

Erstellung von Elementverteilungsbildern
zur Lokalisation vom Phosphor im
Corynebacterium glutamicum Δ mcbR

Michael Epping

Diplomarbeit im Fachbereich Physik
Physikalisches Institut der
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
September 2010

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
1 Energiefilternde Transmissions-Elektronenmikroskopie	7
1.1 Streuprozesse in der Probe	7
1.2 Elektronen-Energieverlustspektrum	9
1.3 Elementverteilungsbilder	12
2 Technischer Aufbau	15
2.1 Das Transmission-Elektronenmikroskop	15
2.2 Aufbau des Zeiss EM 902	16
2.3 EELS am Zeiss Libra 200 FE	19
3 C. glutamicum ΔmcbR	21
3.1 Probenpräparation	22
3.2 Phosphor im C. glutamicum ΔmcbR	25
4 Durchführung der Messungen	27
4.1 Energiegefilterte Aufnahmen	27
4.1.1 Berücksichtigung der Kameraeigenschaften	28
4.1.2 Unterschiedliche Belichtungszeiten der energiegefilterten Bilder	29
4.1.3 Probendrift	30
4.1.4 Reihenfolge der Bildaufnahme	32
4.2 Aufnahme von Elektronen-Energieverlustspektren	34
5 EFTEM-Plug-in für ImageJ	35
5.1 ImageJ	35
5.2 Hilfsfunktion des EFTEM-Plug-ins	38
5.2.1 Driftkorrektur mittels gewichteter Kreuzkorrelation	38

Inhaltsverzeichnis

5.3	Methode der maximalen Ähnlichkeit	40
5.3.1	Berechnung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses	43
5.4	Die Benutzeroberfläche	45
6	Auswertung	49
6.1	Bestimmung der Fensterposition	49
6.2	Elementverteilungsbilder	51
6.3	Verunreinigung der Probe durch Silizium	61
6.3.1	Phosphor-Verteilung unter Berücksichtigung des Siliziums . . .	64
6.4	Korrektur der Fensterpositionen	72
	Zusammenfassung	75
	Literaturverzeichnis	77

Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion von Phosphor in einer biologischen Probe, dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum* Δ mcbR. Phosphor ist nur in geringen Mengen Bestandteil des Bakteriums, jedoch gibt es Anhäufungen von Molekülen, welche Phosphor enthalten. Diese Anhäufungen sollen detektiert werden. Die Methode, die dazu benutzt werden soll, ist die energiefilternde Transmissions-Elektronenmikroskopie. Mit Hilfe der energiefilternden Transmissions-Elektronenmikroskopie ist es möglich, die Verteilung bestimmter Elemente in einer Probe, mit einer lateralen Auflösung von wenigen nm, zu bestimmen. Erschwert wurde die Detektion von Phosphor durch eine Verunreinigung der Proben mit Silizium. Aus einem energiegefilterten Bild lässt sich nicht direkt die Verteilung eines Elementes ablesen. Zuerst muss der vorhandene Untergrund bestimmt und abgezogen werden, wozu die Aufnahme von weiteren energiegefilterten Bildern nötig ist. Der Untergrund wird dabei für jeden Pixel einzeln bestimmt. Durchgeführt wird die Bestimmung des Untergrundes von einem, im Rahmen dieser Arbeit geschriebenen, Computerprogramm. Dieses Programm wurde in der Programmiersprache Java geschrieben. Es ist als Plug-in für die OpenSource Bildbearbeitungssoftware ImageJ realisiert und lässt sich über eine grafische Benutzeroberfläche bedienen. Bei dem Programm habe ich zur Bestimmung des Untergrundsignals nicht die häufig genutzte gewichtete lineare Regression eingesetzt, sondern ich habe mich dazu entschieden, die Methode der maximalen Ähnlichkeit (Maximum-Likelihood-Estimation) zu nutzen. Dabei handelt es sich, wie bei der linearen Regression, um ein parametrisches Schätzverfahren, bei dem numerisch die Parameter bestimmt werden. Insbesondere liefert diese Methode immer das bestmögliche Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SRV).

Kapitel 1

Energiefilternde Transmissions-Elektronenmikroskopie

1.1 Streuprozesse in der Probe

Ein Transmissions-Elektronenmikroskop lässt sich in verschiedenen Modi betreiben. Um die Probe zu analysieren, lassen sich die unterschiedlichen Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit der Probe nutzen. Bei der energiefilternden Transmissions-Elektronenmikroskopie werden die Strahlelektronen zur Bilderzeugung genutzt. Schießt man Elektronen durch eine dünne Probe, so verlieren die Elektronen einen Teil ihrer kinetische Energie. Der Energieverlust der Elektronen resultiert aus der Streuung an den Elektronen der Atomhülle, wobei der Energieverlust spezifisch für die in der Probe enthaltenen Elemente ist. Dabei spricht man von inelastischer Streuung. Neben der inelastischen Streuung findet auch elastische Streuung statt.

Bei der elastischen Streuung (Abbildung 1.1 links) handelt es sich um die direkte Wechselwirkung zwischen Strahlelektron und dem Potential eines Atomkerns. Das Potential des Atomes wird dabei durch die Hüllelektronen abgeschirmt. Mit zunehmendem Abstand r kommt es dabei zu einer Abnahme des Potentials und dadurch zu einem vom Abstand abhängigen Streuwinkel. Der Energieübertrag des Elektrons an das streuende Atom ist wegen des großen Massenunterschieds zwischen Elektron und Atomkern vernachlässigbar klein. Die elastische Streuung lässt anhand der Streuwinkel und Streurichtungen - die man durch die Aufnahme von Beugungsbildern bestimmt - Rückschlüsse auf die Struktur der Probe zu. Die Beugungsbilder

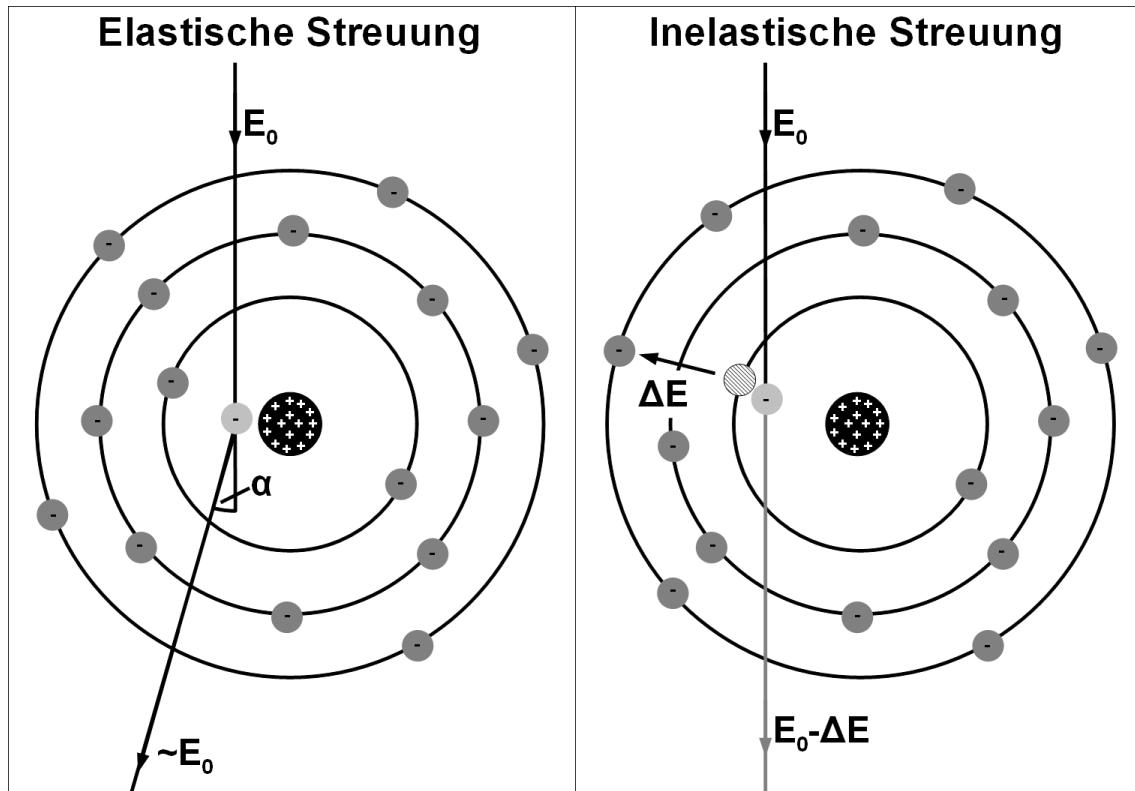


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von elastischer und inelastischer Streuung des Strahlelektrons an einem Phosphoratom.

enthalten Informationen über die mittleren Abstände zwischen den Atomen und deren räumliche Verteilung. Bei der Aufnahme der Beugungsbilder wird eine größere Anzahl von Atomen mit dem Elektronenstrahl ausleuchtet. So erzeugen kristalline Proben aufgrund ihrer strukturierten Atomverteilung scharfe Beugungsspots. Amorphe Proben, wie z. B. die meisten biologischen Proben, weisen hingegen unscharfe Beugungsringe auf, da keine Fernordnung besteht und somit unterschiedliche Atomabstände und Orientierungen in das Beugungsmuster einfließen.

Bei der inelastischen Streuung (Abbildung 1.1 rechts) kommt es zu einem Energieübertrag der Größe $\Delta E = E_f - E_i$. Die Wechselwirkung findet dabei zwischen einem Strahlelektron und einem Hüllenelektron der Probe statt, wobei das Strahlelektron Energie an das Hüllenelektron überträgt. Die Wahrscheinlichkeit für die inelastische Streuung ist dabei abhängig von der Wahrscheinlichkeit für einen Übergang eines Elektrons vom Grundzustand (E_i) in einen freien Zustand oberhalb der Fermienergie

(E_f). Mit der Analyse inelastisch gestreuter Elektronen lässt sich die Zustandsdichte der unbesetzten Zustände untersuchen. Außerdem können die gebundenen Elektronen aus dem Atom herausgeschlagen werden, wodurch ein Energieübertrag möglich ist, der die Bindungsenergie übersteigt. Neben den für ein Element spezifischen Energieverlusten gibt es dadurch noch ein unspezifisches Untergrundsignal.

Wird der nun unbesetzte Zustand wieder durch ein anderes Elektron aufgefüllt, so kommt es zu einem Sekundärprozess, z. B. der Emission von Röntgenstrahlung, oder der Aussendung eines Augerelektron. Beide Effekte können - falls passende Detektoren vorhanden sind - zusätzlich zur Analyse der Probe genutzt werden. In der energielosernden Transmissions-Elektronenmikroskopie wird jedoch der Energieverlust des einfallenden Elektrons genutzt. Die Sekundärprozesse bleiben unberücksichtigt.

1.2 Elektronen-Energieverlustspektrum

Abbildung 1.2 zeigt das Elektronen-Energieverlustspektrosktrum von C. glutamicum für niedrige Energieverluste. Aufgetragen ist eine zur Anzahl der Elektronen proportionale Größe (y-Achse), gegen den Energieverlust (x-Achse) den diese Elektronen erlitten haben. Die größte Intensität besitzt das Signal der Elektronen ohne Energieverlust, dies ist der sogenannte Zero-Loss-Peak. Dieses Signal resultiert aus nicht gestreuten Elektronen und auch elastisch gestreute Elektronen tragen zum Zero-Loss-Peak bei. Die Halbwertsbreite des Peaks ergibt sich, zumindest bei dünnen Proben, aus der Energieauflösung des Mikroskops.

In der Abbildung ist ein weiterer Peak bei 22 eV zu sehen. Im Bereich von einigen 10 eV gibt es zwei unterschiedliche Prozesse, die zu einem Energieverlust führen. Zum einen sind das Plasmonanregungen bzw. Plasmonschwingungen. Dabei handelt es sich um Dichteoszillationen im Elektronengas, die vom elektromagnetischen Feld der die Probe passierenden Strahlelektronen ausgelöst werden. Dieser Effekt tritt in Metallen und Halbleitern auf, bei denen die Leitungselektronen ein Elektronengas bildet. Der zweite Prozess ist die Anregung von gebundenen Valenzelektronen. Werden diese kollektiv angeregt, dann spricht man auch bei diesem Prozess von einer Plasmonanregung.

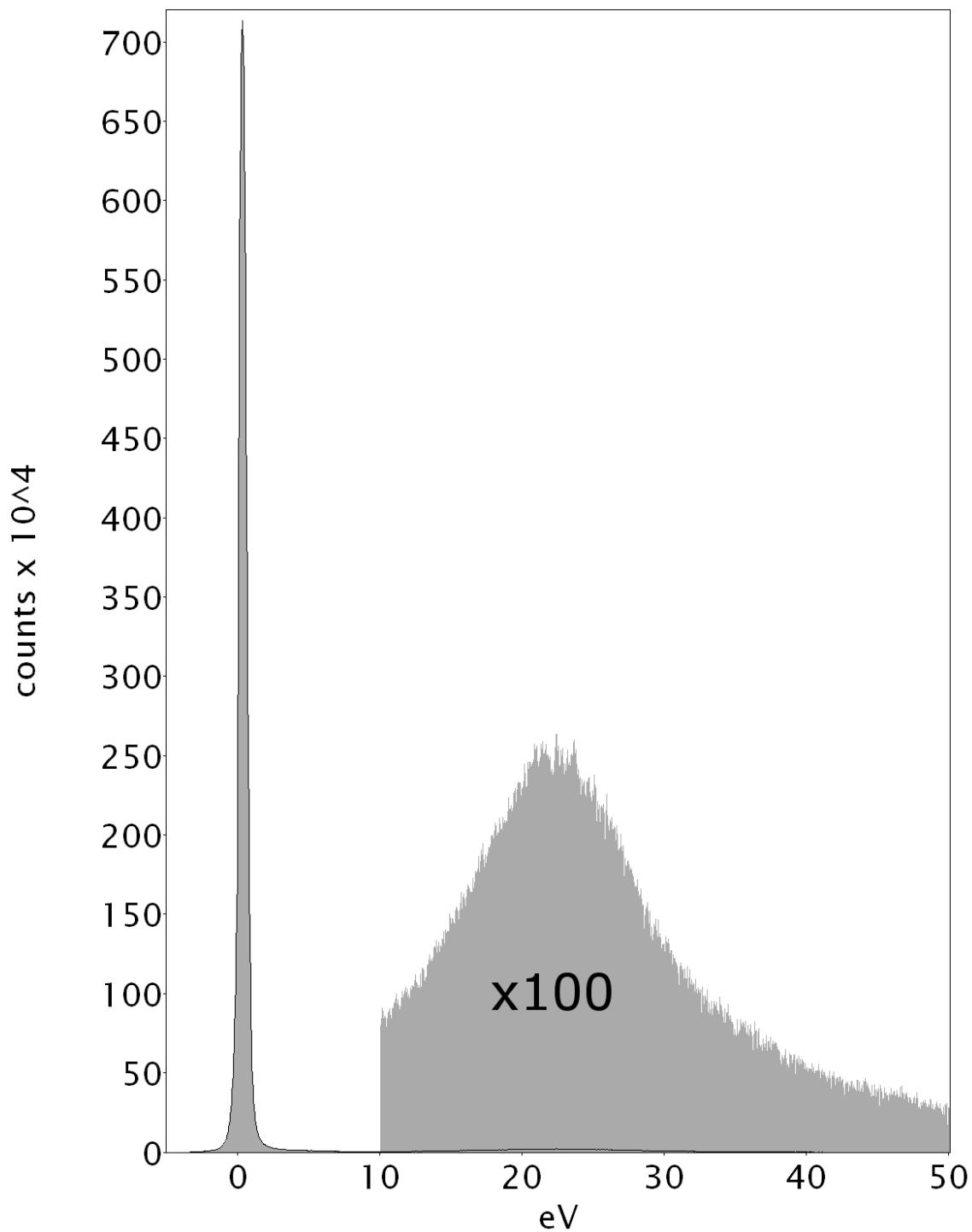


Abbildung 1.2: EELS von *C. glutamicum*. Die schwarze, durchgezogene Linie zeigt das nicht vergrößerte Spektrum.

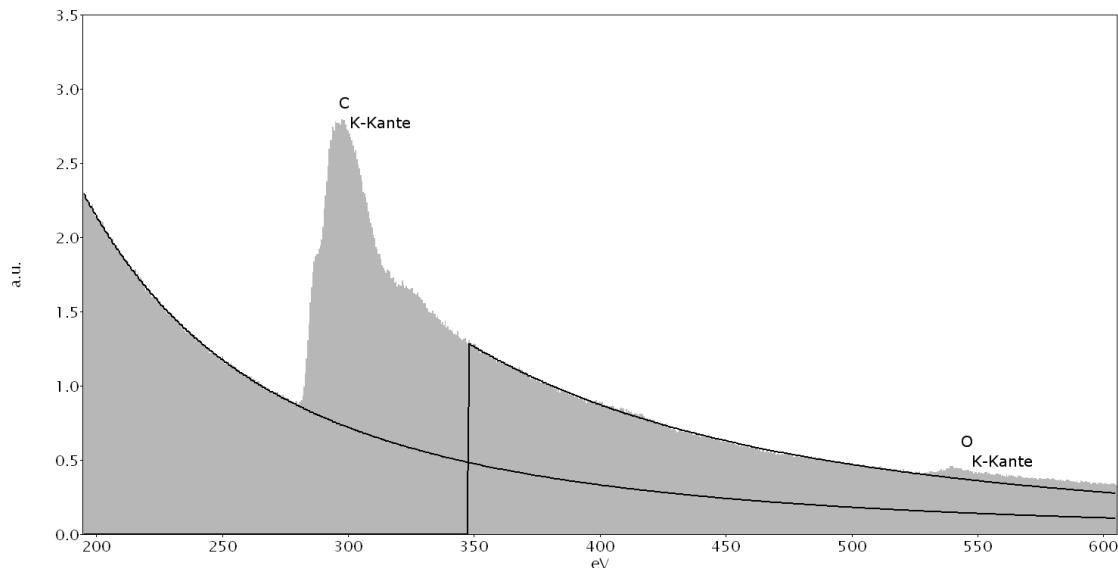


Abbildung 1.3: EELS von *C. glutamicum*. Zu sehen sind jeweils die K-Kanten von Kohlenstoff (284 eV) und Sauerstoff (532 eV).

Alle in einem Spektrum zu sehenden Strukturen, die bei höheren Energieverlustpeaks auftreten, resultieren aus inelastischer Streuung an den Elektronen der inneren Atomhülle (siehe Abbildung 1.3). Die Elektronen werden aus einem stärker gebundenen Zustand in einen schwächer gebundenen Zustand angeregt. Die dazu nötige Energie erhalten sie dabei vom Strahlelektron. Peaks treten dabei eher selten auf. Man spricht von Kanten, diese besitzen einen steilen Anstieg und fallen wesentlich flacher wieder ab. Durch die Aufspaltung der Energieniveaus gibt es eine Vielzahl von möglichen Übergängen. Die Übergänge besitzen dabei eine bestimmte Übergangswahrscheinlichkeit. Diese Wahrscheinlichkeitsverteilung zeigt sich in der Struktur der Kanten. Beim Herausschlagen des Elektrons aus dem Atom kann das herausgeschlagene Elektron beliebige Beträge von kinetischer Energie vom gestreuten Elektron erhalten. Jede Kante erzeugt dadurch einen unspezifischen Untergrund. Besitzt ein Element mehrere voll besetzte Energieniveaus, so lassen sich auch mehrere Kanten im Spektrum beobachten, deren Energieverlust sich deutlich unterscheidet. Bei Phosphor beginnt z. B. die L-Kante bei einem Energieverlust von 132 eV, während die K-Kante, aufgrund der höheren Bindungsenergie der K-Schale, erst bei 2146 eV einsetzt. Die Bezeichnung der Kanten ist analog zu der Bezeichnung des Energieniveaus, aus dem das angeregte Elektron stammt. Die K-Kante resultiert

aus einer Anregung eines Elektrons aus der K-Schale, die L-Kante aus einer Anregung aus der L-Schale usw.. Schwere Elemente wie Uran besitzen noch M-, N- und O-Kanten. Wegen der Aufspaltung der Energieniveaus werden diese noch weiter unterteilt, z. B. in die N_4 - und N_5 -Kante bei Uran, die fast 50 eV auseinander liegen. Wie im Spektrum (Abbildung 1.3) zu sehen ist, gibt es neben den Ionisationskanten auch noch einen, bei steigendem Energieverlust stetig abfallenden Untergrund. Der Untergrund entsteht durch die Anregung von Elektronen in ungebundene Zustände. Dabei besitzen sie anschließend unterschiedliche kinetische Energie, wodurch ein kontinuierlicher Untergrund entsteht. Die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten Energieübertrags sinkt mit steigender kinetischer Energie des herausgeschlagenen Elektron. Da auch die Valenzelektronen zum Untergrund beitragen, setzt dieser schon bei wenigen 10 eV ein und erstreckt sich über das gesamte Spektrum. Die Form des Untergrundes lässt sich durch $a \cdot E^{-r}$ annähern, wobei E der Energieverlust ist. Die Parameter a und r variieren dabei abhängig von der Probendicke und dem Probenmaterial. Abbildung 1.3 zeigt ein Spektrum mit den K-Kanten von Kohlenstoff und Sauerstoff. Es ist deutlich zu sehen, dass neben dem vor dem Kohlenstoffpeak vorhandenen Untergrund, durch die inelastische Streuung am Kohlenstoff, weiteres Signal zum Untergrund hinzukommt.

1.3 Elementverteilungsbilder

Die in den Abbildungen 1.2 und 1.3 gezeigten Spektren geben den Energieverlust in einem kleinen Bereich der Probe wieder. Durch die Filtereintrittsblende oder die Ausmaße des Elektronenstrahls ist der Probenausschnitt beschränkt. Das Spektrum resultiert somit aus einer Integration über den selektierten Probenbereich. Eine Möglichkeit ein Elementverteilungsbild aufzunehmen, wäre das Abrastern der Probe mit einem fokussierten Strahl, um an jedem Punkt ein Spektrum aufzunehmen. Bei dieser Methode, die man STEM (Scanning Transmission-Electron-Microscopy) bezeichnet, nimmt man an einige hundert Bildpunkte jeweils ein Spektrum auf. Die gesamte Aufnahmezeit steigt mit der Anzahl der Bildpunkte. STEM eignet sich besonders gut um kleine Probenstellen mit einer hohen Ortsauflösung zu untersuchen.

Eine Alternative ist die Erstellung der Elementverteilungsbilder durch die sogenannte energiefilternde Transmissions-Elektronenmikroskopie (EFTEM). Aufgenommen werden Bilder, zu denen nur Elektronen aus einem festgelegten Energieverlustbereich beitragen. Dazu nutzt man eine Spaltblende in der energiedispersiven Ebene des Energiefilters. Für die Elementverteilungsbilder werden Aufnahmen mit unterschiedlichem Energieverlust gemacht. Die gesamte Aufnahmezeit steigt mit der Anzahl der Energieverlustaufnahmen.

Als Ergebnis beider Methoden erhält man einen sogenannten Datenwürfel, der zwei Dimensionen für die Ortsauflösung besitzt und in der dritten Dimension den Energieverlust enthält. Das weitere Vorgehen ist für beide Methoden gleich. Man muss den Untergrund im Energieverlustspektrum bestimmen und subtrahieren, um nur noch ein elementspezifisches Signal zu erhalten. Im einfachsten Fall besitzt man nur drei Messwerte für den Energieverlust. Zwei der Messwerte müssen dabei vor der Ionisationskante liegen, der dritte Messwert liegt hinter dieser. Die Potenzfunktion $a \cdot E^{-r}$, durch die sich der Untergrund beschreiben lässt, kann man in einer doppelt logarithmischen Darstellung als Gerade zeichnen

$$\ln I(E) = \ln(a \cdot E^{-r}) = -r \cdot \ln E + \ln a. \quad (1.1)$$

Bei nur zwei Messwerten vor der Ionisationskante, lässt sich aus den beiden gegebenen Punkten direkt die Gerade bestimmen. Dies ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Durch zwei Messwerte wurde eine Gerade gelegt. Der Abstand zwischen der Gerade und dem dritten Messwert entspricht dem vom Untergrund korrigierten Elementsignal. Nutzt man mehr als zwei Vorkantenbilder, so muss man eine Ausgleichsgerade bestimmen, z. B. mit der Methode der kleinsten Quadrate (method of least squares). Mit steigender Anzahl von Energiekanälen wächst der Aufwand für die Berechnung der Ausgleichsgeraden. Steigt die Anzahl an Datenpunkten in der Ortsebene, so erhöht sich die Anzahl der Wiederholungen, da die Untergrundkorrektur für jeden Bildpixel durchgeführt werden muss.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde eine andere Methode zur Bestimmung des Untergrundes verwendet. Dabei handelt es sich um die Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit (Maximum-Likelihood-Estimation). Wie die Methode der kleinsten Quadrate, ist auch dies ein parametrisches Schätzverfahren. Während man bei der Methode der kleinsten Quadrate die Summe der Quadra-

te der Abweichung durch Variation der Parameter minimiert, wird bei der Maximum-Likelihood-Estimation die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion bestimmt und anschließend minimiert. Eine doppelt logarithmischer Darstellung der Potenzfunktion wird dabei nicht benutzt. Eine genauere Beschreibung der Maximum-Likelihood-Estimation finden Sie in Kapitel 5.3.

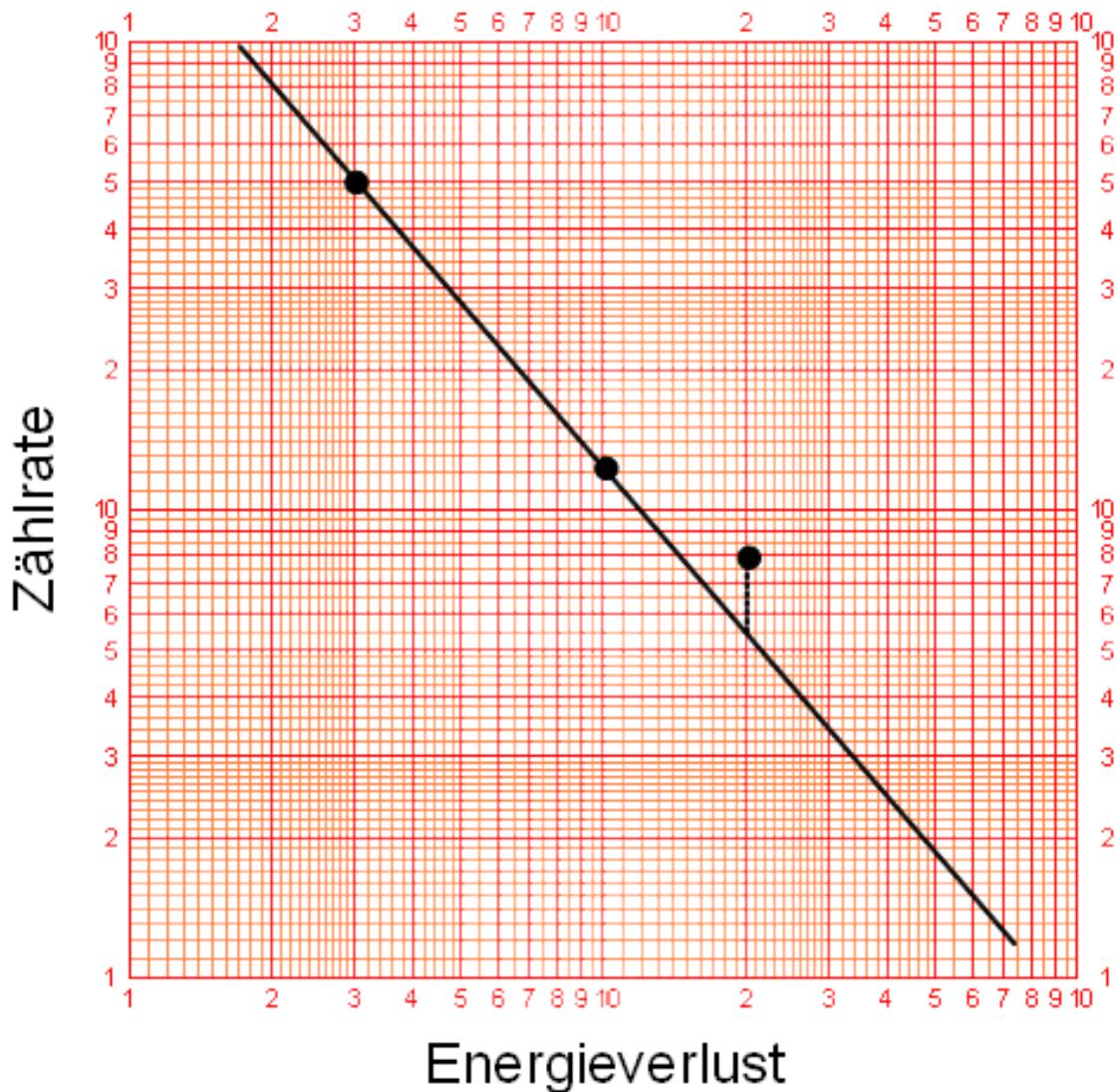


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Untergrundkorrektur in doppelt logarithmischer Darstellung.

Kapitel 2

Technischer Aufbau

2.1 Das Transmission-Elektronenmikroskop

Für die Aufnahme von EEL-Spektren und energiegefilterten Bildern ist ein TEM mit einem Energiefilter nötig. Die beiden genutzten Geräte besitzen einen ähnlichen Aufbau mit einem in der Mikroskopsäule eingebautem Energiefilter. Von oben beginnend und sehr vereinfacht, besteht die Säule aus dem Beleuchtungssystem, dem Probenhalter, dem Energiefilter und abschließend dem Leuchtschirm mit darunter liegendem Kamerasystem. Zwischen diesen Bauteilen liegen noch diverse Linsen, bzw. Linsensysteme. Der Aufbau des Zeiss EM 902, welches mit 80 kV Beschleunigungsspannung betrieben wird und einen Castaing-Henry-Filter besitzt, wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Die Beschreibung beschränkt sich auf die Bauteile, die für die Aufnahme von energiegefilterten Bildern wichtig sind. Einen Teil der Elektronen-Energieverlustspektren wurde an einem Zeiss Libra 200 FE aufgenommen. Welche Unterschiede es bei der Aufnahme der Spektren gibt, wird im Anschluss an die Beschreibung des EM902 besprochen.

2.2 Aufbau des Zeiss EM 902

In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau des EM902 zu sehen. Dabei wurde auf alle Bauteile verzichtet, die für die Aufnahme von energiegefilterten Bildern nicht von Bedeutung sind. Bei der Kathode des Zeiss EM 902 handelt es sich um einen thermischen Emitter aus Wolfram. Durch das Aufheizen der Kathode wird die kinetische Energie der Elektronen erhöht, damit diese die Austrittsarbeit überwinden können. Durch die Potentialdifferenz zwischen Kathode und Anode werden die Elektronen von der Kathode abgesaugt und beschleunigt. Die Elektronen besitzen anschließend eine kinetische Energie von 80 keV. Das Kondensorlinsensystem sorgt dafür, dass der Elektronenstrahl möglichst parallel ist, wenn er die Probe ausleuchtet. Dabei begrenzt die Kondensorblende den Elektronenstrahl. Durch das Variieren der Linsenströme lässt sich der Strahl aufweiten und zusammenziehen. Dadurch kann man die Helligkeit, die proportional zur der Anzahl der Elektronen pro Flächeneinheit ist, anpassen.

Nachdem der Elektronenstrahl die Probe passiert hat, kann man die Elektronen in nicht gestreute Elektronen, elastisch gestreute Elektronen und inelastisch gestreute Elektronen unterteilen. Die elastisch gestreuten Elektronen, die um einem großen Winkel abgelenkt wurden, lassen sich durch die Objektivblende, die sich in der ersten Beugungsebene befindet, herausfiltern. Dies erhöht den Kontrast bei energiegefilterten Aufnahmen, da die Abbildungseigenschaften des Energiefilters nur optimal sind für Elektronen, die sich in einem kleinen Winkel um den unabgelenkten Strahl befinden. Wird die Blende, und damit auch der Winkel, zu klein gewählt, so führt das zu einer Begrenzung der Ortsauflösung. Bei den geringen Vergrößerungen, bei denen sämtliche Aufnahmen gemacht wurden, hat das aber keine sichtbaren Auswirkungen. Mit der Filtereintrittsblende lässt sich der Bildausschnitt begrenzen. Wählt man die Blende so, dass zwar nicht der ganze Leuchtschirm, aber die CCD-Kamera komplett ausgeleuchtet wird, so werden Abbildungsfehler durch den Energiefilter weiter reduziert.

Der Castaing-Henry-Filter besteht aus einem magnetischen Prisma und einem elektrostatischen Spiegel. Das Prisma ist so konstruiert, das der einfallende Strahl um 90° abgelenkt wird und auf den Spiegel trifft. Der reflektierte Strahl wird erneut um 90° abgelenkt und befindet sich dann wieder in der optischen Achse. Dieser Strahlengang trifft jedoch nur für Elektronen zu, die keinen Energieverlust erlitten haben.

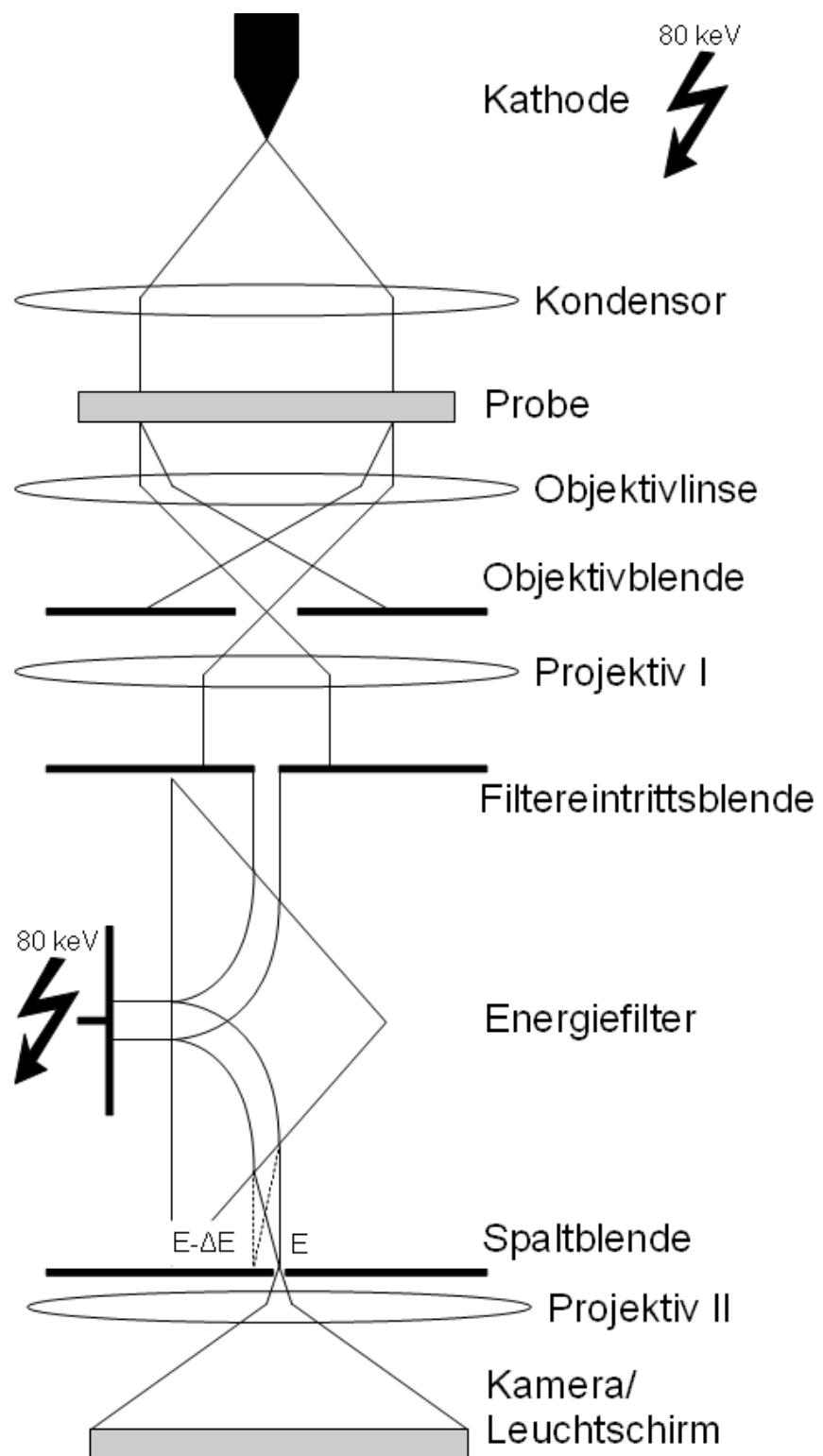


Abbildung 2.1: Aufbau des EM902 mit den für EFTEM wichtigen Bauteilen.

Alle weiteren Elektronen werden zusätzlich um einen kleinen Winkel, der proportional zum Energieverlust der Elektronen ist, abgelenkt. Dadurch ergibt sich in der Filteraustrittsebene in einer Achse eine Aufspaltung nach dem Energieverlust. Durch das Einbringen einer Spaltblende ist es möglich, nur Elektronen mit einem bestimmten Energieverlust passieren zu lassen. Soll der Energiefilter Elektronen mit einem spezifischen Energieverlust optimal abbilden, so erhöht man die Beschleunigungsspannung um den Wert, der dem gewünschten Energieverlust entspricht. Bei einer Beschleunigungsspannung von 80,1 kV besitzen alle Elektronen mit einem Energieverlust von 100 eV nach dem Durchlaufen der Probe eine Energie von 80 keV und werden somit optimal vom Filter abgebildet.

Auf einem fluoreszierenden Leuchtschirm kann man die vergrößerte Abbildung der Probe beobachten. Klappt man den Leuchtschirm hoch, so gelangt der Strahl zu einer CCD-Kamera. Der Kamerachip registriert nicht direkt die einfallenden Elektronen, sondern nur Photonen. Um diese zu erzeugen, befindet sich oberhalb des Kamerachips ein Szintillator, der wie die Phosphorschicht des Leuchtschirms durch Fluoreszenz Photonen erzeugt. Über Lichtwellenleiter ist der Szintillator an den Kamerachip gekoppelt [Hü98].

2.3 EELS am Zeiss Libra 200 FE

EEL-Spektren können am Zeiss EM 902 nur seriell aufgenommen werden. Dazu stellt man einen möglichst schmalen Spalt ein und misst dann für jeden Energiekanal den Elektronenstrom mit einem Faraday-Becher. Der Energieverlust wird in 0,5 eV-, oder 1 eV-Schritten variiert. Die Schrittweite ist dabei kleiner als die Energieauflösung des Mikroskops. Wegen des thermischen Emitters beträgt die Energieauflösung 2 bis 3 eV. Besonders die lange Aufnahmezeit, die aus der seriellen Aufzeichnung resultiert, ist bei biologischen Proben ein Problem, da sich die Probe durch Strahlenschäden verändert. Die meisten Spektren wurden deshalb an einem Zeiss Libra 200 FE aufgenommen, welches mit 200 keV Beschleunigungsspannung arbeitet. Die Energieauflösung beträgt 0,7 eV. Da das Gerät eine Feldemissionskathode besitzt, ist schon die Energiebreite des Elektronenstrahls geringer als beim EM902. Die Spektren lassen sich direkt mit der CCD-Kamera aufnehmen, so dass man sämtliche Energiekanäle in einem Energieverlustbereich von z. B. 126 eV (abhängig von der Nachvergrößerung) parallel aufnehmen kann. In x-Richtung erhält man dann, entsprechend der Pixelanzahl, fast 4096 Energiekanäle und über die y-Richtung - die noch Ortsinformationen enthält und durch die Filtereintrittsblende beschränkt ist - wird aufsummiert. Die Energiekanäle sind wesentlich schmäler als die Energieauflösung. Um die Aufnahmezeit zu verkürzen, kann man jeweils 4x4 Pixel als einen Messwert auslesen (Binning-Modus). Dadurch erhält man 1024 Energiekanäle, deren Breite weiterhin geringer ist als die Energieauflösung.

Kapitel 3

C. glutamicum Δ mcbR

Das *Corynebacterium glutamicum Δ mcbR* ist eine gentechnisch veränderte Art des *Corynebacterium glutamicum*. *C. glutamicum* ist ein schnell wachsendes Bodenbakterium, das beim Menschen keine Krankheiten auslöst. Seinen Name erlangte das 1957 entdeckte Bakterium auf Grund seiner Glutaminsäureproduktion. Häufig wird das *C. glutamicum* für die fermentative Produktion von Aminosäuren und Vitaminen verwendet.

Beim *C. glutamicum Δ mcbR* wurde die *mcbR*-Gensequenz entfernt. Diese Gensequenz soll zur Regulierung des Schwefel-Stoffwechsels dienen und dabei insbesondere Einfluss auf die Synthese der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein haben. Durch deren Entfernung sollte es somit zu einer Überproduktion dieser beiden Aminosäuren kommen. Wie in der Veröffentlichung [KBH⁺08] beschrieben, zeigte sich dieses Verhalten nicht. Statt dessen konnte man größere Körnchen mit hohem Phosphorgehalt entdecken, in denen sich Adenosintriphosphat (ATP) ansammelte.

3.1 Probenpräparation

Um die Bakterien im TEM zu untersuchen ist es notwendig, diese in ein anderes Material einzubetten. Bei den verwendeten Proben handelt es sich um das Harz Spurr. Oft werden Bakterien mit schweren Elementen, wie z. B. Osmium, Blei, oder Uran kontrastiert, um den Kontrast bei TEM Aufnahmen zu erhöhen. Da diese Elemente jedoch O-Kanten bei Energieverlusten von weniger als 100 eV besitzen, würde dadurch die Bestimmung der Phosphor-Verteilung unnötig erschwert, wenn nicht sogar ganz verhindert. Die Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 zeigen die Energieverlustspektren der drei Kontrastmittel Uranylacetat, Osmiumoxid und Bleicitrat. Die in einer Flüssigkeit gelösten Kontrastmittel wurden auf ein Kupfernetz getropft. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels konnten die Proben im Elektronenmikroskop mit der EELS Methode untersucht werden. Der Energieverlust wurde so gewählt, dass man die Auswirkungen der Kontrastmittel auf den Bereich vor der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante sieht. Entscheidend für die Bestimmung des Untergrundes ist ein Bereich von etwa 60 eV vor der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante. Energieverluste, die aus Übergängen zwischen gebundenen Zuständen resultieren, dürfen somit nicht im Bereich von 70 eV bis 130 eV liegen. Besonders beim Uranylacetat (Abb. 3.1) ist deutlich zu sehen, dass dessen $O_{4,5}$ -Kante in diesem Bereich liegt und auch mit der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante bei 132 eV überlappen würde. Osmium (Abb. 3.2) besitzt eine schwache O_1 -Kante bei 84 eV, die auch deutlich im Spektrum zu sehen ist. Hinzu kommt noch das Signal der $O_{2,3}$ -Kante bei 45 eV, die ihre Maxima bei ca. 50 eV und 75 eV besitzt. An der schlecht durchführbaren Untergrundkorrektur (hier wird die Untergrundberechnung von Gatan Digital MicrographTM benutzt) in Abbildung 3.2 kann man dies erkennen. Der Bereich, der für die Korrektur genutzt wurde, liegt am Anstieg zum zweiten Maximum der $O_{2,3}$ -Kante, wodurch der berechnete Untergrund zu hoch ausfällt. Das in Abbildung 3.3 gezeigte Spektrum von Bleicitrat weist keine deutlich sichtbare Kante auf, jedoch benutze ich die Untergrundkorrektur so, dass die $O_{2,3}$ -Kante bei 86 eV zu erkennen ist. Bei dieser Aufnahme ist schwer abzuschätzen, wie stark die Auswirkungen der $O_{4,5}$ -Kante sind, die bei 19 eV beginnt. Wahrscheinlich lässt sich dadurch die Abweichung des Untergrundes vom Potenzgesetz erklären, da die Intensität der $O_{4,5}$ -Kante um ein Vielfaches höher ist als die der $O_{2,3}$ -Kante.

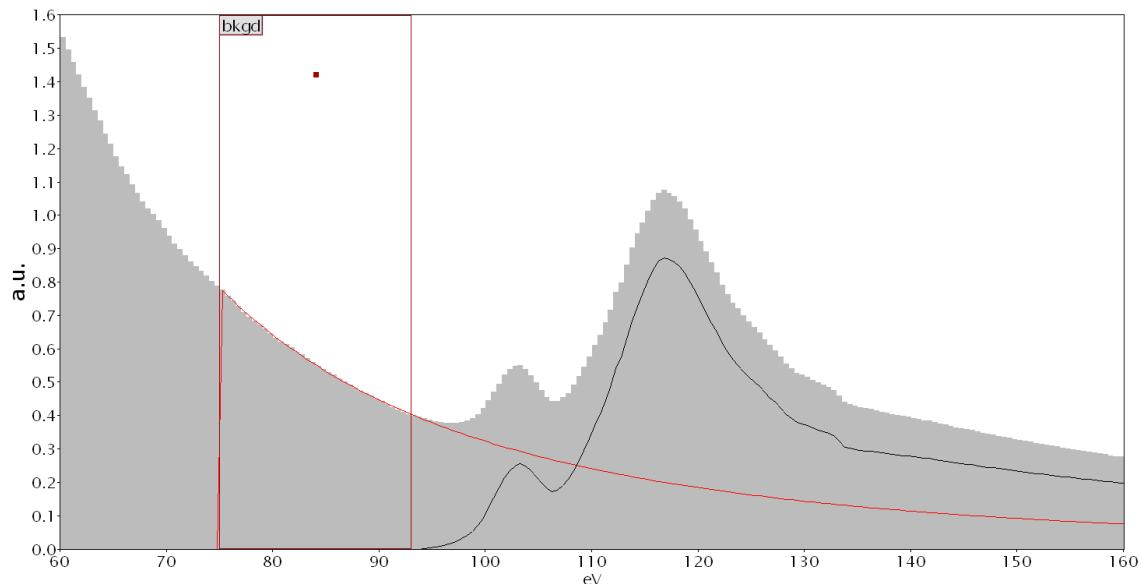


Abbildung 3.1: EELS von Uranylacetat, aufgenommen am Zeiss EM902.

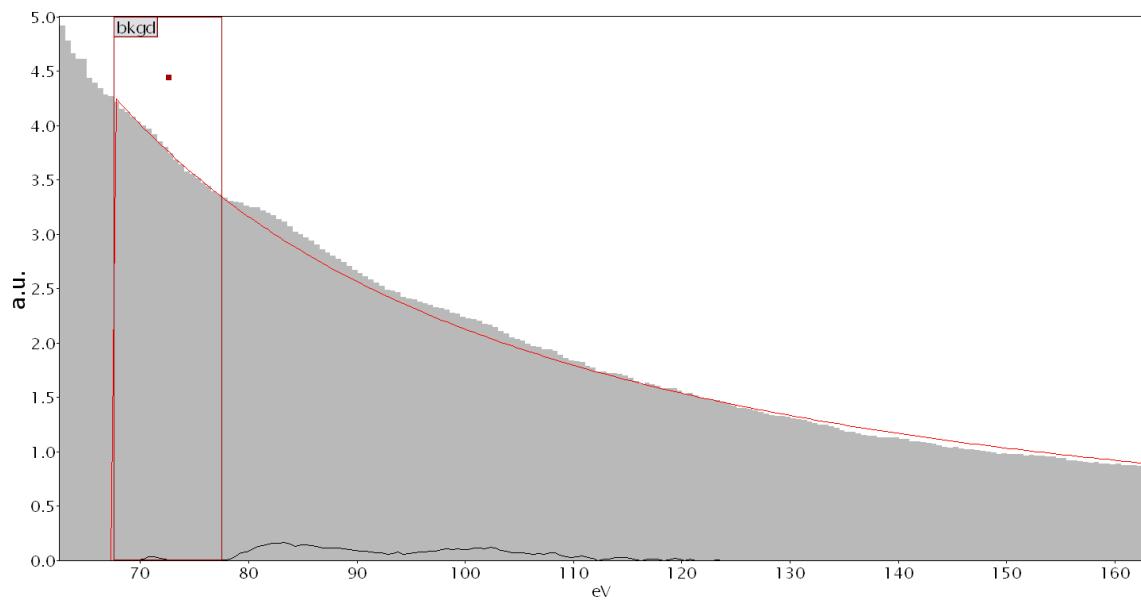


Abbildung 3.2: EELS von Osmiumoxid, aufgenommen am Zeiss EM902. Die gezeigte Untergrundkorrektur soll die Abweichung vom Potenzgesetz verdeutlichen.

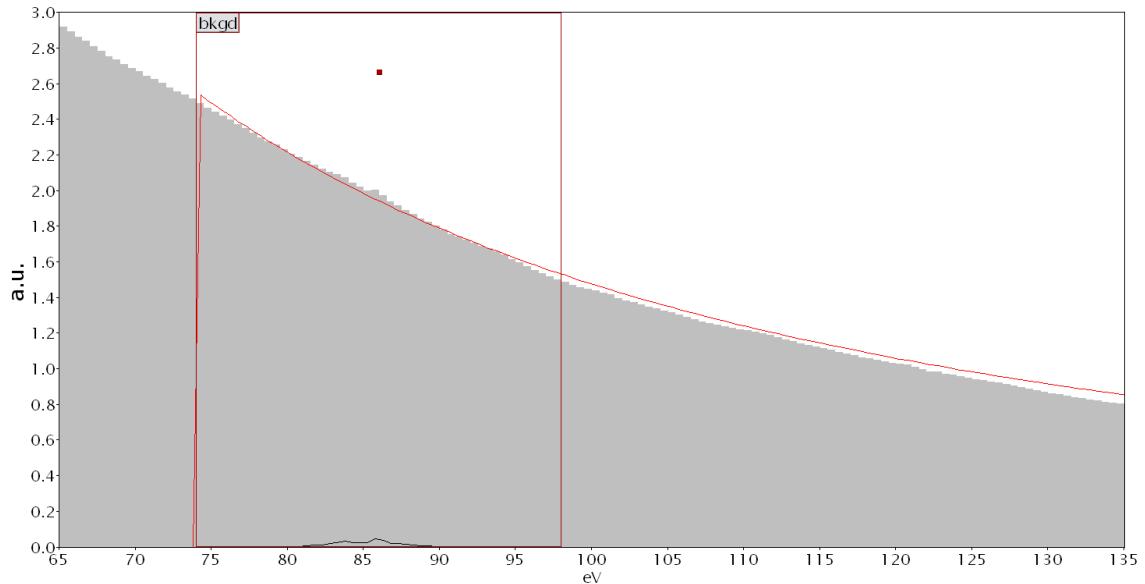


Abbildung 3.3: EELS von Bleicitrat, aufgenommen am Zeiss EM902. Die gezeigte Untergrundkorrektur soll die Abweichung vom Potenzgesetz verdeutlichen.

Da schon anhand der Literaturangaben zu den betreffenden Elementen zu erkennen war, dass deren O-Kanten den zur Untergrundkorrektur benötigten Energieverlustbereich beeinflussen, wurde direkt auf eine Kontrastierung der Proben verzichtet. Von den nicht kontrastierten, in Spurr eingebetteten Bakterien wurden 30 nm und 50 nm dünne Schnitte angefertigt und auf ein Probennetz mit einer Maschenweite von 400 mesh bzw. 1000 mesh gelegt (mesh: Maschen pro Zoll). Das feinere Netz mit 1000 mesh hat den Vorteil, dass die Probe durch die größere Anzahl von Auflageflächen etwas stabiler ist und sich nicht so schnell bei Elektronenbeschuss verformt. Leider verringert sich aber durch die höhere mesh-Zahl die Stabilität des Netzes. Das Netz reißt so leichter, wenn man es aus dem Probenhalter des Zeiss EM902 entfernt. Abbildung 3.4 zeigt ein Foto der Proben. Auf dem Netz mit 400 mesh sind drei Probenschnitte zu sehen. An der Skala erkennt man den Durchmesser des Netzes von 3 mm.

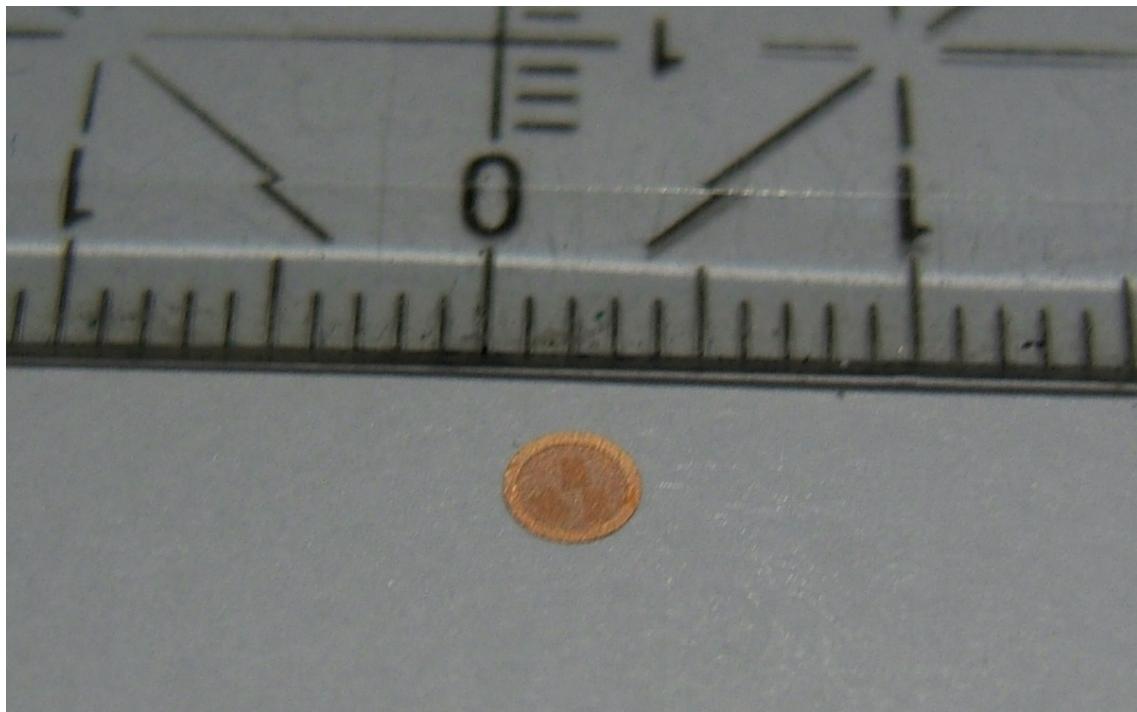


Abbildung 3.4: Foto der Proben auf einem Netz mit 400 mesh.

3.2 Phosphor im *C. glutamicum* $\Delta mcbR$

Ein Molekül, das sich mit einem Phosphor Verteilungsbild lokalisieren lässt, ist das schon erwähnte ATP. Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen [KBH⁺08] an *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ sollten größere Körnchen auffindbar sein, die ein erhöhtes Phosphor-Signal erzeugen. Neben dem Energieträger ATP gibt es noch die weniger energiereichen Moleküle Adenosindiphosphat (ADP) und das Adenosinmonophosphat (AMP). Die drei Moleküle unterscheiden sich dabei durch den Phosphatrest HPO_3 , welcher im Bakterium zur Synthese anderer Moleküle genutzt wird. So sind die Nukleotide der Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus einem Phosphatrest, dem Zucker Desoxyribose und einer von vier organischen Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin aufgebaut. Die DNS besitzt somit genau so viele Phosphoratome wie Basen, beim *C. glutamicum* sind es bis zu 6 Millionen. Weitere Phosphorträger sind die Moleküle Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP), die am Stoffwechsel der Bakterien beteiligt sind. Das NAD besitzt zwei Phosphoratome und das NADP besitzt drei.

Besonders die DNS sollte durch ihre große Anzahl von Phosphoratomen und ihrer kompakten Anordnung gut in Phosphor-Verteilungsbildern zu erkennen sein. Ein Problem stellt aber die geringe Schnittdicke der Proben dar. Liegt die DNS senkrecht zum Schnitt, so ist in der Probe nur ein Querschnitt der DNS vorhanden. Wenn die DNS parallel zum Schnitt liegt, so ist die Wahrscheinlichkeit gering, die Ebene im Schnitt zu erhalten, in der auch die DNS liegt.

Kapitel 4

Durchführung der Messungen

4.1 Energiegefilterte Aufnahmen

Die energiegefilterten Aufnahmen, die in dieser Arbeit besprochen werden, wurden alle mit dem Zeiss EM902 bei einer Beschleunigungsspannung von 80 keV aufgenommen. Die am Zeiss Libra 200 FE aufgenommen energiegefilterten Bilder wurden nicht weiter berücksichtigt, da bei diesem Mikroskop bei Energieverlusten unter 200 eV Störstrahlung auftritt. In Abbildung 4.1 ist zu sehen, dass die Störstrahlung, in der Mitte des Bildes, ein höheres Signal erzeugt. Bei der Störstrahlung handelt es sich wahrscheinlich um Bremsstrahlung der nicht gestreuten Elektronen, die auf die Spaltblende in der Filteraustrittsebene treffen. Bei hoher Helligkeit ist diese Störstrahlung nicht im Bild zu erkennen. Bei geringer Helligkeit, ist die Störstrahlung jedoch deutlich zu sehen. Dies ist leider bei sämtlichen Bildern der Fall, deren Energieverlust hinter der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante liegt. Bei einem Energieverlust von mehr als 200 eV treffen die nicht gestreuten Elektronen die Spaltblende nicht mehr, da sie vom Energiefilter stärker abgelenkt werden.

Der Grund für die geringe Helligkeit dieser Bilder hängt mit der Steigung der Potenzfunktion zusammen, durch die der Untergrund beschrieben wird. Bei geringen Energieverlusten besitzt die Potenzfunktion eine hohe negative Steigung, die mit zunehmenden Energieverlust abnimmt. Da die Phosphor $L_{2,3}$ -Kante mit 132 eV einen, für die Aufnahme von Elementverteilungsbildern sehr geringen Energieverlust besitzt, ist dort die Steigung des Untergrundes auch sehr groß. Das hat zur Folge, dass bei gleicher Belichtungszeit die energiegefilterten Bilder große Unterschiede in der Helligkeit besitzen.

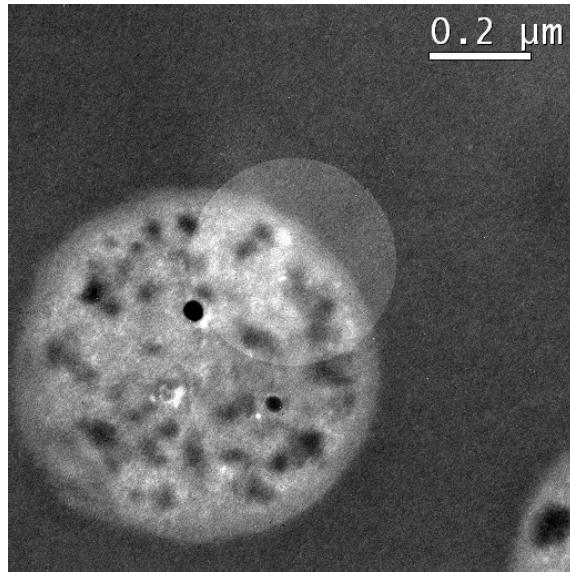


Abbildung 4.1: Energiegefilterte Aufnahme bei 155 eV, aufgenommen am Libra 200 FE.

4.1.1 Berücksichtigung der Kameraeigenschaften

Um den vollen Dynamikbereich der Kamera auszunutzen, wurden die ersten Aufnahmen beim geringsten Energieverlust gemacht, um mit dessen Hilfe die Belichtungszeit zu bestimmen. Die Kamera des EM902 besitzt einen Dynamikumfang von 14 Bit, das entspricht 16384 Graustufen. Die Belichtungszeit wurde so gewählt, dass die hellsten Stellen im Bild nah an diesem Wert liegen, ihn aber gerade nicht erreichen. Die 14 Bit Dynamikumfang können leider nicht vollständig genutzt werden, da temperaturbedingt ein Untergrundsignal aufgenommen wird. Auch bei einer Temperatur von fast -30°C , auf die der Kamerachip gekühlt wird, kommt es noch zu einem Untergrundsignal mit einer Helligkeit zwischen 1045 bei 0,1 s und 2000 bei 60 s Belichtungszeit. Dieses Signal wird automatisch von Gatan Digital MicrographTM, das zur Aufnahme der Bilder benutzt wird, abgezogen. Dazu wird vor der eigentlichen Aufnahme ein Dunkelstrombild bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen, welches dann vom aufgenommenen Bild subtrahiert wird. Außerdem führt Digital MicrographTM noch eine weitere Korrektur durch. Bei gleichmäßiger Ausleuchtung des Kamerachips erhält man nämlich ein ungleichmäßiges Signal. Neben dem Kamerachip selbst tragen auch die Phosphorschicht und die Glasfaserbündel zwischen Szintillator und Kamerachip dazu bei. Man nimmt deshalb ein sogenanntes Gainreferenzbild auf, welches die Helligkeitsunterschiede ausgleichen soll. Aufgenommen wird

dabei die Helligkeit bei gleichmäßiger Ausleuchtung, die dann so umgerechnet wird, dass jeder Pixel den Wert 'Helligkeit des Pixels/Mittelwert' besitzt. Für die endgültige Korrektur wird vom aufgenommenen Bild das Dunkelstrombild subtrahiert und anschließend wird durch das Gainreferenzbild geteilt. Da eine Multiplikation einfacher durchzuführen ist als eine Division, wird der Kehrwert des Gainreferenzbildes gespeichert.

Letztendlich kommt man so auf eine maximale Helligkeit, die zwischen 13000 und 14000 liegt, abhängig von der verwendeten Belichtungszeit. Die mittlere Helligkeit des Bildes liegt dann bei 8000 bis 10000, da es einzelne Stellen in der Probe gibt, die stärker inelastisch streuen und dadurch heller sind. Diese Stellen geben dann die maximal mögliche Belichtungszeit vor.

Wichtig wird diese Vorgehensweise, wenn man das Bild mit dem höchsten Energieverlust betrachtet, das sich hinter der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante befindet. Durch die starke Steigung des Untergrundes nimmt die Helligkeit um einen Faktor zwischen 10 und 16 ab. Man kann so eine mittlere Helligkeit von 500 bis 1000 erreichen. Ziel ist es, durch eine höhere Zählrate einen geringeren relativen Fehler zu erhalten. Da die Messwerte poissonverteilt sind, gilt für den relativen Fehler $u_{\text{rel}} = \frac{1}{\sqrt{N}}$. Durch den geringeren relativen Fehler verbessert sich das SRV und somit auch die Möglichkeit, Phosphor nachzuweisen.

4.1.2 Unterschiedliche Belichtungszeiten der energiegefilterten Bilder

Um den relativen Fehler der energiegefilterten Aufnahmen mit hohem Energieverlust zu verringern, wurden die entsprechenden Bilder mit längeren Belichtungszeiten aufgenommen. Abbildung 4.2 zeigt, dass die Zählrate linear mit der Belichtungszeit ansteigt. Es ist möglich ein Bild, welches mit 8 Sekunden Belichtungszeit aufgenommen wurde, durch 2 zu dividieren, um ein Bild zu erhalten, welches einer Aufnahme mit 4 Sekunden Belichtungszeit entspricht. Bei der Auswertung der mit dieser Methode aufgenommenen Bilder, konnte jedoch keine Verbesserung der Elementverteilungsbilder oder des SRV im Gegensatz zu den Aufnahmen festgestellt werden, die alle mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen wurden. Durch die längere Belichtungszeit kommen auch störende Effekte hinzu: Die Probendrift, die mit längerer Belichtungszeit größer wird und die Strahlenbelastung, mit den daraus re-

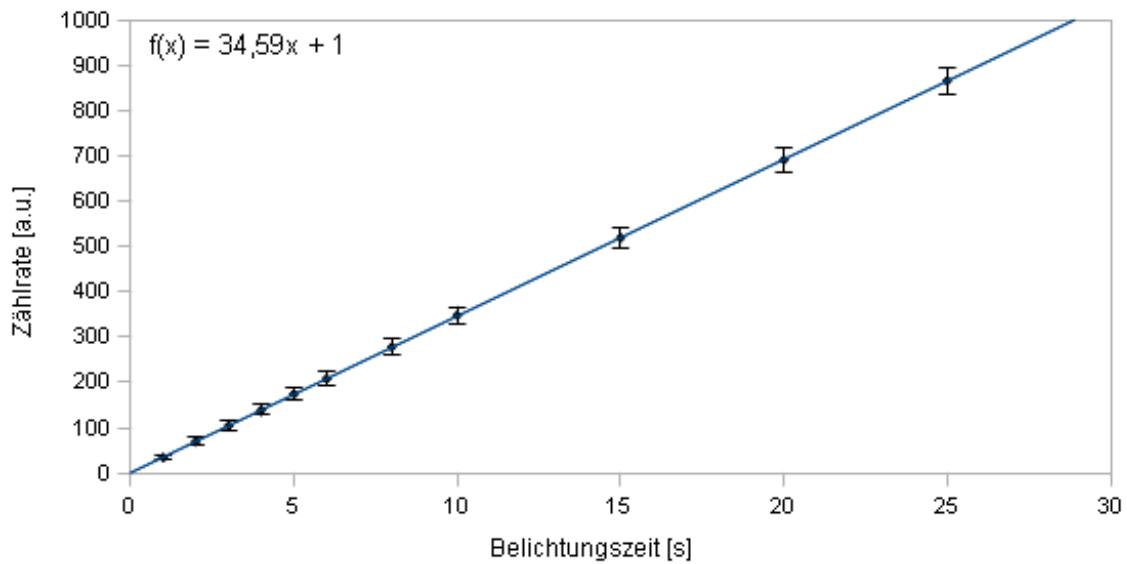


Abbildung 4.2: Die gleiche Probenstelle wurde mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufgenommen. Die Zählrate entspricht dem Mittelwert des jeweiligen Bildes.

sultierenden Schäden an der Probe. Bei einer Erhöhung der Belichtungszeit von 4 auf 8 Sekunden, wird die Probe nicht nur 4 Sekunden länger bestrahlt. Weil auch ein neues Dunkelstrombild aufgenommen werden muss, steigt die Zeit, die die Probe bestrahlt wird, um 12 Sekunden an. Da die Nachteile überwiegen, wurden alle Bilder einer EFTEM-Serie immer mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen.

4.1.3 Probendrift

Möchte man, wie im Kapitel 4.1.1 beschrieben, den vollen Dynamikumfang des Kamerachips ausnutzen, so kann es durchaus möglich sein, dass man ein einzelnes Bild 30 Sekunden und auch länger belichten muss. Während dieser Zeit kommt es zu einer Verschiebung des Probenhalters. Im Gegensatz zu der Drift zwischen zwei Bildern kann man die Drift innerhalb eines Bildes nicht einfach korrigieren. Theoretisch ist dies zwar möglich, jedoch muss man dazu die Verschiebung exakt kennen, was nicht der Fall ist. Als Resultat erhält man ein unscharfes Bild, das weniger Details erkennen lässt. Eine exakte Aussage über die Stärke der Drift, oder über die maximale Belichtungszeit, bei der man noch gute Ergebnisse erhält, lässt sich leider nicht treffen. Dazu schwankt die Drift des EM902 zu stark. Bei mehr als 30 Sekunden Belichtungszeit waren die Bilder meist nicht für eine weitere Verarbeitung

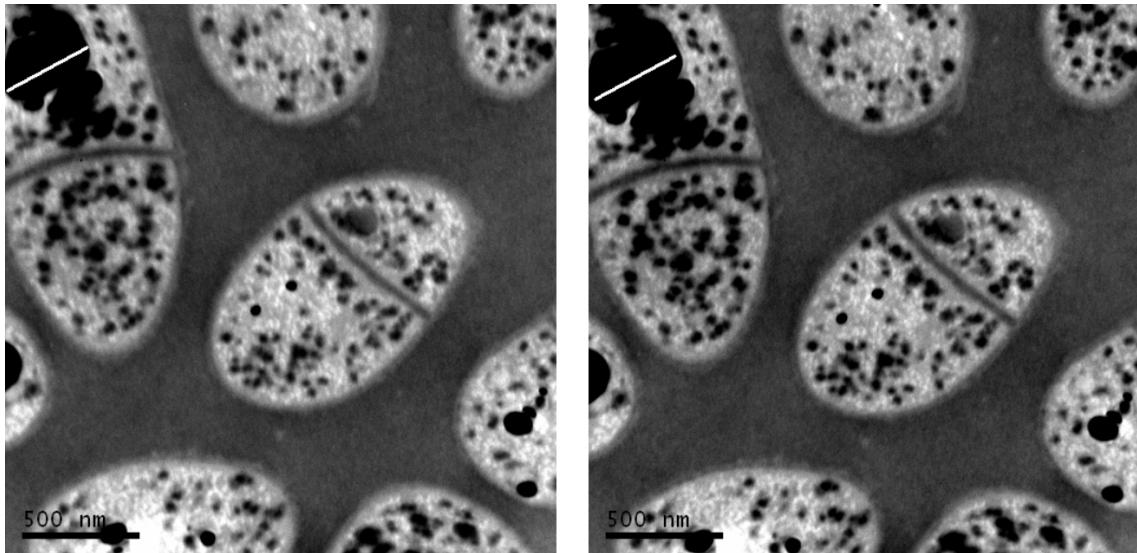


Abbildung 4.3: Energiegefilterte Aufnahmen bei 155 eV. Zwischen den Aufnahmen liegen ca. 5 Minuten. Die weiße Linie ist in beiden Bildern gleich lang.

geeignet. Bei Vergrößerungen von mehr als 10000-fach waren die Bilder auch schon bei kürzeren Belichtungszeiten sehr unscharf, da bei gleicher Drift in nm/s die mit dem Kamerachip registrierte Drift (pixel/s) sich mit steigender Vergrößerung erhöht.

Ein weiterer Effekt, die Verformung der Probe durch Strahlenschäden, hat ähnliche Auswirkungen wie die Drift. Besonders an Löchern, die in fast allen Bakterien der Probe zu finden sind, tritt leicht eine Verformung auf. Abbildung 4.3 zeigt dies am Beispiel von zwei Aufnahmen, die beide bei einem Energieverlust von 155 eV aufgenommen wurden. Oben links, in beiden Bildern, sieht man deutlich, dass sich das Loch nach ca. 5 Minuten Bestrahlung weiter vergrößert hat. Auch an den beiden Bakterien unten rechts, die nur halb zu sehen sind, erkennt man eine Verformung. Um die Schäden zu reduzieren, kann man die Strahlstromstärke reduzieren. Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül in kurzer Zeit von mehreren Elektronen getroffen wird und es kann eine zerstörte Bindung, oder ein Loch eines herausgeschlagenen Atoms schließen. Die Belichtungszeit ist durch die Drift der Probe limitiert, aber gleichzeitig muss man die Strahlstromstärke so weit reduzieren, dass es während der Aufnahmen zu keinen sichtbaren Schäden an der Probe kommt. Insgesamt bleibt Strahlungsbelastung der Probe gleich, wenn man die Strahlstromstärke halbiert, dafür aber die Belichtungszeit verdoppelt. Es verringert sich jedoch

die Verformung der Probe. Es gilt einen Kompromiss zu finden, bei dem die Belichtungszeit möglichst kurz ist, aber die Probe sich noch nicht sichtbar verformt. Auf die Phosphor-Verteilung werden die Strahlenschäden auch eine Auswirkung haben. Ob diese das Ergebnis der Elementverteilungsbilder beeinflussen, oder ob man sie vernachlässigen kann, darauf soll im Folgenden Abschnitt (4.1.4) und in Kapitel 6.2 genauer eingegangen werden.

An Abbildung 4.4 lässt sich sehr gut erkennen, dass Spurr wesentlich resistenter gegen Strahlenschäden ist als die Bakterien. Die Bakterien wurden durch die lange Bestrahlung vollständig zerstört, das Einbettmaterial ist aber weiterhin intakt. Strahlungsresistenz sollte auch eine wichtige Eigenschaft des Einbettmaterials sein.

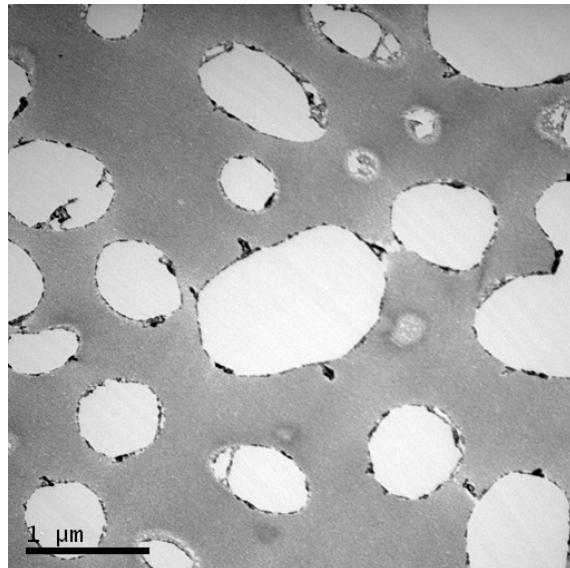


Abbildung 4.4: *C. glutamicum*, nachdem die Probe ca. 2 Stunden durchgehend mit Elektronen bestrahlt wurde.

4.1.4 Reihenfolge der Bildaufnahme

Auch die Reihenfolge, in der die energiegefilterten Bilder aufgenommen werden, hat einen Einfluss auf die Elementverteilungsbilder. Einerseits spielen die Strahlenschäden eine Rolle, aber auch die Kamera wird unterschiedlich beansprucht.

Bei der Aufnahme der Bilder ist zuerst mit dem Bild, welches dem höchsten Energieverlust besitzt, begonnen worden. Mit absteigendem Energieverlust wurden dann die weiteren Bilder aufgenommen. Anschließend wurde der Energieverlust wieder

schrittweise erhöht und es wurden Bilder bei den gleichen Energieverlusten aufgenommen. Da zwei Bilder mit gleichem Energieverlust aufgenommen wurden, konnte man mittlere Helligkeit und die Standardabweichung der Bilder mit dem selben Energieverlust vergleichen. Auffällig war dabei, dass die Helligkeit der Bilder, die vom hohen zum niedrigen Energieverlust aufgenommen wurden, fast immer höher war. Bei der Standardabweichung verhält es sich allerdings genau umgekehrt. Der Grund für diese Beobachtung ist der Kamerachip des EM902. Wenn zuerst die Bilder mit hoher Helligkeit aufgenommen werden, so fließen beim Auslesen höhere Ströme im Kamerachip und erwärmen diesen. Das wirkt sich dann auf das nächste Bild aus, das somit ein stärkeres thermisches Rauschen besitzt. Wird mit der Aufnahme der Bilder bei hohem Energieverlust begonnen, so ist die Helligkeit gering und weniger Strom fließt beim Auslesen des Kamerachips. Außerdem besitzt das nächste Bild eine höhere Helligkeit und das thermische Rauschen hat so auch einen geringeren Einfluss. Am Libra 200 FE konnte dies nicht beobachtet werden. Wie man es eigentlich erwartet, wies am Libra 200 FE das Bild mit der höheren Helligkeit auch die höhere Standardabweichung auf. Der Kamerachip ist jedoch ein anderes Modell und dieser wird nicht so stark gekühlt (fast -30°C beim EM902), sondern bei konstant 25°C betrieben. Dadurch sind die Auswirkungen auf folgende Aufnahmen bei dem moderneren Kamerachip des Libra nicht so groß wie bei der Kamera des EM902. Bei beiden Mikroskopen lässt sich beobachten, dass die Helligkeit bei den Bildern abnimmt, welche später aufgenommen wurden. Diese Verringerung der Helligkeit, hängt mit Strahlenschäden an der Probe zusammen. In [Koo04, S. 37ff] ist detailliert beschrieben, wie sich die unterschiedlichen Aufnahmereihenfolgen auf die Elementverteilungsbilder auswirken. So erhält man das geringste Elementsignal, wenn erst die Vorkantenfenster von hohem zu niedrigem Energieverlust aufgenommen werden und anschließend das Aufkantenbild. Beginnt man jedoch mit dem Aufkantenbild und nimmt die Vorkantenbilder, beginnend mit dem höchsten Energieverlust, anschließend auf, so erhält man das höchste Elementsignal. Entscheidend ist bei dieser Überlegung, dass der Massenverlust Anfangs am stärksten ist und mit der Zeit sich abschwächt. Dadurch kommt es zu einem großen Unterschied bei dem Elementsignal der beiden Aufnahmereihenfolgen. Nimmt man das Aufkantenbild zuerst auf, so überschätzt man das Signal. Wenn das Aufkantenbild zuletzt aufgenommen wird, dann unterschätzt man das Elementsignal. In Kapitel 6.2 sollen die Auswirkungen an einem Beispiel gezeigt werden. Anzumerken ist hier schon, dass die Probenstelle

schon vor der Aufnahme der eigentlichen energiegefilterten Bilder bestrahlt wurde. Die maximale mögliche Belichtungszeit wurde immer an der zu untersuchenden Probenstelle bestimmt, um auch den Dynamikumfang des Kamerachips ganz auszunutzen. Dadurch fällt der Unterschied zwischen den Aufnahmereihenfolgen etwas geringer aus.

4.2 Aufnahme von Elektronen-Energieverlustspektren

Die ersten Spektren, wozu auch die der Kontrastmittel (siehe Kapitel 3.1) gehören, wurden noch am EM902 aufgenommen. Um die genaue Position der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante herauszufinden (siehe Kapitel 6.1), wurden weitere Spektren mit dem EM902 aufgezeichnet. Gerade Spektren bei geringem Energieverlust bereiten dem Spektrometer des EM902 aber Probleme. Aufgrund des starken Abfallen des Signals mit steigendem Energieverlust erreicht man Zählraten, die so gering sind, dass der Dunkelstrom des Detektors mehr als 50% davon ausmacht. Das schwache Signal des Phosphors ist dann in dem Rauschen nicht mehr zu erkennen.

Am Libra 200 FE gibt es solche Schwierigkeiten nicht. Hier entspricht der Bereich, in dem die Zählrate liegen darf, dem Dynamikumfang der Kamera. Dieser liegt bei 16 Bit, was 65536 Graustufen entspricht. Ein Faktor 20 zwischen der niedrigsten und der höchsten Zählrate stellt so kein Problem dar. Wie man später in der Auswertung (Kapitel 6.3) sieht, kann man die einzelnen Maxima der L-Kanten von Phosphor und Silizium sehr gut auflösen. Dazu bedarf es nicht einmal einer besonderen Vorgehensweise, eine gute vorherige Justage der Blenden und des Fokus liefert gute und reproduzierbare Ergebnisse. Bei der Aufnahme eines Spektrums wurde eine große Anzahl von Spektren aufaddiert. Eine entsprechende Funktion dazu ist bereits in Gatan Digital MicrographTM enthalten.

Kapitel 5

EFTEM-Plug-in für ImageJ

Zur Berechnung der Elementverteilungsbilder wurde in der Programmiersprache Java ein Programm geschrieben, welches die nötigen Berechnungen ausführt. Dieses ist als ein Plug-in für die OpenSource Bildbearbeitungssoftware ImageJ realisiert. Dadurch konnte auf die in ImageJ schon vorhandenen Funktionen zurückgreifen werden. Das Öffnen und Speichern der Bilder, sowie das Anzeigen auf dem Bildschirm wird durch ImageJ erledigt, so dass diese Funktionen nicht selbst programmieren werden mussten. Ziel des Plug-ins ist eine einfache Bedienung über eine grafische Benutzeroberfläche. Außerdem sollen die Berechnungen auch aktuelle Prozessoren mit mehreren Kernen ausnutzen. Um etwas über die Qualität der berechneten Elementverteilungsbilder aussagen zu können, gibt es diverse Diagnosefunktionen die implementiert worden sind. Auch eine einfach zu bedienende Driftkorrektur ist Bestandteil des Plug-ins.

5.1 ImageJ

ImageJ ist eine in Java geschriebene Bildbearbeitungssoftware, die ohne Anpassungen auf allen gängigen Betriebssystemen ausgeführt werden kann. Der Quelltext der Software ist frei verfügbar und darf auch beliebig abgeändert werden. Die Software wird von Mitarbeitern der National Institutes of Health, einer Behörde des United States Department of Health and Human Services, entwickelt und zielt vom Funktionsumfang auf medizinische, sowie andere naturwissenschaftliche Anwendungen ab. Hunderte von verfügbaren Plug-ins dienen zur Erweiterung des Funktionsumfangs und auch das Schreiben eigener Plug-ins wird durch im Internet verfügbare

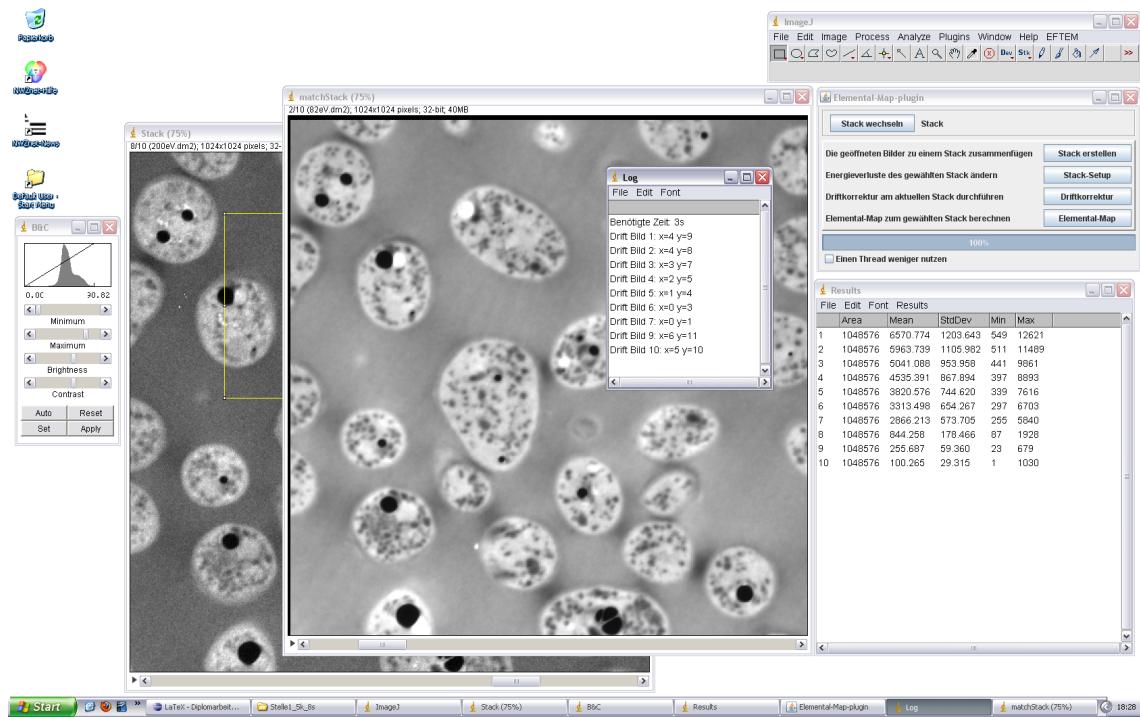


Abbildung 5.1: ImageJ nach der Benutzung der Driftkorrektur. Zu sehen sind zwei Stacks bestehend aus jeweils 10 Bildern.

Anleitungen erleichtert. Außerdem besitzt ImageJ eine eigene Skriptsprache, die es ermöglicht, Arbeitsabläufe zu automatisieren. Von dieser Funktion wurde jedoch noch kein Gebrauch gemacht.

Interessant ist ImageJ gerade deshalb, weil es fast alle verbreiteten Bilddateien öffnen kann. Dazu gehört auch die Formate dm2 und dm3, welche Gatan Digital Micrograph™ benutzt. Die am Zeiss Libra 200 FE aufgenommenen Bilder sind im dm3-Format gespeichert und können direkt mit ImageJ geöffnet werden. Das nötige Plug-in ist schon enthalten. Um die Bilder des Zeiss EM 902 zu öffnen, welche im dm2-Format vorliegen, benötigt man noch ein zusätzliches Plug-in. Neben dem Öffnen und Speichern der Bilder, ist ImageJ auch dafür genutzt worden die Bilder anzuzeigen. Da die Bilder mehr als 256 Graustufen besitzen, die ein Computermonitor darstellen kann, bietet ImageJ die Möglichkeit, den angezeigten Helligkeitsbereich festzulegen. Dabei wird nicht das Bild selbst verändert, sondern nur die Darstellung. Außerdem wird die Möglichkeit genutzt, mit der Maus einen rechteckigen Bereich des Bildes zu markieren, eine sogenannte „ROI“ (region of interest). Es ist dann möglich, im Plug-in, die Koordinaten der oberen linken Ecke und die Seitenlängen abzufragen. Dadurch lässt sich der zur Driftkorrektur benutzte Bereich auf das gewählte Rechteck einschränken. Anstelle der Eingabe von Koordinaten in Eingabefelder oder eine Konfigurationsdatei wird direkt mit der grafischen Oberfläche gearbeitet.

5.2 Hilfsfunktion des EFTEM-Plug-ins

Das Programm dient hauptsächlich dem Zweck, aus einer Reihe von energiegefilterten Aufnahmen, Elementverteilungsbilder zu berechnen. Daneben gibt es jedoch noch die Möglichkeit, die Drift der Bilder zueinander zu korrigieren. Dies ist in den meisten Fällen nötig, um optimale Elementverteilungsbilder zu erhalten. Hinzu kommen noch Funktionen um einen Datenwürfel zu erstellen und diesen zu verwalten. Die am Elektronenmikroskop gemachten Aufnahmen liegen zu Beginn als Einzelbilder vor. Nach dem Öffnen dieser mit ImageJ reicht ein Knopfdruck aus, um daraus einen Stack zu erstellen, der dem Datenwürfel mit dem Energieverlust als z-Koordinate entspricht. Der Energieverlust wird dabei direkt aus den Bezeichnungen der Bilder ausgelesen. Man kann aber auch noch nachträglich den Energieverlust eingeben und ändern, die Bezeichnungen der Bilder werden dann entsprechend angepasst.

5.2.1 Driftkorrektur mittels gewichteter Kreuzkorrelation

Für die Driftkorrektur der Bilder lässt sich gut die Kreuzkorrelation benutzen. Vergleicht man einen Referenzbild (Koordinaten i, j) mit einem Zielbild (Koordinaten r, s), so erhält man für jede Position des Referenzbildes im Zielbild den Korrelationskoeffizienten

$$C(r, s) = \sum_{(i,j) \in R} I(r + i, s + j) \cdot R(i, j). \quad (5.1)$$

Die Kreuzkorrelation kann man auch als eine Multiplikation im Fourierraum durchführen, wodurch die Berechnung schneller geht. Da die energiegefilterten Bilder jedoch mit steigendem Energieverlust an Helligkeit verlieren, ist die normierte Kreuzkorrelation besser geeignet. Beim Vergleich wird dabei die Abweichung vom Mittelwert des betrachteten Bildausschnittes benutzt. So liegt der Korrelationskoeffizient immer zwischen 0 und 1 und ist ein standardisiertes Maß für die Übereinstimmung der beiden Bildausschnitte. Der sogenannte lokale Kreuzkorrelationskoeffizient ergibt sich durch

$$C_L(r, s) = \frac{\sum_{(i,j) \in R} (I(r + i, s + j) \cdot R(i, j)) - K \cdot \bar{I}(r, s) \cdot \bar{R}}{\left[\sum_{(i,j) \in R} (I(r + i, s + j))^2 - K \cdot (\bar{I}(r, s))^2 \right]^{\frac{1}{2}} \cdot \sigma_R}. \quad (5.2)$$

K ist dabei die Anzahl der Pixel im untersuchten Bildabschnitt. \bar{R} ist der Mittelwert des Referenzbildes und $\bar{I}(r, s)$ ist der Mittelwert des Bildausschnittes, der gerade mit dem Referenzbild verglichen wird. σ_R ist die Varianz des Referenzbildes und wird berechnet durch:

$$\sigma_R^2 = \sum_{(i,j) \in R} (R(i, j))^2 - K \cdot \bar{R}^2. \quad (5.3)$$

Da die normierte Kreuzkorrelation wesentlich komplexer ist, lässt sie sich nicht mehr im Fourrierraum berechnen, sondern man muss Gleichung (5.2) direkt implementieren. Die grundlegende Implementierung stammt aus [BB06, S. 420ff] und wurde an die abweichende Ausgangssituation angepasst. So müssen mehr als zwei Bilder miteinander verglichen werden und außerdem kann man den Bildbereich, der verglichen werden soll, mit der Maus markieren. Hinzu kommt noch die Anpassung der Kreuzkorrelation, so dass sie auch mehrere Prozessorkerne nutzt. Der in [BB06, S. 420ff] gegebene Programmcode macht deshalb nur einen kleinen Teil der in dem Programm enthaltenen Driftkorrektur aus.

Ein weiteres Problem bereitet der Helligkeitsunterschied der Bilder beim Bewerten des Ergebnisses der Driftkorrektur. Alle Bilder eines Stacks werden mit dem gleichen Helligkeitsbereich auf dem Monitor dargestellt. Wird ein Bild optimal angezeigt und man wechselt zum nächsten, so ist dieses zu hell oder zu dunkel. Dadurch hat man Schwierigkeiten, zu entscheiden, ob man mit dem Ergebnis der Driftkorrektur zufrieden sein kann. Um die Beurteilung zu erleichtern, wird nicht nur der driftkorrigierte Stack angezeigt, sondern zusätzlich ein weiterer Stack, bei dem alle Bilder auf den gleichen Mittelwert normiert sind. Dadurch bleibt beim Wechseln zwischen den Bildern die Helligkeit gleich und es ist wesentlich einfacher zu sehen, ob die Driftkorrektur gut funktioniert hat.

5.3 Methode der maximalen Ähnlichkeit

Um die Potenzfunktion zu bestimmen, die den Untergrund des EEL-Spektrums beschreibt, wird meist die Methode der kleinsten Quadrate genutzt. Oft nutzt man dabei zusätzlich aus, dass Potenzfunktionen in doppelt logarithmischer Darstellung Geraden sind. Die Methode der kleinsten Quadrate dient dann dazu, eine Ausgleichsgerade zu den Messwerten zu bestimmen, die eine möglichst geringe Abweichung von den Messwerten besitzt. Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt der Geraden lassen sich die Parameter a und r der Potenzfunktion ($u(E) = aE^{-r}$) bestimmen. Die Methode der kleinsten Quadrate gehört damit zu den parametrischen Schätzverfahren. Meist werden die Fehlerquadrate noch gewichtet, um den geringeren relativen Fehler von Messwerten mit hoher Zählrate zu berücksichtigen. Als Alternative zur Methode der kleinsten Quadrate bietet sich die Methode der maximalen Ähnlichkeit an, im Folgenden meist mit MLE (Maximum Likelihood Estimation) abgekürzt. Auch die MLE ist ein parametrisches Schätzverfahren. Dabei wird eine Wahrscheinlichkeitsfunktion bestimmt, die von den Parametern der Potenzfunktion abhängt. Diese Wahrscheinlichkeitsfunktion wird als das Produkt der Wahrscheinlichkeitsfunktionen eines jeden Messwert ausgedrückt. Dabei handelt es sich um Poissonverteilungen

$$p(\vec{c}) = \prod_{i=1}^n \frac{e^{-\lambda_i} \cdot \lambda_i^{c_i}}{c_i!}. \quad (5.4)$$

c_i ist eine natürliche Zahl, deren Wahrscheinlichkeit bestimmt wird. In diesem Fall handelt es sich um eine Zählrate und die Funktion drückt die Wahrscheinlichkeit aus, diese zu messen. $\lambda_i(a, r)_i$ entspricht dem Erwartungswert der Poissonverteilung. Um jetzt die Potenzfunktion zu bestimmen, die am meisten Ähnlichkeit zu den Messwerten hat, gibt man jedoch die Zählrate als festen Wert vor und variiert den Erwartungswert.

Gleichung (5.4) lässt sich durch Logarithmieren in eine Summe überführen, was auf die Position der Maxima keinen Einfluss hat. So wird aus dem Produkt die Summe

$$L(\vec{c}|a, r) = \ln(p(\vec{c}|a, r)) = \sum_{i=1}^n [c_i \cdot \ln(\lambda_i(a, r)) - \lambda_i(a, r) - \ln(c_i!)] \quad (5.5)$$

$$\text{mit } \lambda_i = \lambda_i(a, r) = aE_i^{-r}. \quad (5.6)$$

In diese Funktion wird nun Gleichung (5.6) eingesetzt:

$$L(\vec{c}|a, r) = \sum_{i=1}^n [c_i \cdot \ln(a) - c_i \cdot r \cdot \ln(E_i) - aE_i^{-r} - \ln(c_i!)]. \quad (5.7)$$

Nun gilt es, das Maximum der logarithmierten Likelihood-Funktion zu finden. Vorher sollten jedoch zwei Substitutionen durchgeführt werden. Diese sind $\alpha = \ln(a)$ und $x_i = \ln(E_i)$. Daraus folgt für die Potenzfunktion

$$\lambda_i = e^{\alpha - rx_i}. \quad (5.8)$$

Und aus Gleichung (5.7) wird

$$L(\vec{c}|a, r) = \sum_{i=1}^n [c_i \cdot \alpha - c_i \cdot r \cdot x_i - e^{\alpha - rx_i} - \ln(c_i!)]. \quad (5.9)$$

Die Ableitungen nach α und r sehen wie folgt aus:

$$\frac{\delta L(\vec{c}|\alpha, r)}{\delta \alpha} = \sum_{i=1}^n [c_i - e^{\alpha - rx_i}] = 0, \quad (5.10)$$

$$\frac{\delta L(\vec{c}|\alpha, r)}{\delta r} = \sum_{i=1}^n [-x_i c_i + x_i e^{\alpha - rx_i}] = \sum_{i=1}^n -x_i \cdot [c_i - e^{\alpha - rx_i}] = 0. \quad (5.11)$$

Nach dem Umstellen von Gleichung (5.10) nach α erhält man

$$\alpha = \ln \left(\frac{\sum c_i}{\sum e^{-rx_i}} \right). \quad (5.12)$$

Durch Umstellen von Gleichung (5.11) in Gleichung (5.13) und dem Einsetzen von α erhält man mit (5.15) eine Gleichung, die sich numerisch lösen lässt.

$$e^\alpha \sum x_i e^{-rx_i} - \sum x_i c_i = 0 \quad (5.13)$$

$$\Rightarrow \frac{\sum c_i}{\sum e^{-rx_i}} \sum x_i e^{-rx_i} - \sum x_i c_i = 0 \quad (5.14)$$

$$\Rightarrow \frac{\sum x_i e^{-rx_i}}{\sum e^{-rx_i}} - \frac{\sum x_i c_i}{\sum c_i} = 0. \quad (5.15)$$

Um aus dieser Gleichung r zu bestimmen, bietet sich das Newton-Verfahren an. Die Voraussetzung - stetige Differenzierbarkeit - ist wegen den Exponentialfunktionen gegeben. Mit dem Newton-Verfahren lässt sich die Nullstelle einer Funktion näherungsweise bestimmen. Dabei wählt man einen Wert von r , von dem man glaubt, dass dieser nah an der Nullstelle liegt und bestimmt an dieser Stelle die Tangente. Anschließend berechnet man die Nullstelle der Tangente, wodurch man eine verbesserte Näherung der gesuchten Nullstelle erhält

$$t(r_{n+1}) = f(r_n) + f'(r_n)(r_{n+1} - r_n) = 0 \quad (5.16)$$

$$\Rightarrow r_{n+1} = r_n - \frac{f(r_n)}{f'(r_n)}. \quad (5.17)$$

Anschließend wird die Iteration (5.17) so oft wiederholt, bis $|r_{n+1} - r_n|$ einen vorher definierten Grenzwert unterschreitet.

Implementiert wurde diese Iteration als eine do-while-Schleife. Der erste Durchlauf wird somit immer durchgeführt; vor jedem weiteren Durchlauf wird überprüft ob $|r_{n+1} - r_n|$ schon kleiner als der vorgegebene Grenzwert ist. Alle weiteren Teile der Berechnung sind direkt in den Programmcode überführt worden, dies gilt auch für die Ableitung $f'(r_n)$, die vorher analytisch berechnet wurde.

Auch diese Berechnung wird automatisch auf alle verfügbaren Prozessorkerne verteilt. Bei einem Computer mit 4 Kernen verringert sich die Rechenzeit deutlich. Auch zukünftige Prozessoren können von der Parallelisierung profitieren, da die maximale Anzahl von unterstützten Prozessorkernen der Anzahl der Bildzeilen entspricht. Es ist deshalb möglich mehrere Berechnungen parallel auszuführen, da der Untergrund für jeden Pixel einzeln bestimmt werden muss. In die einzelne Berechnung selbst fließt keine Anpassung ein, um diese parallelisiert ausführen zu können. Ein Spektrum würde somit nicht von der Parallelisierung profitieren.

5.3.1 Berechnung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses

Um die Qualität der Elementverteilungsbilder zu beurteilen spielt das Signal-zu-Rausch Verhältnis (SRV) eine entscheidende Rolle. Dabei bezieht man sich häufig auf das Rose-Kriterium, welches besagt, dass man Objekte sicher in einem verrauschten Bild erkennt, wenn das SRV größer als 5 ist. Bei einem SRV kleiner als 5 ist es möglich, ein chemisches Element nachzuweisen, wenn man von dessen Existenz in der Probe weiß.

Um das SRV konkret zu berechnen gilt

$$SRV = \frac{I_S}{\sqrt{\text{var}\{I_P\} + \text{var}\{I_U\}}} \quad \left(\frac{\text{Elementsignal}}{\text{Rauschen}} \right). \quad (5.18)$$

Das Rauschen setzt sich dabei aus zwei Größen zusammen: Dem Rauschen des gemessenen Zählrate des Fensters hinter der Kante (I_P) und der Varianz des berechneten Untergrundes (I_U). Da es sich um eine Poisson-Verteilung handelt, ist die Varianz von I_P gleich der gemessenen Zählrate ($\text{var}\{I_P\} = I_P$). Die Varianz der Berechnung des Untergrundes ($\text{var}\{I_U\} = \sigma^2$) lässt sich bestimmen durch

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= \left(\frac{\delta I_U}{\delta a} \right)^2 \cdot \text{var}(a) + \left(\frac{\delta I_U}{\delta r} \right)^2 \cdot \text{var}(r) + \left(\frac{\delta I_U}{\delta a} \right) \left(\frac{\delta I_U}{\delta r} \right) \cdot \text{covar}(a, r) \quad (5.19) \\ &= e^{2(a-rx_P)} \cdot m_{\lambda 2} \cdot \text{var}(r) + x_P^2 e^{2(a-rx_P)} \cdot \text{var}(r) - x_P e^{2(a-rx_P)} \cdot m_{\lambda 1} \cdot \text{var}(r) \quad (5.20) \end{aligned}$$

mit

$$\text{var}(r) = \frac{1}{\sum \lambda_i (x_i - m_{\lambda 1})^2} \text{ und} \quad (5.21)$$

$$m_{\lambda k} = \frac{\sum \lambda_i x_i^k}{\sum \lambda_i}. \quad (5.22)$$

Diese Gleichungen für die Varianz und die Kovarianz stammen aus dem Artikel [UEPE87, S. 250], der sich mit den Vorteilen der MLE beschäftigt. Dort wird außerdem gezeigt, dass die MLE das beste mögliche SRV liefert.

Gleichung (5.20) ist schon so umgeformt, wie sie für die Berechnung in dem Programm benutzt wird. Da drei Teile der Gleichung mehrfach vorkommen, wurden diese als eigene Funktionen implementiert, die dann mehrfach aufgerufen werden.

Das SRV wird zwei Größen beeinflusst, der Sensitivität des Szintillators und der DQE (Detection Quantum Efficiency) des Kamerachips. Der Szintillator der EM902 besitzt eine Sensitivität von 1 [Hü98, S. 25], jedes Elektron erzeugt somit ein Photon. Die Sensitivität muss deshalb nicht zusätzlich berücksichtigt werden. Die DQE beschreibt den Einfluss des Detektors, beim EM902 ein CCD-Chip, auf das SRV. Im Idealfall, wenn die Detektion ohne das Aufaddieren von zusätzlichem Rauschen erfolgt, ist die DQE 1

$$DQE = \frac{SRV_{\text{out}}^2}{SRV_{\text{in}}^2} \leq 1. \quad (5.23)$$

Die DQE ist ein experimentell bestimmbarer Parameter. Mehrere Methoden, um die DQE zu bestimmen, sind in [Hü98] beschrieben. Berücksichtigt man die DQE in der Gleichung zur Bestimmung des SRV, so erhält man

$$SRV = \sqrt{DQE} \cdot \frac{I_S}{\sqrt{\text{var}\{I_P\} + \text{var}\{I_U\}}} \quad \left(\frac{\text{Elementsignal}}{\text{Rauschen}} \right). \quad (5.24)$$

In dem Plug-in kann die DQE als Parameter für die Berechnung des SRV angegeben werden, eine nachträgliche Korrektur des SRV ist dadurch nicht nötig. Ist

die Sensitivität des Szintillators nicht gleich 1, so muss dies vor der Berechnung des Elementverteilungsbildes berücksichtigt werden. Kennt man die Sensitivität, dann kann man die Zählrate durch die Sensitivität teilen und erhält eine zu der Anzahl der Elektronen äquivalente Zählrate.

5.4 Die Benutzeroberfläche

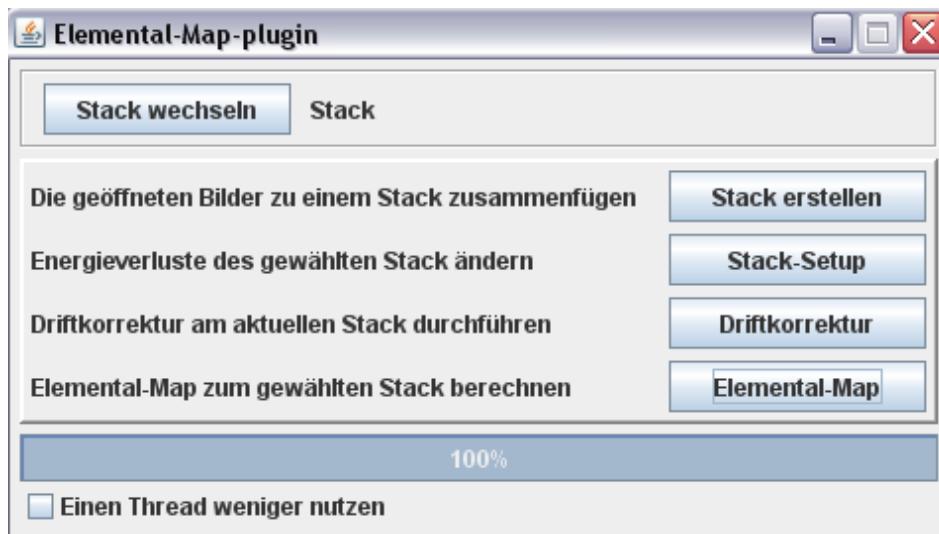


Abbildung 5.2: Das Hauptfenster des ImageJ Plug-ins.

In Abbildung 5.2 ist das Hauptfenster des Plug-ins zu sehen. Da ImageJ mehrere Bilder oder Stacks gleichzeitig geöffnet haben kann, wird angezeigt, welcher Stack von dem Programm genutzt werden soll. Die Auswahl lässt sich über den daneben liegenden Knopf ändern. Über Stack-Setup gelangt man in ein Fenster, dass die Namen der einzelnen Bilder anzeigt und den zugehörigen Energieverlust, falls dieser im Namen vermerkt ist. Dabei wird zuerst nach einem Ausdruck gesucht, der die Form hat "[xeV]", wobei x eine Zahl zwischen 0 und 9999 sein kann. Die eckigen Klammern dürfen auch weggelassen werden. Der Energieverlust lässt sich ändern, oder falls keiner angegeben ist, kann man ihn festlegen. Der Name des Bildes wird automatisch angepasst, bzw. um den Energieverlust ergänzt.

Möchte man die Driftkorrektur starten, so muss vorher ein Bildbereich markiert worden sein, der für die Bestimmung der Drift genutzt werden soll. Hat man dies nicht gemacht, so wird man darauf hingewiesen. In dem sich öffnenden Fenster lässt

sich auswählen, welches der Bilder als Referenz dienen soll. Anfangs ist immer das erste Bild des Stacks eingestellt. Außerdem legt man fest, wie groß die maximale Verschiebung sein soll, für die Korrelationskoeffizienten berechnet werden. Bis zu diesem Wert werden die Bilder gegeneinander verschoben, wobei für jede Verschiebung der Korrelationskoeffizient berechnet wird. Anschließend wird bestimmt, für welche Verschiebung der Korrelationskoeffizient maximal war, und die Bilder werden um diesen Wert zueinander verschoben. In einer zukünftigen Version des Programms soll es um eine Funktion ergänzt werden, die auf die Eingabe der maximalen Verschiebung verzichtet. Statt dessen wird die Verschiebung schrittweise erhöht, bis der maximale Korrelationskoeffizient gefunden wurde. Dabei wird ausgenutzt, dass das aus den Korrelationskoeffizienten erstellte Bild nur ein Maximum besitzt. Dies trifft zumindest in den bisher untersuchten Bildern zu. Nimmt der Korrelationskoeffizient mit steigender Verschiebung wieder ab, so kann die Berechnung abgebrochen werden.

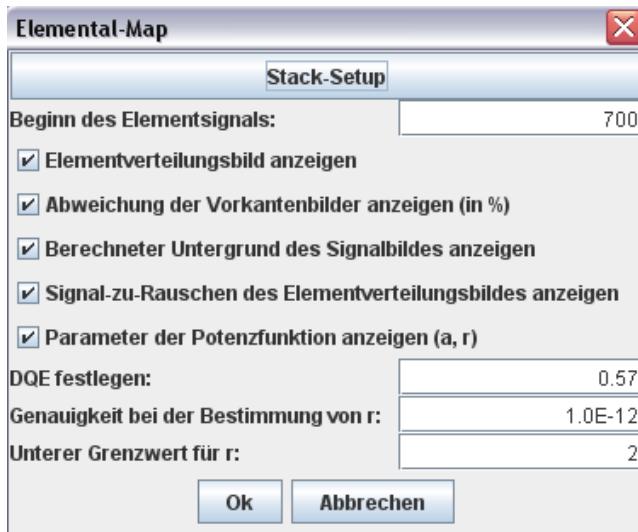


Abbildung 5.3: Die Einstellungsmöglichkeiten für die Berechnung der Elementverteilungsbilder.

Abbildung 5.3 zeigt das Fenster zum Konfigurieren des Programmteils, der für die Berechnung der Elementverteilungsbilder zuständig ist. Der oberste Knopf ermöglicht den Zugriff auf das Fenster zum Editieren der Energieverluste. Das folgende Eingabefeld legt fest, bei welchem Energieverlust die Ionisationskante des zu untersuchenden Elements beginnt. Alle Bilder, die mit einem niedrigeren Energieverlust

aufgenommen wurden, werden als Vorkantenbilder für die Bestimmung des Untergrundes benutzt. Ihre Anzahl ist egal, so lange es zwei oder mehr sind. Entsprechend wird für alle Bilder, die bei einem Energieverlust oberhalb des eingestellten Wertes aufgenommen wurden, ein Elementverteilungsbild berechnet. Auch hier ist die Anzahl egal.

Die fünf Auswahlkästen legen fest, welche Bilder am Ende angezeigt werden sollen. Die Abweichung der Vorkantenbilder gibt einem Informationen darüber, wie gut die Untergrundberechnung funktioniert hat, bzw. wie gut der Untergrund sich durch eine Potenzfunktion darstellen lässt. Jeder Pixel der Vorkantenbilder wird dabei mit dem berechneten Untergrund verglichen und die Abweichung in % bestimmt. So wird für jedes Vorkantenbild auch ein Bild mit den Abweichungen angezeigt.

Außerdem kann man sich den Untergrund der Signalbilder anzeigen lassen. Das ist sinnvoll um festzustellen, ob es durch die Verformung der Probe zu Fehlern bei der Untergrundberechnung gekommen ist. In dem Untergrundbild sind diese Fehler wesentlich besser zu erkennen als in dem stärker verrauschten Elementverteilungsbild. Die Parameter a und r kann man sich zur Kontrolle ausgeben lassen. Ich habe diese Funktion bei der Entwicklung des Programms benötigt und anschließend beibehalten.

Neben diesen Bildern wird noch ein Fehlerbild erstellt und angezeigt. Dies lässt sich nicht deaktivieren, da es wichtige Informationen über Fehler bei der Berechnung enthält. Es gibt vier Arten von Fehlern, die während der Berechnung protokolliert werden. Ein Fehler wird gemeldet, wenn das Newton-Verfahren nicht konvergiert. Für den zugehörigen Pixel kann in diesem Fall kein Untergrund berechnet werden. Verlässt eine Zahl ihren möglichen Wertebereich, so wird ebenfalls ein Fehler gemeldet. Java verhindert hier zwar, dass mit einer ungültigen Zahl weiter gerechnet wird und setzt die Zahl auf NaN (Not a Number), das Elementverteilungsbild muss aber in diesen Pixel auf 0 gesetzt werden. Für den nächsten Fehler möchte ich kurz auf das Eingabefeld „Unterer Grenzwert für r :“ eingehen. Damit wird eine minimale Steigung des Untergrundes festgelegt, was als Filter wirkt. Ich habe mich für 2 als Standardwert entschieden, da dies der minimale Wert für r ist, wenn der Untergrund nur durch die Anregung von Valenzelektronen und Plasmonenschwingungen erzeugt wird. Ein Fehler wird dabei protokolliert, wenn das berechnete r unterhalb des Grenzwertes liegt und damit wird der Pixel in den Elementverteilungsbildern auf 0 gesetzt. Beim letzten Fehler wird auf ein auftretendes NaN reagiert. Dazu kommt

es, wenn bei der Aufnahme der Bilder das Dunkelstrombild zu hell war und dadurch auch negative Werte im den Bildern vorhanden sind. In Gleichung (5.12) wird dann der Logarithmus einer negativen Zahl berechnet, was NaN ergibt, da diese Rechnung mathematisch falsch ist.

Als weitere Option kann man die Detector Quantum Efficiency (kurz DQE) der benutzten Kamera angeben. Dieser Wert hat Einfluss auf das SRV, nämlich in der Form $SRV_{DQE} = \sqrt{DQE} \cdot SRV$. Außerdem lässt sich die Genauigkeit bei der Bestimmung von r festlegen, die Abbruchbedingung des Newton-Verfahrens. In Abbildung 5.3 ist ein sehr kleiner Wert zu sehen, jedoch liefert auch 10^{-3} schon ein gutes Ergebnis, da das Newton-Verfahren sehr schnell konvergiert.

Nach der Durchführung der Berechnung, bekommt man eine kurze Zusammenfassung angezeigt. Neben der für die Berechnung benötigten Zeit wird ein Durchschnittswert für die Anzahl der Iterationen des Newton-Verfahren angegeben, sowie die genaue Anzahl, wie oft die vier oben beschriebenen Fehler aufgetreten sind.

Kapitel 6

Auswertung

6.1 Bestimmung der Fensterposition

Um ein optimales Ergebnis bei der Erstellung der Elementverteilungsbilder zu erreichen, muss man sich vorher Überlegungen über die genaue Position der Energieverlustfenster machen. Dabei ist die Breite der Energieverlustfenster eine wichtige Größe. Als Breite wurden Anfangs 20 eV pro Energieverlustfenster gewählt, um bei kurzen Belichtungszeiten noch ein ausreichend helles Bild für das Energieverlustfenster hinter der Phosphor-Kante zu erreichen.

Bei der Positionierung der Vorkantenfenster ist man stark eingeschränkt. Durch die Breite von jeweils ca. 20 eV ergibt sich bei drei Vorkantenfenstern schon ein Bereich von mindestens 60 eV. Lässt man keine Lücken zwischen den Vorkantenfenstern, so wird ein Energieverlust von 72 eV bis 132 eV, dem Beginn der Ionisationskante, abgedeckt. Abbildung 6.1 zeigt ein am EM902 aufgenommenes Spektrum, das den Vorkantenbereich und die Phosphor- $L_{2,3}$ Kante einschließt. Das Spektrum gibt leider keinen Aufschluss über den Beginn der Ionisationskante. Aus diesem Grund wurden die Literaturangaben zu Phosphor berücksichtigt. Direkt vor der Kante wurde eine Lücke von 2 eV frei gelassen. Bei einem scharfen Peak und der Berücksichtigung der schlechten Energieauflösung des Zeiss EM902, die etwa 2 eV bis 3 eV beträgt, wäre dieser Abstand wahrscheinlich noch zu klein. Da Phosphor aber eine verzögerte Kante besitzt, sollte das letzte Vorkantenbild nicht durch das Phosphor-Signal beeinflusst werden.

Auch bei der Platzierung des Energieverlustfensters hinter der Kante hilft Abbildung 6.1 nicht weiter. Als Referenz dient daher das Spektrum von Galliumphosphid,

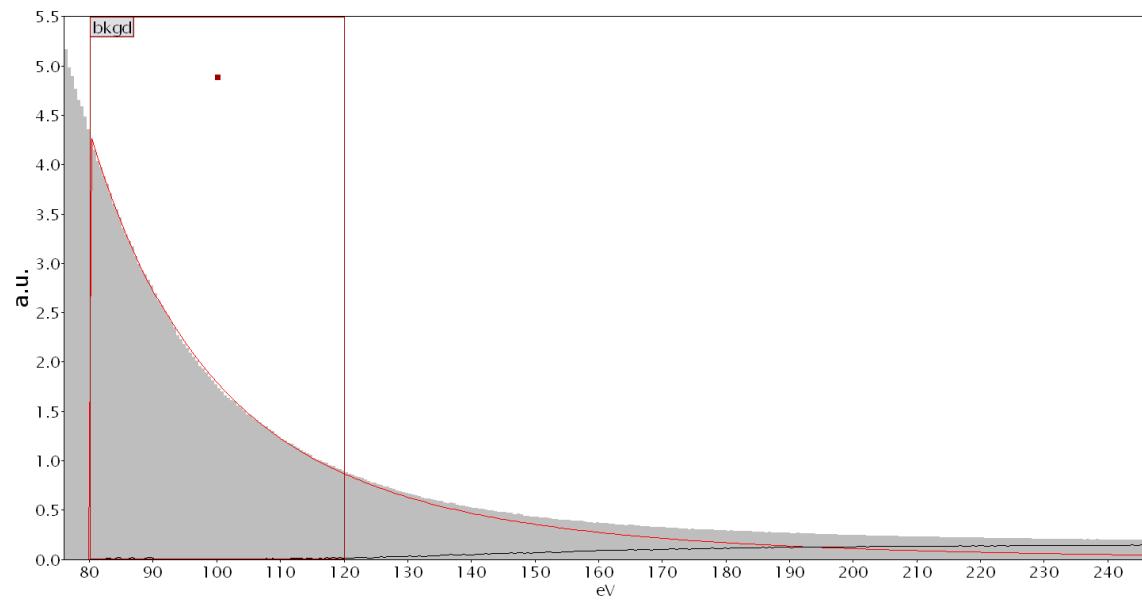


Abbildung 6.1: EELS von *C. glutamicum* aufgenommen am Zeiss EM902. Die Phosphor $L_{2,3}$ -Kante ist nicht zu erkennen.

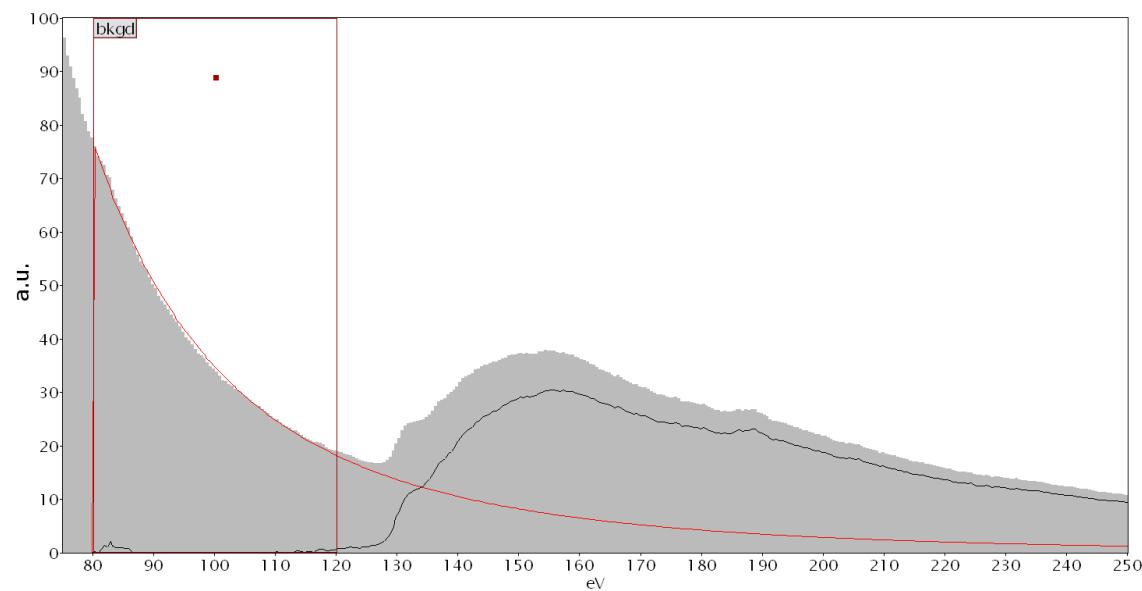


Abbildung 6.2: EELS eines GaP-Films, aufgenommen am Zeiss EM902.

das aus früheren Messungen für [RZM⁺92] vorlag. Abbildung 6.2 zeigt dieses Spektrum. Das Maximum des vom Untergrund korrigierten Signals liegt bei 154,5 eV. Das höchste aufsummierte Signal, bei Benutzung eines 20 eV breiten Energieverlustfensters, erhält man für einen Energieverlust von 147 eV bis 167 eV. Da man diese Werte nur als Richtwerte ansehen kann, wurde als Energieverlust 155 eV gewählt und somit bei 20 eV Breite ein Fenster, das von 145 eV bis 165 eV reicht.

Da die Mitte des Energieverlustfensters immer auf den am Mikroskop eingestellten Energieverlust justiert ist, wird in den folgenden Abschnitten nur diesen Wert angeben. Aus den vorherigen Überlegungen ergeben sich damit die Werte 80 eV, 100 eV und 120 eV für die Fenster vor der Phosphor-Kante und 155 eV für das Signalfenster hinter der Kante.

6.2 Elementverteilungsbilder

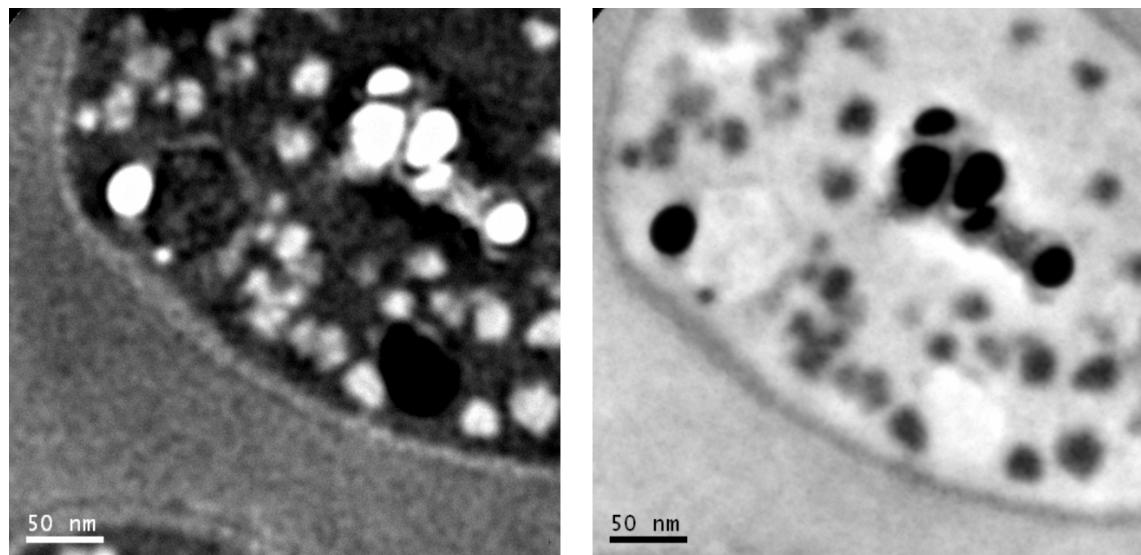


Abbildung 6.3: Elastisch gefilterte Aufnahme von *C. glutamicum* (links) und bei einem Energieverlust von 25 eV (rechts), jeweils bei 35000-facher Vergrößerung.

Die Aufnahmen zum Bestimmen der Phosphor-Verteilung, die hier besprochen werden, sind bei 35000-facher Vergrößerung gemacht worden. Nach den Überlegungen in Kapitel 6.1 wurden die Energieverlustfenster bei 80 eV, 100 eV, 120 eV und 155 eV platziert.

Kapitel 6 Auswertung

In Abbildung 6.3 sind ein elastisch gefiltertes Bild und eine Aufnahme bei einem Energieverlust von 25 eV zu sehen. Im elastisch gefilterten Bild sind die schon erwähnten Löcher als sehr helle Stellen zu erkennen. Bei der Aufnahme mit 25 eV Energieverlust ist der Kontrast umgekehrt, da hier ein Teil der inelastisch gestreuten Elektronen das Bild erzeugt. Interessant sind die dunklen Stellen im linken Bild, da hier der Elektronenstrahl besonders stark gestreut wird, was an Elementen mit höherem Wirkungsquerschnitt, oder an einer höheren Dichte an dieser Probenstelle liegt. Aus anderen Untersuchungen der Bakterien war außerdem bekannt, dass gerade die dunklen Stellen eine erhöhte Konzentration von Phosphor aufweisen sollen [KBH⁺08].

Abbildung 6.4 zeigt die Aufnahmen, die zur Bestimmung der Phosphor-Verteilung gemacht wurden. Dabei handelt es sich um die gleiche Probenstelle wie bei der elastisch gefilterten Aufnahme. Die Breite des Energiespaltes betrug 18 eV. Aufgenommen wurden die Bilder mit einer Belichtungszeit von 20 Sekunden. Die Abfolge der Aufnahmen war von hohem Energieverlust zu niedrigem und damit 155 eV, 120 eV, 100 eV und zuletzt 80 eV. Die Balken in der linken unteren Ecke zeigen den dargestellten Helligkeitsbereich. Hier ist deutlich die starke Abnahme der Helligkeit mit steigendem Energieverlust zu sehen. Um die Belichtungszeit und damit die Probendrift zu begrenzen, wurde nicht der komplette Dynamikumfang der Kamera ausgenutzt. Zusätzlich zu den in Abbildung 6.4 gezeigten Bildern wurden noch weitere Aufnahmen gemacht, deren Aufnahmereihenfolge von niedrigem nach hohem Energieverlust verlief. Diese Bilder sollen Aufschluss auf von Strahlenschäden verursachte Veränderungen geben. Direkt sind keine Unterschiede zu erkennen, deshalb wird darauf verzichtet, sie hier abzubilden.

Um das Phosphor-Verteilungsbild zu erstellen, mussten zuerst die vier Bilder zueinander driftkorrigiert werden. Dazu wurde die in Kapitel 5.2.1 beschriebene Methode verwendet. Vor dem Berechnen des Elementverteilungsbildes wurde noch einen Filter angewendet, der „Remove Outliers“ heißt. Dieser korrigiert alle Pixel, deren Zählrate stark von den direkt benachbarten Pixeln abweicht. So kann man Ausreißer aus dem Bild entfernen, die durch Röntgenstrahlung entstehen. Die Röntgenstrahlung entsteht als Bremsstrahlung beim Ablenken der Elektronen und sie lässt sich nicht komplett abschirmen.

Die so korrigierten Vorkantenbilder wurden dann genutzt, um mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode den Untergrund bei 155 eV zu bestimmen. Dieser Unter-

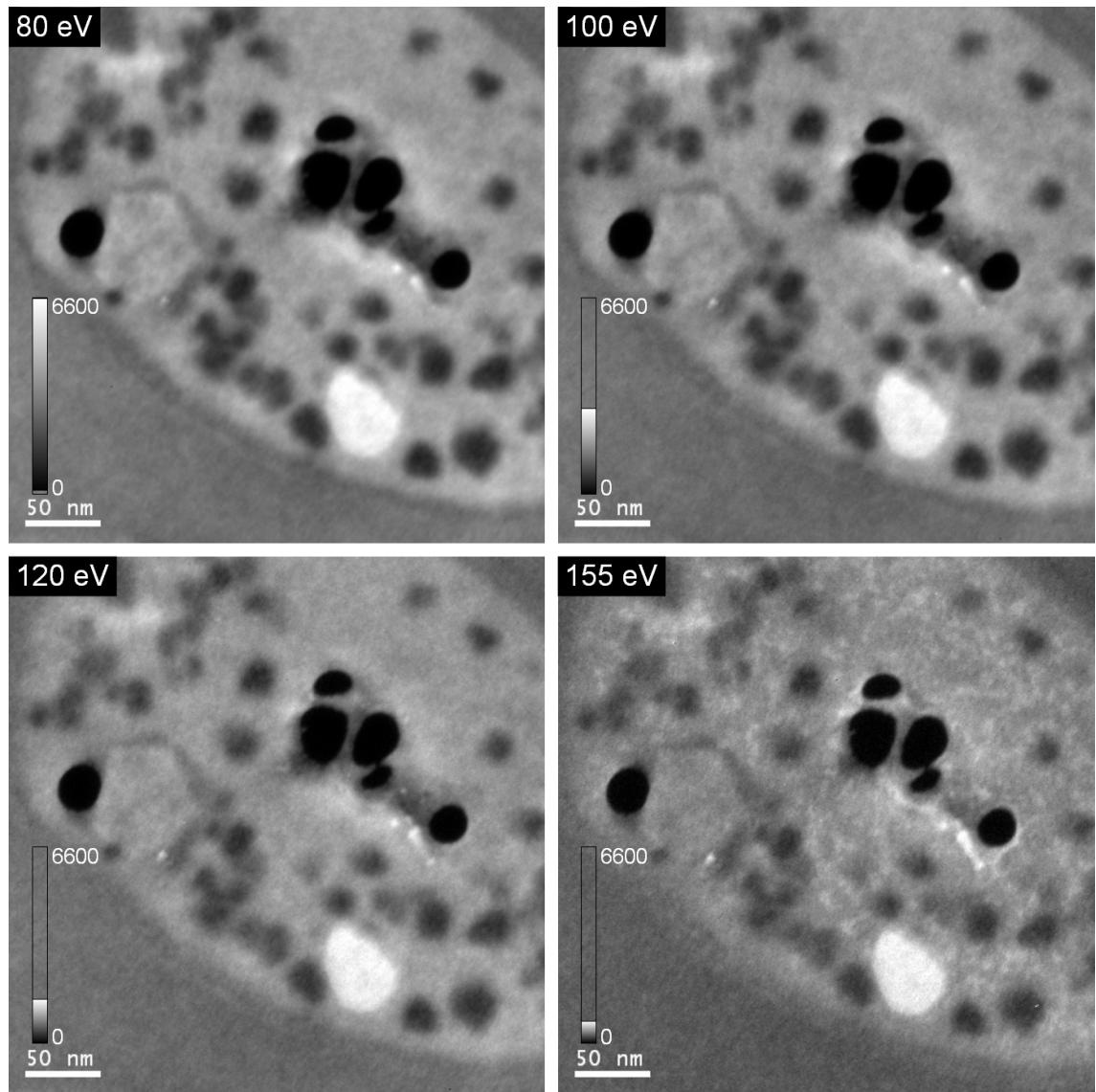


Abbildung 6.4: Energiegefilterte Aufnahmen von *C. glutamicum* bei den Energieverlusten 80 eV, 100 eV, 120 eV und 155 eV.

grund wurde anschließend von der 155 eV-Aufnahme abgezogen. Außerdem wurde zu dem Elementverteilungsbild das SRV berechnet. Diese Schritte führt das in Kapitel 5 vorgestellte Programm automatisch durch.

In Abbildung 6.5 ist links das Ergebnis der Berechnung zu sehen. Die dargestellten Graustufen reichen von 0 bis 255. Die schon vorher zu sehenden hellen Stellen weisen ein deutliches Phosphor-Signal auf, aber auch über das ganze Bakterium sind Stellen mit erhöhtem Phosphor-Anteil zu erkennen. Um die Löcher herum ist ein deutliches Signal zu sehen. Dieses war auf dem 155 eV-Bild noch nicht so gut sichtbar. Dabei könnte es sich um die DNS des Bakteriums handeln. Das rechte Bild in Abbildung 6.5 zeigt das SRV. Dargestellt sind nur die Bereiche, in denen das SRV Werte aufweist, die größer als 5 sind. Im Vergleich zu anderen Aufnahmen - die in dieser Arbeit nicht gezeigt werden - gibt es relativ wenige Stellen mit einem SRV von mehr als 5. Die hängt damit zusammen, dass der Dynamikumfang der Kamera nicht komplett genutzt wurde. Dadurch ist die Helligkeit der 155 eV-Aufnahme gering, woraus ein größerer relativer Messfehler resultiert. Phosphor lässt sich dennoch sicher nachweisen.

Die Markierungen, die in Abbildung 6.5 eingezeichnet sind, zeigen den Bereich, der zur Erstellung von Linienprofilen genutzt wurde. Diese Linienprofile zeigt Abbildung 6.6. In grau ist dabei das Linienprofil der Messung mit sinkendem Energieverlust dargestellt. Die schwarze Linie zeigt das minimale Phosphor-Signal und im unteren Bild das minimale SRV. Da zugehörige Aufnahmerekhenfolge ist 120 eV, 100 eV, 80 eV und 155 eV. Da alle Bilder zueinander driftkorrigiert wurden, handelt es sich um die gleiche Stelle der Probe. Das Signal und auch das SRV sind durchgängig niedriger als wenn man das Aufkantenbild zuerst aufnimmt. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Untersuchung in [Koo04, S. 37ff] überein. Der auffälligste Unterschied, zwischen den Aufnahmerekhenfolgen, ist in dem Bereich zu erkennen, in dem sich das Loch befindet. Wird das Aufkantenbild zuletzt aufgenommen, so erhält man dort, wo kein Signal vorhanden sein sollte, ein negatives Signal. Wird das Aufkantenbild zuerst aufgenommen, so ist das Signal innerhalb des Loches positiv, weicht aber weniger von 0 ab. Das die Abweichung geringer ist, hängt damit zusammen, dass zwischen den Vorkantenbildern und dem zweiten Aufkantenbild noch zwei weitere Vorkantenbilder aufgenommen wurden. Während dieser Zeit setzte sich der Massen-

verlust fort, was zu einem geringeren Signal des Aufkantenbildes führte. Stellt man in einem Bild alle Pixel dar, die einen Negativen Wert aufweisen, so kann man die Unterschiede der Aufnahmereihenfolgen gut erkennen. Abbildung 6.7 zeigt solche Bilder für drei verschiedene Aufnahmereihenfolgen. Das Elementverteilungsbild zu der Aufnahmereihenfolge 120 eV, 100 eV, 80 eV und 155 eV besitzt zu mehr als 11 % negative Werte. Bei der Aufnahmereihenfolge 155 eV, 120 eV, 100 eV und 80 eV sind es weniger als 2,5 %. Zu den negativen Werten, die aus dem Rauschen resultieren kommt ein weiterer Anteil durch die Auswirkungen der Aufnahmereihenfolge hinzu.

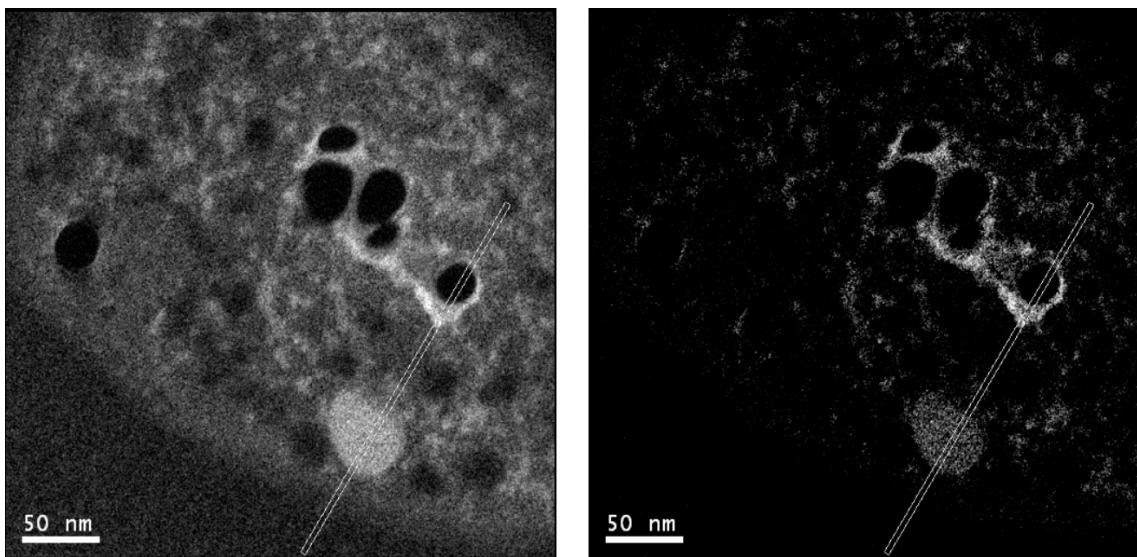


Abbildung 6.5: Phosphor Verteilungsbild (links) und zugehöriges SRV (rechts).

Trotz der ungünstigen Bedingungen, für die Aufnahmereihenfolge 120 eV, 100 eV, 80 eV und 155 eV, sind die Unterschiede zu der Reihenfolge 155 eV, 120 eV, 100 eV und 80 eV gering, wie man in Abbildung 6.6 sehen kann. Im Folgenden wird deshalb nur die zweite Reihenfolge berücksichtigt. Möchte man sicher Phosphor nachweisen, muss man berücksichtigen, dass das Signal etwas zu hoch bestimmt wurde. Vergleicht man das SRV der Elementverteilungsbilder beider Aufnahmerichtungen, so gibt es außer bei der Höhe des SRV keine Unterschiede. Abbildung 6.8 zeigt das SRV für beide Reihenfolgen. Die Bilder wurden so dargestellt, dass sie möglichst gleich aussehen. Dadurch unterscheiden sie sich im dargestellten Helligkeitsbereich. In beiden Bildern sind die gleichen Strukturen zu erkennen. Bei den Strukturen kann man sicher sein, dass Phosphor vorhanden ist. Für die Aufnahmereihenfolge, die im

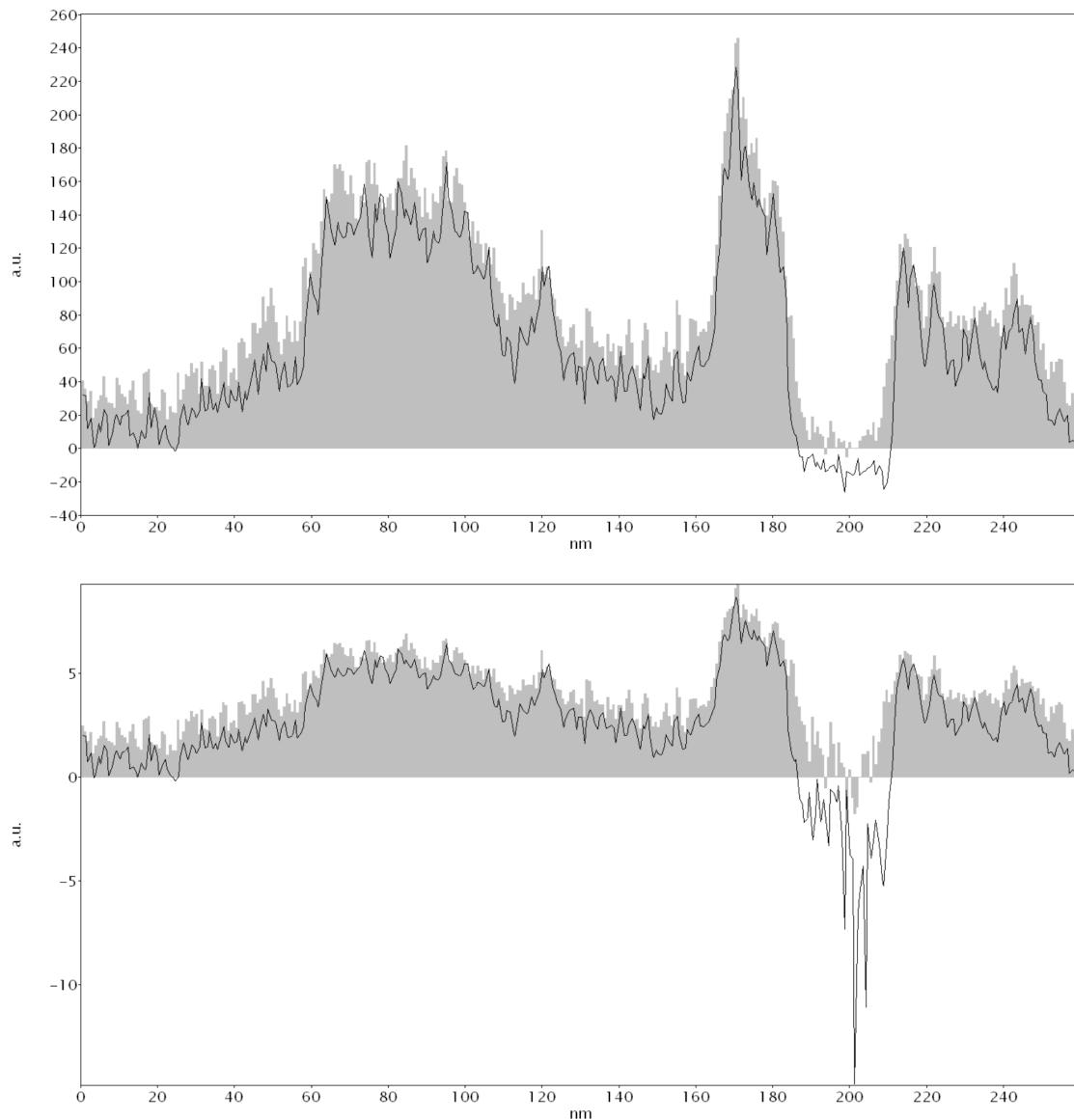


Abbildung 6.6: Linienprofile zu Abbildung 6.5. Oben das Phosphorsignal und unten das SRV. Dargestellt sind die Profile für die Aufnahmereihenfolge 155 eV-120 eV-100 eV-80 eV (grau) und 120 eV-100 eV-80 eV-155 eV (schwarz)

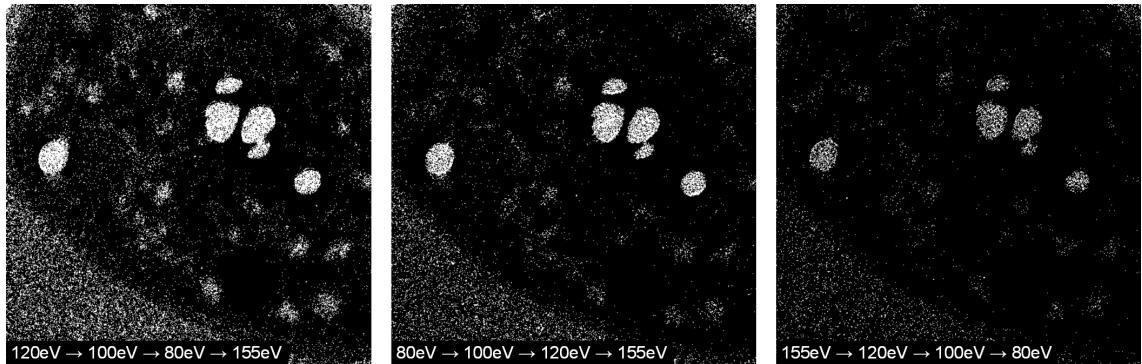


Abbildung 6.7: Vergleich zwischen verschiedenen Aufnahmereihenfolgen. Pixel die im Elementverteilungsbild kleiner als 0 sind besitzen den Wert 1, alle anderen den Wert 0.

rechten Bild gezeigt ist, muss man dehalb die Nachweissgrenze, mit einem SRV von 6, etwas höher wählen.

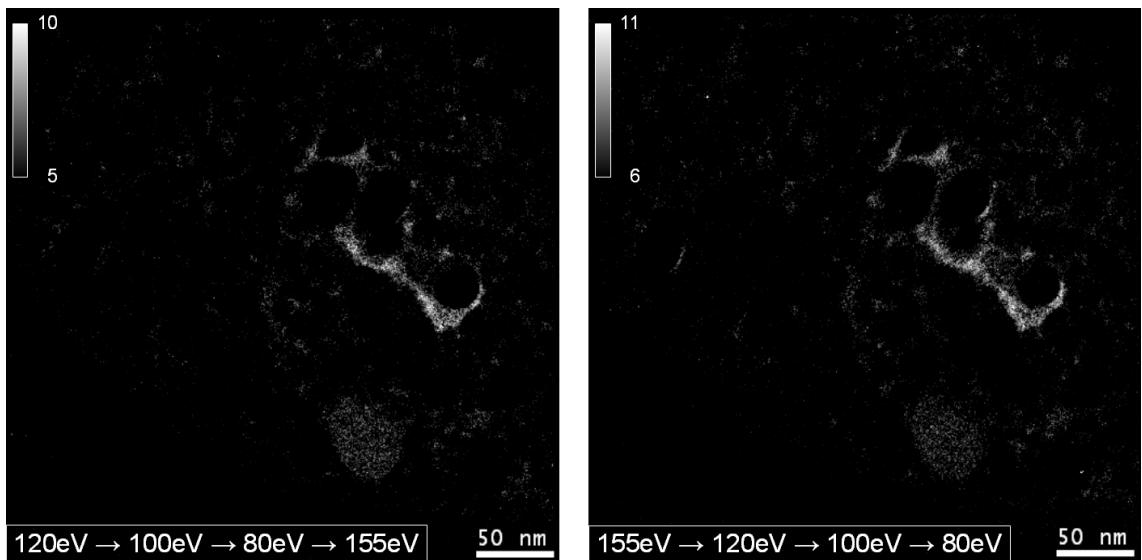


Abbildung 6.8: Vergleich des SRV für die die unterschiedlichen Aufnahmereihenfolgen. Das dargestellte SRV ist jeweils angegeben.

Das Elementverteilungsbild weist noch mehrere Auffälligkeiten auf. So entspricht das höchste Phosphor-Signal nicht der großen Phosphor-Ansammlung, sondern die Struktur, die sich um die Löcher herum befindet, weist das höchste Phosphor-Signal auf. Vermutlich handelt es sich hierbei um die DNS. In der großen Phosphor-Ansammlung werden wahrscheinlich ATP, ADP und AMP zu finden sein. Da das

Kapitel 6 Auswertung

Phosphor-Signal aber nicht so hoch ist wie bei der DNS, die einen geringeren Phosphor-Anteil besitzt, haben sich hier wahrscheinlich noch Moleküle angesammelt, die kein Phosphor enthalten. Diese erzeugen an dieser Stelle einen hohen Untergrund, der auch schon in den Vorkantenbildern deutlich zu sehen ist.

Da ATP als Energieträger dient und somit für viele Prozesse im Bakterium benötigt wird, ist überall im Bakterium Phosphor nachweisbar. Es muss deshalb auch immer dort sein, wo gerade Energie benötigt wird, wodurch es auch überall im Bakterium verteilt ist.

Beim Betrachten des Einbettmaterials fällt auf, dass auch dieses ein schwaches Phosphor-Signal aufweist. Spurr enthält aber kein Phosphor und auch eine Verunreinigung sollte auszuschließen sein. Im nächsten Kapitel wird diese Diskrepanz genauer untersucht.

Abbildung 6.9 zeigt noch einmal das Phosphor-Signal, diesmal sind jedoch an unterschiedlichen Positionen Linienprofile erstellt worden. Die Länge der Profile und auch die Breite, über die aufsummiert wird, sind bei den drei Linienprofilen gleich. Position a) zeigt ein hohes Phosphor-Signal und ein Loch, welches kein Signal aufweist. Das Linienprofil an Position b) zeigt die große Phosphor-Ansammlung. Diese beiden Linienprofile werden jeweils mit dem Phosphor-Signal im Einbettmaterial verglichen. Die Abbildung 6.10 zeigt jeweils Position a) und b) in grau und Position c) ist in beiden Profilen als Vergleich in schwarz eingezeichnet. Das Signal im Einbettmaterial ist sehr konstant, so dass es nicht vom Rauschen der einzelnen Bilder kommen kann. Eher kommt ein Problem bei der Untergrundkorrektur in Frage. Abbildung 6.1 zeigt jedoch, dass der Untergrund sich gut durch eine Potenzfunktion beschreiben lässt, hier sollte der Fehler eigentlich nicht liegen. Klare Erkenntnisse lieferten erst die EEL-Spektren, die mit dem Libra 200 FE aufgenommen wurden.

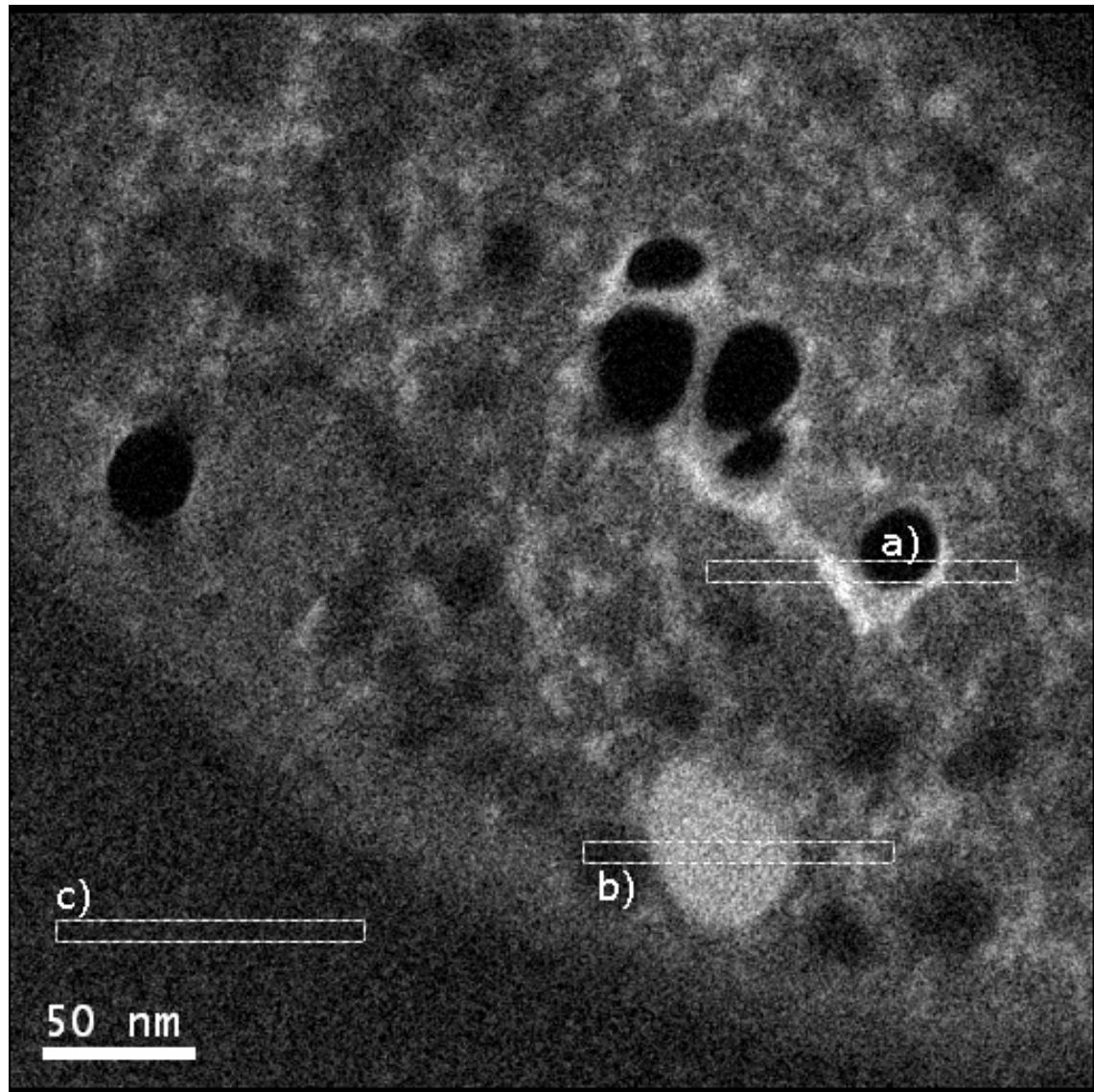


Abbildung 6.9: Phosphor Verteilungsbild aus Abbildung 6.5. Die zugehörigen Linienprofile zeigt Abbildung 6.10.

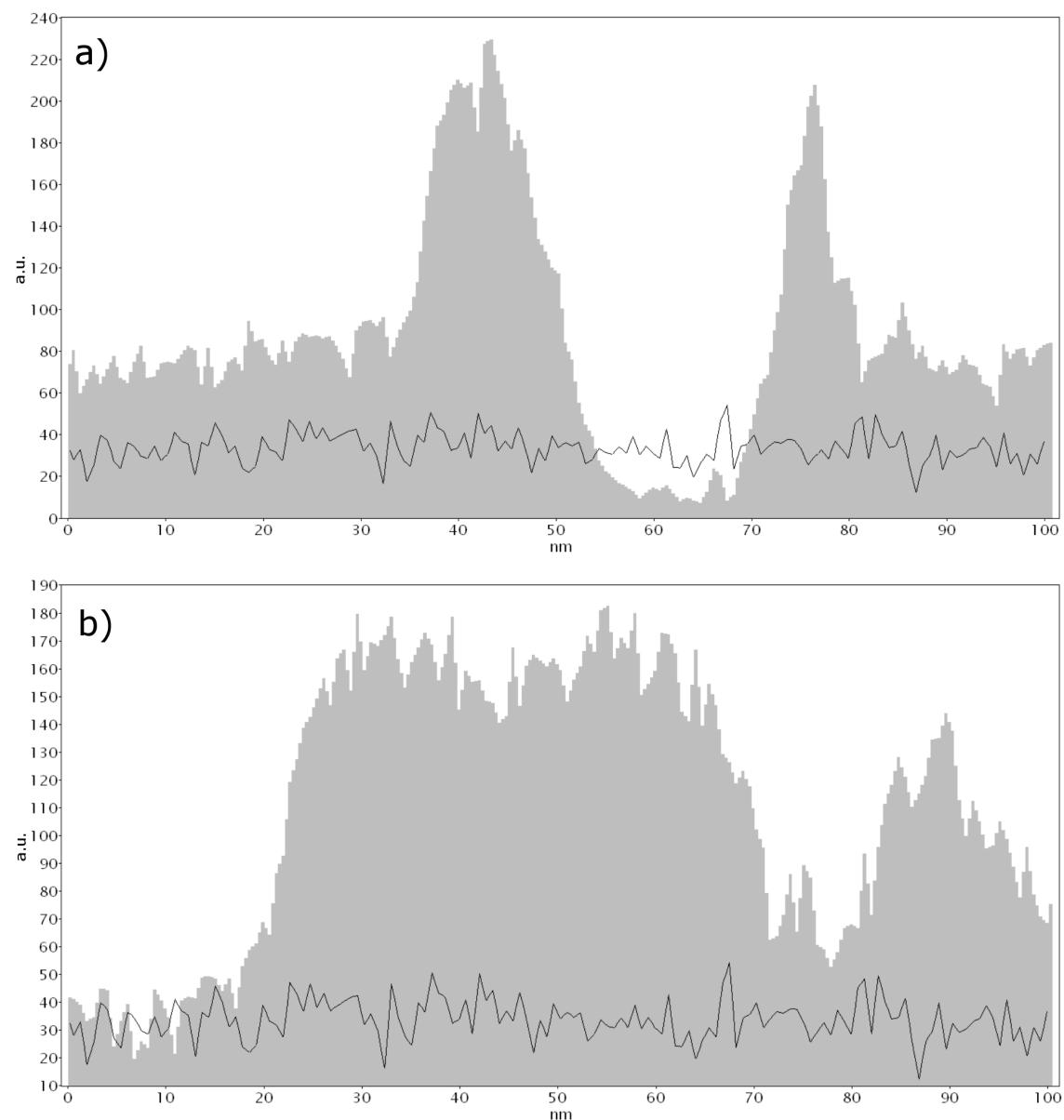


Abbildung 6.10: Linienprofile der Abbildung 6.5. Die schwarze Linie in beiden Profilen zeigt das Phosphorsignal im Spurr (Stelle c).

6.3 Verunreinigung der Probe durch Silizium

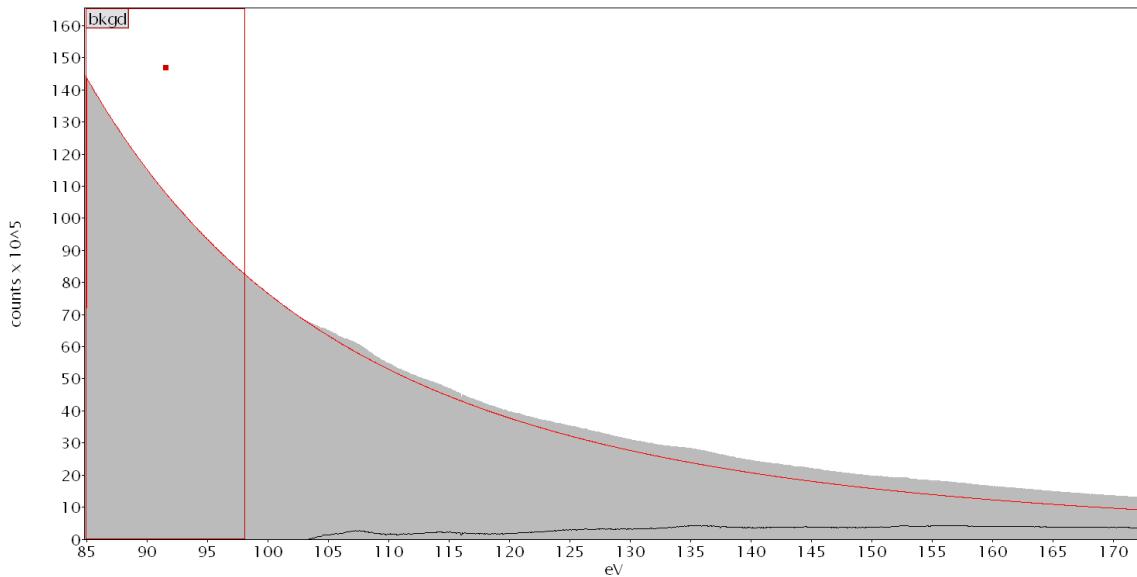


Abbildung 6.11: EELS von *C. glutamicum*. Aufgenommen am Zeiss Libra 200 FE, vor der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante bei 132 eV ist die Silizium $L_{2,3}$ -Kante zu erkennen.

In Abbildung 6.11 ist ein Spektrum zu sehen, dass mit dem Libra 200 FE aufgenommen wurde. Die Stelle, an der das Spektrum aufgenommen wurde, befand sich innerhalb eines Bakteriums. Im Gegensatz zu den am EM902 aufgenommenen Spektren ist in diesem eine Struktur zu erkennen. So sieht man bei 155 eV ein Maximum, das vom Phosphor stammt. Viel deutlicher sind aber die Maxima davor. So liegt eines bei 107 eV und ein weiteres bei 136 eV. Diese Maxima können nicht vom Phosphor stammen, denn dessen $L_{2,3}$ -Kante setzt erst bei 132 eV ein und, da es eine verzögerte Kante ist, tritt das erste Maximum erst bei 155 eV auf. Ein Element, auf das die zu sehende Kantenstruktur passt, ist Silizium, welches hier als Siliziumoxid vorhanden ist. Zur Bestätigung dient ein weiteres Spektrum, das die K-Kante von Silizium zeigt. In Abbildung 6.12 dieses Spektrum. Die Proben enthalten somit definitiv Silizium.

Um festzustellen, ob das Silizium dafür verantwortlich ist, dass die Phosphor-Verteilungsbilder auch im Spurr noch ein Signal zeigen, ist ein Blick auf die genaue Form der Silizium L_1 - und $L_{2,3}$ -Kanten nötig. Dazu wurden zwei verschiedenen Spektren aufgenommen. Das eine wurde im Einbettmaterial aufgezeichnet, es sollte deshalb nur Silizium zeigen. Das zweite Spektrum stammt von einer Stelle in einem

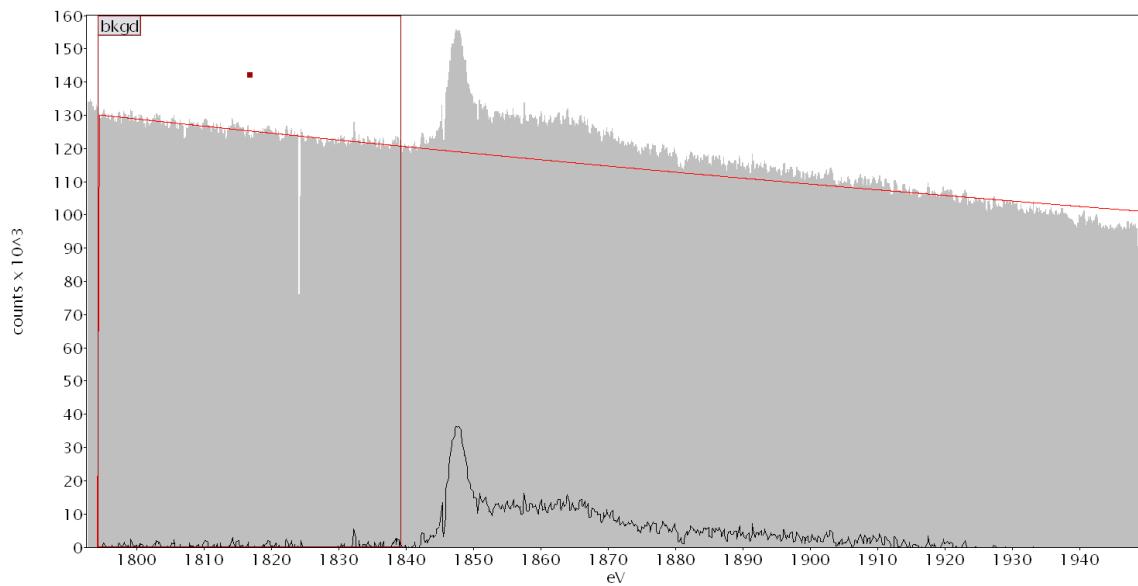


Abbildung 6.12: Die Silizium K-Kante. Aufgenommen am Libra 200 FE.

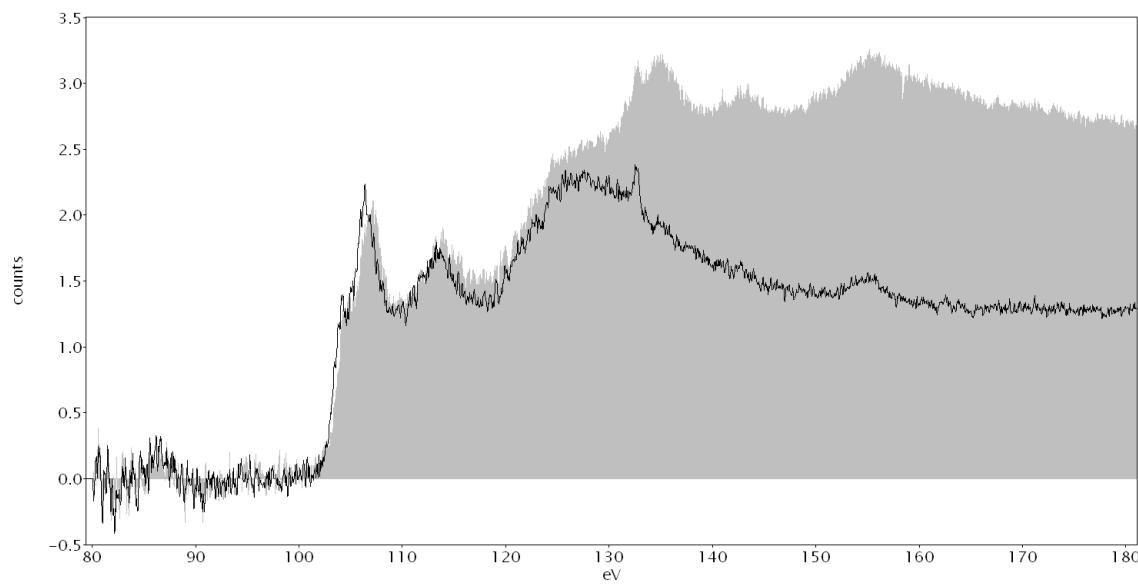


Abbildung 6.13: Vergleich des untergrundkorrigierten Signals. Aufgenommen im Spurr (schwarz) und im Bakterium (grau).

Bakterium, an der ein hohes Phosphor-Signal erwartet wurde. Anschließend wurde ein Energieverlust gewählt, der direkt vor der Silizium-Kante liegt und jeweils alle Kanäle des Spektrums wurden durch die Zählrate des gewählten Kanals geteilt. Dadurch sind beide Spektren besser miteinander vergleichbar. Der Energieverlustbereich, um mit Gatan Digital MicrographTM den Untergrund zu bestimmen und das Signal zu extrahieren, ist bei beiden Spektren gleich. Abbildung 6.13 zeigt das Ergebnis dieser Vorgehensweise, den Vergleich des Untergrundkorrigierten Signals. In grau ist das Signal des Spektrums zu sehen, das innerhalb eines Bakteriums aufgenommen wurde. Die schwarze Linie zeigt das Signal des Spektrums, welches im Spurr aufgenommen wurde. Die ersten beiden Maxima der Silizium $L_{2,3}$ -Kante stimmen in beiden Spektren exakt überein. Auch das dritte Maxima bei 130 eV beginnt gleich, durch den Beginn der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante weichen dann jedoch die beiden Spektren von einander ab.

Um das Erstellen der Phosphor-Verteilungsbilder anzupassen, muss man die Auswirkungen des Siliziums auf die Untergrundbestimmung kennen. Durch das Silizium-Signal erhöht sich die Zählrate der beiden Vorkantenfenster bei 100 eV und 120 eV. Dies führt dazu, dass ein höherer Untergrund berechnet wird, als eigentlich vorhanden ist. Betrachtet man die Position des Fensters hinter der Kante, so ist dort ein hohes Silizium-Signal ($L_{2,3}$ -Kante) sowie das Maximum der Silizium L_1 -Kante vorhanden. Daraus folgt, dass zwar ein zu hoher Untergrund bestimmt wurde, jedoch ist das Silizium-Signal bei 155 eV noch so hoch, dass daraus ein schwaches Signal in der Phosphor-Verteilung resultiert. Es muss deshalb ein Weg gefunden werden, dieses Problem zu umgehen. Die Vorkantenfenster für die Bestimmung des Untergrundes müssen so platziert werden, dass kein Silizium-Signal mehr zu den Bildern beiträgt. Außerdem muss das Silizium-Signal aus dem Elementverteilungsbild entfernt werden. Die K-Kanten von Silizium und Phosphor liegen so dicht beieinander, dass es nicht möglich ist das Phosphor-Signal getrennt vom Silizium-Signal aufzunehmen.

6.3.1 Phosphor-Verteilung unter Berücksichtigung des Siliziums

Die bisherige Position der Vorkantenfenster kann nicht beibehalten werden, da zwei Vorkantenfenster das Signal der Silizium $L_{2,3}$ -Kante enthalten. Eine Möglichkeit wäre die Fenster weiter zu geringeren Energieverlusten zu verschieben. Dabei stößt man aber auf zwei Probleme: Das erste Problem ist die Vergrößerung des Helligkeitsunterschiedes. Dieser Zusammenhang wurde in Kapitel 4.1.1 detailliert besprochen, deshalb soll nur erwähnt werden, dass dadurch die Helligkeit des Bildes hinter der Phosphor-Kante weiter abnimmt und damit auch das SRV. Außerdem nähert man sich mit sinkendem Energieverlust dem Plasmonenpeak. Der Untergrund weicht dadurch von einer Potenzfunktion ab. Oberhalb von 60 eV zeigt sich in den aufgenommenen Spektren aber noch eine gute Übereinstimmung mit dem Potenzgesetz. Der für die Untergrundkorrektur zur Verfügung stehende Bereich beträgt dadurch nur noch etwa 40 eV. Mit kleineren Energieverlustfenstern kommt es aber zu den Problemen, die in Kapitel 4.1 beschrieben wurden. So verringert sich, bei gleicher Belichtungszeit, die Helligkeit der Bilder. Ein Verlängern der Belichtungszeit führt dann zu stärkeren Auswirkungen der Probendrift und der Strahlenschäden. Wenn die Breite der Energieverlustfenster nicht verringert werden soll, müssten sich die Fenster überlappen. Bei dem Überlappen der Energieverlustfenster gibt es wahrscheinlich Probleme bei der Bestimmung des Rauschens und damit auch des SRV. Ob das zu dieser Messung berechnete SRV richtig ist, bleibt deshalb noch unklar. Ein direkter Vergleich zu anderen Messungen ist deshalb nicht möglich.

Als Beispiel dienen Aufnahmen bei einer relativ geringen Vergrößerung von ca. 5000-fach (siehe Abbildung 6.14) und einer Belichtungszeit von 8 Sekunden pro Bild. Die Breite des Energiespaltes beträgt 15 eV. Der Bereich, in dem die Vorkantenfenster platziert wurden, liegt zwischen 68 eV und 96 eV. In diesem Bereich wurde alle 2 eV eine Aufnahme gemacht. Sortiert nach der Reihenfolge, in der die Aufnahmen gemacht wurden, sind dies 88 eV, 86 eV, 84 eV, 82 eV, 80 eV, 78 eV und 76 eV. Alle sieben Bilder wurden zur Bestimmung des Untergrundes benutzt. Zum Vergleich wurde auch eine Berechnung mit nur drei Fenstern durchgeführt, wozu die Bilder mit den Energieverlusten 88 eV, 82 eV und 76 eV genutzt wurden. Auch hinter der Ionisationskante des Silizium wurden mehrere Aufnahmen gemacht. Einmal bei 115 eV, um

nur das Signal von Silizium zu erhalten. Als weiteren Energieverlust wurde wieder 155 eV gewählt, damit auch eine Vergleichbarkeit mit den vorherigen Ergebnissen zu gewährleisten. Bei diesem Energieverlust fließt das Signal der Phosphor $L_{2,3}$ -Kante und das Signal der Silizium L_1 -Kante ein. Als dritter Energieverlust wurde zusätzlich 200 eV betrachtet. Dort sollte von den Silizium L-Kanten nur noch der Untergrund vorhanden sein, der Phosphor mit seiner verzögerten Kante sollte hier noch ein höheres Signal liefern.

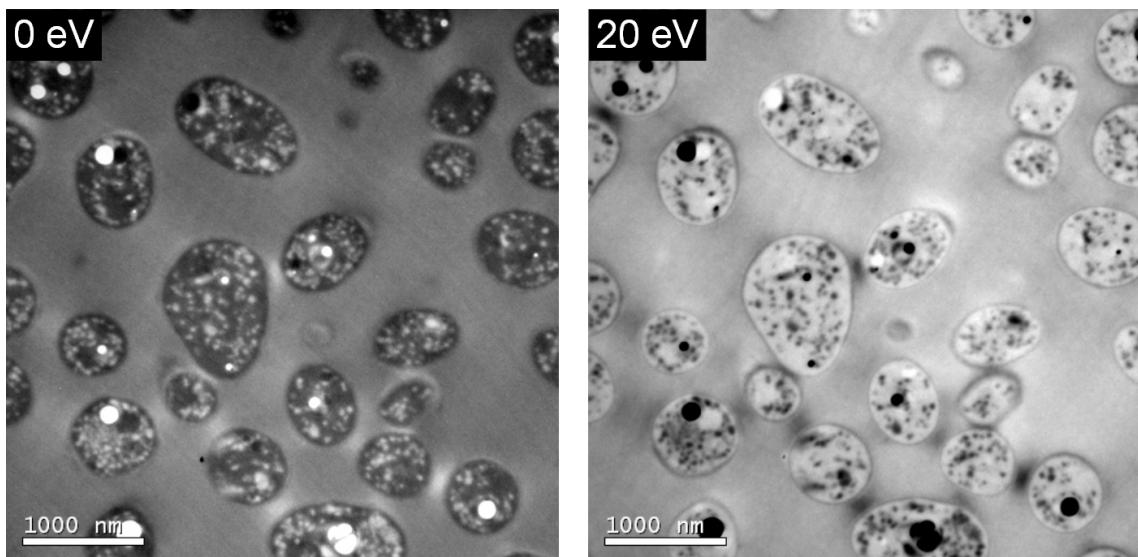


Abbildung 6.14: Elastisch gefilterte Aufnahme von *C. glutamicum* (links) und bei einem Energieverlust von 20 eV (rechts), jeweils bei 5000-facher Vergrößerung.

In Abbildung 6.15 sind die oberen Bilder mit einer Helligkeit von 0 bis 350 dargestellt und die unteren beiden mit einer Helligkeit von 0 bis 150. Im Silizium-Verteilungsbild kann man die Konturen der Bakterien erkennen, jedoch heben diese sich nicht stark vom Untergrund ab. Bei 155 eV hebt sich, durch den Phosphor, das Signal innerhalb der Bakterien stärker ab. Außerdem kommen Details mit hohem Signal hinzu. Dabei kann es sich nur um Phosphor handeln, da sie im Elementverteilungsbild bei 115 eV noch nicht zu sehen waren. Bei 200 eV sind die Stellen mit hohem Phosphor-Signal noch deutlicher zu erkennen. Die Helligkeit ist jedoch wegen des höheren Energieverlustes gesunken. Vergleicht man das Phosphor-Verteilungsbild, welches mit 8 Fenster erstellt wurde, mit dem, für dessen Berechnung nur 4 Fenster genutzt wurden, so fällt zunächst nur die geringere Helligkeit des zweiten Bildes auf. In dem ersten Bild kann man an hellen Stellen aber auch noch weitere De-

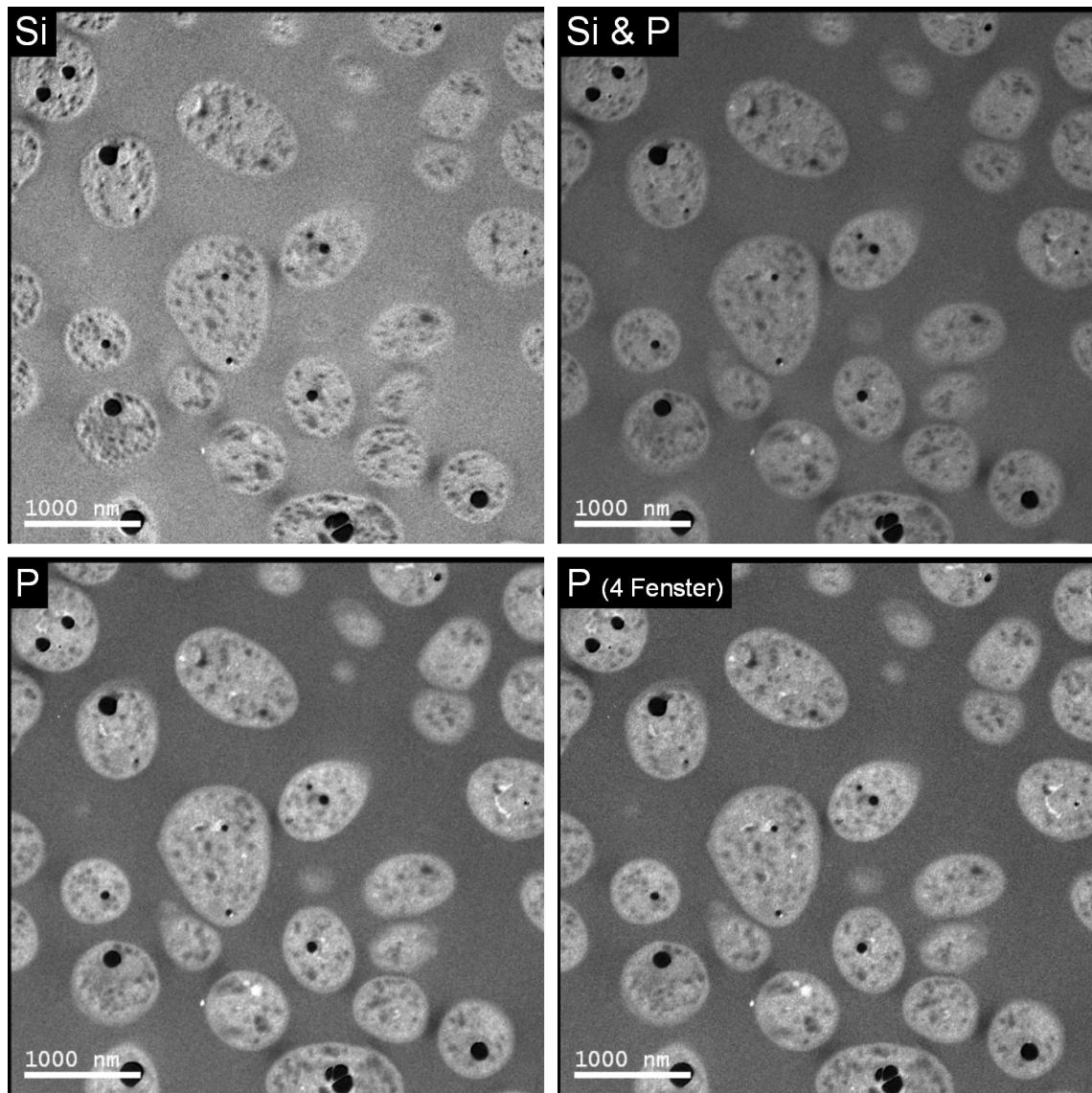


Abbildung 6.15: Elementverteilungsbilder: 115 eV (oben links), 155 eV (oben rechts) und 200 eV (unten links). Zum Vergleich: 200 eV mit drei statt sieben Vorkantenfenstern (unten rechts).

tails erkennen, hingegen wirken ein paar dunkle Stellen etwas verschwommen. Durch die größere Anzahl an Bildern lässt sich zwar der Untergrund besser bestimmen, jedoch können sich die berechneten Bilder durch die insgesamt höhere Gesamtdrift innerhalb der Aufnahmezeit auch verschlechtern.

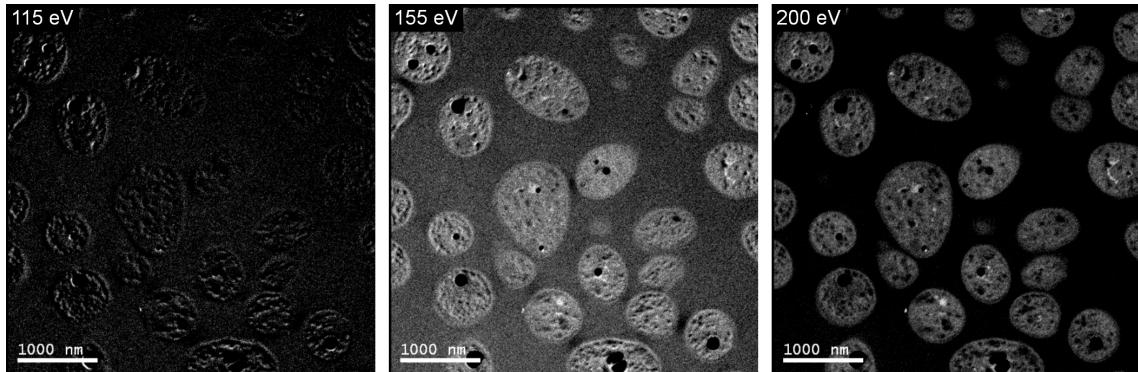


Abbildung 6.16: SRV zu den ersten drei Bildern in Abbildung 6.15. Dargestellt wird ein SRV von 7 bis 12.

Das zu den Elementverteilungsbildern mit sieben Vorkantenfenstern gehörende SRV ist in Abbildung 6.16 zu sehen. Das am Anfang des Kapitels beschriebene Problem mit dem SRV kann, beim Vergleich der Bilder zueinander, vernachlässigt werden. Das Rauschen durch die Untergrundbestimmung ist bei allen drei Bildern gleich, nur die Varianz von Signals und Untergrund führen zu dem unterschiedlichen SRV. Bei 115 eV ist das SRV über das ganze Bild relativ konstant. Stellen mit höherem SRV liegen an Löchern und kommen dadurch zustande, dass die Löcher von Bild zu Bild durch Strahlenschäden größer werden. Da die Bilder hinter der Ionisationskante zuerst aufgenommen wurden, ist dort das Loch noch kleiner. Aus einem geringen Signal, aber einem noch viel geringeren Untergrund, resultiert ein hohes SRV.

Das SRV bei 155 eV ist wesentlich höher als das bei 115 eV. Schaut man sich nochmal Abbildung 6.13 an, so ist klar, warum das so ist. Zum einen ist das Silizium-Signal noch etwa gleich stark, der Untergrund ist jedoch geringer. Hinzu kommt noch das Phosphor-Signal, das in den Bakterien zu einem hohen SRV führt.

Bei 200 eV ist das SRV wieder geringer. Besonders im Spurr ist es geringer als 7, wenn auch nicht weit darunter. Die relative Änderung des SRV ist innerhalb der Bakterien ca. 50% geringer als im Spurr. Die Bereiche mit besonders hohem SRV

heben sich stärker ab als im Bild mit 155 eV Energieverlust. Der Anteil von Silizium am Elementverteilungsbild bei 200 eV scheint geringer zu sein als bei 155 eV, wirkt sich aber noch deutlich auf das Elementverteilungsbild und das SRV aus.

Subtraktion des Silizium-Signals

Zur Entfernung des störenden Silizium-Signals aus den Bildern, wurde eine relativ simple Methode genutzt. Dazu wird ein Elementverteilungsbild benötigt, dass nur das Silizium-Signal enthält und ein Bild mit Phosphor- und Silizium-Signal, das korrigiert werden soll. Da im Spurr kein Phosphor vorhanden ist - die EEL-Spektren bestätigen dies - stammt beim zu korrigierenden Bild das Signal im Spurr nur vom Silizium.

Zuerst markiert man bei beiden Bildern einen Bereich im Spurr aus und bestimmt dort die mittlere Zählrate. Der Quotient aus beiden Werten (I_{Si+P}/I_{Si}) gibt an, wie stark das Silizium-Signal, im Bild mit Phosphor- und Silizium-Signal, gesunken ist. Mit diesem Quotienten multipliziert man das Bild, das nur das Silizium-Signal enthält. Das neu erhaltene Bild entspricht nun dem Silizium-Signal in dem Bild, welches Phosphor- und Silizium-Signal enthält. Zieht man das neu erhaltene Bild davon ab, dann bekommt man ein Bild, das nur noch das Phosphor-Signal enthält. Die Einzelnen Schritte in der Übersicht sind

$$q = \frac{\text{Spurr}(155 \text{ eV})}{\text{Spurr}(115 \text{ eV})}, \quad (6.1)$$

$$[Si - Map](155 \text{ eV}) = q \cdot [Si - Map](115 \text{ eV}), \quad (6.2)$$

$$[P - Map](155 \text{ eV}) = [P - Si - Map](155 \text{ eV}) - [Si - Map](155 \text{ eV}). \quad (6.3)$$

Das Ergebnis der Korrektur zeigt Abbildung 6.17. Die Bilder mit gleichem Energieverlust werden auch mit gleicher Helligkeit dargestellt. Dadurch ist deutlich zu sehen, dass in den korrigierten Bildern im Spurr fast kein Signal mehr vorhanden ist. Auch in den Bakterien sind die Stellen mit hohem Phosphor-Signal besser zu erkennen. Leider weist das 155 eV-Elementverteilungsbild durch die Korrektur sehr viele Artefakte auf. Die Artefakte, die schon im Silizium-Verteilungsbild (Abbildung 6.15) zu sehen sind, wirken sich hier aus. Man erkennt an vielen Stellen Strukturen, die dreidimensional wirken. Meist entstehen diese Artefakte, wenn die Bilder noch

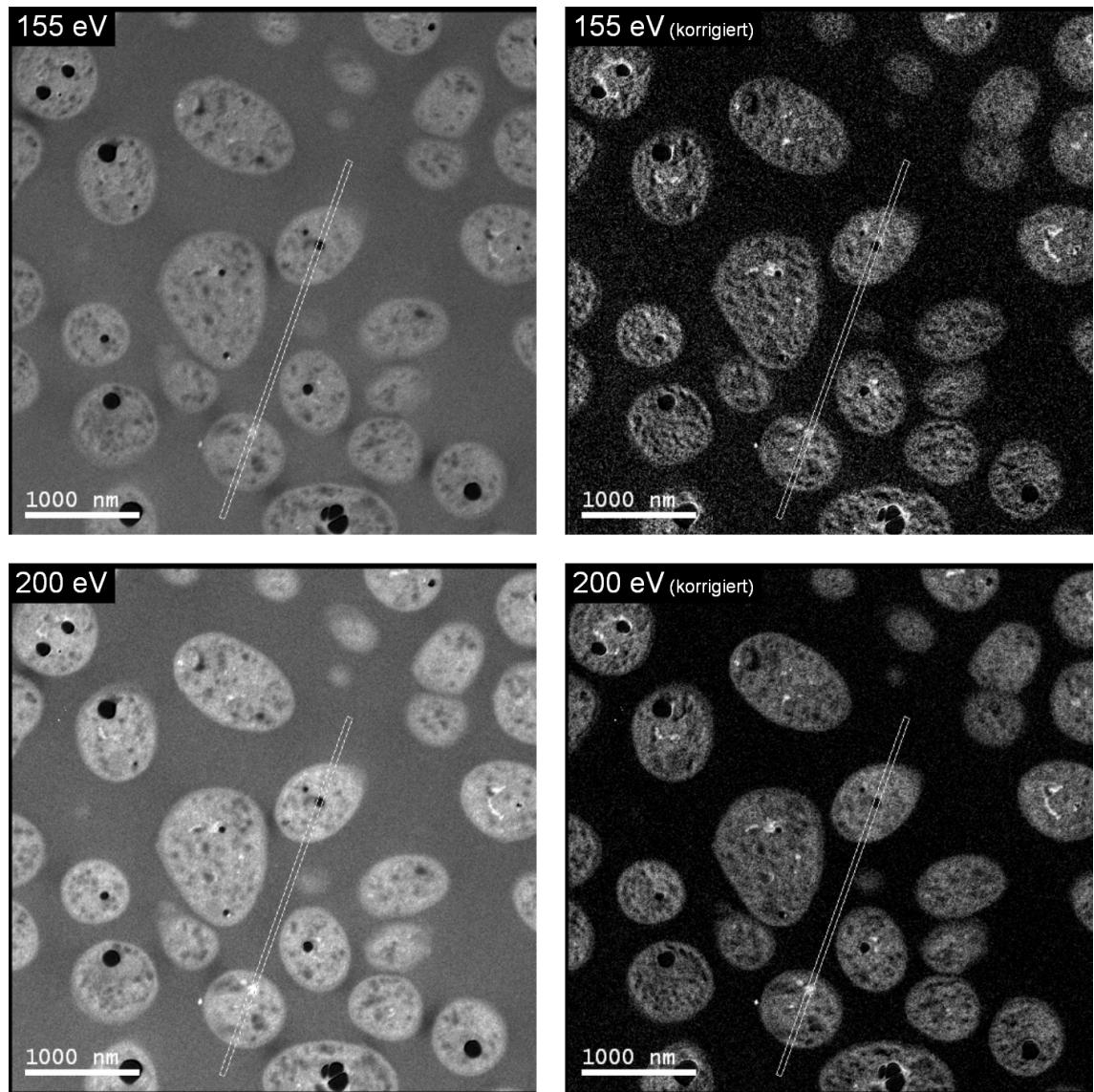


Abbildung 6.17: Phosphor-Verteilungsbilder mit Si-Signal (links) und die korrigierten Bilder (rechts).

zueinander verschoben sind. In diesem Fall ließen sich die Artefakte jedoch nicht durch die Driftkorrektur verringern. Eine Vermutung war, dass das Silizium nur an der Probenoberfläche vorhanden ist. Dann würde es nicht richtig fokussiert sein, was zu einer falschen Lokalisierung des Silizium-Signals führt. Durch die geringe Dicke der Probe, lässt sich diese Vermutung aber ausschließen. Bei dem 200 eV-Elementverteilungsbild sieht man weniger Artefakte und es weist wesentlich weniger Rauschen auf. Das Verhältnis des Silizium-Signals zum Phosphor-Signal ist bei 200 eV nicht mehr so hoch wie bei 155 eV, dadurch funktioniert bei 200 eV die Korrektur etwas besser.

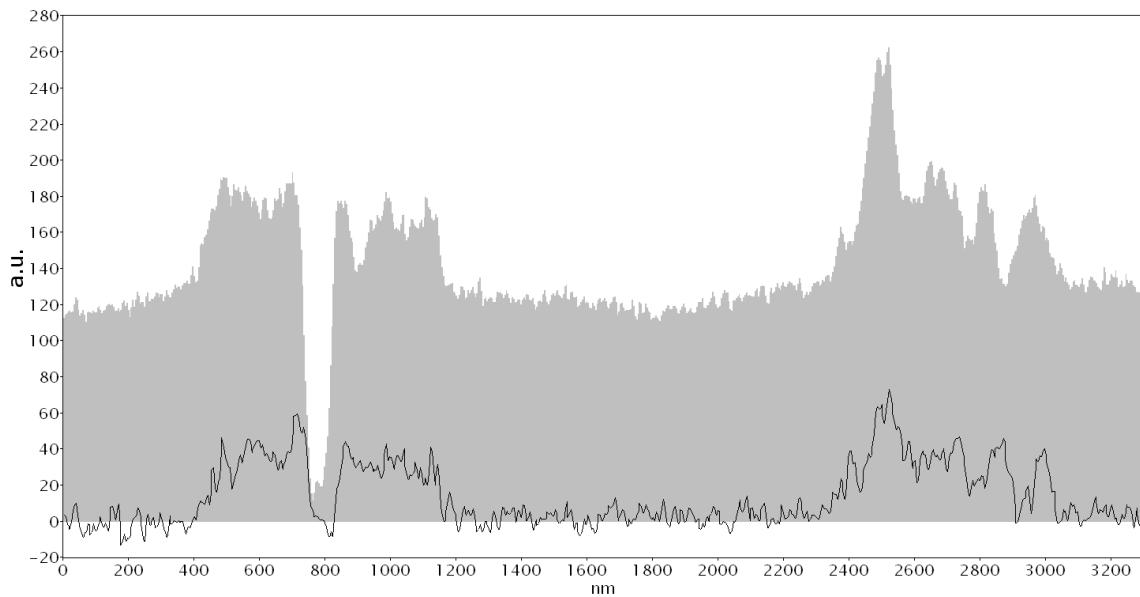


Abbildung 6.18: Vergleich zwischen korrigiertem (schwarz) und unkorrigiertem (grau) Phosphor-Verteilungsbild bei 155 eV.

Um den Effekt der Korrektur noch besser sichtbar zu machen, wurden an den in Abbildung 6.17 eingezeichneten Markierungen Linienprofile erstellt. Abbildung 6.18 zeigt das Linienprofil für das 155 eV-Elementverteilungsbild und Abbildung 6.19 für das 200 eV-Elementverteilungsbild. Man kann an den Bereichen im Spurr sehen, wie gut sich das Silizium-Signal herausrechnen lässt. Wenn man die beiden Abbildungen miteinander vergleicht, sieht man deutlich, dass nach der Korrektur das Rauschen bei 200 eV geringer ist als bei 155 eV.

Es ist somit sinnvoll, für die Korrektur einen so hohen Energieverlust zu wählen. Jedoch funktioniert das nicht immer so gut. Bei den Aufnahmen erreicht das 76 eV-

6.3 Verunreinigung der Probe durch Silizium

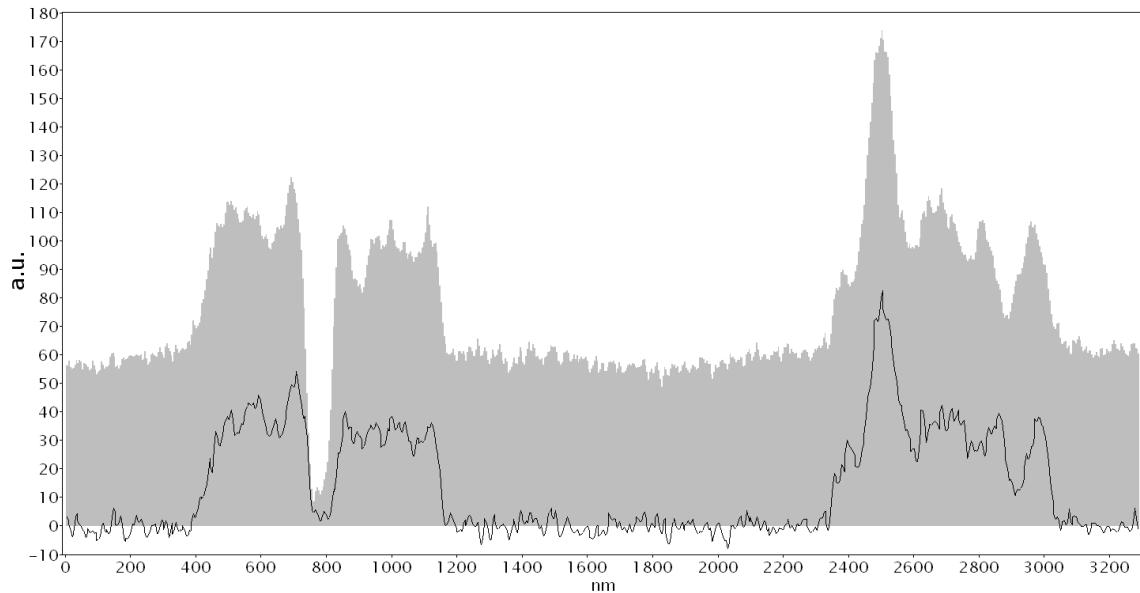


Abbildung 6.19: Vergleich zwischen korrigiertem (schwarz) und unkorrigiertem (grau) Phosphor-Verteilungsbild bei 200 eV.

Bild die maximale Helligkeit, die man mit der Kamera noch aufnehmen kann. Die Aufnahme bei 200 eV erreicht maximal 330 und im Durchschnitt sind es sogar nur 100. Nutzt man den vollen Dynamikumfang der Kamera nicht aus, so lassen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Besonders die Strahlenschäden sorgen dafür, dass man mehrere Versuche benötigt, bis man brauchbare Bilder aufgenommen hat. Auch bei den hier gezeigten Bildern waren an den Löchern schon erste Auswirkungen der Strahlenschäden zu sehen.

6.4 Korrektur der Fensterpositionen

Bei der Angabe des Energieverlustes macht man unvermeidlich immer einen Fehler. Bei der Rechnung geht man davon aus, dass die Bilder mit einer infinitesimalen Spaltbreite aufgenommen wurden. Man integriert jedoch über einen festen Energiebereich. Bei der Aufnahme eines Spektrums kann man dies vernachlässigen, so integriert man beim Libra 200 FE über einen Bereich von 0,7 eV pro Energiekanal. Bei Energieverlustbildern mit 20 eV Spaltbreite weicht durch das Integrieren der tatsächliche Energieverlust von dem am Mikroskop eingestellten ab. Der Grund dafür ist die Steigung des Potenzfunktion. Die Energieverluste unterhalb des eingestellten Wertes tragen dadurch stärker zum Signal des Bildes bei, als die, die oberhalb davon liegen. Dieser Effekt ist umso stärker, je geringer der Energieverlust ist und umso breiter das Energieverlustfenster gewählt wird. Es wäre deshalb sinnvoll, die Bestimmung des Untergrundes mit den korrigierten Energieverlusten durchzuführen. Zunächst muss man jedoch die korrigierten Energieverluste bestimmen. Eine Möglichkeit besteht darin, das EEL-Spektrum dazu zu nutzen. Man muss alle Energiekanäle innerhalb des Energieverlustfensters aufsummieren und durch die Anzahl der Energiekanäle teilen. Diesen Mittelwert vergleicht man dann mit dem y-Werten des Spektrums und erhält so den richtigen Energieverlust für das Fenster. Die so erhaltenen Werte lassen sich dann bei der Untergrundkorrektur benutzen.

Ich möchte aber noch eine weitere Methode vorstellen, die ganz ohne zusätzliches Spektrum funktioniert und, wenn sie einmal in dem vorgestellten Programm integriert ist, auch voll automatisch funktioniert. Zuerst wird die Potenzfunktion bestimmt, die den Untergrund beschreibt. Statt die Potenzfunktion zu nutzen, um das Elementverteilungsbild zu berechnen, dient sie als Ersatz für das Spektrum. Für alle Energieverluste, die innerhalb des Energieverlustfensters liegen, wird der Untergrund bestimmt und die Werte werden aufsummiert.

$$\text{Sum} = \sum_{E \in \Delta E} U(E) \quad (6.4)$$

Nach dem Teilen durch die Anzahl der Energiekanäle erhält man den Mittelwert. Da die Potenzfunktion bekannt ist, lässt sich mit Hilfe der Umkehrfunktion der korrigierte Energieverlust bestimmen.

Der Vorteil dieser Methode im Gegensatz zur Korrektur anhand des Spektrums ist, dass diese Berechnung pixelweise durchgeführt wird und somit auch der nicht konstante Untergrund berücksichtigt wird. Ein Nachteil ist jedoch die erhöhte Rechenzeit. So muss die MLE zweimal durchgeführt werden und auch das Bestimmen der korrigierten Energieverluste kostet etwas Rechenzeit.

Tabelle 6.1: Berechnung zur Korrektur der Fensterposition

80 eV		100 eV		120 eV		155 eV	
E (eV)	U	E (eV)	U	E (eV)	U	E (eV)	U
71	5171,57	91	2058,41	111	984,59	146	355,97
72	4909,93	92	1976,57	112	952,35	147	347,07
73	4664,87	93	1898,83	113	921,44	148	338,44
74	4435,12	94	1824,92	114	891,79	149	330,09
75	4219,55	95	1754,62	115	863,34	150	321,99
76	4017,11	96	1687,73	116	836,04	151	314,15
77	3826,84	97	1624,04	117	809,82	152	306,54
78	3647,86	98	1563,37	118	784,64	153	299,17
79	3479,38	99	1505,55	119	760,44	154	292,02
80	3320,65	100	1450,42	120	737,18	155	285,09
81	3171,01	101	1397,82	121	714,82	156	278,37
82	3029,82	102	1347,63	122	693,31	157	271,84
83	2896,52	103	1299,70	123	672,61	158	265,51
84	2770,57	104	1253,91	124	652,70	159	259,36
85	2651,49	105	1210,15	125	633,52	160	253,40
86	2538,84	106	1168,31	126	615,06	161	247,60
87	2432,19	107	1128,29	127	597,27	162	241,98
88	2331,17	108	1090,00	128	580,14	163	236,51
89	2235,41	109	1053,34	129	563,62	164	231,20
\emptyset	3460,52	\emptyset	1489,14	\emptyset	750,77	\emptyset	288,23
E_{korr}	79,12 eV	E_{korr}	99,29 eV	E_{korr}	119,41 eV	E_{korr}	154,54 eV

Die Tabelle 6.1 zeigt die Ergebnisse einer so durchgeführten Berechnung. Für die Parameter der Potenzfunktion wurden die Parameter $r = 3,712$ und $\alpha = 24,374$ genutzt, die von der Berechnung des Elementverteilungsbildes in Kapitel 6.2 stammen. Wichtig ist, dass man die Darstellung des Untergrundes als Exponentialfunktion nutzt (siehe dazu Gleichung 5.8). Für die Berechnung wurden nur ganzzahlige Energieverluste gewählt. Kleinere Schritte sollten das Ergebnis nicht mehr viel verbessern. Wie zu erwarten war, fällt bei kleinen Energieverlusten die Abweichung

Kapitel 6 Auswertung

etwas größer aus. Selbst bei 80 eV beträgt die Abweichung vom eingestellten Energieverlust nur 0,88 eV. Für die Aufnahmen des EM902 macht diese Korrektur deshalb keinen Sinn, die Energieauflösung ist um ein vielfaches größer als dieser Korrekturwert. Und auch die Fehler beim justieren von Position und Breite der Spaltblende dürften größer sein als 0,88 eV. Bei hohen Energieverlusten ist die Steigung der Potenzfunktion geringer und die Verschiebung fällt dadurch noch geringer aus. Dann spielt diese Korrektur keine Rolle mehr.

Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass man Phosphor in den Bakterien der Art *Corynebacterium glutamicum* gut nachweisen kann. Die gezeigten Ergebnisse waren meist nicht einfach zu reproduzieren, da es viele Schwierigkeiten bei der Aufnahme der Bilder gab, die berücksichtigt werden mussten. So war es nötig, den vollen Dynamikumfang der Kamera zu nutzen, da die Energieverlustbilder einen sehr großen Helligkeitsunterschied aufweisen, wenn man sie mit gleicher Belichtungszeit aufnimmt. Hinzu kommen die Beschränkungen bei der Belichtungszeit durch die Probendrift und das Verformen und Zerreißen der Probe durch Strahlenschäden. So waren meist viele Versuche nötig, bis die richtigen Parameter für eine Aufnahme gefunden wurden.

Als weiteres Problem stellte sich die Verunreinigung durch Silizium heraus. So ließen sich zwar auch ohne Korrekturen mögliche Phosphor-Ansammlungen lokalisieren, jedoch störte das über die ganze Probe verteilte Signal, welches vom Silizium erzeugt wurde. Nach einer Anpassung der Energiefensterpositionen konnte die Silizium-Verteilung bestimmt werden, um damit das Phosphor-Verteilungsbild zu korrigieren. Auch wenn die dazu genutzte Methode sehr einfach ist, so kann das Ergebnis doch überzeugen. Das Silizium-Signal im Einbettmaterial lässt sich vollständig entfernen, die Standardabweichung ist dort größer als die Abweichung des Mittelwertes von null.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Java-Programm nutzt die Möglichkeiten moderner Mehrkernprozessoren und beschleunigt dadurch die Driftkorrektur und die Berechnung der Elementverteilungsbilder. Die Ergebnisse entsprechen denen, die mit einem Programm erzeugt wurde, dass die gewichtete Methode der kleinsten Quadrate verwendet. Dabei liefert die Methode der maximalen Ähnlichkeit aber das bessere SRV. Wichtig war es für auch ein einfach zu bedienendes Programm zu entwickeln, das trotzdem noch flexibel ist und alle wichtigen Informationen zur Berechnung liefert. So ist man nicht auf die Berechnung mit vier Fenstern beschränkt, sondern

Kapitel 6 Auswertung

kann auf beiden Seiten der Kante fast beliebig viele Bilder nutzen. Beschränkt wird die Anzahl nur durch den Arbeitsspeicher des Computers. Außerdem sieht der Nutzer direkt, ob es Fehler bei der Durchführung der Untergrundbestimmung gab und Dank der Fehler-Map, lassen sich diese Fehler auch sofort im Bild lokalisieren.

Mit dem Abschluss dieser Diplomarbeit soll aber nicht die Entwicklung des Programms beendet werden. So soll noch die Funktion zur Korrektur der Fensterpositionen implementiert werden. Das Programm muss noch ins Englische übersetzt werden, dies ist jedoch leicht zu realisieren, da sich alle Texte die angezeigt werden, in einer einzelnen Datei befinden. Es besteht sogar die Möglichkeit die Sprache dann abhängig von der Sprache des Betriebssystems automatisch zu wählen. Es wäre wünschenswert, wenn weitere Personen von der Arbeit, die in dieses Programm gesteckt wurde, profitieren können.

Literaturverzeichnis

- [BB06] BURGER, W. ; BURGE, M. J.: *Digitale Bildverarbeitung*. Springer Berlin Heidelberg, 2006
- [Hü98] HÜLK, C.: *Charakterisierung von CCD-Kamerasystemen in der Transmissionselektronenmikroskopie und deren Einsatz bei der Erstellung von Elementverteilungsbildern*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Diss., 1998
- [KBH⁺08] KROMER, J. O. ; BOLTEN, C. J. ; HEINZLE, E. ; SCHRODER, H. ; WITTMANN, C.: Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiology* **154** (2008), 3917–3930
- [Koo04] KOOP, A.: *Abbildung der Stickstoffverteilung zum Nachweis von Cyano-phycin in Bakterienzellen mit Hilfe von energiefilternder Transmissionselektronenmikroskopie*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Diplomarbeit, 2004
- [RZM⁺92] REIMER, L. ; ZEPKE, U. ; MOESCH, J. ; SCHULZE-HILLERT, S. ; ROSS-MESSEMER, M. ; PROBST, W. ; WEIMER, E.: *EEL Spectroscopy*. Carl Zeiss, Electron Optics Division, 1992
- [UEPE87] UNSER, M. ; ELLIS, J. R. ; PUN, T. ; EDEN, M.: Optimal background estimation in EELS. *Journal of Microscopy* **145** (1987), 245–256

Erklärung der Urheberschaft

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift