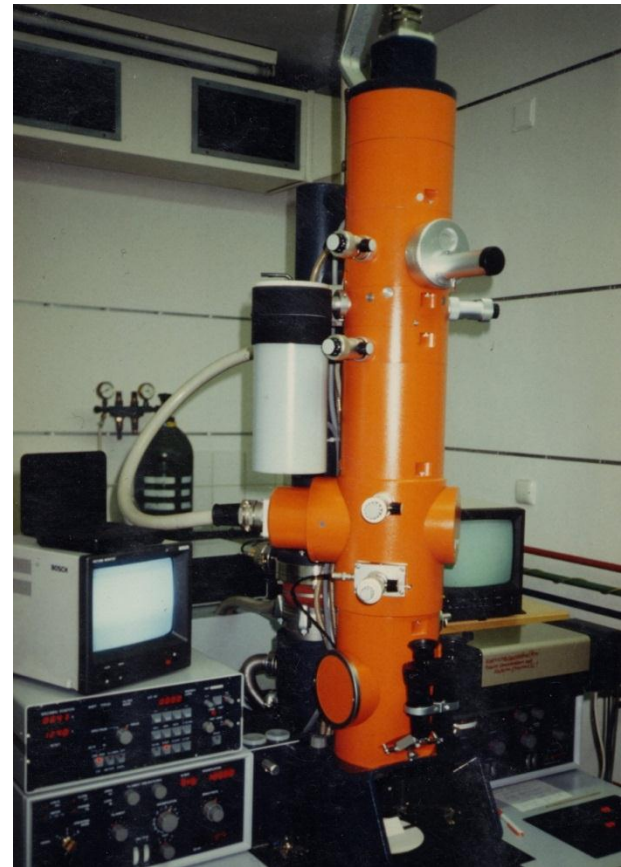
Ein Transmissions-EM hat immer eine hohe Säule, die Distanz zwischen den Linsen (Kondensor-, Objektiv-, Projektivlinse) wird für die Vergrößerung genutzt, um unten, auf dem **Zinksulfid-beschichteten Schirm**, ein vergrößertes Live-Bild sehen zu können.



Der Elektronenbeschuss: TEM

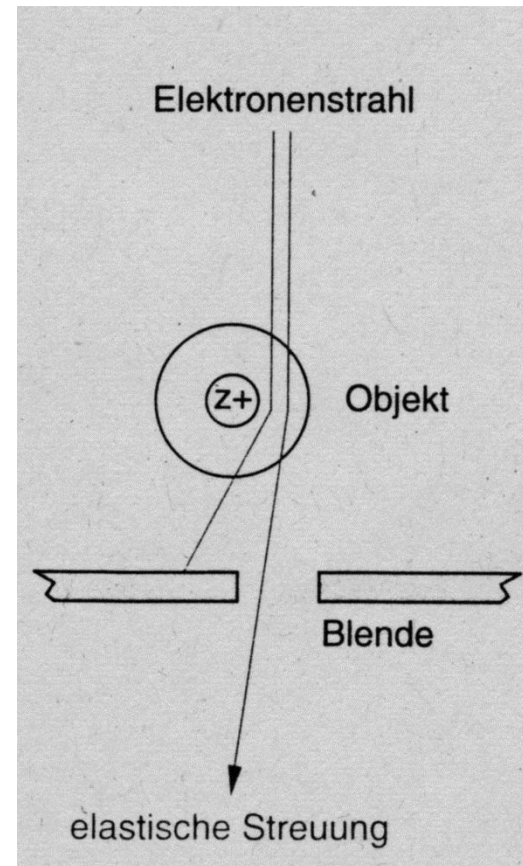
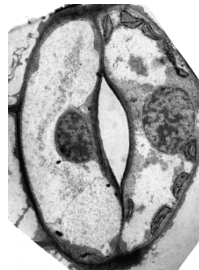
Elektronen durchdringen das Präparat und werden abgelenkt, es entstehen elastische Elektronen, die ein kontrastreiches Bild ergeben. Inelastische Elektronen verschlechtern im Normalfall die Abbildung; etwa am EM902 (Zeiss) können sie hilfreich verwendet werden... (Energieverlust)

- Für das TEM benötigen wir Ultradünnschnitte, die bei ausreichendem Kontrast die Zellstrukturen in aller Klarheit zeigen.
- Die TEM-Proben müssen mit viel Sorgfalt und unter längeren Präparationsbedingungen erstellt werden.



Der Elektronenstrahl durchdringt das Objekt am TEM

- Biologische Proben werden bevorzugt mit Schwermetallen (Osmiumtetroxid) fixiert. *Osmiumsäure* wird am häufigsten verwendet, denn es ist mit einer hohen *Kontraststeigerung* zu rechnen, noch zumal außer den Proteinen (durch die Aldehyd-Fixierung) auch noch die Lipide gebunden werden. Besonders gut „gefärbt“ erscheinen die Membranen.



TEM: Stets notwendige *chemische Präparation biologischer Proben*

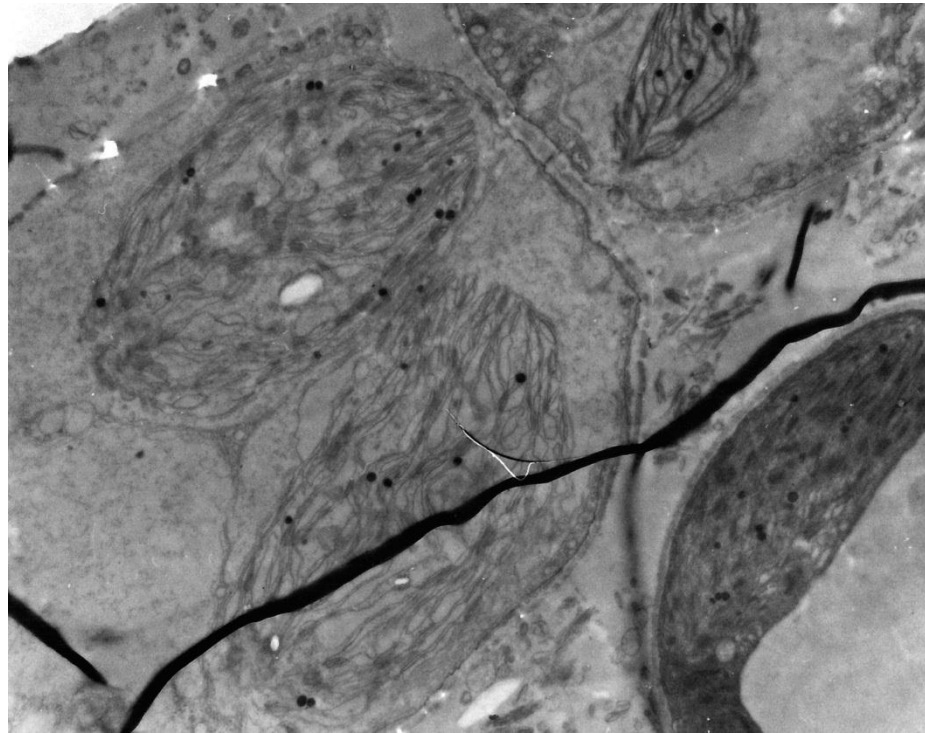
Jede Probe die am TEM mit ultradünnen Schnitten untersucht werden soll, muss zuvor chemisch fixiert werden: Die Feinstrukturen sollten optimal dem Bild der Natur oder dem des Laborversuchs entsprechen. Etwaige Störungen gelten grundsätzlich als Artefakte (ungewollt künstlich erzeugte Strukturen).

Angenommen, wir halten eine Pflanze in Dauerlicht - mehr als zehn Stunden -, so wird diese überreichlich Stärke produzieren. Die Chloroplasten werden das deutlich zeigen. Oder: wird die gleiche Pflanze bewusst in Dunkelheit belassen, so wird sie etiolieren (vergeilen). Die Thylakoide werden dann rückgebildet und erscheinen nur noch als schwache Membranreste.

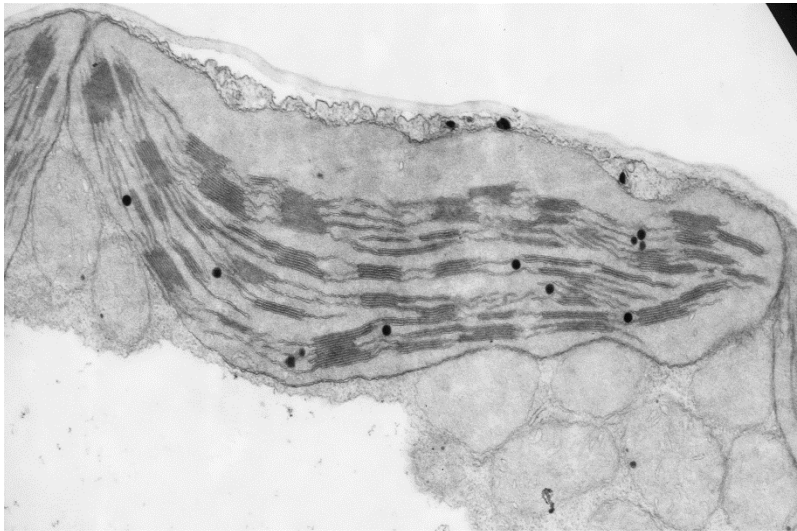
Gewöhnlich ist eine Fixierung mit einem schwachprozentigen (1-5 %) Glutardialdehyd für die Proteine ausreichend, dann aber folgt ein weiterer Gang mit Osmiumsäure zur Lipidfixierung. Die Aldehyde kontrastieren kaum, das Osmiumtetroxid, etwa 1%, dagegen bestens, es zeichnet die Membranen dunkel durch. Die verwendeten aggressiven Säuren müssen in Lösungen gepuffert werden, aber auch der pH-Wert ist zu beachten und u.U. die Osmolarität.

Die *ideale Fixierung* ist nicht immer erreichbar, da selbst in einem Blattgewebe in den verschiedenen Zonen, Gefäßen, dem „Parenchym“, unterschiedliche Osmolaritäten vorherrschen können. Gerade auch an die meist großen Vakuolen ist hier zu denken. Selbst durch die Kutikula der Epidermis dringt oft das chemische Fixans schwer in das Gewebe ein, dagegen an den für das Präparat angeschnittenen Kanten der Blattstücke rasch.

So sieht es aus, wenn man chemisch falsch oder schlecht fixiert hat: Lamellen-Salat!



Transmissions-Elektronenmikroskopische Arbeitsweise (Arbeiten am TEM)



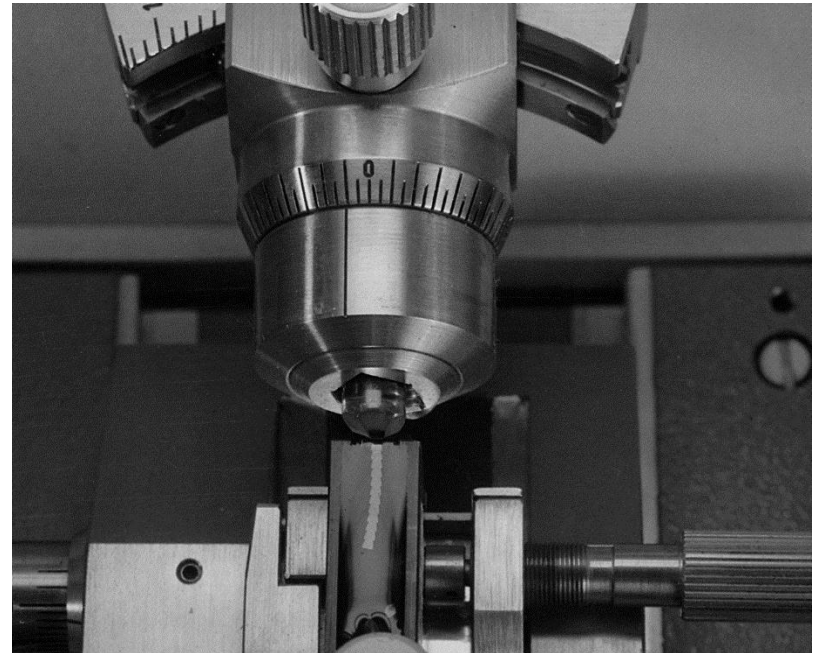
Chloroplast der Sonnenblume

Univ.Frankfurt Botanisches Inst. MR

- Die ultradünnen Schnitte werden am TEM durchgemustert und interessante Ergebnisse sogleich fotografiert.
- Untersucht werden etwa physiologisch unterschiedlich angezogene Pflanzen einer Art oder eines „Typs“; diese zeigen erwartungsgemäß in der Feinstruktur Veränderungen an ihren Zellorganellen. Dazu muss grundsätzlich eine Kontrollpflanze mit einbezogen werden.
- TEM-Foto.: ein gut ausgebildeter Chloroplast zeigt neben sich im Plasma Mitochondrien und Dictyosome. Die Zellwand ist schwach zu sehen (oben); nach unten zu, befindet sich die große Vakuole.

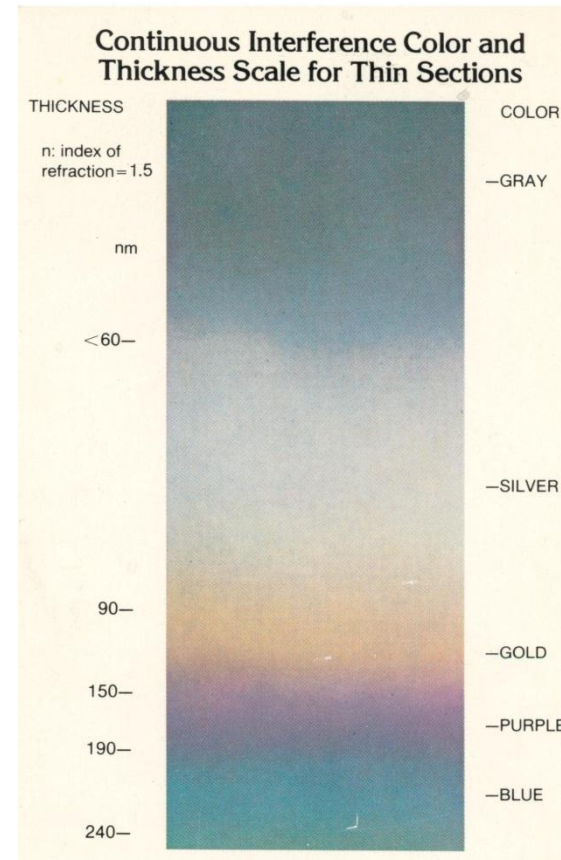
Die Ultra-Mikrotomie (1)

Weichteilige, „wasserhaltige“ biologische Proben werden chemisch **fixiert** und **kontrastiert**. Anschließend einer **Entwässerung** mit Aceton (oder Ethanol) unterzogen und in einen flüssigen **Kunststoff** überführt. Die dann auspolymerisierten Kunststoffe sind „knochenhart“; die Kapseln (mit den Präparaten in deren Spitze) werden nun zu einer Pyramide **getrimmt**. Am **Ultramikrotom** werden sie in ca. 50 *Nanometer* dicke, feinste **Schnitte** zerlegt. Das Tausendstel einer Zeitungsseite...



Die Ultra-Mikrotomie (2)

- Die Ultradünnschnitte variieren in ihrer Dicke; erkennen kann man die Schnittdicke im Interferenzlicht.
- Es gibt Schwankungen von hellgrau (Silber), ca. 10-20 nm, bis goldgelb (50 nm) und lila-blau (von 100 nm). Letztere sind zu dick, um vom TEM-Strahl gut durchdrungen zu werden. Nebenstehende Abbildung stammt von „Sorvall Microtomes“ (USA, ca. 1980).



Die historische Entwicklung der Elektronenmikroskopie

Die moderne Biologie oder Biowissenschaft ist ohne die Vorläufer vergangener Zeiten nicht denkbar...

- *Die Elektronenmikroskopie selbst ist schon seit langer Zeit nur noch Hilfswissenschaft --- Ergänzung bei strukturellen Problemen, wo das Lichtmikroskop (LM) mit seiner Auflösung nicht hinreicht.*

Wir fassen zusammen ---

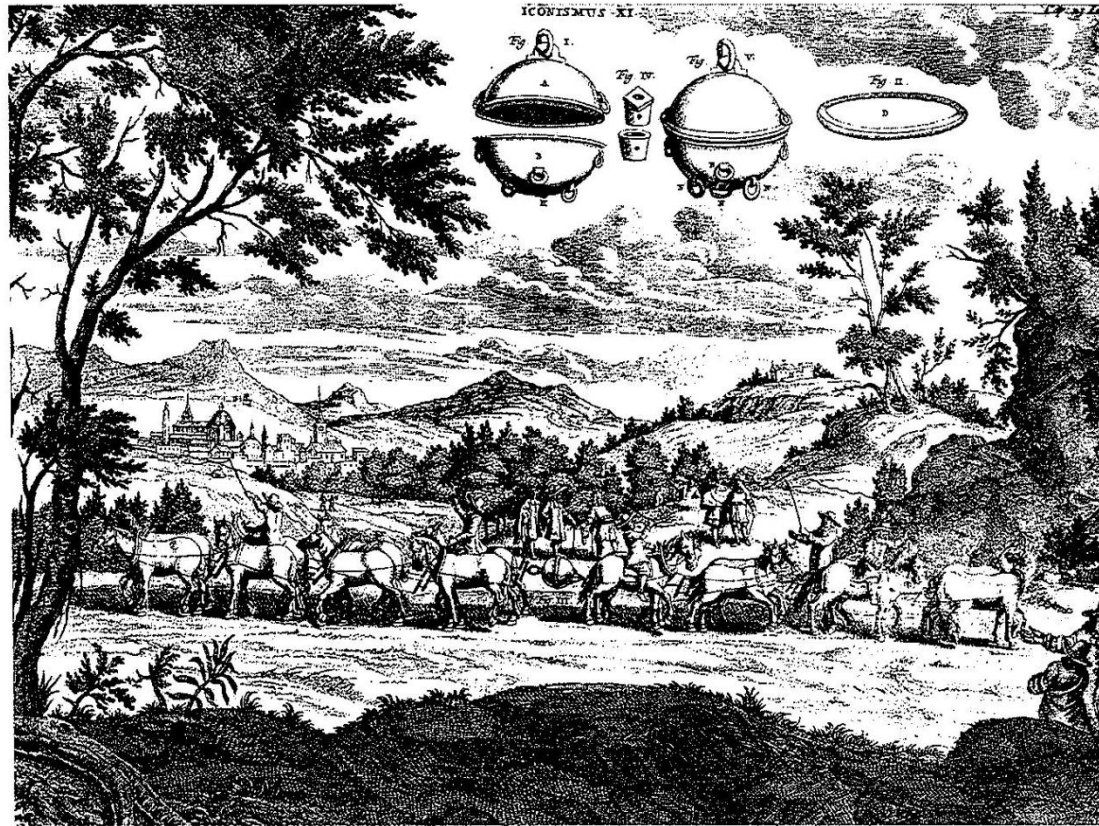
- **Ein qualitativ *gutes* Lichtmikroskop löst bis 0,2 μm Strukturen auf (= 200 nm) - ein TEM dagegen schafft es leicht bis zu 0,2-0,5 nm (2-5 \AA) - und ein REM (mit seinem enggebündelten Strahl) auf unter 50 nm oder – wie hier am FE-REM [Feldemission*] – auf unter 10 nm.**
- *((*Spezifiziert sind die Auflösungen beim REM S-4500 : 1,5nm bei 15 kV - WD 4mm - und 4nm bei 1 kV - WD 3mm –Testreport Hitachi und Angaben R.Schmidt/Hitachi.))*

Die „Väter des Elektronenmikroskops“...

- Es gibt sicher mehrere Väter des Elektronenmikroskops, doch ein Wissenschaftler sticht besonders heraus, der auch die elektromagnetischen Linsen durchentwickelt hat: **Ernst Ruska** mit dem sog. „Übermikroskop“ der Firma Siemens (1939).
- Ruska stammte aus der Arbeitsgruppe **Max Knoll** von der TH Berlin und arbeitete mit **Bodo von Borries** am ersten serienmäßig hergestellten Transmissions-EM der Firma Siemens.
- Eine Seitenentwicklung der Firma AEG, ein EM mit „elektrischen Linsen“ herzustellen, hatte jedoch keinen weiteren Erfolg (genannte Mitarbeiter: **E. Brüche** und **H. Mahl**).
- Zeitgleich arbeitete man an mehreren Wissenschaftsstandorten der Welt an hochauflösenden Elektronenmikroskopen, doch Siemens mit Ernst Ruska (1986 den Nobelpreis im „Nachtrag“ erhalten), waren die technisch schnelleren „Problemlöser“.
- Beim Raster-EM müssen wir aber ebenfalls an **M. Knoll** und besonders an **Manfred von Ardenne** denken, doch diese Entwicklung erfolgte erst etwas später, da die Abbildung mit der Fernsehtechnik zunächst noch Schwierigkeiten bereitete.

Vakuum - oder der luftleere (gasfreie) Raum: Otto von Guericke und die Magdeburger Halbkugeln...

Elektronenmikroskope benötigen ein Vakuum!!!



Das Vakuum – oder die Angst vor der Leere

- *Die Erkenntnisse der antiken Wissenschaft wurden besonders von der islamgeprägten arabischen Kultur übernommen und weitergegeben –*
- *im christlich geprägten “Abendland“ dagegen kam es erst einmal zu einem Rückschritt -*
- *man pflegte die Angst vor der Leere – dem luftleeren Raum – „horror vacui“ - das war die aristotelische Einstellung zu der Sache: es gäbe keine Leere, sondern das Weltall sei mit einem „Äther“ ausgefüllt...*
- *Erst mit dem Aufkommen der „modernen: europäischen“ Technik und Naturwissenschaft im 17. Jahrhundert änderte sich alles.*

Otto von Guericke (1602-86) bewies um 1660, dass es einen luftleeren Raum, ein Vakuum geben muss, indem er zwei zusammengehaltene Halbkugeln aus Messing mit Hilfe einer Pumpe „entleerte“, er evakuierte sie quasi luftleer. Als er seine Pumpentechnik verfeinert hatte (das Wasser herausziehen und keine Luft hineinlassen), versuchte er in einer Art Groß-Spektakel (Bild zuvor) eine luftleere Kugel durch 16 Pferde auseinander zu ziehen, aber die Kugel blieb durch die enorme Kraft des irdischen Luftdrucks zusammen.

- Guericke war Bürgermeister von Magdeburg, Naturwissenschaftler und Autor: „Neue, sog. Magedburger Versuche über den Leeren Raum...“ 1672. Wie weit er informiert war, dass sein italienischer Wissenschaftskollege **Evangelista Torricelli (1608-47)** ebenfalls zeitgenössisch am gleichen Problem arbeitete, ist nicht exakt zu bestimmen. Nicht ganz umsonst wurden später „Drücke“ in **Torr** oder **Pascal** angegeben, leider nicht in Guericke...

Wie hoch ist denn das Vakuum? Wie gasfrei ist der Raum im EM?
(und bitte nicht vergessen, wir arbeiten mit einem Feldemissions-REM – mit dem man schwache Vergrößerungen machen kann und Hochauflösungen!)

In der Schleusen-Kammer, wo die Probe eingelegt wird, ist es noch relativ schwach, aber es zerplatzen hier schon die Proben, schrumpfen usw., wenn sie nicht gut getrocknet sind!

Nein, in „TORR“, wird das nicht mehr gesagt, auch kaum noch in „mbar“, man spricht von Pascal: „Pa“.

Nach den Rotationspumpen arbeitet nun die sehr starke Öldiffusionspumpe in der Kammer und im unteren REM.

„1 x 10 hoch - 3 Pascal“, so sagt man. So im unteren Säulen-Bereich, aber oben, wo die Ionengetterpumpen an der Strahlquelle sitzen, sieht es schon „besser“ aus :1 x 10⁻⁷ Pa...

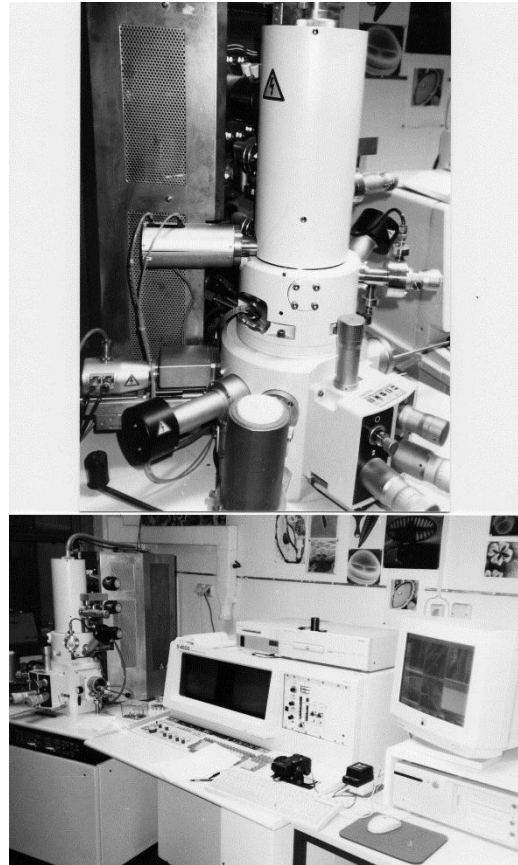
(hier befinden sich aber immer noch reichlich Gasatome pro ccm Raum!)

Wie im Weltall? fragte der Operator. „Im Weltall?“, lächelten müde die Astrophysiker, die beim ihm zu Besuch waren, „nein, im interstellaren Raum herrscht ein Druck von 1 x 10⁻¹⁴ Pa.“

(soll heißen, nur noch 2 Gasatome auf einen ccm Raum!)

Das Oberflächen-abtastende
(mit Elektronen scannende)
Raster-Elektronenmikroskop
- Raster – oder REM oder SEM -

REM: gedrungene Säule, die Vergrößerungen entstehen durch Verringerung des Linsenstromes bei gleichbleibender Größe des Bildschirms.



Das Raster-Elektronenmikroskop

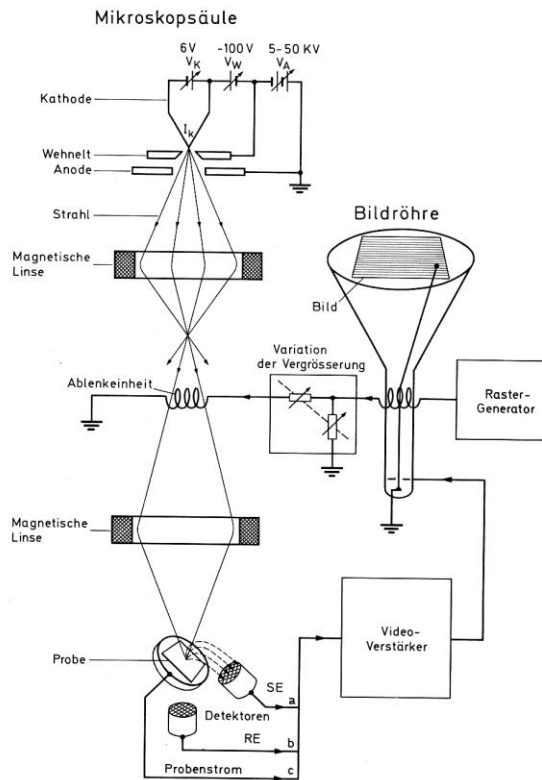


Abb. 1.1. Prinzipieller Aufbau und Wirkungsweise des Raster-Elektronenmikroskopes

- Das Raster-EM hat einen ähnlichen Aufbau wie ein Transmissions-EM. Beide Mikroskope arbeiten mit einem Strahl aus Elektronen und müssen demnach unter einem sehr hohen Vakuum stehen.
- Beim REM trifft der gebündelte Elektronenstrahl aber auf die Probe auf und die reflektierten „Sekundärelektronen“ werden als „Signale“ (Höhen und Tiefen eines Objektes abtastend) von einem Detektor gesammelt und über einen TV-Monitor als Strahl gezeichnet (abgerastert). Diese Sekundärelektronen zeigen demnach die Oberflächenstrukturen des Objektes und erzeugen das plastische Bild mit der typischen *Schärfentiefe* des Raster-Elektronenmikroskops.
- Abb. aus REIMER&PFEFFERKORN (1973)

REM --- so geht das ...

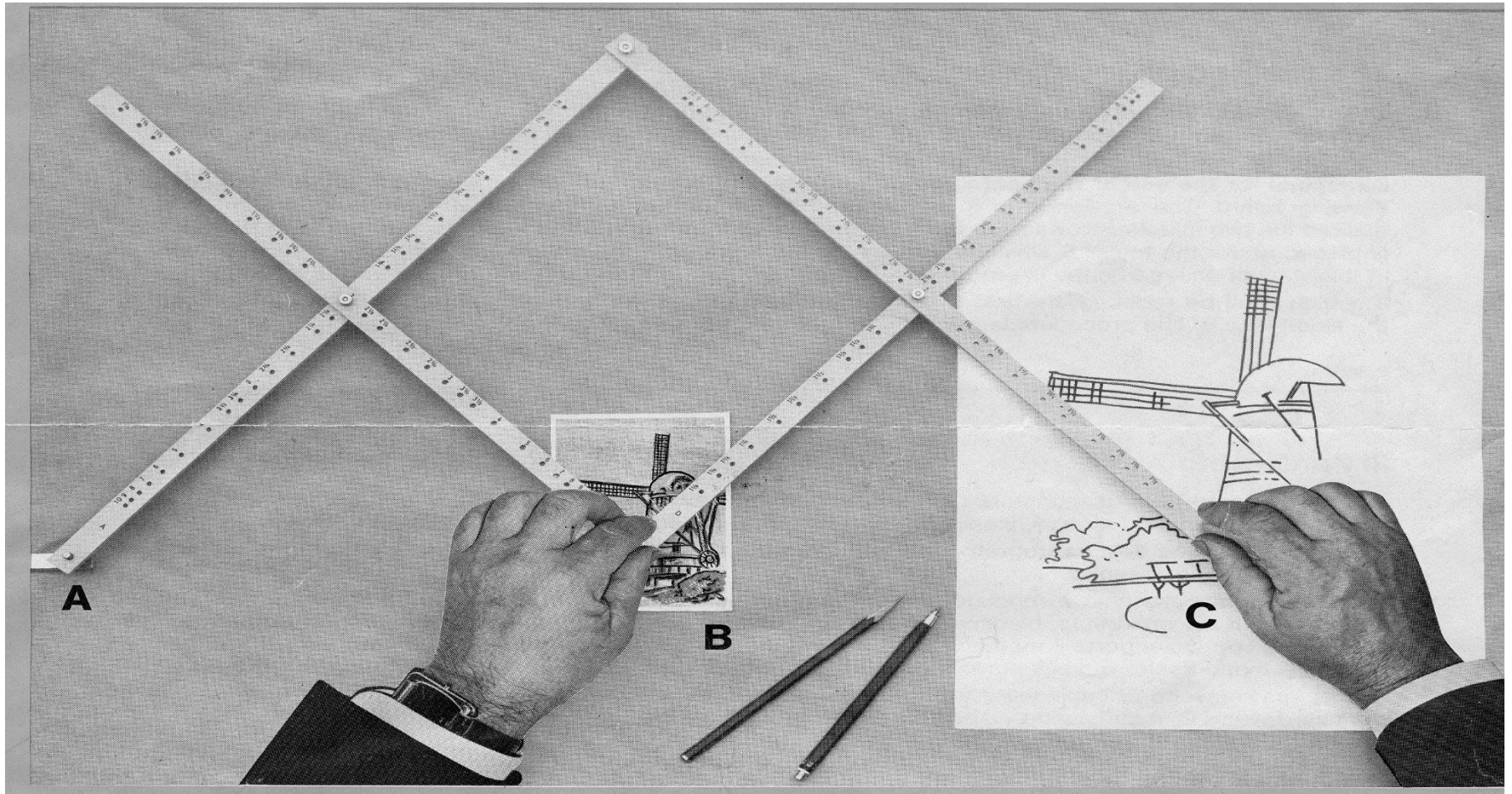


„Die große Schärfentiefe und der Effekt der flächenabhängigen SE-Emission führen zu dem plastischen (dreidimensionalen) Eindruck von REM-Bildern.“

P.F. Schmidt u.a. „Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse“ (1994)

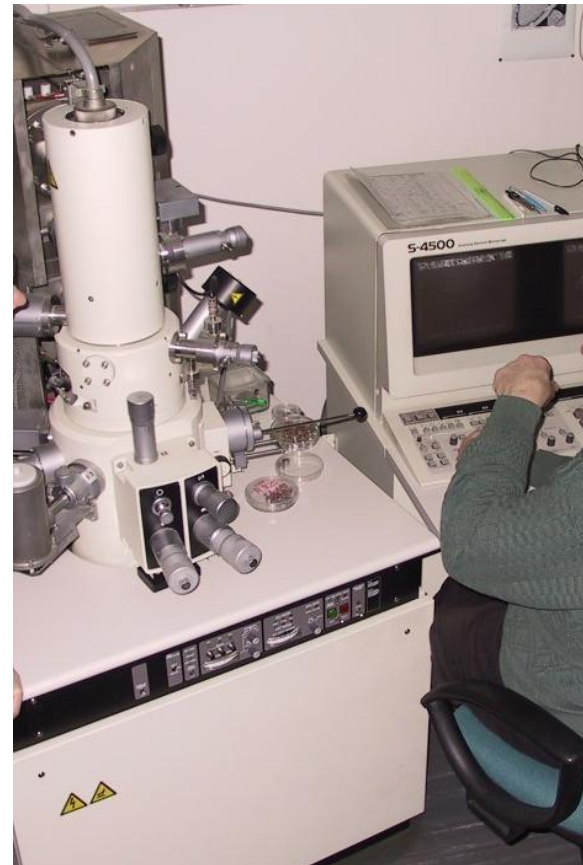
- Wie?
- Eine Probe befindet sich unten im Hochvakuum des Raster-Elektronenmikroskops:
- Die Kathode (Filament) ist eingeschaltet, sie sendet von oben nun ununterbrochen die Elektronen (E-Strahl) durch die *elektromagnetischen Linsen* hindurch.
- Typisch ist jetzt das feinste *Abtasten* - genannt „*Rastern*“ auf der Oberfläche, dies wird mit einem *eng gebündelten Strahl* aus Elektronen vorgenommen.
- Die auf die oberste Schicht des Objektes eintreffenden *Primärelektronen* von rund *5000 eV* (beachten: „nur“ 5 KV) „*boxen*“ aus den vorhandenen Höhen und Tiefen neue Elektronen (SE = Sekundärelektronen) mit unterschiedlicher Energie heraus... (etwa 0,5 bis maximal 50 eV): *Bildentstehung* durch SE- und Rückstreu-Elektronen...
- ((Die reichlich vorhandene überschüssige Energie muss abgeleitet werden --- Sputtern mit Gold --- sonst kommt es zu sog. Aufladungen! Streifenbildung, Leuchten, Überstrahlen.))
- Die herausgeschlagenen *Sekundärelektronen* zeigen, nach dem *Sammeln und Auffangen* durch *einen Detektor* = das Messgerät wird dann die einzelnen Signale der Höhen und Tiefen, aber auch die der Schatten und Krümmungen, hell und dunkel, Punkt für Punkt = auf einem nachleuchtenden *Bildschirm* übertragen. Somit wird diese exakt die abgetastete Oberfläche im plastischen (*quasi dreidimensionalen*) schwarz-weiß-Bild *aufzeichnen*.

Der Raster-Elektronenstrahl zeichnet die Oberflächenstruktur wie ein Pantograph

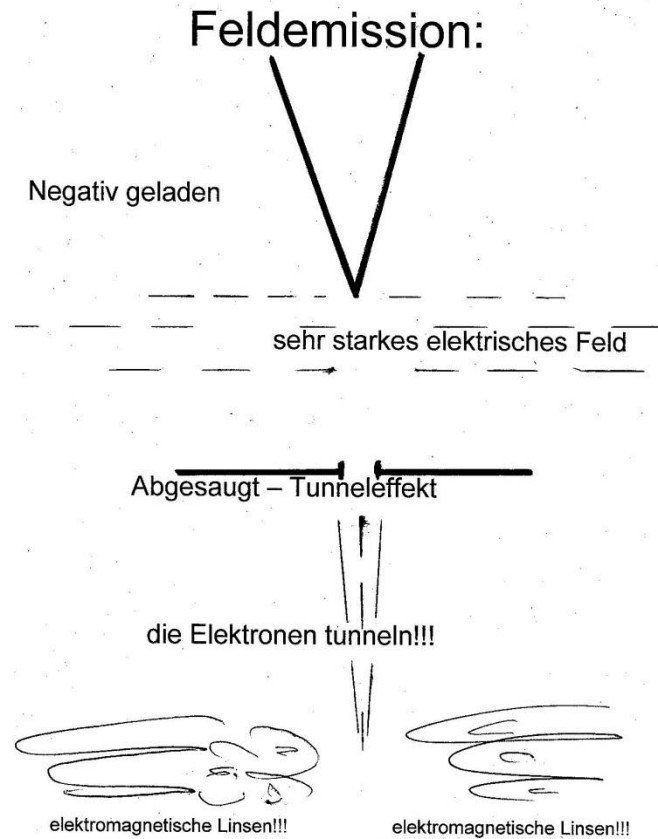


Das Raster-Elektronenmikroskop vor Ort am Fachbereich Biowissenschaften:

- Dieses REM ist ein Hochleistungs-Gerät der Firma Hitachi, S 4500
- Es ist mit einer Feld-Emissions-Kathode bestückt und hat viele Einsatzmöglichkeiten über zwei verschiedene Detektoren, die in der biologischen Forschung wechselweise zum Einsatz kommen. Wir können plastische Bilder für die Übersichten erstellen, sowie leicht und zuverlässig scharfe Fotos erzeugen, die aber auch in einen Hochauflösungsbereich hineingehen, wo herkömmliche Geräte nicht mehr mitmachen.



Arbeiten mit dem S-4500 Hitachi (ab 1996 im Einsatz):
gute Auflösung, höchste Qualität
((wichtig ist, stets stabiles „hohes“ Vakuum))



Durch die Wechselwirkung Elektronenstrahl und Präparat

- im REM - entstehen folgende Phänomene:

- Der aus der „Kanone“ (Kathode-Anode) austretende beschleunigte Elektronenstrahl wird durch das elektromagnetische Linsensystem (Objektiv, Kondensorlinse, Kondensorblende, Kontrastblende) eng gebündelt. Dieser Primärelektronenstrahl dringt aus der geheizten Aperturblende (am unteren Ende der Säule) mit einem Durchmesser von nur 50-200 nm (Angabe nicht exakt) aus und trifft auf das Präparat.
- Dabei entsteht ein Stoss-, Ionisierungs- und Augerprozess durch primäre und rückgestreute Elektronen (siehe weiter unten). 70 % der Sekundärelektronen haben weniger als 15 eV. Aber diese sekundären Elektronen, die von der Objektoberfläche „herausgeboxt“/abgenommen werden, sind für unsere Abbildungen wichtig.
- *Funktioniert also so:*
- Die vom Detektor-Sammelsystem (Szintillator) „angesaugten“ Sekundärelektronen werden über einen Signalverstärker (Photomultiplier) in Licht umgewandelt und auf eine TV-Kathodenstrahl-Röhre geschrieben (Monitore).
- Der Rasterstrahl „scant“ Zeile für Zeile. Arbeitet quasi wie ein „elektronischer Storchschnabel“: auf dem Bildschirm vor dem „Operator“ wird die Struktur nachgezeichnet.

Primär-Elektronen treffen mit hoher Energie auf *wiederholt, aber anders gesagt:*

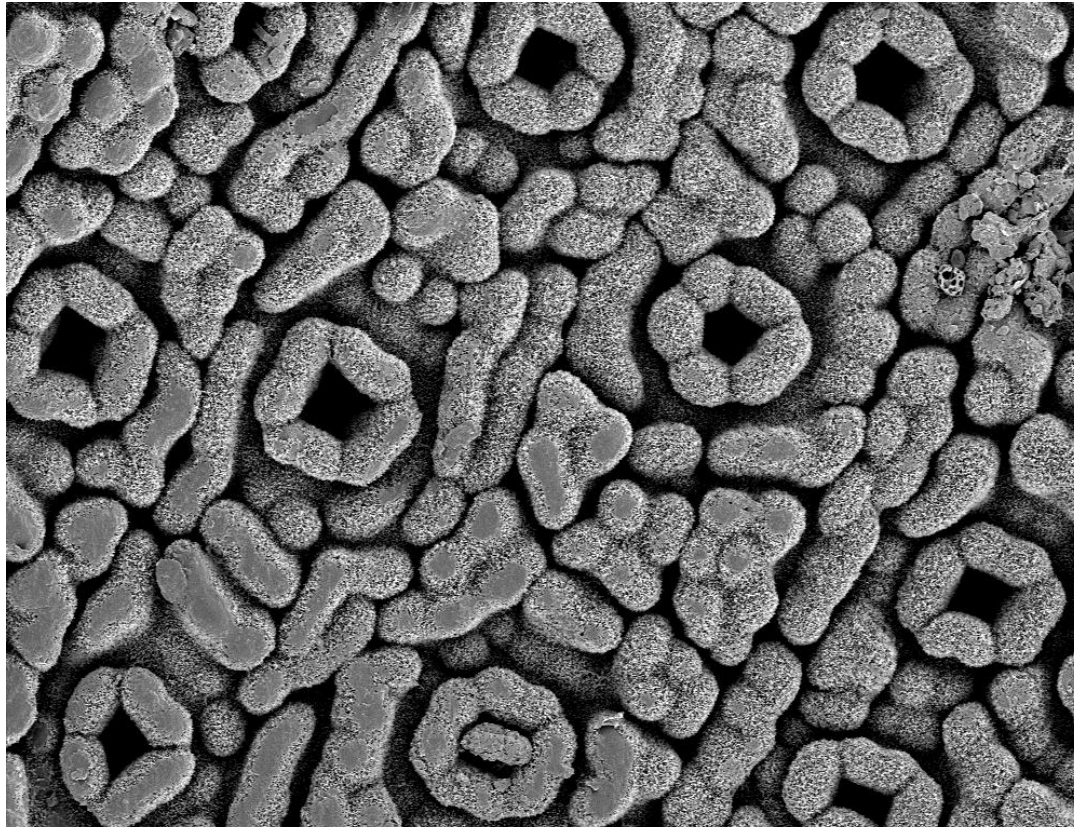
- Die Primärelektronen treffen mit nahezu einheitlicher Geschwindigkeit, mit 5000eV (veränderbare Beschleunigungsspannung) auf das Präparat auf.
- Wahlweise von 1 Kilovolt bis 30 Kilovolt „KV“ einsetzbar...
- -Die herausgeschlagenen Sekundärelektronen aber haben sehr unterschiedliche Geschwindigkeiten und deren Energien liegen eher niedrig, jedoch auch zwischen 0-50eV!

- 100 % Primärelektronen treffen auf und die Ausbeute ist gleich A

- $A = SE + RE$ (= SE-Sekundärelektronen = RE-Rückstreuelektronen)
- $A = \text{kleiner als } 1$ (Probe lädt sich negativ auf)
- $A = \text{größer als } 1$ (Probe lädt sich positiv auf)

Typisches REM-Oberflächenbild:

Zeile für Zeile, Punkt um Punkt, abgetastet und nachgezeichnet...



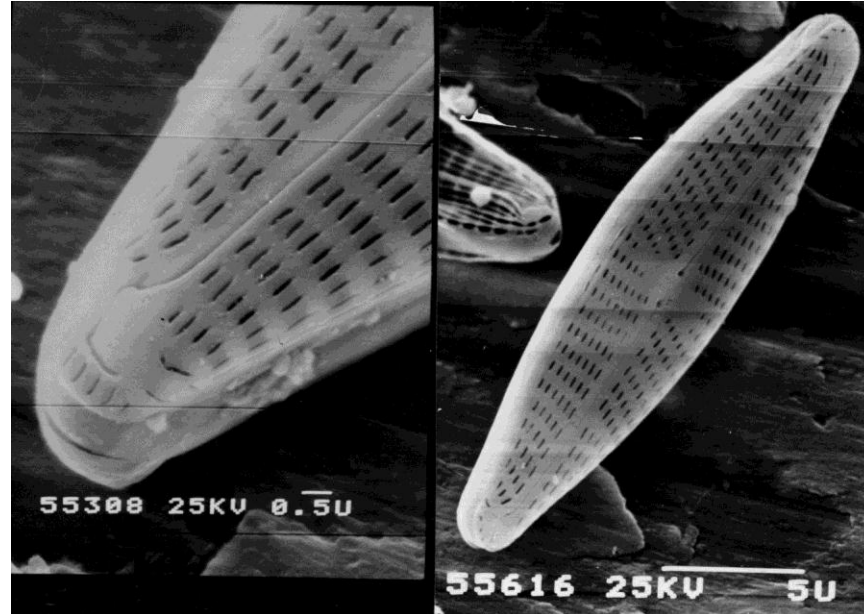
Eibennadel Botanischer Garten

70 μm

Die Auflösung und die Bildqualität müssen aber übereinstimmen: ein Foto sollte nicht übervergrößert und/oder unscharf erzeugt werden. Weiter ist zu beachten, dass an einem REM typische Störfaktoren auftreten können: etwa Aufladungen (führt zu Streifen), Kondensor-Probleme (deutliche Unschärfen) und Kanteneffekte, siehe Fotos nächstes Blatt.

- Gewöhnlich ist es so, dass bei einem konventionellen Durchstrahlungselektronenmikroskop (TEM) die *Kontrastblende* besonders zu beachten ist. Natürlich werden bei einem Justiervorgang grundsätzlich die *Kondensorblende* und die *Bereichs-*, bzw. *Zwischenbildblende* zuvor zentriert. Die Kontrastblende anschließend, und dabei ausgewählt auf eine bestimmte Blendengröße (etwa 30, 60 oder 90 μm).

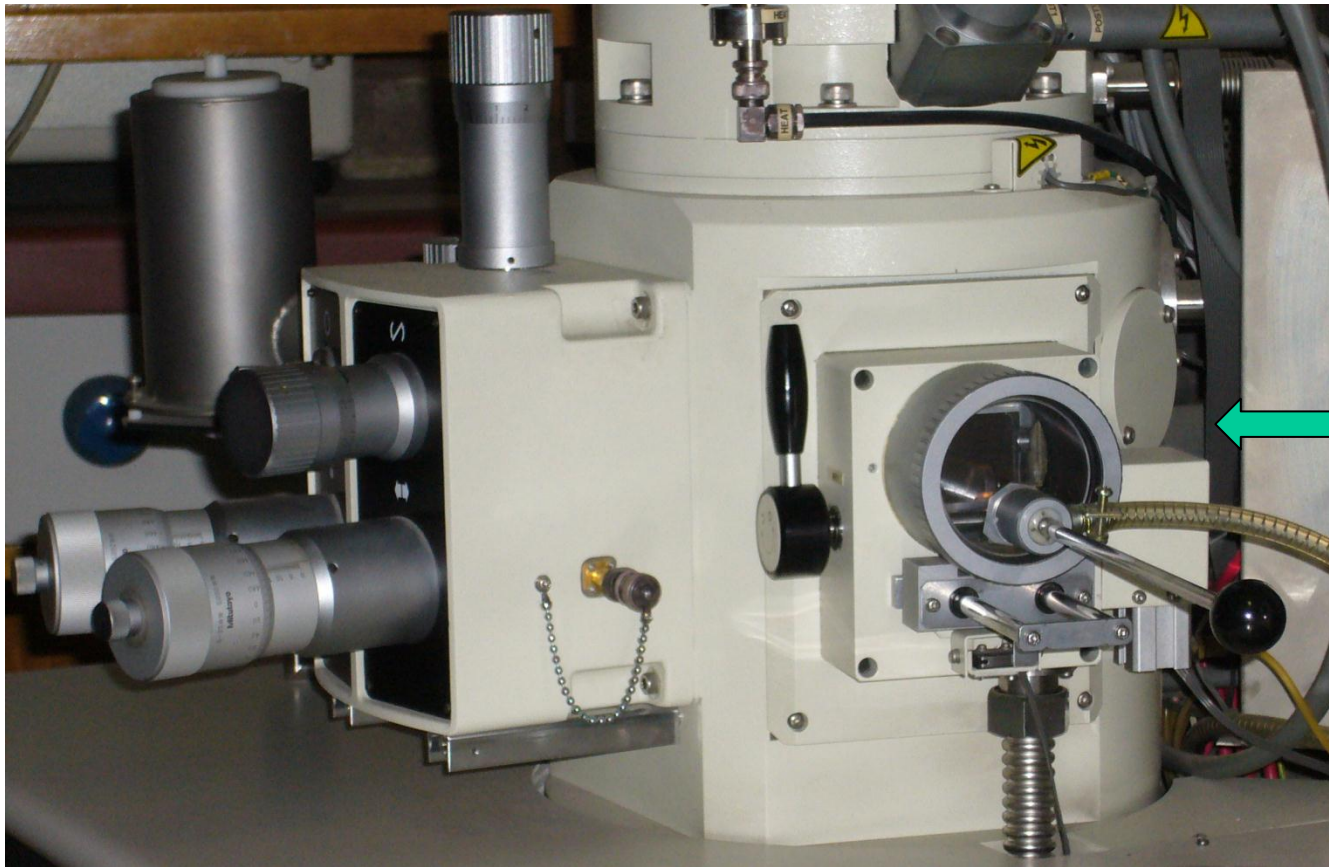
Aufladungsprobleme und Unschärfen: so sollen REM-Fotos heute nicht mehr aussehen!



Das A und O: Jedes Elektronenmikroskop wird über dessen *Blenden* und die in der Säule befindlichen *elektromagnetischen Linsen* justiert.

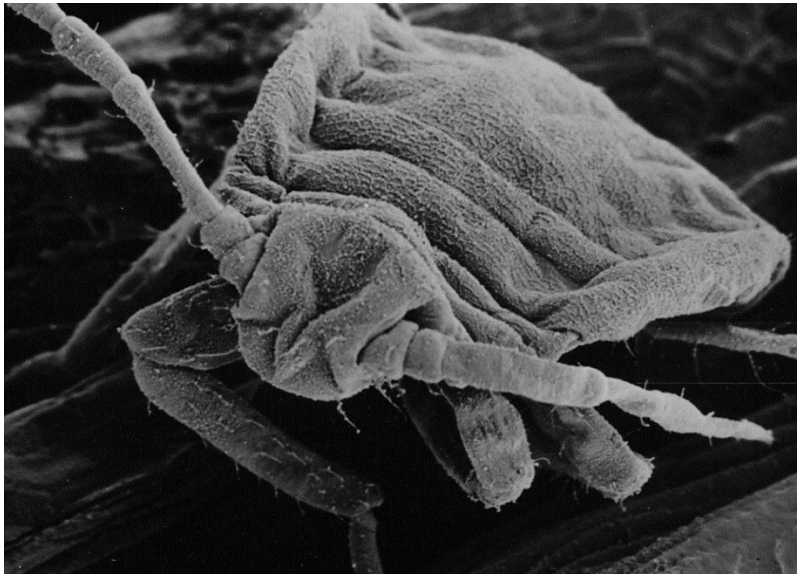
- Die Korrektur des *Astigmatismus* ist das A und O eines jeden gut eingestellten EMs. Dieser wird am Objekt selbst korrigiert, oder beim TEM, an der dazu extra gefertigten „*Lochfolie*“, deren Säume zur Einstellung geöffnet und geschlossen werden (Fokusknöpfe). Meist bei 50.000 oder 100.000fach. Öffnen und schließen sich die Säume zentrisch oben und unten, rechts und links, ist die Korrektur gelungen. Nun kann man Fotografieren. Allerdings ist die *echte Schärfe* oft nur als bestmögliche Kontrasteinstellung zu erreichen, die nicht ganz der wirklichen Fokusschärfe entspricht (und liegt meist winzige „Schritte“ daneben). Wer sicher gehen will, fotografiert gleich im leichten Über- und Unterfokus und in der Mitte von beiden (eine etwas materialaufwendige Methode aus den frühen siebziger Jahren). Meist ist ein TEM über den Tag unanfällig für Astigmatismus-Verstellungen (ganz im Gegensatz zu einem REM), jedoch ist es wichtig, ständig, während der Arbeit, die Bildqualität zu beachten (ev. zu korrigieren).
- Anders bei REM. Da wird der Astigmatismus direkt über die Stigmatorknöpfe **am Objekt** eingestellt. Und das Nachstellen ist ein ständiger Begleiter während der Arbeit.

Geschlossene Kammer am REM: über die **Schleuse (rechts)** werden die Proben eingeführt.



Probenbearbeitung für das REM

Trocken und leitfähig --- Beispiel : die geschrumpfte Blattlaus



Biologische Proben müssen wegen ihrer "Wasserhaltigkeit"

einem schonenden Prozess des Trocknens ausgesetzt werden:

denn sie schrumpfen durch den Verlust von Wasser im Vakuum.

Wasser hat eine hohe

Oberflächenspannung; bei der

Gefriertrocknung (mit vorherigem

„Schockgefrieren“) kann es dennoch zu

Eiskristallen kommen, die die Probe zerstören.

Bildung von Artefakten...

Biologische Proben sind obendrein im

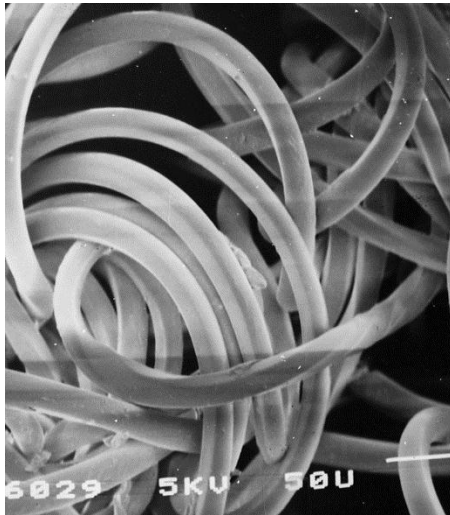
REM so etwas wie „elektrische

Isolatoren“ (an ihnen muss erst

Leitfähigkeit erzeugt werden: Gold!)

weiter: Probenbearbeitung für das REM

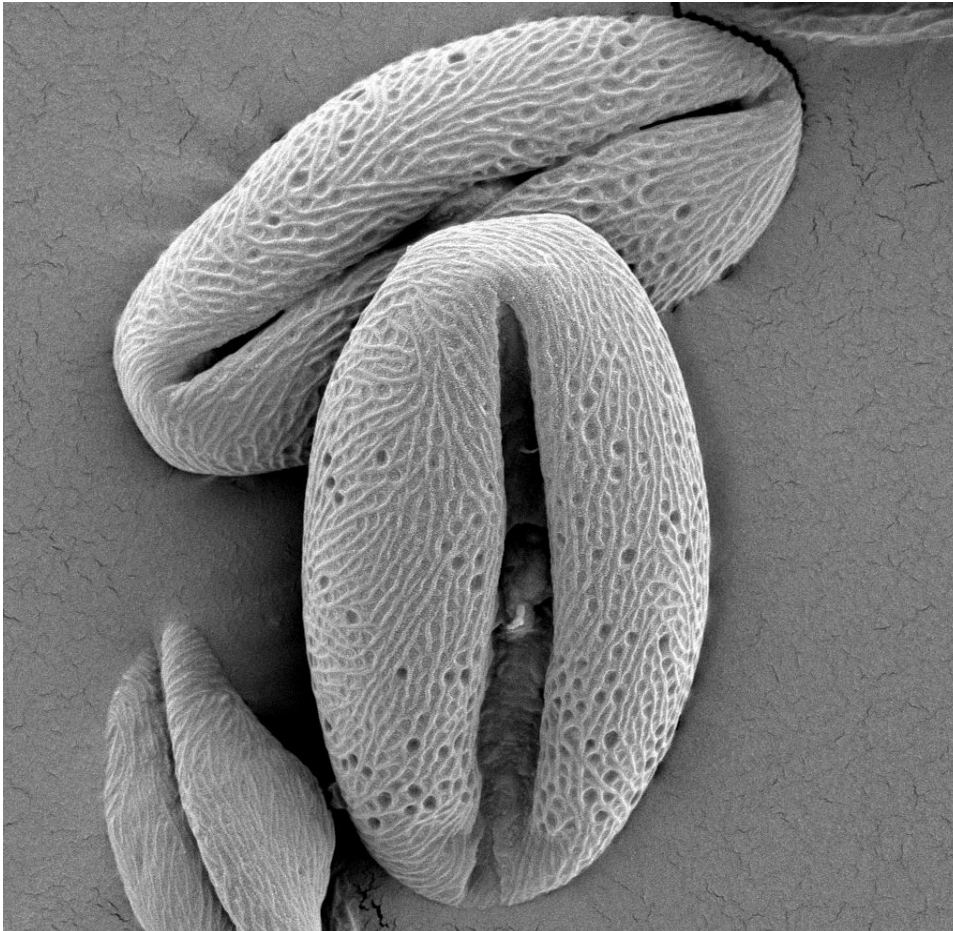
Trocken und leitfähig ---- Beispiel : Aufladungen entstehen
(Nylonstrumpf)



- Die meist verwendete Methode ist die chemische Fixierung mit Glutardialdehyd und der nachfolgenden Entwässerung mit Aceton oder Alkohol. Jetzt kann man die Präparate entweder mit „Silan“ trocknen (Silan = Hexamethyldisilazane)
- (*es verdampft anschließend langsam*) - oder
- die „Kritisch-Punkt-Trocknung“ verwenden (*Überführen in noch flüssiges Kohlendioxid und langsames Aufheben der Phasengrenzen am „kritischen Punkt“*).

weiter: Probenbearbeitung für das REM

Trocken und leitfähig ----- das gilt für alle Präparate !



Aesculus parviflora NA

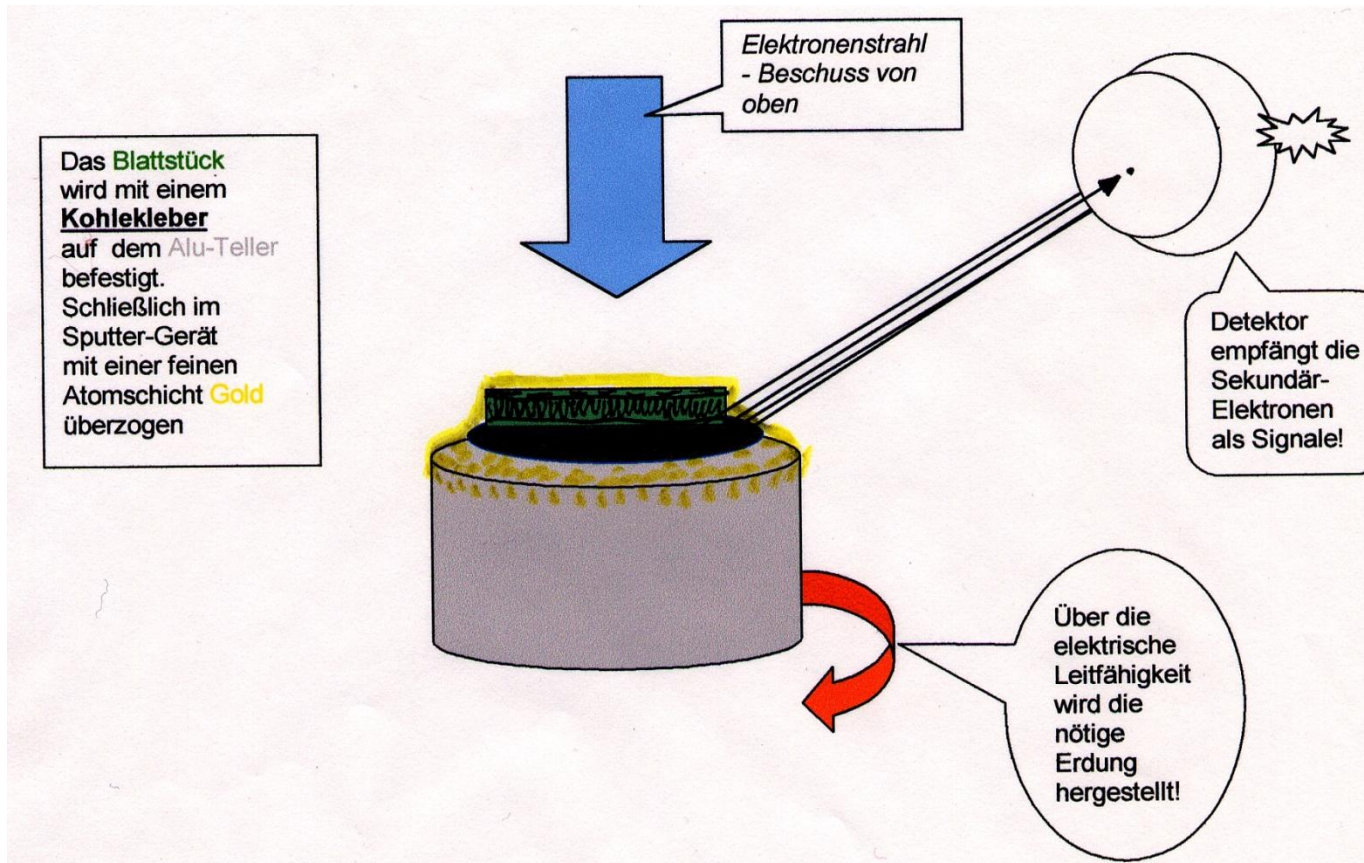
10µm

- Pollen von der Blüte direkt nehmen; Artefakte durch Schrumpfung möglich;
- Kieselalgen nach dem Auskochen auftropfen;
- Blätter (Behaarung usw.) mit N₂ Schock-Gefrieren und Gefriertrocknen;
- Zellstrukturen oder Insektenstücke mit chem. Lösung fixieren und Silan-Trocknung vollziehen oder mit Kritisch-Punkt bearbeiten.

Übergießen mit flüssigem Stickstoff, dann wird das Blattmaterial in die Gefriertrocknungs-Apparatur gelegt!



Raster-EM: Probenteller wie/was?



„Sputtern“ mit Gold

Die Proben für das REM werden auf Aluminiumteller aufgebracht und meist mit Kohlekleber befestigt, so erhalten selbst die biologischen Proben eine Untergrund-Leitfähigkeit. Leider reicht die nicht aus, und aus diesem Grunde werden die Präparateteller als Ganzes in ein Vakuum verbracht und mit einer hauchdünnen Atomschicht aus reinstem Gold überzogen. Diesen Vorgang nennt man „sputtern“, etwa *Umsprudeln*.

Die im Rezipienten befindlichen Restgase werden ionisiert. Diese „Atomrümpfe“ reißen aus der oben im Kopf sitzenden Goldschicht (hohe Spannung) die Goldatome heraus.

So kann der „störende Probenstrom“ gut abgeleitet werden!

Zu sehen ist „die Goldwolke“: das Restgas (oder auch Argon) leuchtet im UV-Licht!



Was können wir untersuchen?
Was darstellen?

Ja, was?

Schlagwort - Biodiversität : anhand von morphologischen Unterschieden
Artenvielfalt belegen...

Die Untersuchungsmöglichkeiten sind weit gefächert:

alles das, was Oberflächen besitzt – was von oben (außen) betrachtet werden kann, mag es auch ein Schnitt ins Innere sein, ist mit einem REM durchführbar!!!

Etwa: Zellwachstum auf künstlichen Knochen (Unfallchirurgie),

Strukturen von Zahn-Implantaten oder deren Bewuchs im Kiefer, deren ev. Brüche usw. (Zahnmedizin),

Gentechnisch oder molekularbiologisch veränderte Pflanzen oder Bakterien (Biowissenschaft, Molekularbiologie),

Nanopartikel im Einsatz für die Medizin (Pharmazeutische Technologie),

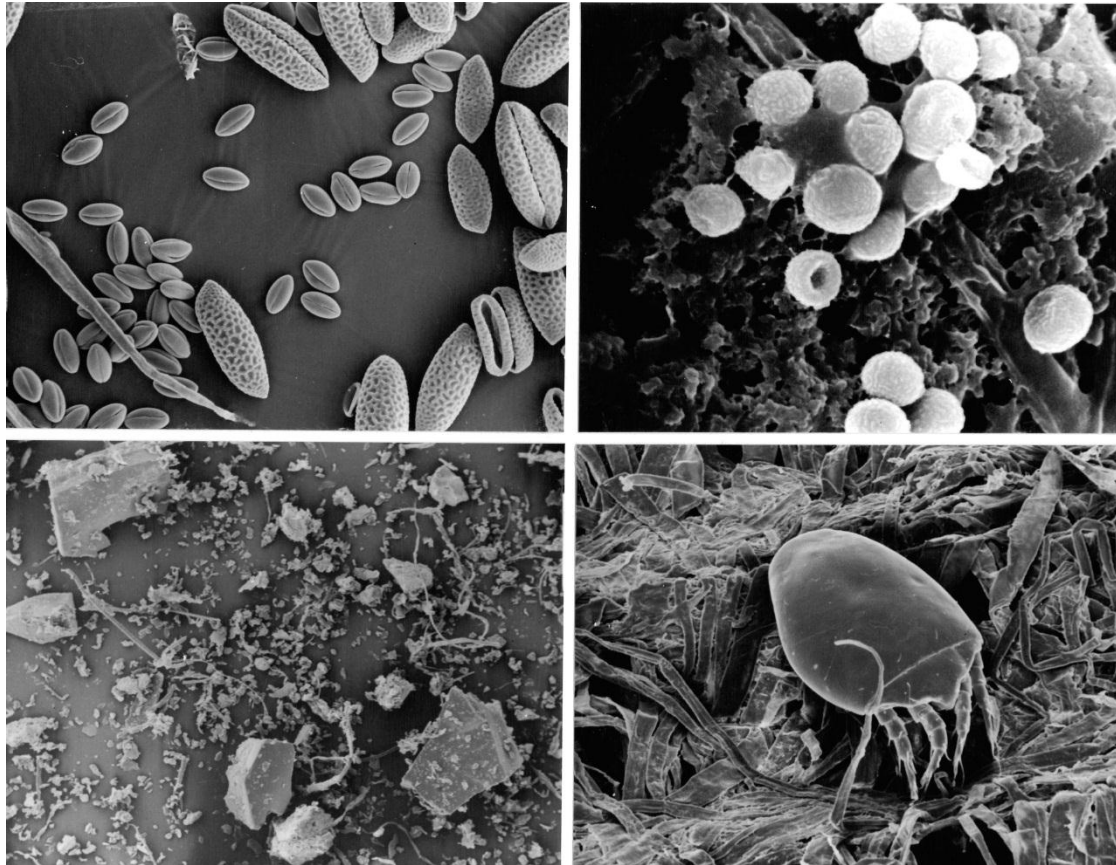
umgedreht aber auch Nanopartikel als Umweltverschmutzer (Ökotoxikologie),

Pilzsporen auf Blättern, aber auch auf der menschlichen Haut (Mykologie),

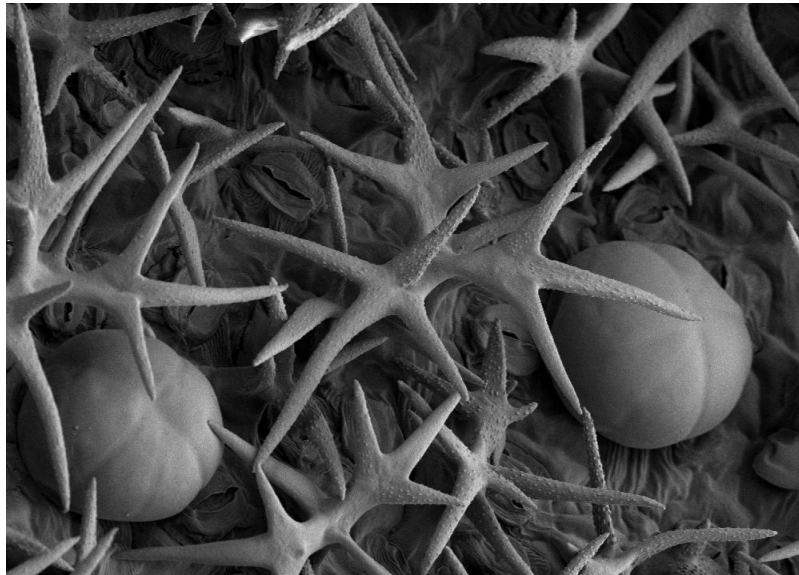
Insekten und Spinnentiere für Morphologie und Systematik (Entomologie, Funktion, Verhalten, Evolution usw.)

Pollen, Blattstrukturen (Haare, Drüsen, Wachse), Kieselalgen etc. sind bereits erwähnt worden, und gerade Pflanzen zeigen durch ihre Artenvielfalt viele Merkmale, die besonders gut im REM mit Abbildungen den Systematikern helfen können. Trotz der nun überall eingesetzten „DNA-Analysen“, ist die Morphologie allemal Voraussetzung!

Allergieauslöser: Pollen – Pilzporen – Hausstaub - Milben



Der Lavendel unter dem Elektronenmikroskop



Lavendelblatt

60 µm

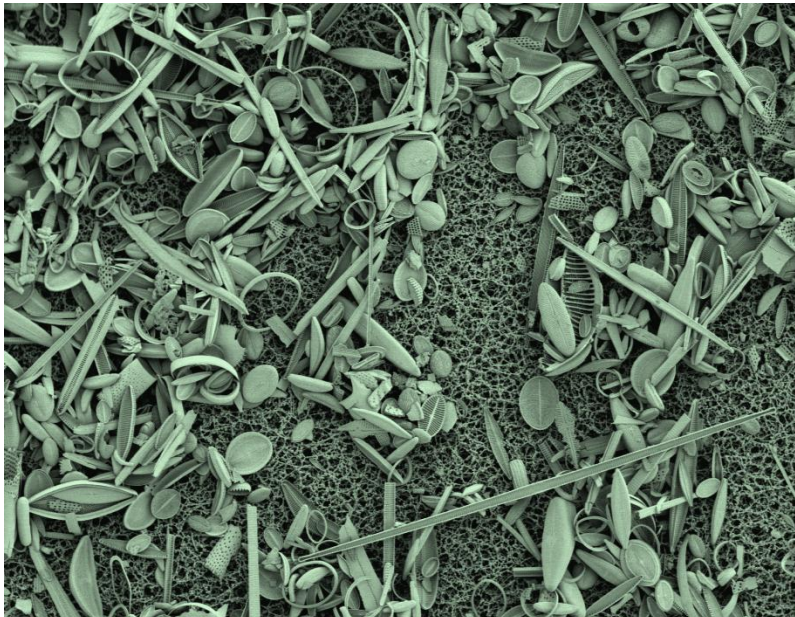
In Südfrankreich bedecken ganze lilablaue Areale des „Echten Lavendels“ die Landschaft und begeistern die Durchreisenden durch ihre Farbenpracht.

Die Arzneipflanze **Lavandula angustifolia** ist ein Lippenblütler, die ursprünglich aus dem Mittelmeerraum stammt und heute als Gartenpflanze weit verbreitet ist.

Sie enthält ein **ätherisches Öl**, eine Mischung aromatischer Substanzen, die sie in vielerlei Hinsicht zur Drogenproduzentin verschiedener Arzneimittel macht und darüber hinaus auch noch die Kosmetik- und Parfümindustrie beliefert.

Auf unserem Bild sehen wir eine plastische, unbekannte Welt auftauchen, die nichts anderes darstellt, als die Blattunterseite mit ihrer Epidermis, aus der Spaltöffnungen und die als Austrocknungsschutz dienenden Blatthaare hervortreten. Die kugeligen Gebilde selbst sind die Drüsenbälle, die die ätherischen Öle beinhalten und bei Reibung den charakteristischen Geruch des Lavendels offenbaren.

Wie sieht es auf dem Grunde eines Süßwassersees aus? --- und stimmt das? Jedes 4. von uns eingeatmete Sauerstoffmolekül kommt von den Kieselalgen!

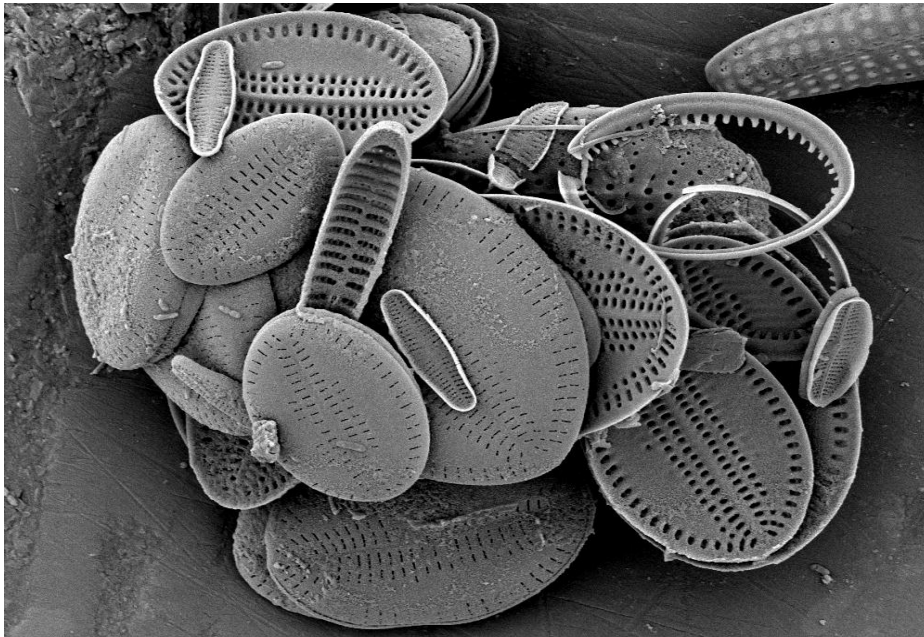


Diatomeen-Rasen vom Grunde

70 µm

- Myriaden von Kieselalgen (Diatomeen) bedecken den Boden eines Sees. Diese sitzen in ganzen Kolonien auf den Steinen und bilden einen schleimigen Überzug. Natürlich besteht der Seegrund aus verwesenden Materialien, zum großen Teil aber aus anorganischen Stoffen: Schluffen, Tonen, Sanden...
- Abgestorbene *Organismen* sinken und bilden ein Substrat, der bakteriellen Zersetzung ausgesetzt. Aber überall dort, wo noch Licht hindringen kann, wachsen Algen.
- Da Diatomeen nicht nur im Süßwasser leben, sondern auch im Meer, ist die Menge dieser Sauerstoffproduzenten ungeheuer groß: geschätzte 25 % der Atemluft kommt also aus den Chloroplasten dieser einzelligen Algen!

Aus dem Bereich der Kieselalgen- Forschung :



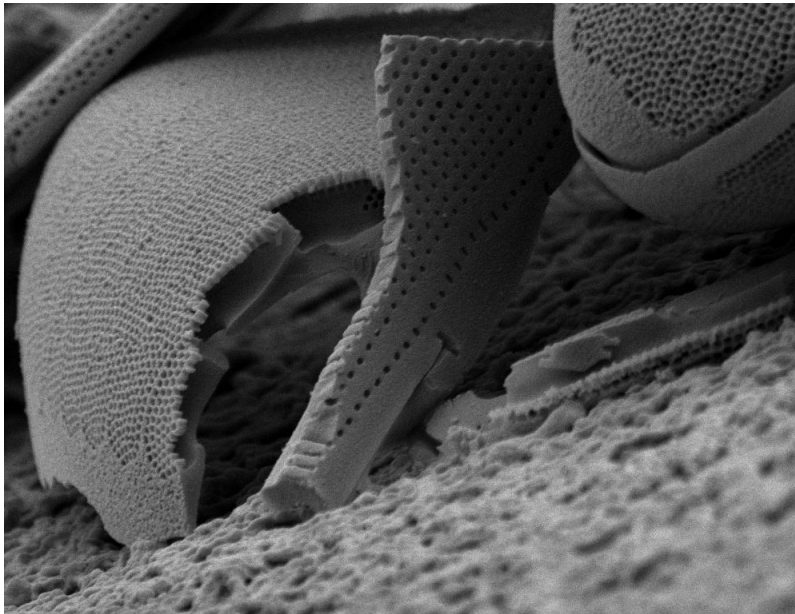
Gi CSIR Durban B45 620

— 10 µm —

*Durch die hohe Auflösung am
Raster-EM können die
Diatomologen
die Feinstrukturen der Schalen
besser erkennen, die für die
Unterscheidung der Arten
wichtig sind.*

**Nebenstehendes Foto zeigt eine Gruppe aus einer
marinen Kieselalgen-Population von der
südafrikanischen Küste.**

Kieselalgenschalen besitzen Öffnungen: *Löcher – Poren - Areolen*



Panama

— 3 µm —

- Aufgebrochene Schalen zeigen, dass die verkieselten „Zellwände“ von Diatomeen Öffnungen besitzen. Diese ermöglichen den Stoff- bzw. Gasaustausch (der Prozess der Photosynthese muss ablaufen können) zwischen dem wässrigen Medium (See, Fluss, Bach, Meer...) und dem plasmatischen Zellinnern. Stoffe können so aufgenommen und abgegeben werden.

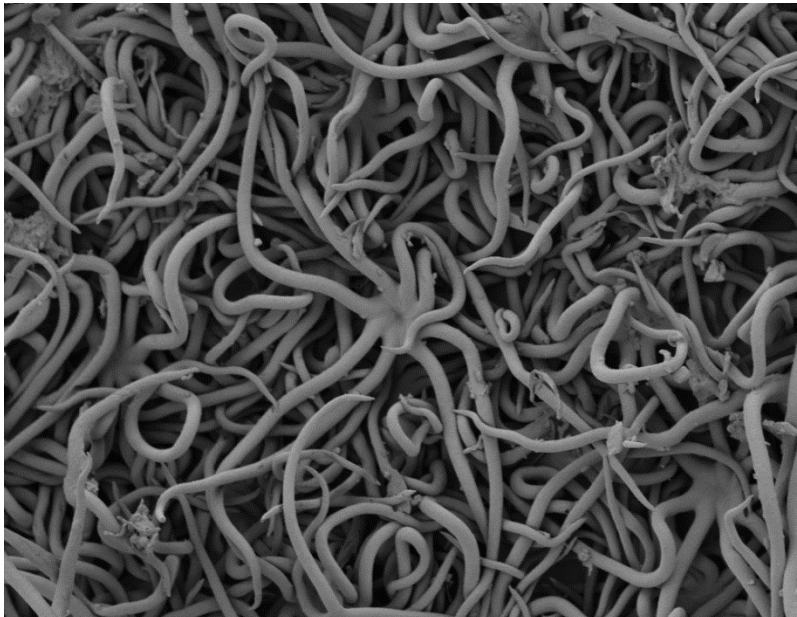
Organismen - Vielfalt - Nutzen :

- **Kiesel-Algen sind einzellige Pflanzen –**
- Pflanzen sind der Quell unserer Atemluft, denn sie „machen Photosynthese“ -
- Eine große Gruppe innerhalb der Algen sind solche mit Kieselskeletten: Diatomeen oder Kieselalgen genannt –
- Diese pflanzlichen Einzeller produzieren ein Viertel des gesamten Sauerstoffs unseres Planeten –
- Und fixieren dabei auch das *schädliche*, durch die Zivilisation erzeugte CO² in gewaltigen Mengen: Stichwort Klimawandel ! –
- Da Kieselalgen mit ihrer ästhetischen Formenvielfalt nur mikroskopisch erkennbar sind, blieben sie bisher der Durchschnittsbevölkerung so gut wie unbekannt –
- Ihre enorme Bedeutung für die Sauerstoffproduktion und Ökologie ist unübersehbar –
- Darüber hinaus sind sie ein wichtiges Glied in der Nahrungskette –
- Diatomeen sind Bioindikatoren: sie spielen in der Gewässeruntersuchung eine extrem große Rolle –

weiter: Diatomeen sind...

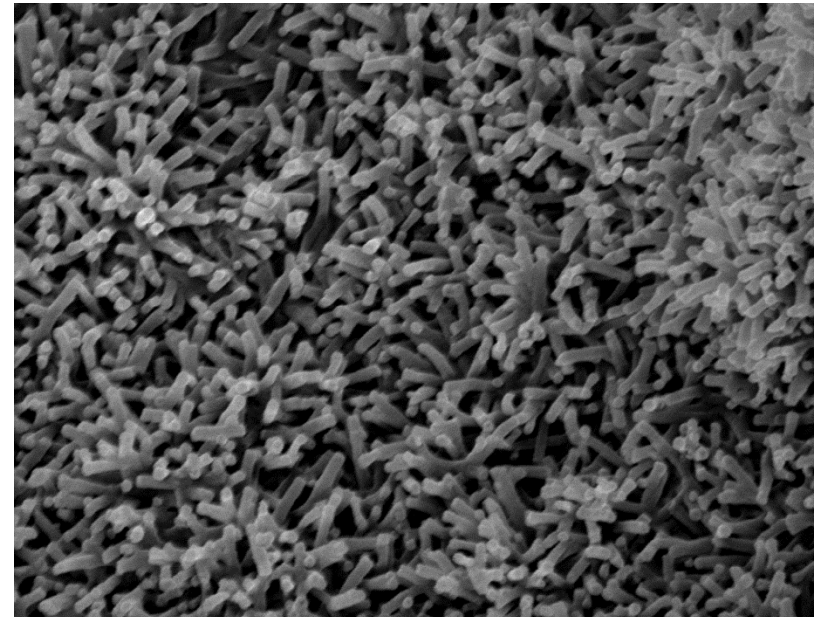
- Sie kommen in jedem Gewässer vor, aber auch da, wo es ein wenig feucht ist, unter Steinen, in der Erde, auf Blättern –
- Sie schweben als Plankton oder leben am Grunde von Seen, bewachsen andere Pflanzen und sind sozusagen auch dort stets vorhanden (Benthos) –
- Auch im Meer spielen sie eine ganz große Rolle –
- Sie sind wie alle Pflanzen vom Sonnenlicht abhängig -
- Fast alle Kieselalgen besitzen ein lichtdurchlässiges SiO_2 - Gehäuse, ein Gerüst mit feinen Löchern (für den Stofftransport) –
- Ihre Quarzglas-Schalen greifen wie bei einer Käseschachtel ineinander –
- Jedes der Individuen besteht aus zwei unterschiedlich alten Schalen -
- Nur bei wenigen Gattungen sind die Skelette in der Evolution wieder zurückgebildet worden (etwa bei den Symbiosepartnern der Korallen) –
- Diatomeen gibt es seit der Kreide-Zeit, also seit vielen Millionen von Jahren (Gesteinsbildner) –
- Es gibt die runden, dosenförmigen Kieselalgen: „Zentrische“ und die umfangreichste, vielfältigste Großgruppe der Diatomeen, die langgestreckten „Pennaten“ –
- Die Größe der Diatomeen ist sehr unterschiedlich, die kleinsten Formen sind nur wenige Mikrometer lang, andere können dagegen bis zu zwei-drei Millimeter erreichen.

Der Lotus-Effekt ist an der Feinstruktur des Blattes zu erkennen: einerseits gröbere Strukturen, wie bei vielen Eichenarten (links), andererseits feinste Wachsfibrillen etwa beim Ginkgo (rechts)



Steineiche

— 100 μm —



— 1 μm —

Der Lotus-Effect®

Superhydrophobe selbstreinigende mikrostrukturierte Oberflächen nach dem Vorbild der Natur - Schmutz perlt mit dem Regen ab.

Als erstes wurde dieser Effekt von Prof .Barthlott beschrieben, (ehem. Botaniker der Universität Bonn).

In der Pflanzenwelt (Blätter) werden Bakterien und Pilzsporen durch die Mitnahme des „Schmutzes“ gleichsam abgespült. Die Unterseite eines Blattes besitzt Spaltöffnungen, und diese besonders gefährdeten Unterseiten zeigen häufig einen „Lotus-Effekt“ durch gröbere „Behaarung“ und meist durch feinstrukturelle „harzige“ Oberflächen.

Siehe Eichen - Eiben - Gewürzpflanzen. Variationen sind möglich...

Technische Anwendungen gibt es mittlerweile zahlreiche: etwa für Dächer, Wandfarben, Taschen, Autolacke...

ENDE

Vielen Dank
für Ihre
Geduld!

REM-Foto-Tafel
zeigt einheimische Pollen.
Frühblüher aus dem
Rhein-Main-Gebiet
(vom ersten REM Hitachi
S-500 , 1987).

