

Der direkte Blick auf die Magnetosomen-Kette

—

PEEM- und SEM-Untersuchungen am intakten *Magnetospirillum* *magnetotacticum*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät Physik
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Phys.
Christoph Keutner
geboren in Kempen

1. Gutachter : Prof. Dr. C. Westphal

2. Gutachter : Prof. Dr. Dr. W. Rhode

Abgabedatum: 07. August 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Magnetotaktische Bakterien	5
2.1. Das <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	6
2.2. Magnetit	8
3. Theoretische Grundlagen	13
3.1. Photoemission	13
3.2. Inelastische Streuung	17
3.3. Röntgenabsorptionsspektroskopie	18
3.4. Anregung durch Elektronen	22
3.5. Magnetismus	24
3.6. Magnetischer Linear- und Zirkulardichroismus	27
4. Die Mikroskope	33
4.1. Das Photoemissions-Elektronenmikroskop	33
4.1.1. Schwellenwert- und Hochenergie-Emission	35
4.1.2. Topographischer Kontrast	36
4.1.3. Austrittsarbeitskontrast	37
4.1.4. Chemischer und magnetischer Kontrast	38
4.1.5. Abbildungseigenschaften	40
4.2. Das Raster-Elektronenmikroskop	42
5. Apparativer Aufbau und Datenaufnahme	45
5.1. Lichtquellen	45
5.1.1. Die Strahllinie 11	45
5.1.2. Die Strahllinie 4-ID-C	46
5.1.3. Die Quecksilber-Kurzbogenlampe	46

5.2. Die Strahllinien-Endstationen	47
5.2.1. Das DELTA-PEEM	47
5.2.2. Das APS-PEEM	51
5.3. Software	52
6. Datenbearbeitung und Identifizierbarkeit der MTB	59
6.1. Datenbearbeitung der PEEM-Spektren	59
6.2. Identifizierbarkeit mittels PEEM	63
7. Probenpräparation und Probengüte	67
7.1. Anreicherung	67
7.2. Wasch-Prozedur	69
7.3. Nachbehandlungen	75
7.4. Alternative Methode	82
8. Einblick in intakte MTB	85
8.1. PEEM-XAS	85
8.2. Magnetosomen mittels SEM	93
8.3. SEM-EDX Ergebnisse	98
9. Zusammenfassung und Ausblick	105
Literaturverzeichnis	126
Anhang	128
A. Substanzen	129
A.1. Nährmedium	129
A.2. Phosphatgepufferte Salzlösung	131
B. NEMeSUS	133
Publikationen	137
Danksagung	143

1. Einleitung

Eisenhaltige Biomineralien werden von einer Vielzahl Organismen ausgebildet. Zu ihnen zählen neben Bakterien auch höhere Organismen wie Bienen, Tauben, Seegurken und Meeresschildkröten [1–5]. Diese Biomineralien dienen beispielsweise der Gewebeverstärkung [6] oder der Festigung von Zähnen [7]. Auch stehen sie im Zusammenhang mit der intrazellulären Eisenspeicherung und den damit eng verbundenen Eisenspeicherkrankheiten, der Entgiftung, sowie der Erfassung von Magnetfeldern [8–12]. Selbst im menschlichen Gehirn konnten magnetische Eisenkristalle nachgewiesen werden [13–15]. Die Biomineralisation magnetischer Minerale, wie sie bei einigen Bakterienspezies zu finden ist, stellt hierbei eines der faszinierendsten Beispiele der Biosynthese dar. Diese magnetotaktischen Bakterien (MTB) nutzen Ketten dieser Minerale, die sogenannte Magnetosomenkette, um Magnetfelder in ihrer Umgebung zu detektieren. Natürlicherweise handelt es sich hierbei um das Magnetfeld der Erde. Unter künstlich geschaffenen Bedingungen kann es sich hierbei jedoch auch um ein von Menschenhand erzeugtes Feld handeln. Diese biologisch hergestellten Magnetosomen zeichnen sich dabei durch ihre Eigenschaften aus, die in vergleichbarer Güte nur schwer durch nicht biologische Prozesse erzielt werden können [16]. Hierzu zählen unter anderem ihre schmale Größenverteilung im Nanometerbereich, ihre speziesabhängige charakteristische Form und die biokompatible Lipidschicht, die jedes Magnetosom umgibt [8, 17]. Diese Charakteristika sind von herausragender Bedeutung für mögliche Anwendungen, insbesondere im Feld der Biotechnologie.

Doch selbst die bloße Existenz der MTB hat Auswirkungen auf die unterschiedlichsten Forschungsdisziplinen. Seit der ersten Beschreibung einer MTB-Spezies 1975 [18] beeinflussten MTB Forschungen reichend von der Mikrobiologie, Biochemie, Mineralogie und Kristallographie über die Geologie, Chemie, Physik, Limnologie, Ozeanographie und Meeresbiologie bis hin zur Astrobiologie [19]. So hat beispielsweise das Auffinden von fossilen Magnetosomen in Tiefseesedimenten [20–23] und Sedimentgestein [24] das Interesse der Paleomagnetiker geweckt. Sie sollen dabei Erkenntnisse über die natürliche, remanente Magnetisierung zur Zeit ihrer Fossilisierung liefern [25]. Derartige fossile

Funde lassen sich dabei auf ein Alter von bis zu 3,4 Milliarden Jahre datieren [26]. Im Zusammenhang hiermit stehen die im Mars-Meteorit ALH84001 gefundenen und bis jetzt kontrovers diskutierten Strukturen [27]. Auch bei ihnen soll es sich um fossile Überreste magnetischer Bakterien handeln. Mit 3,6 Milliarden Jahre wären sie damit älter als vergleichbare, auf der Erde entstandene Strukturen [28]. Inwiefern es sich dabei wirklich um fossile Überreste oder um Produkte rein inorganischer Reaktionen handelt, konnte bis jetzt nicht endgültig geklärt werden [29, 30]. Obwohl dieser Punkt nicht geklärt ist, wurden Magnetosomen und potentielle MTB-Fossilien in der Vergangenheit wiederholt als Biomarker für extraterrestrisches Leben vorgeschlagen [31–33].

Auch abseits der reinen Grundlagenforschung finden die MTB weiteren praktischen Nutzen, insbesondere in den Biowissenschaften und der Medizin. So lassen sie sich für Behandlungen bei der Krebstherapie verwenden [34]. Injiziert in das Tumorgewebe lassen sie sich gezielt bei der magnetischen Hyperthermie mittels magnetischer Wechselfelder erhitzen. Insbesondere pure Magnetosomen versprechen hierbei eine höhere Effizienz als vollständige MTB [16]. Ebenfalls eignen sich die Magnetosomen zum Gentransport und -transfer [35], sowie als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie [36, 37]. Der magnetische Kontrast lässt sich ebenfalls mit ganzen MTB erzielen. Dies bietet den weiteren Vorteil, dass sich MTB tendenziell in der Nähe von Tumoren anreichern, wie sich in Studien mit Mäusen gezeigt hat [38]. Auch zur Behandlung anderer Krankheiten abseits der Krebstherapie lassen sich MTB einsetzen. So ist es generell wichtig, dass die zur Behandlung nötigen Medikamente zielgerichtet an ihren Wirkungsort gelangen und vorzugsweise nur dorthin. Dies ließe sich relativ einfach durch steuerbare Nanoroboter lösen, die Wirkstoffe gezielt deponieren. Da sie sich doppelt so schnell wie beispielsweise *Escherichia coli* aktiv im Blutkreislauf fortbewegen können [39] und dabei auf externe Magnetfelder reagieren sind MTB ideal für diese Aufgabe. In der Diskussion sind sie dabei sowohl als Antriebssystem separater Nanoroboter wie auch als direkter Wirkstoffträger [40, 41].

Für die Umsetzung dieser mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten ist ein besseres Verständnis der magnetischen Eigenschaften der MTB und deren Magnetsinnes wichtig. Dieses kann darüber hinaus helfen, den Magnetsinn anderer Spezies besser zu verstehen und zu ergründen, inwiefern sie wirklich über einen solchen verfügen. So wird beispielsweise seit Jahren darüber diskutiert, ob die langreichweitige Navigation der Tauben mit Hilfe des Schnabels oder der Augen geschieht [1, 42, 43]. Über Vergleiche der magnetischen Partikel im Taubenschnabel mit Befunden der MTB könnte sich klären lassen, ob die prinzipiellen Voraussetzungen für eine Magnetfelddetektion im Schnabel

erfüllt sind. Aufgrund ihrer besonderen Anforderungen hat sich dabei die Kultivierung der MTB als sehr kompliziert herausgestellt [44]. Dies lässt sich auch an der relativ kleinen Zahl der über die Stammsammlungen beziehbaren MTB-Spezies erkennen. Für Untersuchungen der MTB sind daher Präparationsmethoden von Interesse, die sich relativ einfach und ohne besondere Spezialapparaturen durchführen lassen. Nach der Isolation können so die MTB präpariert werden ohne sie für einen weiteren Transport kultivieren zu müssen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es eine derartige Präparationsmethode zu entwickeln. Das sich hieraus ergebene Präparat soll dabei möglichst plan und frei von störenden Rückständen sein. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die hier erfolgenden, weiteren Untersuchungen. So lassen sich bisherige Untersuchungen der MTB grob in zwei Vorgehensweisen unterteilen. Sie geschahen entweder an „freien“ Magnetosomen-Ketten, die aus den MTB extrahiert wurden [45], oder die MTB wurden mittels Prozessen wie der Gefrierätzung [46] gezielt zerstört [47]. Im Unterschied hierzu soll diese Arbeit ergründen, inwiefern die hier entwickelte Präparation Einblicke in intakte MTB gewährt. Mittels Photoemissions-Elektronenmikroskopie (PEEM) soll dabei die eisenhaltige Magnetosomen-Kette in den MTB nachgewiesen werden. Ist dieses erfolgt, soll untersucht werden, inwiefern ein Zugriff auf die magnetischen Eigenschaften der Magnetosomen-Kette mittels PEEM in Kombination mit zirkular polarisiertem Licht möglich ist. Um diese Techniken effektiv nutzen zu können werden spezialisierte Programme benötigt, die hier ebenfalls entwickelt werden. Komplementär hierzu wird Raster-Elektronenmikroskopie kombiniert mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (SEM-EDX) eingesetzt um die Magnetosomen erstmals direkt in den intakten Bakterien abzubilden und chemisch zu analysieren.

Diese Arbeit ist in acht Kapitel gegliedert. Nach dieser Einleitung wird in Kapitel 2 genauer auf die MTB eingegangen und das hier untersuchte *Magnetospirillum magnetotacticum* beschrieben. Thematisiert wird hier ebenfalls der Aufbau und die magnetische Struktur von Magnetit, aus dem die Magnetosomen des *M. magnetotacticum* bestehen. Kapitel 3 widmet sich der Beschreibung der in den Experimenten auftretenden physikalischen Prozesse und Effekte. Hier werden Anregungen mit Photonen und Elektronen, sowie die dazugehörigen Relaxationsprozesse beschrieben. Ebenfalls wird auf den Magnetismus in Festkörpern und den damit verbundenen Dichroismen eingegangen. Kapitel 4 beschreibt die prinzipiellen Wirkungsweisen der beiden hier verwendeten Mikroskoptypen. Zudem sind die unterschiedlichen Kontrast- und Bildmodi Thema dieses Kapitels. Der Aufbau der unterschiedlichen Lichtquellen, sowie der Experimentierstationen wird in Kapitel 5 beschrieben. Auf die Funktionsweise der hier entwickelten

und implementierten Software wird ebenfalls eingegangen. Die Bearbeitung der aufgenommenen Daten beschreibt Kapitel 6. Hier wird ebenfalls diskutiert, wie sich die *M. magnetotacticum* mittels PEEM identifizieren lassen. Mit der Entwicklung und Verbesserung der Präparationstechnik befasst sich das Kapitel 7. Für jeden Präparationsschritt erfolgt des Weiteren eine Analyse und Beurteilung anhand der hier definierten Gütekriterien. Zum Abschluss dieses Kapitels wird eine weitere, abgewandelte Form der Präparation beschrieben, die einen etwas anders gewichteten Kompromiss aus Aufwand und Nutzen darstellt. Die Messergebnisse werden in Kapitel 8 präsentiert und diskutiert. Abschließend wird die Arbeit in Kapitel 9 zusammengefasst und ein Ausblick auf mögliche zukünftige Untersuchungen gegeben.

2. Magnetotaktische Bakterien

Bei den magnetotaktischen Bakterien (MTB) handelt es sich um eine polyphyletische Gruppe von Bakterien. Sie umfasst eine Vielzahl von Prokaryoten unterschiedlicher Morphologien und Metabolismen, die größtenteils zur Abteilung der Proteobacteria gehören. Neben den hier behandelten *Magnetospirillum magnetotacticum* gehören hierzu unter anderem die *Alphaproteobacteria* *M. gryphiswaldense* [48], *M. magneticum* [49], *Magnetofaba australis* (IT-1) [50], *Magnetospira thiophila* (MMS-1) [51], *Magnetococcus marinus* (MC-1) [52] und die *Deltaproteobacteria* *Candidatus Magnetanas* [53], *Desulfovibrio magneticus* (RS-1) [54] und *Candidatus Desulfamplus magnetomortis* (BW-1) [55]. Ihnen allen ist gemein, dass sie mittels Biomineralisation magnetische Nanokristalle ausbilden [56, 57]. Die genaue Zusammensetzung und Morphologie dieser Magnetosomen ist dabei vom jeweiligen Stamm abhängig [58]. Im Allgemeinen bestehen die Magnetosomen entweder aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Greigit (Fe_3S_4), wobei einige Spezies auch beide Formen ausbilden können [59, 60]. Im Inneren der Bakterien bilden die in der Größenordnung von typischerweise 50 nm liegenden Magnetosomen eine oder mehrere Ketten aus. Die magnetotaktischen Bakterien nutzen diese Magnetosomen-Ketten zur Detektion magnetischer Felder, insbesondere das der Erde.

So herrschen in Tiefen nahe der Oxisch-Anoxischen Übergangs-Zone (Oxic-Anoxic Transition Zone, OATZ) der ideale Sauerstoffgehalt für das Wachstum der Bakterien. Die Magnetotaxis hilft den MTB diesen für sie idealen Lebensräumen aufzufinden. Da die Bakterien hierzu ebenfalls die Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung detektieren, spricht man heutzutage präziser von einer Magneto-Aerotaxis. Im Allgemeinen sind Bakterien dabei nicht fähig Sauerstoffgradienten in ihrer Umgebung direkt zu detektieren. Nicht magnetotaktische Bakterien, die lediglich die Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung detektieren, führen daher eine Bewegung in eine zufällige Richtung durch [61]. Sie detektieren dabei regelmäßig die Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung. Ändert sich während dieser Bewegung der Gehalt zu ihren Gunsten, so ist es wahrscheinlicher, dass die Bewegung in diese Richtung beibehalten wird. Ansonsten variiert das Bakterium seine Bewegungsrichtung zufällig im dreidimensionalen Raum. Die MTB reduzieren

diese drei Freiheitsgrade auf einen, indem sie sich parallel zu den Feldlinien des Erdmagnetfeldes bewegen. In den meisten Regionen unterscheidet sich der Inklinationwinkel dieser Feldlinien deutlich von Null. Somit weisen sie eine Komponente parallel zum Gradienten der mit der Tiefe abnehmenden Sauerstoffkonzentration auf [62], was der Migrationsachse der MTB entspricht.

Die Magneto-Aerotaxis lässt sich grob in zwei Varianten unterteilen [63]. Bei der polaren Magneto-Aerotaxis bewegen sich die Bakterien entlang einer Vorzugsrichtung. Ob diese Vorzugsrichtung parallel oder antiparallel zu den Feldlinien verläuft hängt davon ab, ob die Bakterien von der nördlichen oder südlichen Hemisphäre stammen. Bei polaren magneto-aerotaktischen Bakterienarten wird daher zwischen nord- und südsuchenden Varianten unterschieden [64]. Diese Bakterien kehren ihre Bewegungsrichtung erst beim Eintritt in Schichten mit zu geringer Sauerstoffkonzentration um. Eine erneute Umkehr findet erst beim Erreichen von Bereichen zu hoher Sauerstoffkonzentration statt. Ein Vertreter dieser Variante der Magneto-Aerotaxis ist *Magnetococcus marinus* (MC-1).

Bei der axialen Magneto-Aerotaxis ist eine Unterteilung in nord- und südsuchende Varianten nicht nötig. Diese Bakterien detektieren durchgängig den Sauerstoffgehalt ihrer Umgebung. Ändert sich dieser zu ihrem Nachteil, so kehren sie ihre Bewegungsrichtung um, ansonsten wird sie beibehalten. Sie verfügen demnach nicht über ein hemisphärenabhängige Vorzugsrichtung wie polare MTB. Vertreten wird dieser Variante der Magneto-Aerotaxis beispielsweise durch das *Magnetospirillum magnetotacticum*.

Die Gründe weshalb es diese beiden unterschiedlichen Varianten der Magneto-Aerotaxis existieren ist bisher noch ungeklärt [65]. Neuere und detailliertere Betrachtungen des Verhalten der MTB deuten darüber hinaus auf die Existenz deutlich differenzierter Untervarianten der Magneto-Aerotaxis hin [66].

2.1. Das *Magnetospirillum magnetotacticum*

Beim *Magnetospirillum magnetotacticum* handelt es sich um die erste jemals entdeckte magneto-aerotaktische Bakterienart [18]. Die ursprüngliche Beschreibung erfolgte dabei als *Aquaspirillum magnetotacticum* [67], später wurde sie der neu etablierten Gattung *Magnetospirillum* gen. nov. zugeordnet [68]. Wie in Abbildung 2.1 zu erkennen ist, verfügen sie über einen schraubenförmig geschwungene Körper. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt circa 0,32 μm bei einer mittleren Länge von ungefähr 4,3 μm . Letztere sowie die

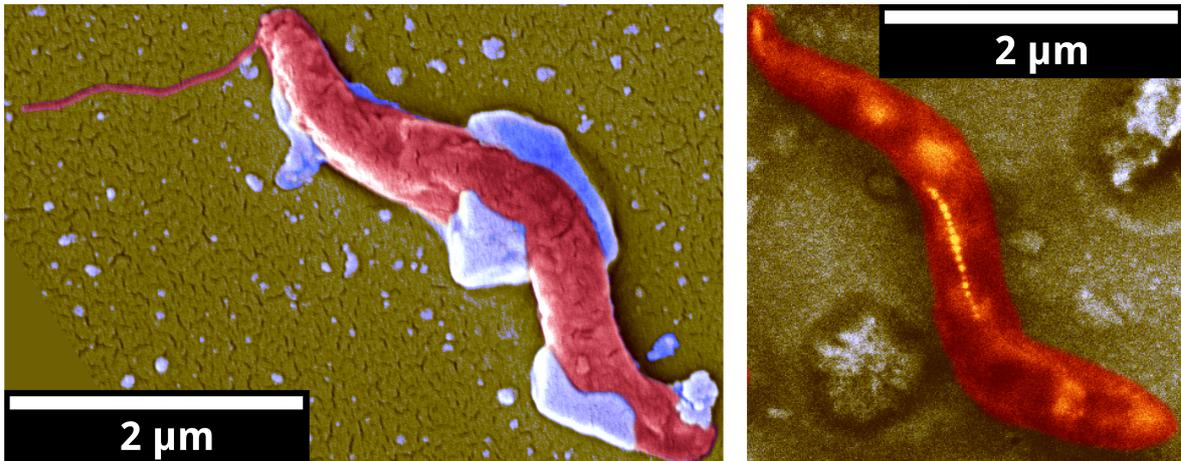


Abbildung 2.1.: SEM-Aufnahmen von *M. magnetotacticum*. Die Bakterien liegen in ihrer charakteristischen doppelten „S“-Form auf einem Silizium-Substrat. Links ist dank einer Goldbeschichtung auch eine der polaren Flagellen zu erkennen. Im rechten Bild ist die Magnetosomen-Kette gut zu erkennen, mit den einzelnen Magnetosomen als helle Punkte in der Mitte des Bakteriums.

Anzahl der Windungen variiert dabei sehr stark von Individuum zu Individuum [69]. Dem Antrieb des *M. magnetotacticum* dient eine amphitriche Begeißelung mit je einem Flagellum pro Zellpol. Ihre Magnetosomen bestehen aus Magnetit Kristallen mit Durchmessern von typischerweise 40 nm bis 45 nm [16].

M. magnetotacticum bevorzugt als mikroaerophiles Bakterium Sauerstoffkonzentration die unterhalb der an der Luft-Medium-Grenzschicht auffindbaren liegen. Einen kompletten Sauerstoffausschluss, wie ihn obligat anaerobe Bakterien benötigen, ist *M. magnetotacticum* jedoch genauso wenig zuträglich wie eine zu hohe Sauerstoffkonzentration. Mittels der Magneto-Aerotaxis können sie die dünne Schicht idealer Sauerstoffkonzentration auffinden. Diese Schicht liegt zwischen den Schichten, in denen sich die obligat aerophilen und obligat anaeroben Bakterien ansammeln, wie in Abbildung 2.2 gezeigt.

In etwa 19% jeder *M. magnetotacticum*-Population besitzen dabei nicht die Möglichkeit Magnetosomen auszubilden [69]. Dieses Fehlen der Magnetosomen lässt sich leicht in Abbildung 2.3 erkennen. Hier sind drei mikroskopische Aufnahmen einer Video-Sequenz gezeigt. Während sich die meisten Bakterien entlang des veränderlichen, externen Magnetfeld ausrichten (weiße Pfeile) gibt es einige Individuen die ihre Orientierung beibehalten. Um dennoch die Bereiche idealer Sauerstoffkonzentration aufzufinden,

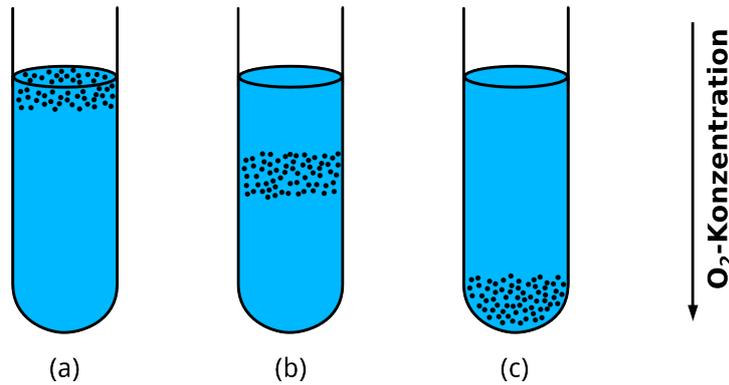


Abbildung 2.2.: Das Verhalten aerober und anaerober Bakterien. Obligat aerophile Bakterien (a) häufen sich an der Luft-Medium-Grenzschicht an. Mikroaerophile Bakterien (b) suchen die reduzierte Sauerstoffkonzentration der OATZ. Obligat anaerobe Bakterien (c) minimieren die Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung.

greifen diese Bakterien auf die pure Aerotaxis zurück. Neben diesen prinzipiell nicht zur Magnetosomen-Ausbildung fähigen Bakterien kann es auch in anderen Individuen jeder MTB-Spezies zum Fehlen der Magnetosomen kommen [70–73]. Dies kann durch eine zu geringe Eisenkonzentration in der Umgebung verursacht werden, so dass die Grundbestandteile der Magnetosomen nicht in hinreichenden Mengen vorhanden sind. Auch eine zu hohe Sauerstoffkonzentration kann zum nicht Entwickeln der Magnetosomen führen [74].

2.2. Magnetit

Da Magnetit ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4$) der Hauptbestandteil der Magnetosomen des *M. magnetotacticum* ist, soll nun kurz auf dessen Struktur eingegangen werden. Magnetit gehört zur Gruppe der Spinelle, die sich durch eine Verbindung des Typus AB_2O_4 auszeichnen [75]. Hierbei bezeichnen A und B Metallkationen, deren aufsummierte Oxidationszahl 8 entspricht [76].

In Abbildung 2.4 ist der Aufbau der Magnetit-Einheitszelle gezeigt. Die Sauerstoffanionen sind hierin in einem kubisch flächenzentriertem (fcc) Gitter angeordnet. Seine Gitterkonstante ($a_{\text{fcc}} = 4,2 \text{ \AA}$) ist dabei halb so groß wie die der Magnetit-Einheitszelle ($a_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 8,4 \text{ \AA}$) [77]. Im Weiteren können hier zwei Arten von Gitterlücken unterschied-

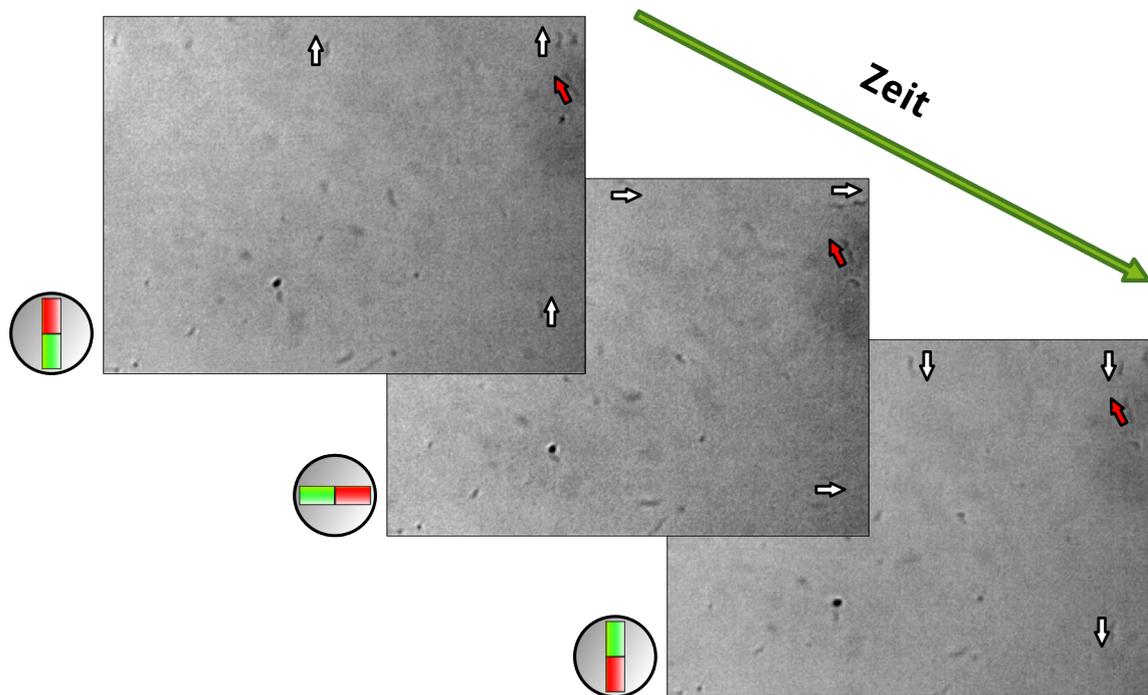


Abbildung 2.3.: Einfluss eines externen, magnetischen Feldes auf *M. magnetotacticum* unter dem Lichtmikroskop. Die drei Bilder einer Videosequenz zeigen wie die Bakterien (dunkel) auf ein veränderliches Magnetfeld reagieren. Die Richtung des Feldes ist dabei durch die Stabmagnete angedeutet. Die meisten Bakterien richten sich entlang des Feldes aus (weiße Pfeile). Einige wenige reagieren nicht auf die Feldänderung (roter Pfeil).

den werden. Zentral in der Sauerstoffgitterzelle, sowie in der Mitte der Kanten des fcc-Gitters finden sich oktaedrische Gitterlücken. Tetraedrische Gitterlücken befinden sich in der unmittelbaren Umgeben der Sauerstoffanionen in den Gitterecken. Ein Achtel diese tetraedrischen Gitterplätze wird von Eisenionen besetzt. Die Gesamtheit dieser besetzten tetraedrischen Gitterplätze wird als A-Untergitter bezeichnet. Die verbleibenden Eisenionen besetzen jede zweite oktaedrische Gitterlücken und spannen so das B-Untergitter auf [78]. Bei einem „normalen“ Spinell würden diese A- und B-Untergitter ausschließlich von den jeweiligen A- und B-Ionen aus der chemischen Formel besetzt werden. Bei Magnetit handelt es sich jedoch um ein „inverses“ Spinell [79]. Bei ihm wird das A-Untergitter von der Hälfte der Fe^{3+} -Kationen bevölkert. Das B-Untergitter wird demnach von der verbleibenden Hälfte der Fe^{3+} -Kationen sowie den Fe^{2+} -Kationen besetzt [80]. Um dies in Einklang mit der allgemeinen Spinell Summenformel AB_2O_4 zu bringen, wird Magnetit auch als $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]\text{O}_4$ geschrieben [81].

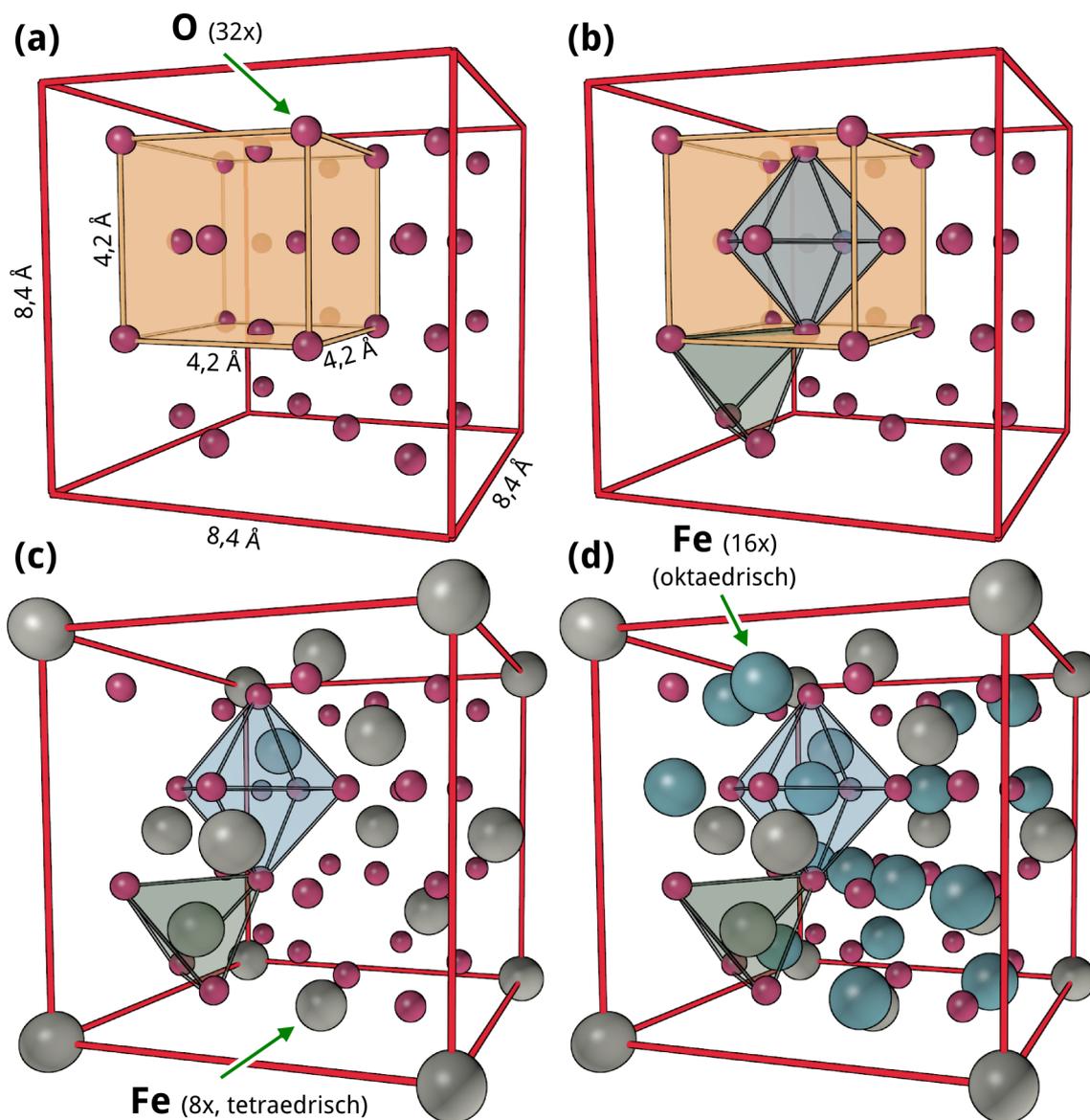


Abbildung 2.4.: Aufbau der Magnetit-Einheitszelle ($a_{\text{Fe}_3\text{O}_4} = 8,4 \text{ \AA}$) (rot). (a) Die Sauerstoff-Atome sind in einer fcc-Struktur ($a_{\text{fcc}} = 4,2 \text{ \AA}$) (orange) angeordnet. (b) Im Zentrum dieser fcc-Struktur findet sich ein oktaedrischer Gitterplatz (blau). Die oktaedrischen Gitterplätze in der Mitte der Kanten des fcc-Gitters sind nicht eingezeichnet. Um die Gitterecken befinden sich tetraedrische Gitterplätze (grün). (c) Ein Achtel dieser tetraedrischen Gitterplätze wird durch Eisen-Atome besetzt. (d) Jeder zweite oktaedrische Gitterplatz wird ebenfalls von einem Eisen-Atome besetzt.

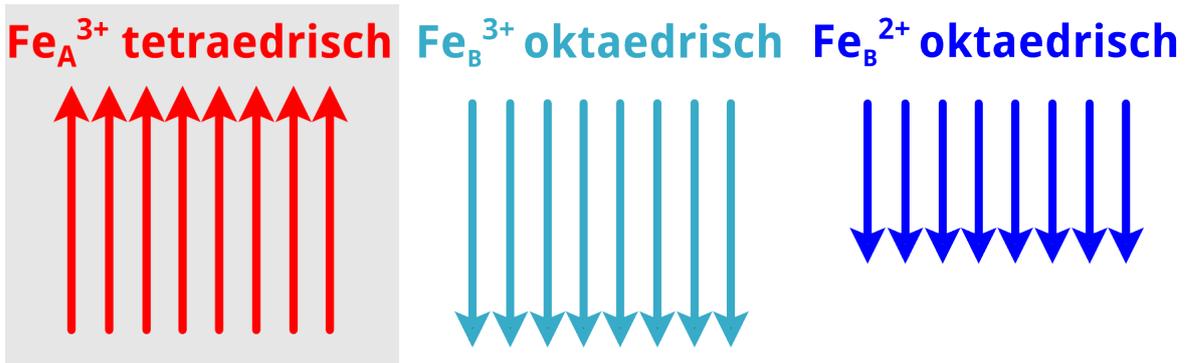


Abbildung 2.5.: Ausrichtung der magnetischen Momente in den beiden Magnetit Untergittern. Jeder Pfeil steht dabei für ein Atom in der Einheitszelle. Die Pfeillänge gibt dabei qualitativ die Stärke des magnetischen Momentes wieder. Die magnetischen Momente des A-Untergitters (rot) sind entgegengesetzt denen des B-Untergitters (türkis, blau) ausgerichtet. Innerhalb der einzelnen Untergitter sind die magnetischen Momente parallel ausgerichtet.

Die magnetischen Eigenschaften des Magnetits ergeben sich nun aus dem Zusammenwirken der beiden Untergitter. Das A- und B-Untergitter koppeln antiferromagnetisch aneinander, was zu einer antiparallelen Ausrichtung der jeweiligen magnetischen Momente führt [82]. Innerhalb der Untergitter sind die magnetischen Momente der Ionen parallel zueinander ausgerichtet [83]. Anhand eines rein ionischen Modells kann das magnetische Verhalten des Magnetits relativ einfach beschrieben werden. Die fünf d-Elektronen der Fe^{3+} -Kationen führen dabei zu einem magnetischen Moment von $5 \mu_B$ [78]. Bei den Fe^{2+} -Kationen kompensieren sich die Spins zweier der sechs d-Elektronen gegenseitig. Effektiv liefern die übrigen vier Elektronen somit einen Beitrag von $4 \mu_B$. Die Beiträge der Fe_A^{3+} -Kationen und der Fe_B^{3+} -Kationen kompensieren sich aufgrund der antiferromagnetischen Ausrichtung der beiden Untergitter, wie in Abbildung 2.5 gezeigt. Makroskopisch bleibt somit lediglich der Beitrag der Fe_B^{2+} -Kationen von $4 \mu_B$ übrig, was mit Tieftemperaturmessungen gut übereinstimmt [84]. Für eine genauere Quantifizierung ist eine nähere Betrachtung nach der Kristallfeld-Theorie [85, 86] nötig, da die Bahndrehmomente nicht vollständig verschwinden [87]. An der hier wichtigen antiparallelen Ausrichtung der Untergitter und dem Ferrimagnetismus des Magnetits ändert dies nichts [78]. Kleine Magnetitkristalle mit Durchmessern zwischen 30 nm und 80 nm bilden zudem lediglich eine magnetische Domäne aus [88, 89]. Da die hier betrachteten Magnetosomen genau in diesem Größenbereich liegen, kann auch bei ihnen von eindomänigen Partikeln ausgegangen werden.

3. Theoretische Grundlagen

Bei der Photoemissions-Elektronenmikroskopie wie auch der Raster-Elektronenmikroskopie ist die Wechselwirkung zwischen anregendem Signal und der Probe von Bedeutung. Daher soll im Folgenden auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen in der Probe bei Anregung mit Röntgenstrahlung wie auch mit Elektronen eingegangen werden. Da die der Anregung folgenden Relaxationsprozesse ebenfalls für die in dieser Arbeit benutzten Techniken von Bedeutung sind, wird sich dieser hier ebenfalls gewidmet.

3.1. Photoemission

Die Basis der Photoemissions-Elektronenmikroskopie stellt der photoelektrische Effekt oder Hallwachseffekt dar. Er wurde 1887 von Heinrich Hertz und Wilhelm Hallwachs bei einem Experiment zur Ausbreitung von elektromagnetischen Wellen entdeckt [90, 91]. Erst nach der Entdeckung des Elektrons [92] gelang Albert Einstein die theoretische Beschreibung [93] des Effektes. Hierzu führte Einstein eine diskrete Quantisierung des Lichtes in einzelne Photonen ein [94]. Die Energie eines Photons ist dabei als Produkt der Lichtfrequenz ν und des Planck'schen Wirkungsquantums h gegeben. Um ein Elektron aus dem Festkörper zu lösen muss das Photon genug Energie zur Verfügung stellen, um die Bindungsenergie des Elektrons E_B sowie die Austrittsarbeit der Probe ϕ_0 zu überwinden. Beide Energien werden dabei relativ zur Fermi-Energie E_F angegeben. Die Austrittsarbeit gibt dabei den Abstand zur Vakuum-Niveau E_V an. Jede über die Summe aus Bindungsenergie und Austrittsarbeit hinaus gehende Energie wird dem Elektron als kinetische Energie E_{kin} zur Verfügung gestellt. Hierfür ergibt sich somit die photoelektrische Gleichung:

$$E_{\text{kin}} = h\nu - \phi_0 - E_B. \quad (3.1)$$

Bei Anregung mit monochromatischem Licht $h\nu$ können Elektronen aus Zuständen bis zu $E_B = h\nu - \phi_0$ aus der Probe austreten. Dies ist in Abbildung 3.1 zusammen mit der sich daraus ergebenden Verteilung der kinetischen Energien der Elektronen gezeigt. Elektronen aus stärker gebundenen Zuständen weisen dabei nach Gleichung (3.1) geringere kinetische Energien auf als schwächer gebundene Elektronen, wie beispielsweise aus dem Valenzband. Da die Bindungsenergien der einzelnen Niveaus sowohl elementspezifisch sind, als auch von den Bindungspartnern abhängen, lassen sich aus der Verteilung der kinetischen Energien der Elektronen Aussagen über die chemische Zusammensetzung des Festkörpers treffen.

Reicht die Energie des Photons nicht aus um ein gebundenes Elektron in einen Vakuumzustand anzuregen, so besteht die Möglichkeit es in einen unbesetzten Zustand oberhalb

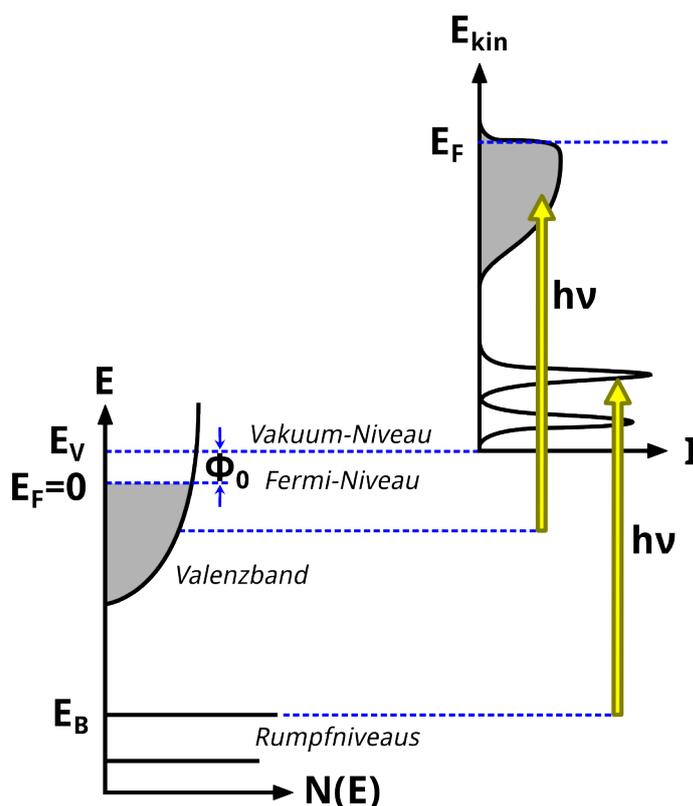


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung der Entstehung eines Photoemissionsspektrums. Die Bindungsenergien der Elektronen im Festkörper sind auf der linken Seite relativ zum Fermi-Niveau dargestellt. Das Spektrum der kinetischen Energie der mit monochromatischem Licht ins Vakuum angeregten Elektronen ist auf der rechten Seite gezeigt (Nach [95]).

der Fermi-Energie anzuregen. Hierzu muss das Photon lediglich die Energiedifferenz zwischen Bindungszustand und unbesetztem Zustand zur Verfügung stellen.

Beide Fälle resultieren in einem unbesetzten, kernnahen Zustand. Da dies energetisch ungünstig ist, wird dieser durch Relaxation eines Elektrons aus einer höheren Schale aufgefüllt [95]. Hierbei wird die Energiedifferenz

$$\Delta E = E_i - E_f \quad (3.2)$$

zwischen der Bindungsenergie des relaxierenden Elektrons E_i und der Bindungsenergie des unbesetzten Zustandes E_f frei. Diese Energie wird durch zwei konkurrierende Prozesse abgeführt. Bei dem in Abbildung 3.2 (b) gezeigten Auger-Meitner-Effekt wird die Energie genutzt um ein schwächer gebundenes Auger-Elektron ($E_B^{\text{Auger}} \leq \Delta E$)

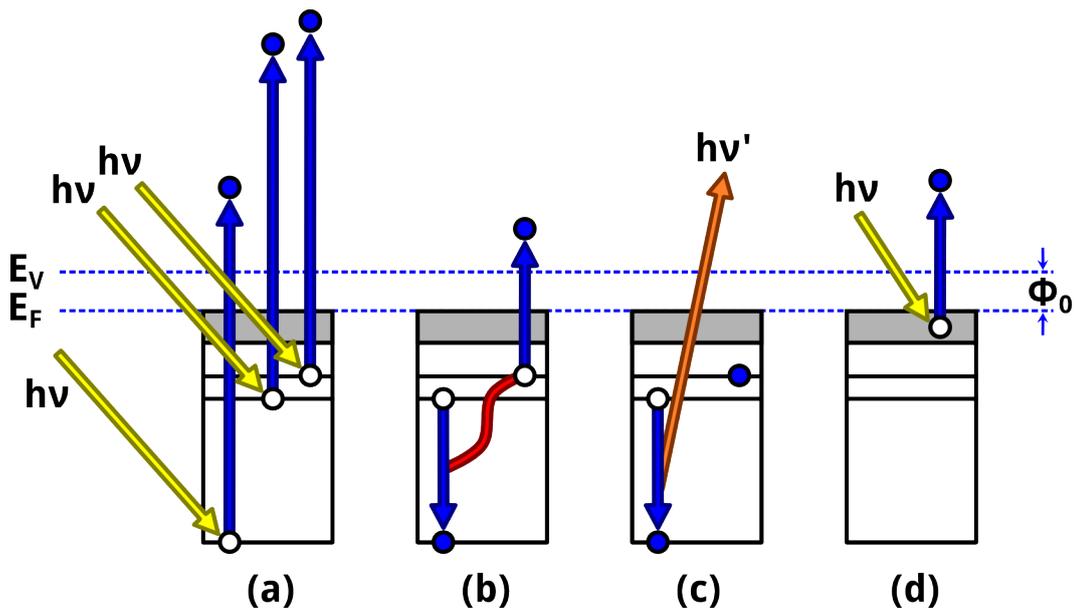


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung der bei der Photoemission auftretenden Prozesse. Energiereiche Photonen ($h\nu$) können kernnahe Elektronen in Vakuumzustände anregen (a). Die bei der Besetzung der so entstandenen Vakanz freiwerdende Energie wird beim Auger-Meitner-Effekt (b) zur Emission eines weiteren Elektrons genutzt. Konkurrierend hierzu kann die freiwerdende Energie als charakteristische Röntgenstrahlung ($h\nu'$) (c) abgegeben werden. Photonen ($h\nu$) können auch Elektronen aus dem Valenzband (grau) anregen, wobei die Relaxationsprozesse (b,c) nicht auftreten.

auszulösen [96,97]. Alternativ wird bei der Fluoreszenzstrahlung die Energie als ein Photon mit $h\nu' = \Delta E$ emittiert [98]. Diese Prozesse treten lediglich auf, sofern ein kernnaher Zustand unbesetzt ist (Abbildung 3.2 (a)). Wird ein Elektron direkt aus dem Valenzband angeregt (Abbildung 3.2 (d)), so treten diese Prozesse nicht auf. Der Auger-Meitner-Effekt und die Fluoreszenzstrahlung treten stets nebeneinander auf. Für Elemente mit Kernladungszahlen unter $Z = 30$ dominiert dabei der Auger-Meitner-Effekt. Die Fluoreszenzstrahlung überwiegt hingegen bei schwereren Elementen mit Kernladungszahlen oberhalb von $Z = 60$ [99].

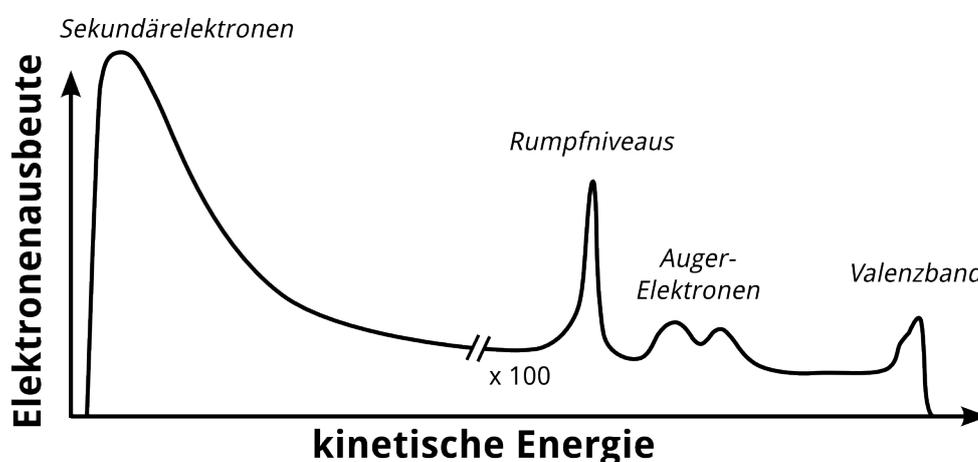


Abbildung 3.3.: Das Spektrum der kinetischen Energie, der nach Anregung mit monochromatischem Licht aus dem Festkörper austretenden Elektronen. Die Beiträge der Sekundärelektronen sind so stark, dass der Bereich des Valenzbandes, der Auger- und der Rumpfelektronen vergrößert dargestellt ist.

Bei Anregung mit monochromatischem Licht werden somit Elektronen aus dem Festkörper emittiert, deren kinetische Energie wie in Abbildung 3.3 gezeigt verteilt ist. Photoelektronen und Auger-Elektronen können dabei aufgrund ihrer unterschiedlichen Freisetzungsprozesse unterschieden werden. So ist die kinetische Energie der Auger-Elektronen nach Gleichung (3.2) ausschließlich durch die an der Relaxation beteiligten Zustände gegeben. Die kinetische Energie der Photoelektronen hängt hingegen nach Gleichung (3.1) maßgeblich von der Photonenenergie ab. Bei einer Variation der anregenden Photonenenergie ändert sich somit die Positionen der Rumpfniveau- und Valenzband-Signale im Spektrum. Die Beiträge der Auger-Elektronen bleibt hingegen in ihrer Energie fest. Im Folgenden soll nun noch auf den Ursprung der ebenfalls eingezeichneten Sekundärelektronen eingegangen werden.

3.2. Inelastische Streuung

Die im vorangegangenen Abschnitt 3.1 beschriebenen Elektronen verlassen die Probe nur mit den beschriebenen kinetischen Energien, sofern sie nicht vorher inelastisch gestreut werden. Diese inelastische Streuung ist über die inelastische mittlere freie Weglänge λ gegeben. Sie gibt an, nach welcher Strecke die Anzahl der ungestreuten Elektronen auf den Faktor $1/e$ abgefallen ist. Mit der Schichtdicke d und der Anzahl der dort freigesetzten Elektronen I_0 ist die Anzahl der nicht inelastisch gestreuten Elektronen somit gegeben als:

$$I(d) = I_0 \exp\left(\frac{-d}{\lambda}\right). \quad (3.3)$$

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, zeigt die inelastische mittlere freie Weglänge für die meisten anorganischen Stoffe keine elementspezifische Abhängigkeit. Vielmehr hängt sie von der kinetischen Energie der Elektronen ab, weshalb dieser Verlauf auch als universelle Kurve bezeichnet wird. Im Bereich niedriger Energien dominieren hier Ein-Elektronen-Anregungen während Plasmonen-Anregungen für höhere Energien den dominierenden Streuprozess darstellen [95]. Dieses führt zu einem Minimum der universellen Kurve bei ungefähr 50 eV bis 80 eV und einer inelastischen mittleren freien

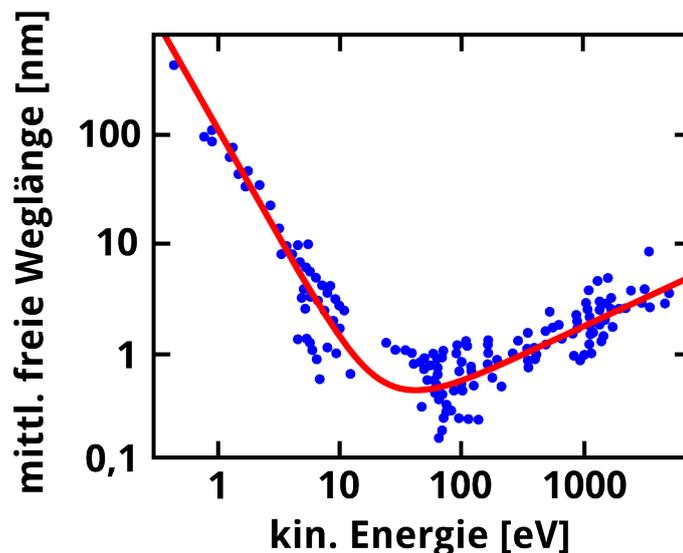


Abbildung 3.4.: Inelastische mittlere freie Weglänge von Elektronen in Abhängigkeit ihrer kinetischen Energie. Die Meßwerte wurden für unterschiedliche Elemente gemessen und folgen der sogenannten universellen Kurve (nach [100]).

Weglänge von etwa 5 \AA . Diese inelastischen Streuprozesse liefern langsame Elektronen, die als Sekundärelektronen bezeichnet werden. Ihre Anzahl ist dabei bis in Tiefen von etliche Nanometern proportional zum Absorptionsquerschnitt der elektromagnetischen Strahlung [101, 102], worauf in Kapitel 3.3 genauer eingegangen wird. Damit liefern sie Informationen über tiefer liegende Schichten, die aus der Emission von direkt emittierten Photoelektronen nicht zugänglich sind.

3.3. Röntgenabsorptionsspektroskopie

Bei der Röntgenabsorptionsspektroskopie (x-ray absorption spectroscopy, XAS) wird die Absorption der Probe abhängig von der Photonenenergie gemessen. Dies kann direkt aus dem Verhältnis des transmittierten Strahls relativ zur eingehenden Strahlung geschehen, wie bei der Röntgentransmissions-Mikroskopie (x-ray transmission microscopy, XTM) [103]. Hierfür wird eine dünne Probe benötigt, so dass es nicht zur vollständigen Absorption der Röntgenstrahlung kommt [104].

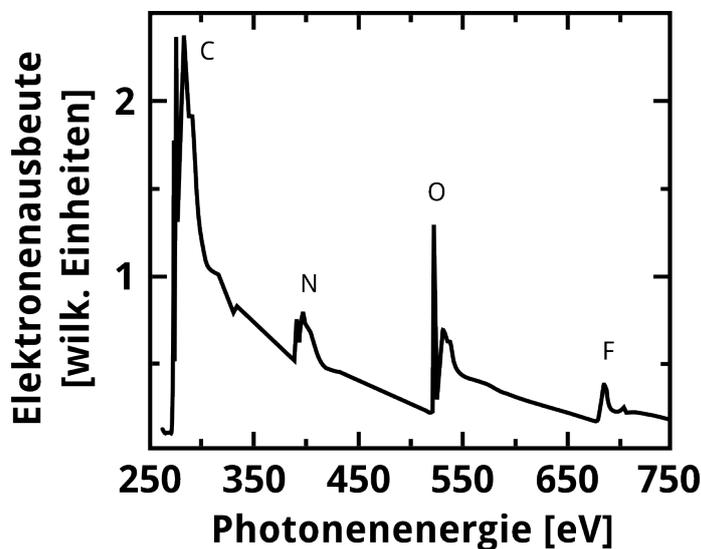


Abbildung 3.5.: Beispiel eines XAS-Spektrum (Polymid) mit elementenspezifischen Absorptionskanten (nach [105]).

Stehen derart dünne Proben nicht zur Verfügung, so kann die Absorption auch anhand der Elektronenausbeute (electron yield) indirekt gemessen werden [106]. Dies geschieht beispielsweise bei der Photoemissions-Elektronenmikroskopie [107]. Über

den Photoeffekt werden hierbei kernnahe Elektronen in einen unbesetzten, gebundenen Zustand angeregt. Die nachfolgende Relaxation setzt Auger-Elektronen frei, die wiederum Sekundärelektronen durch inelastische Stöße generieren. Die Anzahl dieser Elektronen aufgetragen gegen die Photonenenergie ergibt ein Spektrum wie es in Abbildung 3.5 gezeigt ist. Dabei entspricht das Signal jeder Energie dem Integral eines wie in Abbildung 3.3 gezeigten Spektrums. Den dominanten Beitrag liefern dabei die Sekundärelektronen, deren Ausbeute die anderen elektronischen Beiträge um Größenordnungen übersteigt [105]. Auf diese Sekundärelektronen beschränkt sich die Detektion beim PEEM. Wie in Kapitel 4.1 eingehend beschrieben wird, fungiert die Elektronenoptik des PEEM als energetischer Tiefpass. Somit werden lediglich die in Abbildung 3.6 hervorgehobenen Sekundärelektronen im PEEM zur Abbildung genutzt [105].

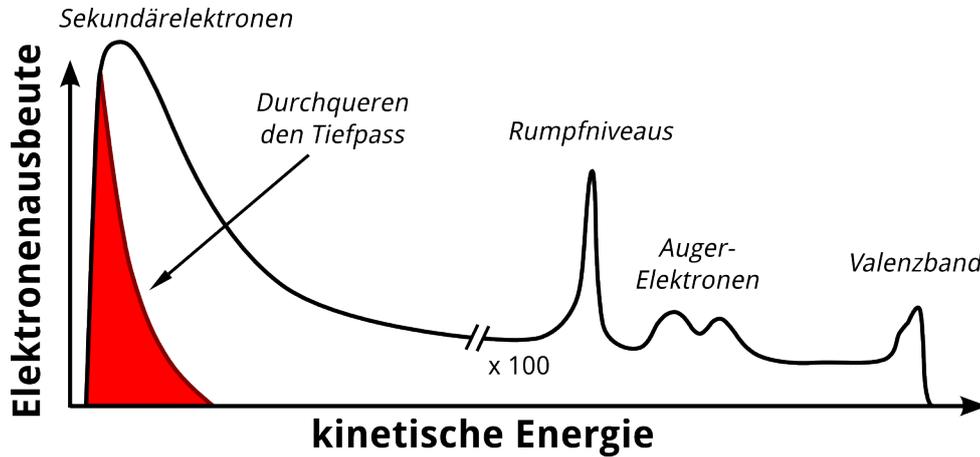


Abbildung 3.6.: Skizze der durch Photoemission und nachfolgende Prozesse aus dem Festkörper emittierten Elektronen. Lediglich die langsamen Elektronen (rot) werden beim PEEM genutzt.

Die einzelnen XAS-Signale lassen sich elementspezifischen, elektronischen Übergängen zuordnen [106]. Werden Photonen einer Energie $h\nu$ absorbiert, so gilt Fermis Goldene Regel [108]:

$$I(h\nu) \propto \sum_{i,f} \int_{\text{BZ}} d^3k M_{fi}^2 \delta(E_f(\mathbf{k}) - E_i(\mathbf{k}) - h\nu) \mathcal{F}(E_i(\mathbf{k})) [1 - \mathcal{F}(E_f(\mathbf{k}))]. \quad (3.4)$$

Die Summe und das Integral laufen dabei über die Anfangs- (i) und Endzustände (f), beziehungsweise die Brillouinzone (BZ). Die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen Anfangs- und Endzustand ist dabei durch das Übergangsmatrixelement M_{fi}^2 gegeben.

Die Delta-Distribution garantiert die Energieerhaltung. Die beiden Fermi-Funktionen \mathcal{F} sorgen schließlich dafür, dass nur Übergänge von besetzten Anfangszuständen in unbesetzte Endzustände berücksichtigt werden. Nach Gleichung (3.4) kommt es daher zu einer besonders starken Absorption, wenn die Energie des Photons gerade der Energiedifferenz zwischen einem besetzten und einem unbesetzten Zustand jeweils großer Zustandsdichte entspricht. Dabei sind nicht alle Übergänge quantenmechanisch erlaubt. Abhängig davon ob das Übergangsmatrixelement M_{fi}^2 verschwindet oder nicht lassen sich folgende Auswahlregeln aufstellen [109]:

$$\Delta l = \pm 1 \quad (3.5)$$

$$\Delta m_J = 0, \pm 1. \quad (3.6)$$

Die Drehimpulsquantenzahl l muss sich bei einem erlaubten Übergang um eins ändern. Für die magnetischen Quantenzahl m_J gibt es zwei unterscheidbare Fälle. Bei einer Anregung mit linear polarisierter Strahlung bleibt die magnetischen Quantenzahl unverändert. Erfolgt eine Anregung mit zirkular polarisierter Strahlung, ändert sich die magnetische Quantenzahl um eins, abhängig von der jeweiligen Helizität der Strahlung.

Für die Bezeichnung dieser XAS-Signale existieren zwei Notationen. So entspricht beispielsweise die Anregung des $2p_{1/2}$ -Niveaus einer L_2 -Resonanz. Wie in Gleichung (3.4) zu erkennen ist, tragen auch die unbesetzten Zustände zur Signalform bei, da die kernnahen Elektronen lediglich über die Fermi-Energie aber nicht über die Vakuum-Niveau angeregt werden [110]. Mit einer steigenden Kernladungszahl und damit zunehmend volleren Valenzbandzuständen, lassen sich daher Verringerungen der Signalintensität feststellen. Darüber hinaus beeinflusst auch die Elementkonzentration die Signalintensität [111]. Neben den Übergängen in d-artige Zustände liefern auch die nach Gleichung (3.5) erlaubten Übergänge in s-artige Zustände einen Beitrag zum Absorptionsspektrum.

Die Komposition eines Absorptionssignals soll anhand der in Abbildung 3.7 gezeigten $L_{2,3}$ -Resonanzen verdeutlicht werden. Nach Gleichung (3.4) stellt das Absorptionsspektrum im wesentlichen eine Faltung der Zustandsdichten der besetzten, rumpfnahen Zuständen mit den unbesetzten Valenzband-Zuständen dar. Im hier gezeigten Beispiel ist die Zustandsdichte des $2p_{3/2}$ -Zustandes größer als die des $2p_{1/2}$ -Zustandes. Aus diesem Grunde weist die L_3 -Resonanz eine höhere Intensität als die L_2 -Resonanz auf. Zu beachten ist dabei, dass für eine Anregung aus dem schwächer gebundenen $2p_{3/2}$ -

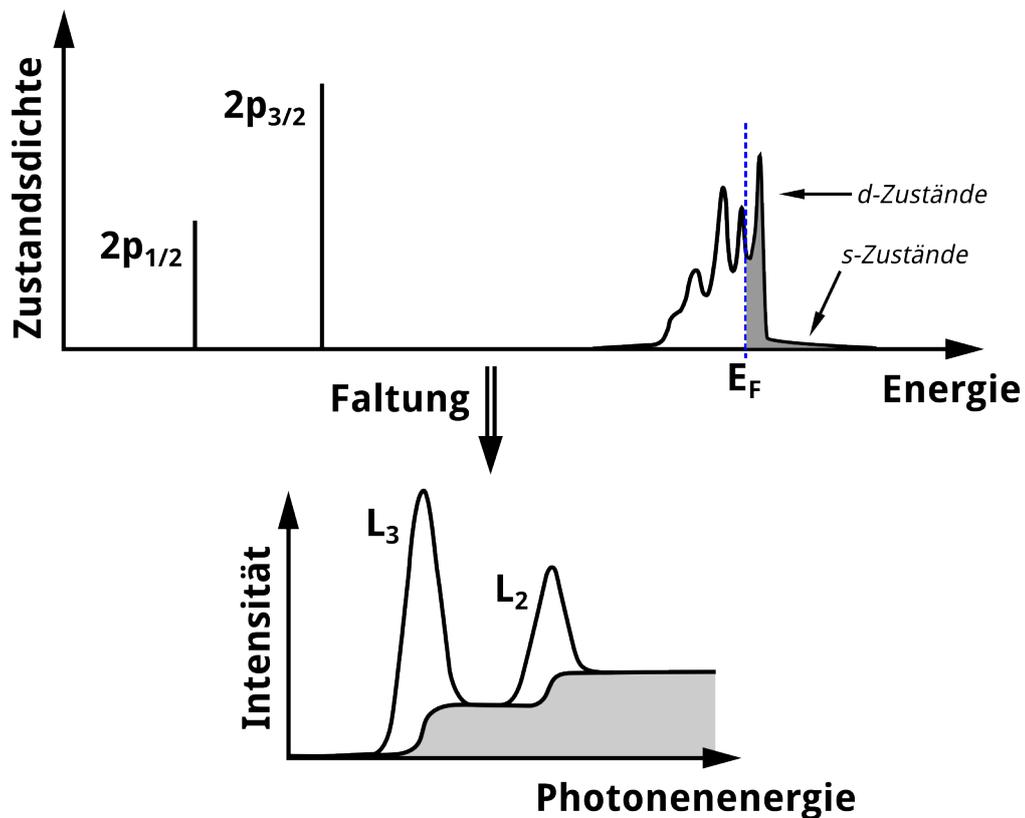


Abbildung 3.7.: Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines Absorptionsspektrums (unten). Bei der Absorptionsspektroskopie werden Elektronen aus besetzten Rumpfniveaus in unbesetzten Valenzbandzustände angeregt. Die Intensität des Absorptionsspektrums hängt dabei von der Faltung der Zustandsdichten (oben) der besetzten Anfangszustände (links, $2p_{1/2}$, $2p_{3/2}$) und der unbesetzten Endzustände (rechts, dunkelgrau) ab. Hierbei tragen die unbesetzten, d-artigen Valenzbandzustände zu den beiden L-Absorptionskanten bei. Der stufenförmigen Untergrund (hellgrau) ergibt sich dabei aus dem Beitrag der s-artigen Valenzbandzustände.

Zustand weniger Energie nötig ist und die korrespondierende L_3 -Resonanz daher bei kleineren Photonenergie auftritt als die L_2 -Resonanz. Die Übergänge in s-Zustände tragen hier als stufenförmiger Untergrund zum Absorptionssignal bei [112]. Wegen der sphärischen Symmetrie der s-Zustände tragen diese Signalkomponenten nicht zur magnetischen Informationsgewinnung bei, wie sie in Kapitel 3.6 beschrieben wird.

3.4. Anregung durch Elektronen

Neben der bis hierhin beschriebenen Anregungen mit Photonen, lässt sich ein Festkörper auch mit hochenergetischen Elektronen anregen. Hierbei treten viele der oben beschriebenen Effekte ebenfalls auf, wie beispielsweise die Röntgenfluoreszenz und der Auger-Meitner-Effekt. Im Folgenden soll daher kurz auf die Besonderheiten bei einer Anregung mit Elektronen eingegangen werden.

Das vom Elektronenstrahl angeregte Volumen ist abhängig vom Elektronenfluss, der kinetischen Energie der Elektronen sowie der Ordnungszahl des Probenmaterials. Qualitativ entspricht es dabei der in Abbildung 3.8 gezeigten Tropfenform. Die Eindringtiefe x der Elektronen und die Breite y des angeregten Volumens lassen sich dabei mit folgenden, empirischen Formeln abschätzen [113]:

$$x/\mu\text{m} = \frac{0,1 \cdot (E_0/\text{keV})^{1,5}}{\rho/\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} \quad (3.7)$$

$$y/\mu\text{m} = \frac{0,077 \cdot (E_0/\text{keV})^{1,5}}{\rho/\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}}. \quad (3.8)$$

Dabei ist ρ die Dichte der Probe und E_0 die Energie des Primärelektronen-Strahls. Die maximale Eindringtiefe der Elektronen liegt dabei typischerweise im Bereich von $1 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$ [113].

Welche Effekte in diesem Volumen beobachtet werden können hängt von zwei Faktoren ab. Zum einen verlieren die Elektronen beim Durchqueren der Probe zunehmend an Energie. Somit treten Effekte, die eine gewisse Mindestenergie benötigen, in tieferen Schichten nicht mehr auf. Zum anderen ist die Tiefe, bis zu der das Resultat eines Effektes detektierbar ist, von der Absorption und damit auch von der Wegstrecke bis zur Oberfläche abhängig. Beispielsweise werden Sekundärelektronen im gesamten angeregten Volumen erzeugt. Den Festkörper verlassen jedoch nur die nahe der Oberfläche entstehenden Sekundärelektronen, die noch über eine hinreichende hohe Energie verfügen.

Bei den aus den tiefsten Bereichen austretenden Elektronen handelt es sich um rückgestreute Elektronen. Diese werden weitgehend elastisch an Atomkernen gestreut. Hierbei tritt auch ein gewisser inelastischer Anteil auf, so dass die Rückstreu-Elektronen etwas

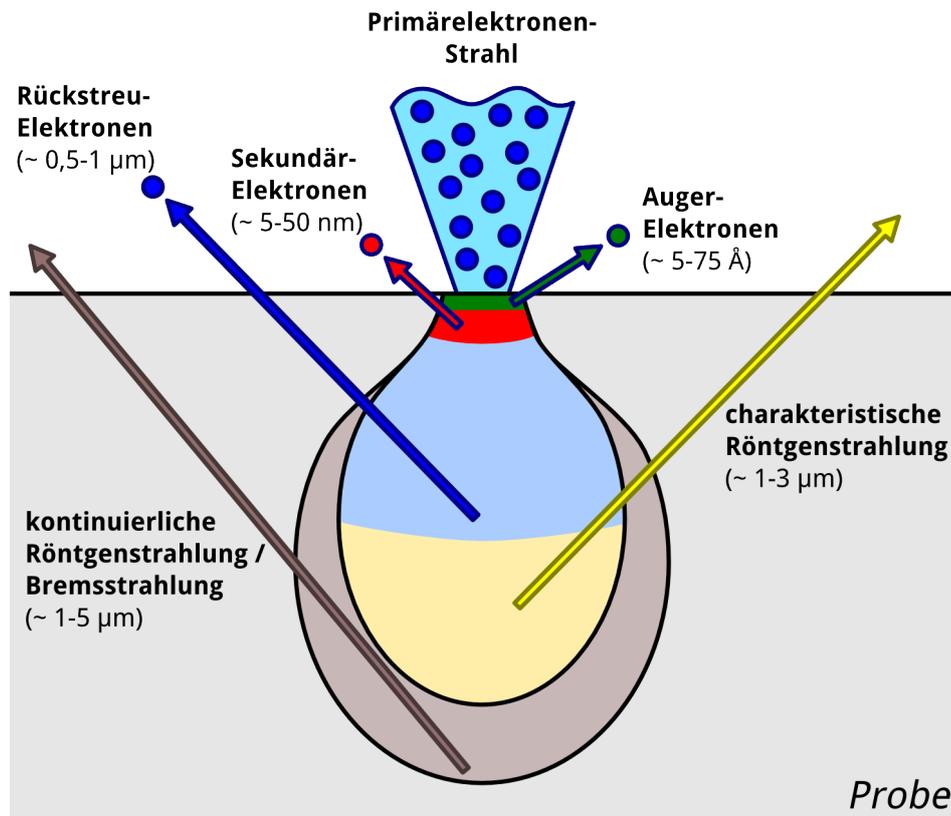


Abbildung 3.8.: Die verschiedenen Wechselwirkungsprozesse des Primärelektronen-Strahls mit dem Probenvolumen. Die unterschiedlichen Farben geben die Tiefen an, bis zu denen die jeweiligen Prozesse detektierbar sind. So können Auger-Elektronen nur aus einer sehr dünnen Schicht nahe der Probenoberfläche austreten. Röntgenstrahlen hingegen treten auch aus tieferen Bereichen des angeregten Volumens aus.

energieärmer sind als die Elektronen des primären Strahls [114,115]. Sie verlassen dabei die Probe aus Tiefen bis zur halben Eindringtiefe des Primärelektronen-Strahls [116,117]. Bei den übrigen auftretenden Prozessen handelt es sich um inelastische Streuprozesse. Hierzu zählt neben der Abgabe von Wärme und Fluoreszenz auch der oben beschriebene Auger-Meitner-Effekt. Ebenfalls ist es den in Tiefen von bis zu 5 nm bis 50 nm erzeugten Sekundärelektronen möglich die Probe zu verlassen [118]. Aufgrund ihrer Oberflächenempfindlichkeit, Häufigkeit und niedrigen Energie werden sie bei der Rasterelektronenmikroskopie vorzugsweise zur topographischen Abbildung verwendet. Mit maximalen Austrittstiefen von ungefähr 1 µm bis 3 µm liefert die charakteristische Röntgenstrahlung Informationen aus deutlich tieferen Probenregionen, als es den Elektronen möglich ist. Da sie von nicht bindenden Zuständen herrührt (siehe Kapitel 3.1) ist das

resultierende Signal zwar chemisch sensitiv aber nicht abhängig von unterschiedlichen Bindungszuständen [118, 119]. Als Untergrund der charakteristischen Röntgenstrahlung findet sich schließlich die kontinuierliche Röntgenstrahlung, oder auch Bremsstrahlung genannt. Sie ist charakteristisch für eine Anregung mit Partikeln und tritt daher bei Anregungen mit Photonen nicht auf. Hervorgerufen wird sie durch das Abbremsen der eintreffenden Elektronen als Folge der Wechselwirkung mit den elektromagnetischen Feldern der Atomkerne. Dabei entspricht ihre maximale Entstehungstiefe der maximalen Eindringtiefe der Primärelektronen [116].

3.5. Magnetismus

Im Folgenden soll auf die Ursachen des Magnetismus eingegangen werden. Er hängt vor allem von der Bahnbewegung der Elektronen und deren Spin ab. Der Beitrag des Kerns kann dabei vernachlässigt werden, da das Kernmagneton μ_K um mehr als drei Größenordnungen kleiner ist als das Bohr'sche Magneton der Elektronen μ_B . Seine Ursache findet der atomare Magnetismus in der Besetzung der Schalen mit Elektronen möglichst gleichen Spins, wie es der zweiten Hundschen Regel entspricht. So besitzen Elektronen mit einer antisymmetrischen Ortswellenfunktion vereinfacht betrachtet einen größeren Abstand zueinander und unterliegen daher einer geringeren Coulomb-Wechselwirkung. Als Fermionen müssen sie, dem Pauliprinzip folgend, eine total antisymmetrische Gesamtwellenfunktion aufweisen. Dies wird nur durch eine total symmetrische Spinwellenfunktion ermöglicht, was zu parallel ausgerichteten Elektronenspins führt. Der energetische Unterschied zwischen paralleler und antiparalleler Spinkonfiguration wird als Austauschenergie bezeichnet [120]. Die meisten Materialien verfügen jedoch nicht über eine derartige ferromagnetische Ordnung. Dies liegt an der Kompensation der gewonnenen potentiellen Energie durch eine anwachsende Gesamtenergie.

Zur Veranschaulichung dient das freie Elektronengas. Es bildet den Extremfall eines Festkörpers, in dem die atomaren Wellenfunktionen überlappen und so frei bewegliche Valenzelektronen ermöglichen. Die alle besetzten Zustände umschließende Fermi-Kugel wird durch

$$k_F = (3\pi^2 n)^{1/3} \quad (3.9)$$

$$E_F = \frac{\hbar^2 k_F^2}{2m} \quad (3.10)$$

beschrieben. Hierbei beschreibt n die Elektronendichte im Realraum, k_F den Fermi-Impuls und E_F die Fermi-Energie. Im unmagnetischen Fall sind sämtliche Zustände doppelt besetzt. Für eine einfache Besetzung mit gleicher Elektronenzahl steigt die Energie jedoch um einen Faktor $2^{2/3}$ an, da das Volumen der Fermi-Kugel verdoppelt werden muss. Diesen Energiezuwachs kann die Austauschenergie nicht mehr kompensieren. Daher zeigen vollständig delokalisierte Elektronen keinen Magnetismus. Es

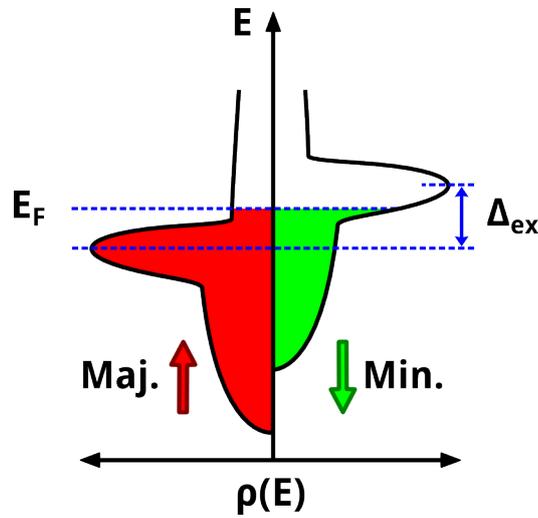


Abbildung 3.9.: Zustandsdichte $\rho(E)$ nach dem Stoner-Modell für einen Ferromagneten. Sowohl der Majoritäts- (rot) als auch der Minoritäts-Teil (grün) der Zustandsdichte ist bis zur Fermi-Energie E_F besetzt (farbig hervorgehoben). Die beiden Teile sind um die Stoner-Austauschenergie Δ_{ex} gegeneinander verschoben (nach [121]).

existieren jedoch durchaus Festkörper mit magnetischen Eigenschaften. Bei ihnen reicht die Austauschwechselwirkung zur Kompensation des Energiezuwachses aus. Zur Beschreibung der Austauschwechselwirkung wird das Heisenberg-Modell [122] verwendet. Der dazugehörige Operator hat die Form:

$$\mathbf{H}_H \propto - \sum_{i,j} I_{i,j} \mathbf{S}_i \mathbf{S}_j. \quad (3.11)$$

Neben den Spins S an den jeweiligen Gitterplätzen i und j , enthält er das Austauschintegral $I_{i,j}$. Als entscheidender Bestandteil gibt dieses Auskunft über die Stärke

der auftretenden Wechselwirkung. Aus der energetisch günstigsten Spinanordnung folgt die Form des im Grundzustand vorherrschenden Magnetismus [123]. Ein Austauschintegral $I_{i,j} > 0$ führt zu einer parallelen Spinausrichtung (Ferromagnetismus), $I_{i,j} < 0$ hingegen zu einer antiparallelen Ausrichtung (Antiferro- oder Ferrimagnetismus). Diese Art die Austauschwechselwirkung setzt eine Lokalisierung der magnetischen Momente voraus. Sie ist daher nicht für Elektronen geeignet die sowohl zum Magnetismus als auch zur elektrischen Leitfähigkeit eines Stoffes beitragen. Diese können weder als stark lokalisiert noch als delokalisiert betrachtet werden. Für derartige Elektronen, wie sie bei 3d-Übergangsmetallen zu finden sind, liefert das Stoner-Modell eine gute Beschreibung [124]. Es vereint sowohl die Einflüsse der Austauschwechselwirkung als auch die elektrische Leitfähigkeit miteinander. Hierbei werden die Zustandsdichten für Spin-up und Spin-down Elektronen als gleich angenommen. Verursacht durch die Austauschwechselwirkung kommt es zu der in Abbildung 3.9 gezeigten konstanten Verschiebung der Bänder. Der Betrag dieser Verschiebung wird als Stoner-Austauschenergie Δ_{ex} bezeichnet. Die Fermi-Energie E_{F} beider Teilbänder weist weiterhin den gleichen Wert auf. Somit kommt es zu einer Umverteilung der Elektronen zwischen Majoritäts- und Minoritätsband und einer daraus resultierenden Nettomagnetisierung [121].

Auch hier gilt das Prinzip der Energieminimierung. Die durch Verschieben der Bänder erhöhte kinetische Energie muss durch den Gewinn der Austauschenergie ausgeglichen werden. Ein hinreichendes Kriterium für das Auftreten dieses spontanen Ferromagnetismus stellt dabei das Stoner-Wohlfarth-Kriterium dar [125]:

$$I \cdot \rho(E_{\text{F}}) \geq 1. \quad (3.12)$$

Je höher die Zustandsdichte $\rho(E)$ des Leitungsbandes an der Fermi-Kante (E_{F}) und je stärker die Austauschwechselwirkung I ist, umso geringer fällt dabei die Zunahme der kinetischen Energie aus [126].

Neben der Austauschwechselwirkung beeinflussen noch weitere Faktoren die magnetischen Eigenschaften eines Festkörpers. So verursachen senkrecht zu den Grenzflächen eines Festkörpers stehende Komponenten der Magnetisierung Streufelder. Diese führen über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zur Entmagnetisierung und Erhöhung der Gesamtenergie. Externe Felder beeinflussen die magnetische Struktur dahingehend, dass eine Ausrichtung entlang ihrer Feldlinien energetisch günstiger ist. Aber auch Anisotropien des Festkörpers können zur Entstehung magnetischer Vorzugsrichtungen beitragen.

3.6. Magnetischer Linear- und Zirkulardichroismus

Der oben beschriebene Magnetismus lässt sich durch die Wahl geeigneter Anregungen untersuchen. Ein Beispiel hierfür ist die Anregung mit polarisiertem Licht, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Bei dieser Anregung können magnetische Dichroismen auftreten. Allgemein handelt es sich dabei um die polarisationsabhängige Absorption des Lichtes. Der Begriff Dichroismus (dichroos, griechisch für zweifarbig) hierfür stammt aus der Optik und bezeichnete ursprünglich lediglich Materialien die je nach Lichtpolarisation in einer anderen Farbe erschienen. Heute wird der Begriff allgemeiner gefasst und in zwei Kategorien unterteilt. Zum einen in den linearen Dichroismus, der durch linear polarisiertes Licht hervorgerufen wird. Zum anderen in den zirkularen Dichroismus, der von zirkular polarisiertem Licht verursacht wird. In diesem Abschnitt wird vor allen auf die durch Magnetisierung hervorgerufenen Varianten dieser Dichroismen eingegangen.

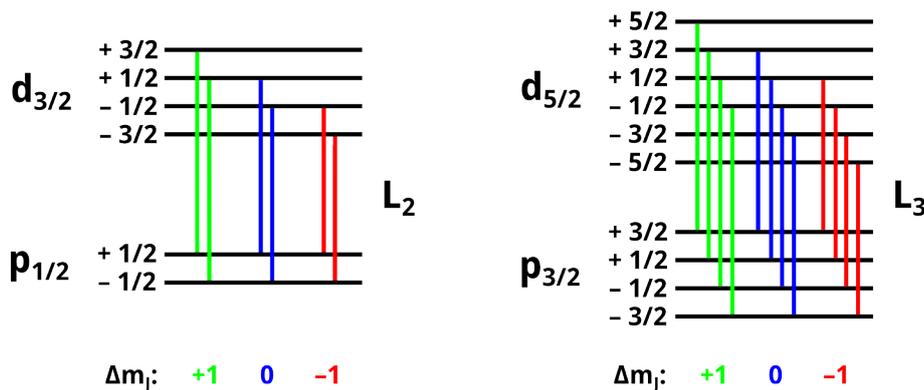


Abbildung 3.10.: Erlaubte Übergänge der L_2 - und L_3 -Resonanzen, aufgeteilt in die m_J -Zustände.

Wären alle der in Abbildung 3.10 gezeigten m_J -Zustände in einem Atom gleich bevölkert und lägen sie bei den gleichen Bindungsenergie, so gäbe es keinen Unterschied in der Absorption bei Anregungen verschiedener Polarisation. In magnetischen Proben weisen diese m_J -Zustände jedoch unterschiedliche Zustandsdichten auf. Zusammen mit den Auswahlregeln (3.5) und (3.6) führt dies zu unterschiedlichen Linienformen, abhängig von der Polarisation der Anregung [127].

Der magnetische Lineardichroismus (MLD) beeinflusst dabei die Intensität der einzelnen Multiplettlinien bei Anregung mit linear polarisiertem Licht. Von besonderem Interesse ist der MLD bei der Untersuchung von Antiferromagneten, da er sensitiv auf

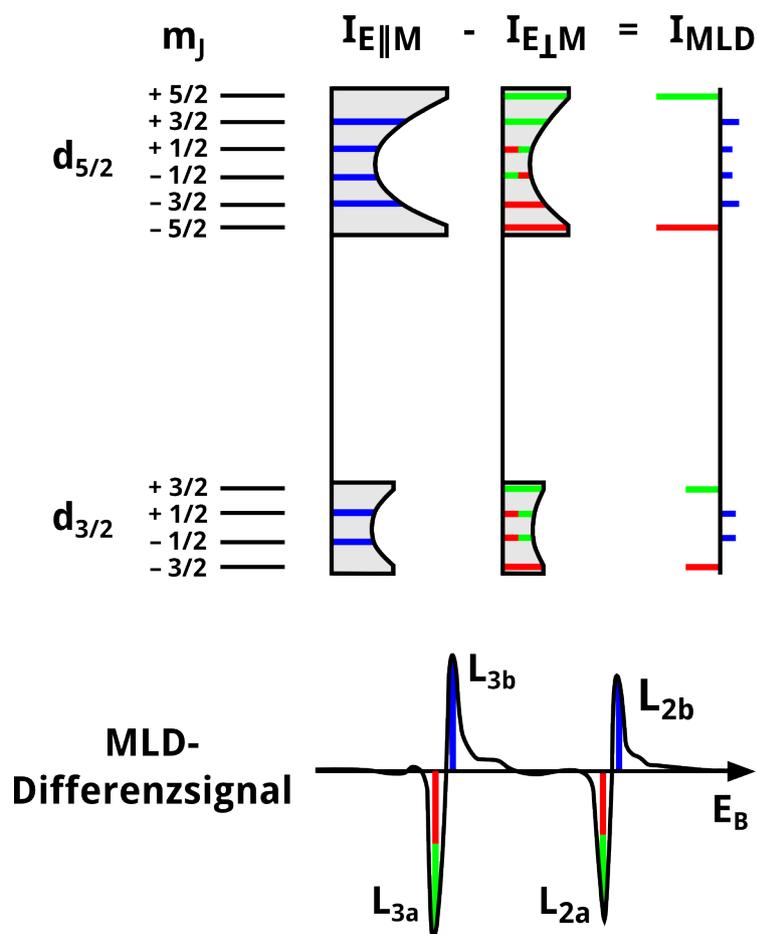


Abbildung 3.11.: Entstehung des MLD-Differenzsignals. Die d-Zustandsdichten (oben) sind grau schraffiert. Die Bindungsenergie der durch parallel (blaue Valenzzustände) und orthogonal (rote und grüne Valenzzustände) zur Magnetisierung polarisiertes Licht angeregten Zustände muss sich unterscheiden, um ein MLD-Signal zu erhalten (unten).

die Ausrichtung der Magnetisierungsachse ist und nicht auf die genaue Ausrichtung der magnetischen Momente. In Antiferromagneten sind die Zustände mit betragsmäßig großer Bahndrehimpulsquantenzahl $|m_j|$, deren Magnetisierung also kollinear zur Quantisierungsachse ausgerichtet ist, bedingt durch die Austauschwechselwirkung stärker besetzt. Da die Linienintensität sowohl von der Zustandsdichte des Anfangs- als auch des Endzustandes abhängt, müssen auch die oben in Abbildung 3.11 gezeigten Valenzbandzustände beachtet werden. Zudem handelt es sich beim MLD um einen Nettoeffekt, der erst bei der Subtraktion zweier Spektren deutlich erkennbar wird. Hierbei muss ein Spektrum mit Licht aufgenommen werden, dessen elektrisches Feld parallel zur

Magnetisierungsachse der Probe steht. Das andere Spektrum wird mit orthogonal zur Magnetisierungsachse polarisiertem Licht aufgenommen. Diese Anregung wird dabei als Superposition der Anregungen gegensätzlicher Helizitäten aufgefasst. Zur Beobachtung eines MLD-Signals ist zudem eine m_J -Aufspaltung notwendig, da die Beiträge beider Polarisierungen nahezu gleich stark sind und sich bei der Subtraktion ansonsten aufheben würden [127]. Die nur durch eine Polarisation anregbaren Multipletts großer Bahndrehimpulsquantenzahl $|m_J|$ müssen dabei eine andere Bindungsenergie aufweisen. Eine mögliche Ursache hierfür kann der Zeeman-Effekt sein, dessen Aufspaltung lediglich in der Größenordnung von 0,05 eV liegt und daher mit elektronischen Messverfahren schwierig zu detektieren ist. Neben der Aufspaltung durch den Zeeman-Effekt ist also eine deutlichere Aufspaltung von Vorteil. Nachgewiesen wurde der MLD zum ersten Mal an seltenen Erden [128]. Die Intensität des MLD-Signals in Abhängigkeit des Winkels α zwischen der Magnetisierungsachse und des Polarisation des Lichtes ist gegeben durch

$$I_{\text{MLD}} \propto (1 - 3 \cos^2 \alpha) \langle M^2 \rangle_T, \quad (3.13)$$

wobei $\langle M^2 \rangle_T$ das statistische Mittel der quadratischen Magnetisierung bei einer Temperatur T angibt [106]. Lineare Beiträge in M verschwinden hierbei aufgrund des nicht vorhandenen makroskopischen magnetischen Moments in Antiferromagneten.

Beim magnetischen Zirkulardichroismus (MCD) [129] erfolgt die Anregung mittels zirkular polarisiertem Licht. Hierbei verschwinden die in M linearen Beiträge zur Intensität nicht, so dass der MCD bei Antiferromagneten nicht auftritt. Bei der Untersuchung von Ferromagneten wird dadurch allerdings die magnetisierungsaufgelöste Abbildung der Domänen ermöglicht. In Abhängigkeit des Winkels α zwischen Helizitätsvektor σ und der Magnetisierung \mathbf{M} der Probe gilt für die Intensität des MCD-Signals:

$$I_{\text{MCD}} \propto \cos \alpha \langle M \rangle_T. \quad (3.14)$$

Hierbei ist $\langle M \rangle_T$ das statistische Mittel der Magnetisierung bei einer gegebenen Temperatur T [106].

Abhängig von der Helizität werden hierbei mehr Elektronen einer Spinausrichtung angeregt. Hierbei ist die Auswahlregel $m_l = \pm 1$ eine direkte Folge der Bahndrehimpulserhaltung bei Absorption zirkular polarisierter Photonen. Mit Hilfe der Clebsch-Gordan-Koeffizienten [130] kann das Verhältnis der drei m_l -Übergänge $1 \rightarrow 2$, $0 \rightarrow 1$ und $-1 \rightarrow 0$ zu 60 : 30 : 10 bestimmt werden. Die unterschiedliche Spinpolarisation der

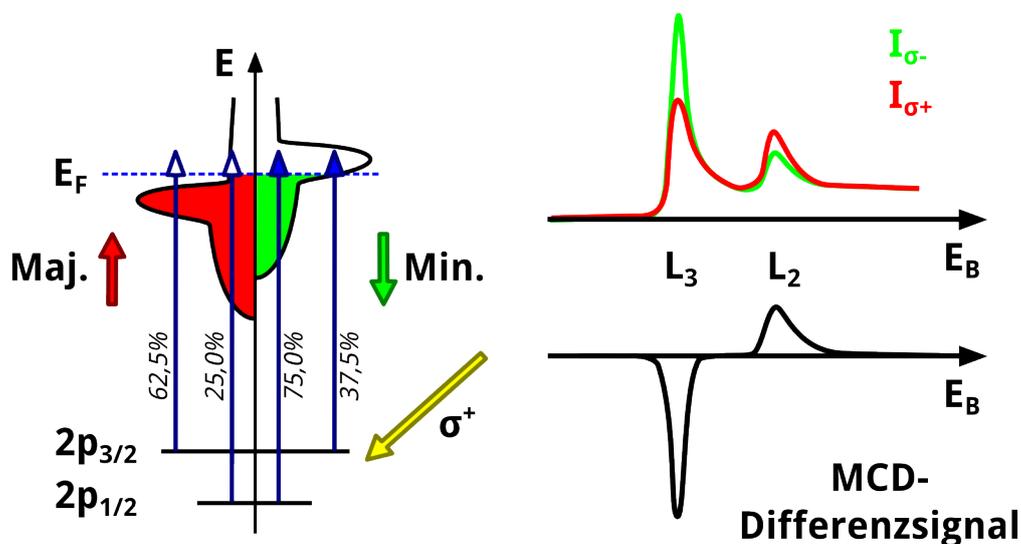


Abbildung 3.12.: Helizitätsabhängigkeit der Absorption bei Anregung mit zirkular polarisiertem Licht. Die Spinpolarisierungen der einzelnen Übergänge und die unterschiedlichen Zustandsdichten der unbesetzten Zustände sind links für rechtszirkuläres Licht gezeigt. Dies bewirkt einen Unterschied in den Absorptionssignalen für unterschiedliche Helizitäten (rechts oben). Dies ist insbesondere im MCD-Differenzsignal gut zu erkennen (rechts unten).

L-Übergänge lässt sich in Abbildung 3.13 am Beispiel einer Anregung mit rechtszirkulärem Licht ablesen. Wie zu erkennen ist werden bei Verwendung von rechtszirkular polarisierter Strahlung bevorzugt Spin-down Elektronen beim L_2 -Übergang (75,0 %) und Spin-up Elektronen beim L_3 -Übergang (62,5 %) angeregt. Für linkszirkular polarisierte Photonen gilt das entsprechend Umgekehrte. Die $p_{3/2}$ -d-Übergänge weisen demnach eine zu den $p_{1/2}$ -d-Übergängen entgegengesetzte Spinpolarisation auf [131].

Wie oben beschrieben unterscheiden sich in Ferromagneten die Zustandsdichten von Majoritäts- und Minoritätszuständen nahe der Fermikante. Beides zusammen führt somit zu einer Helizitätsabhängigkeit in der Absorption, wie in Abbildung 3.12 gezeigt ist. Gleichzeitig ist die Zustandsdichte der unbesetzten Zustände ebenfalls vom Spin abhängig. Bei einer Helizität werden daher an der L_2 -Resonanz eher Minoritätszuständen und an der L_3 -Resonanz eher Majoritätszustände angeregt. Für die jeweils andere Helizität verhält es sich entsprechend umgekehrt. Demnach sind die Absorptionen an den Resonanzen unterschiedlich stark und alternieren in Abhängigkeit der Helizität. Dieser Unterschied lässt sich besonders gut in dem MCD-Differenzsignal erkennen. Hierbei handelt es sich um die Differenz zweier mit unterschiedlicher Helizität

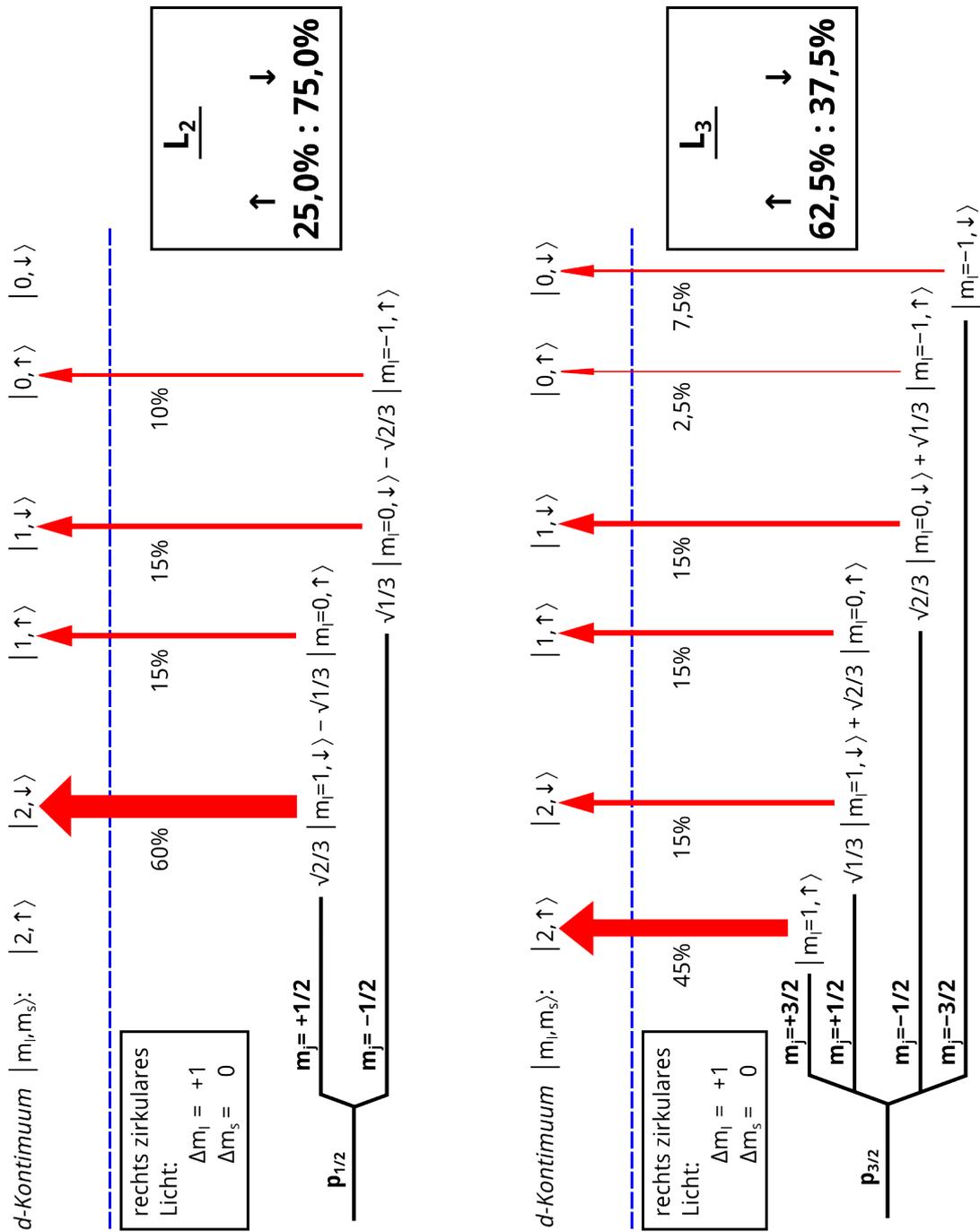


Abbildung 3.13.: Schematische Darstellung der an den L_2 - und L_3 -Übergängen beteiligten Zustände für eine Anregung mit rechtszirkulärem Licht. Die Übergangswahrscheinlichkeit in das d -Kontinuum ist sowohl neben jedem Übergang angegeben, als auch in der Pfeildicke kodiert.

aufgenommenen Absorptionsspektren. Wegen des unterschiedlichen Vorzeichens des MCD-Differenzsignals an den L_2 - und L_3 -Übergängen ergibt sich wieder ein von Null verschiedenes Signal [126]. Im Unterschied zum MLD ist hierfür keine weitere Aufspaltung notwendig [127].

4. Die Mikroskope

Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits auf die Wechselwirkungsprozesse bei der Anregung eines Festkörpers eingegangen. Dieses Kapitel befasst sich mit den Techniken um diese Effekte zu beobachten. In dieser Arbeit sind dies namentlich die Photoemissions-Elektronenmikroskopie wie auch die Raster-Elektronenmikroskopie. Dabei soll das Hauptaugenmerk auf dem allgemeinen Aufbau und die Funktionsweise dieser Mikroskope gelegt werden und weniger auf die detaillierte Konstruktion der im Einzelnen verwendeten Modelle. Für beide Mikroskope gilt dabei, dass sie unter Vakuum-Bedingungen betrieben werden. Dies ist aus zwei Gründen nötig. Zum einen dürfen die Elektronen zwischen Austritt aus der Probe und der Detektion nicht mit Restgasatomen wechselwirken, da dies sonst das Messergebnis verfälschen würde. Zum anderen wird die Probenoberfläche vor Verunreinigungen geschützt, was insbesondere für Untersuchungen hochreiner Probensysteme von Bedeutung ist.

4.1. Das Photoemissions-Elektronenmikroskop

Das Photoemissions-Elektronenmikroskop (PEEM) nutzt abhängig vom Betriebsmodus sowohl primäre Photoelektronen als auch Sekundärelektronen zur Abbildung der Probe. Die Probe stellt dabei einen integralen Bestandteil des in Abbildung 4.1 (a) skizzierten Systems dar. So liegt zwischen Probe und Objektivlinse eine einstellbare Transfer-Spannung von mehreren Kilovolt an. Diese beschleunigt die emittierten Elektronen in Richtung des radialsymmetrischen Linsensystems. Hier dient eine Aperturblende nicht nur zur Beschränkung des Strahlenganges sondern auch als energetischer Tiefpass. Elektronen mit großer kinetischer Energie werden von der Objektivlinse auf einen Punkt hinter der Aperturblende fokussiert. Sie können daher die Blende nicht passieren. Nur langsame Elektronen werden so fokussiert, dass sie hindurch treten können. Im Strahlenweg folgt der Aperturblende ein Stigmator aus Oktupollinsen. Dieser dient dem

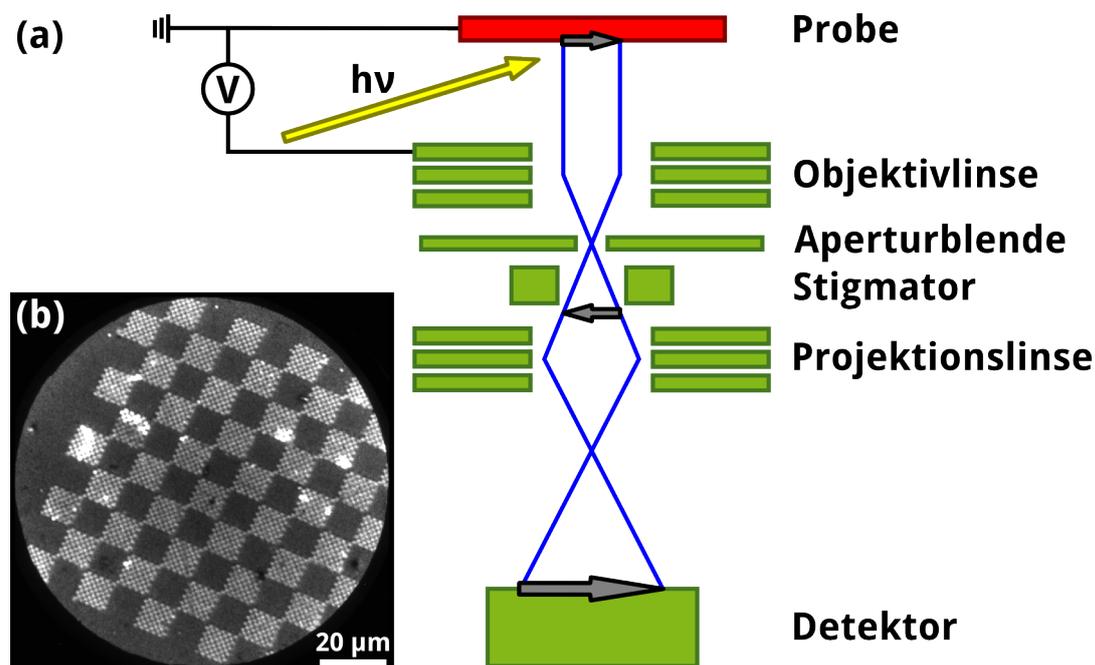


Abbildung 4.1.: (a) Vereinfachte Darstellung eines PEEM-Linsensystems. Zwischen geerdeter Probe und Objektivlinse liegt eine Beschleunigungsspannung an. Die Aperturblende beschränkt den Strahlengang. Sie dient ebenfalls als energetischer Tiefpass. Die Projektionslinse vergrößert das Elektronenbild und bildet es auf den Detektor ab. Alle Linsen sind hierbei als elektrostatische, drei Elektroden Sattelfeld-Linsen ausgeführt. (b) Beispiel eines PEEM-Bildes. Abgebildet sind Goldquadrate (hell) auf Silizium (dunkel).

Ausgleich des axialen Astigmatismus (siehe Kapitel 4.1.5). Das nachfolgende Linsensystem vergrößert das Bild weiter und projiziert es auf den Detektor. Im Allgemeinen besteht dieses Linsensystem aus mehr als einer Linse. Bei dem Detektor handelt es sich typischerweise um ein dreistufiges System. Zunächst vervielfältigt eine Doppel-Mikrokanalplatte (micro-channel plate, MCP) die von der Probe emittierten Elektronen. Eine hierauf folgende Leuchtstoffschicht wandelt das elektronenoptische in ein lichtoptisches Bild um. Dieses wird mit einer hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen und kann so elektronisch gespeichert werden. Abbildung 4.1 (b) zeigt ein so aufgenommenes PEEM-Bild.

Bei den PEEM-Linsen handelt es sich um radialsymmetrische, elektrostatische, drei Elektroden Sattelfeld-Linsen. Anders als magnetischen Linsen weisen sie keine das Probensystem beeinflussenden Streufelder auf [132]. Insbesondere für Untersuchungen

magnetischer Systeme wären diese Felder von beträchtlichem Nachteil. Zur Erzeugung des namensgebenden Sattelfeldes befinden sich die erste und letzte Elektrode auf dem gleichen, konstanten Potential. Die mittlere Elektrode wird schwächer bespannt, wobei sich dieses Potential einstellen lässt. In die Linse eintretende Elektronen werden durch diese negative Potentialdifferenz zunächst verzögert. Nach dem Passieren der mittleren Elektrode erfahren sie eine Beschleunigung in der zweiten Linsenhälfte [133]. Die abbildenden Eigenschaften des Linsensystems sind hierbei durch die Verhältnisse der Spannungen gegeben [132, 134].

Anders als beim Rasterelektronenmikroskop (SEM) setzt sich das PEEM-Bild nicht aus einzelnen Rasterlinien zusammen. Vielmehr wird der gesamte Bildbereich simultan abgebildet. Somit ist es nicht durch eine Abtastgeschwindigkeit des Elektronenstrahls beschränkt. Dies ermöglicht selbst Phänomene im Bereich einiger hundert Pikosekunden zeitaufgelöst zu untersuchen [135]. In den folgenden Unterkapiteln soll auf die hierfür genutzten Emissionsmodi, Kontraste und Abbildungseigenschaften des PEEM eingegangen werden.

4.1.1. Schwellenwert- und Hochenergie-Emission

Beim PEEM lässt sich abhängig von dem Energiebereich der Anregung zwischen Schwellenwert- und Hochenergie-Emission unterscheiden.

Unter Verwendung niederenergetischer UV-Strahlung kommt es zur Schwellenwert-Emission. Energetisch liegt diese im Bereich der Austrittsarbeit vieler Elemente [136]. Sie stellt demnach nicht genug Energie bereit um kernnahe Elektronen anzuregen. Lediglich Valenzelektronen nahe der Fermi-Kante können von ihr angeregt werden. Bei der Verwendung einer UV-Lampe stehen daher ausschließlich Austrittsarbeits- und topographische Kontraste zur Abbildung der Probe zur Verfügung, die weiter unten näher beschrieben werden. Wie in Abbildung 4.2 gezeigt, liefert diese Anregung Elektronen, deren kinetische Energie im Bereich eines Elektronenvolts liegt. Aufgrund dieser schmalen Energieverteilung lassen sich mit der Schwellenwert-Emission die besten Ortsauflösungen erzielen.

Erfolgt die Anregung hingegen mit der energiereicheren Vakuum Ultraviolett Strahlung (VUV) oder Röntgenstrahlung kommt es zur Hochenergie-Emission. Durch Anregung kernnaher Zustände emittiert die Probe hierbei ein breites Spektrum von direkten Photoelektronen bis hin zu niederenergetischen Sekundärelektronen, wie in Kapitel 3

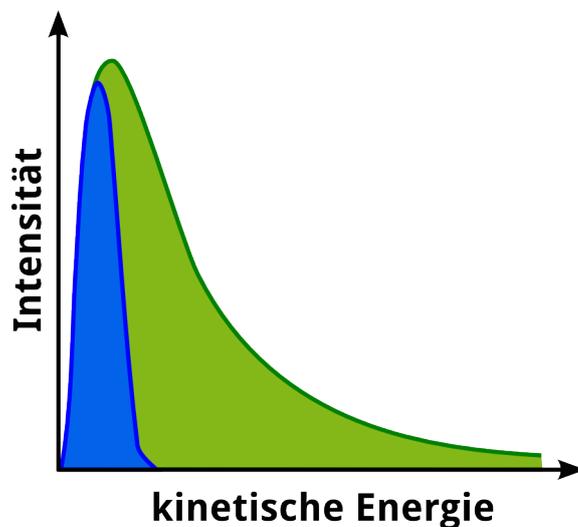


Abbildung 4.2.: Energieverteilung der zur Abbildung verwendeten Elektronen, bei Schwellenwert- (blau) und Hochenergie-Emission (grün).

beschrieben [110]. Von diesen werden im wesentlichen die niederenergetischen Sekundärelektronen zur Abbildung verwendet [105], da die Elektronenoptik als Tiefpass fungiert. Aus Abbildung 4.2 ist ersichtlich, dass die Hochenergie-Emission eine größere Energiedispersion als die Schwellenwert-Emission aufweist. Dies führt zu einer reduzierten Ortsauflösung des Mikroskops. Anders als bei der Schwellenwert-Emission sind hierbei aber auch die chemischen und magnetischen Kontraste zugänglich.

4.1.2. Topographischer Kontrast

Zur Erkennung unterschiedlicher Strukturen auf einem PEEM-Bild, müssen diese zu einer unterschiedlichen Elektronenstromdichte auf dem Detektor führen. Dieser Unterschied kann von einem Unterschied in der Anzahl der emittierter Elektronen hervorgerufen werden, beispielsweise bei einer Probe aus unterschiedlichen Elementen. Es gibt jedoch auch andere Prozesse, die einen Unterschied auf dem Detektor ausmachen. Hierzu zählt der topographischer Kontrast.

Da zwischen der Probe und der Objektivlinse ein elektrostatisches Feld anliegt, führen topographische Strukturen der Probe zu Feldinhomogenitäten. Diese beeinflussen die Elektronentrajektorie wie in Abbildung 4.3 gezeigt. Selbst wenn pro Flächenelement die gleiche Anzahl an Elektronen emittiert wird kommt es so zu unterschiedlichen Intensitäten am Detektor [137]. Mit zunehmender Ausprägung des Höhenunterschieds

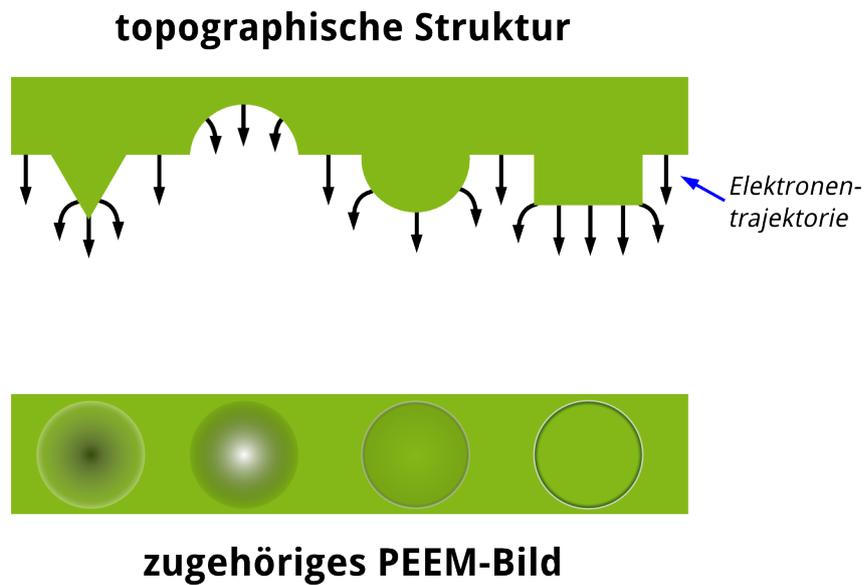


Abbildung 4.3.: Grundprinzip des topographischen Kontrastes. Die unterschiedlichen topographischen Strukturen (oben) beeinflussen die Elektronentrajektorien (schwarz) und führen so zu unterschiedlichen Intensitätsverteilungen im PEEM-Bild (unten).

der Topographie kommt es zu einer Verzerrung des Bildes. Dabei besteht keine Proportionalität mehr zwischen Gegenstands- und Bildgröße [138]. Fällt das Licht zudem streifend ein, kommt es darüber hinaus noch zu einem Schattenwurf. Auf der dem Licht abgewandten Seite der Oberflächenstruktur werden somit keine Elektronen mehr angeregt, was zu einem dunklen Bereich auf dem PEEM-Bild führt.

4.1.3. Austrittsarbeitskontrast

Der Austrittsarbeitskontrast bedient sich eines Unterschieds in der Anzahl der emittierter Elektronen. Wie aus Kapitel 3.1 bekannt, müssen Elektronen zum Verlassen des Festkörpers mindestens die Austrittsarbeit überwinden. Da sich diese für jedes Material unterscheidet, tritt der in Abbildung 4.4 gezeigte Kontrast auf. Hierbei erfolgt die Anregung mit niederenergetischen Photonen. Abhängig von der Austrittsarbeit regen diese Valenzelektronen nahe der Fermi-Energie in Zustände oberhalb des Vakuum-Niveaus an. Bei einer relativ kleinen Austrittsarbeit können dabei mehr Zustände angeregt werden und die dazugehörige Region erscheint hell. Ist die Austrittsarbeit hingegen zu groß, so werden keine Elektronen emittiert und der Bereich erscheint dunkel. Dieser Kontrastme-

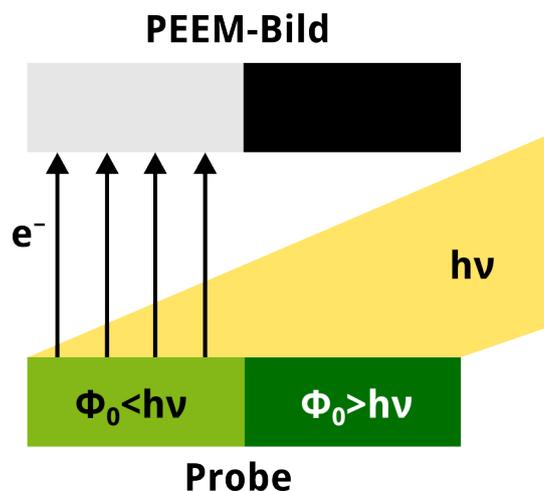


Abbildung 4.4.: Grundprinzip des Austrittsarbeitskontrastes. Eine Probenoberfläche (grün) wird mit monochromatischem Licht ($h\nu$) bestrahlt. Bereiche, die eine Austrittsarbeit Φ_0 unterhalb der Photonenenergie aufweisen ($\Phi_0 < h\nu$) emittieren Elektronen (e^-). Diese Bereiche erscheinen auf dem PEEM-Bild hell. Überschreitet die Austrittsarbeit eines Bereichs die Anregungsenergie ($\Phi_0 > h\nu$), werden keine Elektronen emittiert. Diese Bereiche erscheinen im PEEM-Bild dunkel.

chanismus ist dabei nicht nur durch die chemische Zusammensetzung der Probe gegeben. Auch die kristallographische Ausrichtung der Oberfläche kann zu Unterschieden in der Austrittsarbeit führen [139]. Der Austrittsarbeitskontrast tritt somit selbst bei einer chemisch homogenen, polykristallinen Probe auf. Hier lässt er sich zur Abbildung unterschiedlicher Körner nutzen [140]. Ausgezeichnet ist der Austrittsarbeitskontrast dabei durch seine Schärfe. So führen bereits kleinste Unterschiede von 5 meV in der Austrittsarbeit zu Änderungen der Signalintensität [141].

4.1.4. Chemischer und magnetischer Kontrast

Durch eine Anregung mit hinreichend hochenergetischem Licht lassen sich die in Kapitel 3.3 beschriebenen elementspezifischen Resonanzen zur Abbildung nutzen. So emittiert jedes Element an seiner Resonanz mehr Elektronen als abseits von ihr, wie in Abbildung 4.5 gezeigt ist. Aus dem Umstand, dass ein Bereich eines in Resonanz aufgenommenen PEEM-Bildes hell erscheint lässt sich jedoch noch nicht auf die Präsenz eines Elementes schlussfolgern. So kann ein anderer Stoff bei dieser Energie verhält-

nismäßig mehr Elektronen emittieren, wenn er in diesem Energiebereich die größere Elektronenausbeute aufweist [142]. Energieabhängig moduliert diese Elektronenausbeute weniger stark als es beim Erreichen einer Resonanz der Fall ist. Daher muss ein größerer Energiebereich betrachtet werden, um die Anwesenheit einer Resonanz und damit eines Elements zu bestätigen. Für diese orts aufgelöste Absorptionsspektroskopie gibt es zwei grundlegende Vorgehensweisen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Spektromikroskopie wird zunächst eine Sequenz von Bildern aufgenommen. Die Anregungsenergie jedes einzelnen Bildes unterscheidet sich dabei minimal von den Anderen. In der Nachbearbeitung wird eine Region von Interesse (ROI, region of interest) festgelegt und deren Bildintensität gegen die Photonenenergie aufgetragen. Für die Mikrospektroskopie wird vor Aufnahmebeginn eine ROI festgelegt. Gemessen wird im Anschluss lediglich die Intensität dieser Region für unterschiedliche Anregungsenergien [110].

Der magnetischer Kontrast fußt auf dem gleichen Vorgehen wie der chemische, unter der zusätzlich Ausnutzung des MCD oder MLD, wie in Kapitel 3.6 beschrieben wurde. Welcher Dichroismus und damit auch welche Polarisation des Lichtes genutzt wird hängt von der zur untersuchenden Probe ab. So bietet sich der MCD aufgrund seiner Abhängigkeit von der Magnetisierungsrichtung besonders zur Abbildung einzelner Weiss'scher Bezirke in Ferromagneten an. Der MLD hingegen erlaubt es unterschiedliche

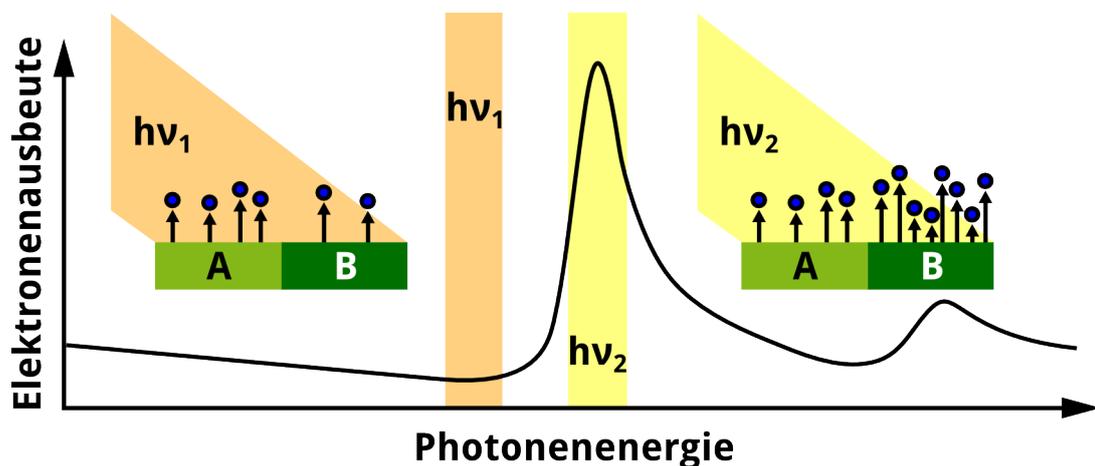


Abbildung 4.5.: Grundprinzip des chemischen Kontrastes für zwei unterschiedliche chemische Stoffe A und B. Bei Anregungen abseits einer seiner Resonanzen ($h\nu_1$) emittiert der Stoff B weniger Elektronen (blau) als an der Resonanz ($h\nu_2$). Der Stoff A zeigt hier hingegen geringe bis keine Änderung der Elektronenausbeute.

Domänen in Antiferromagneten abzubilden, da hier lediglich die Magnetisierungsachse und nicht die genauer Richtung entlang dieser von Belang ist [143].

4.1.5. Abbildungseigenschaften

Ähnlich wie in der Lichtoptik treten bei der Translation der Elektronen durch die Optik Abbildungsfehler auf. Grob können diese in chromatische und geometrische Fehler eingeteilt werden. Letztere folgen aus der Ungültigkeit der paraxialen Optik für nicht paraxiale Strahlen [144]. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Abbildungsfehler eingegangen werden.

Zu den dominanten chromatischen Abbildungsfehlern gehört die in Abbildung 4.6 gezeigte chromatische Aberration. Ihren Ursprung hat sie in der energieabhängigen Brechkraft der Linsen. Hierbei werden schnelle Elektronen weniger stark abgelenkt als energiearme Elektronen. Dies steht im Gegensatz zur chromatischen Aberration optischer Sammellinsen, bei denen kurzwelliges, blaues Licht stärker gebrochen wird als langwelliges, rotes Licht. Zu einer scharfen Abbildung kann es daher nur für eine möglichst schmale Energieverteilung der Elektronen kommen. Da die im PEEM verwendeten Sekundärelektronen eine große Energiebreite ΔE aufweisen wirkt sich die chromatischen Aberration hier besonders stark aus [145]. Dieser Fehler kann durch eine Aperturblende abgeschwächt werden. Durch ihr Tiefpassverhalten schränkt sie die Divergenz der Elektronenenergie ein [146] und verbessert damit die Auflösung. Da sie einen Teil des eintretenden Strahls blockt wird die Signalintensität reduziert.

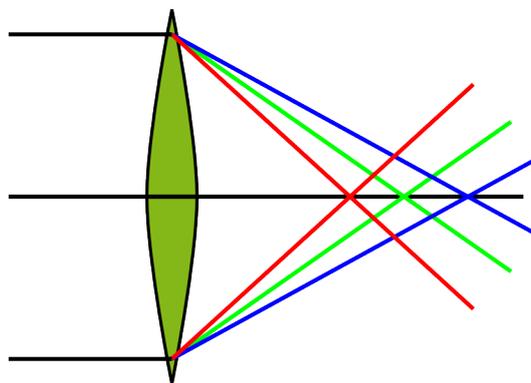


Abbildung 4.6.: Chromatische Aberration einer Elektronenlinse (grün). Die Brennweite energiearmer Elektronen (rot) ist im Vergleich zu energiereichen Elektronen (blau) reduziert.

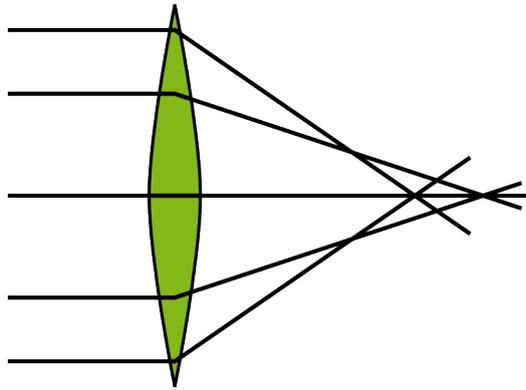


Abbildung 4.7.: Sphärische Aberration einer Elektronenlinse (grün). Die achsfernen Strahlen werden auf einen andern Punkt fokussiert als die achsnahen.

Zu den geometrischen Fehlern zählt die sphärische Aberration. Wie in Abbildung 4.7 gezeigt kommt es hierbei zu einer stärkeren Brechung achsferner Strahlen. Dies führt zu einem vom Brennpunkt der paraxialen Strahlen abweichenden Fokus. Eine scharfe Abbildung ist somit nicht mehr für alle Strahlengänge gleichzeitig möglich. Auch dieser Abbildungsfehler kann durch das Einbringen einer Aperturblende in den Strahlengang reduziert werden. Hierdurch werden achsferne Elektronen geblockt und können so nicht mehr zum Detektor gelangen [111]. Demzufolge erfolgt diese Verbesserung der Auflösung auf Kosten der Intensität am Detektor.

Durch die Verwendung einer Aperturblende lässt sich die Auflösung jedoch nicht unbegrenzt verbessern. Neben der stetig abnehmenden Signalintensität treten bei zu kleinen Aperturblenden zudem Beugungsfehler auf. Diese wirken sich insbesondere bei kleinen Transferspannungen stark aus. Hierbei sind die Elektronen relativ langsam, ihre de Broglie-Wellenlänge ist somit groß und in der Größenordnung der Aperturblenden, was die Beugung ermöglicht [147].

Abseits der drei bis hierhin genannten Abbildungsfehler können zusätzlich Bildfeldwölbungen, Koma, axialer Astigmatismus und Raumladungsfehler auftreten. Diese wirken sich vergleichsweise schwach aus. Die Gesamtauflösung ist demnach primär von sphärischer und chromatischer Aberration, und eingeschränkt von Beugungsfehlern gegeben [148]. Die unteren Grenze des Auflösungsvermögens lässt sich dabei durch [111]

$$\delta \simeq \sqrt{2} \frac{\Delta E d}{e U_{\text{Transf}}} \quad (4.1)$$

abschätzen. Hierbei ist δ der kleinste Abstand für den sich zwei benachbarte Punkte noch unterscheiden lassen. Er wird bestimmt durch die Energiebreite der Elektronen ΔE , die Elementarladung e , die Transferspannung U_{Transf} und den Abstand zwischen Probe und Objektivlinse d . In dieser Gleichung wird die Größe der Aperturblende nur indirekt durch die Energiebreite der Elektronen berücksichtigt. Um die maximale Auflösung zu erzielen, sollte daher eine möglichst kleine Aperturblende und eine hohe Transferspannung gewählt werden. Mit der neuesten PEEM-Generation lassen sich so bereits Bestauflösungen von einigen Nanometern erzielen [149]. Bei dem hier verwendeten STAIB-PEEM-350-20 in Dortmund und dem Omicron-Focus PEEM in Argonne lassen sich typischerweise Auflösungen von 220 nm [150] beziehungsweise 100 nm [151] erzielen.

4.2. Das Raster-Elektronenmikroskop

Das Raster-Elektronenmikroskop (scanning electron microscope, SEM) nutzt einen stark fokussierten, hochenergetischen Elektronenstrahl um über die Probe zu rastern. Die genutzten Elektronen befinden sich dabei typischerweise im Energiebereich zwischen 2 keV und 100 keV [118]. Der prinzipielle Aufbau eines solchen SEM ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Zur Erzeugung des Elektronenstrahls dient eine Elektronenkanone bestehend aus Kathode, Wehnelt und Anode. Dieser Strahl wird von einer nachfolgenden Kondensorlinse auf einen Durchmesser von 0,4 nm bis 5 nm fokussiert [152]. Mittels Ablenkspulen wird dieser abgelenkt und so über die Probenoberfläche gerastert. Beim Auftreffen auf die Probe kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungseffekten, die in 3.4 beschrieben sind. Die dabei freigesetzten Elektronen beziehungsweise Strahlung wird im Folgenden detektiert. Da ihr Ursprung auf das Wechselwirkungsvolumen des eingehenden Elektronenstrahls mit dem Probematerial beschränkt ist, lässt sich so eine Ortsauflösung erzielen. Mittels Korrelation des detektierten Signals mit der Position des jeweiligen Rasterpunktes kann so sequenziell ein Abbild der Probe aufgebaut werden. Die Vergrößerung lässt sich dabei über den Abstand der einzelnen Rasterpunkte variieren [153]. Die erzielbare Ortsauflösung wiederum hängt von dem zur Abbildung genutzten Effekt ab. So weist das angeregte Probenvolumen eine Tropfenform auf, die für tiefere Probenregionen breiter wird, wie in Abbildung 3.8 gezeigt. Effekte, die ihren Ursprung in tieferen Regionen haben, weisen demzufolge eine schlechtere Ortsauflösung auf, da der Querschnitt des Anregungsvolumens hier größer ist als in oberflächennahen Regionen.

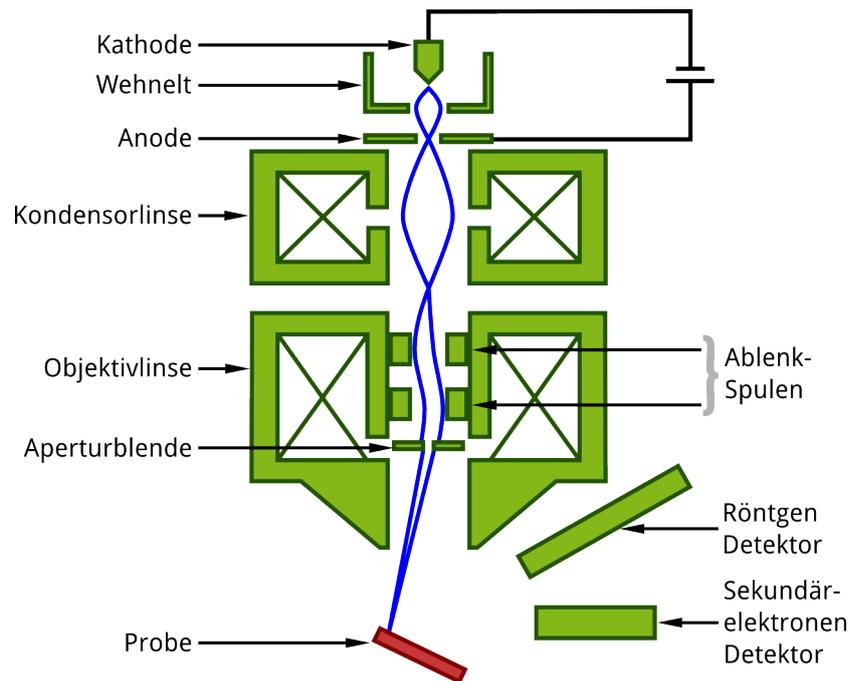


Abbildung 4.8.: Darstellung eines SEM-EDX-Systems. Die aus Kathode, Wehnelt und Anode bestehende Elektronen-Kanone erzeugt einen hochenergetischen Elektronenstrahl. Ein nachfolgendes Linsensystem fokussiert diesen Strahl weiter. Mittels Ablenkspulen wird so die Probe abgerastert. Die von der Probe emittierten Sekundärelektronen (SEM) und Röntgenstrahlung (EDX) werden anschließend mit den jeweiligen Detektoren nachgewiesen.

Einer der bei der Wechselwirkung auftretenden Effekte ist die Erzeugung von Sekundärelektronen. Diese sind aufgrund ihrer geringen Austrittstiefe besonders sensitiv auf die Oberflächentopographie [118]. Der Kontrast wird dabei durch den sogenannten Kanteneffekt dominiert. So können mehr Sekundärelektronen die Probe an Kanten der Topographie verlassen, was zu einem stärkeren Signal an diesen Positionen führt. Des Weiteren ist die Ausbeute der Sekundärelektronen auch elementabhängig, wodurch schwerere Elemente heller erscheinen als leichtere [154]. Die Detektion der Sekundärelektronen erfolgt mittels eines Everhart-Thornley-Detektors [155]. Hierbei werden die langsamen Sekundärelektronen von einem elektrischen Feld in Richtung des Detektors abgelenkt. Dies erfolgt indem an einem Faraday-Käfig ein Potential von einigen +100 V relativ zur Probe angelegt wird [119]. Schnellere Elektronen, wie der Primärstrahl, werden von diesem Feld nicht beeinflusst. Nach dem Durchqueren des Faraday-Käfigs werden die Sekundärelektronen auf einen Szintillator beschleunigt. Mittels Lichtwellenleiter werden die hierbei entstehenden Photonen zu einem außerhalb des Vakuums befindlichen

Photoelektronenvervielfacher geführt. Dieser verstärkt das Signal und wandelt es in einen elektronisch auswertbaren Spannungsimpuls um. Die erzielbare Auflösung liegt für diesen Kontrast im Bereich von 50 Å bis 200 Å [156].

Um eine chemische Untersuchung der Probe zu ermöglichen kann auf die von ihr emittierte charakteristische Röntgenstrahlung zurückgegriffen werden. Hierzu wird bei der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray spectroscopy, EDX) die emittierte Röntgenstrahlung spektral aufgenommen. EDX ist dabei nicht sehr sensitiv auf Elemente die leichter sind als Kohlenstoff. Leichte Elemente sind schwerer zu detektieren, da die Wahrscheinlichkeit der Röntgenemission zusammen mit der Ordnungszahl abnimmt [99, 118]. Die Detektion der Photonen erfolgt dabei mittels eines Siliziumdriftdetektors (SDD). In ihm erzeugen die Photonen bei der Absorption Elektronen-Loch-Paare. Durch ein starkes, elektrisches Feld wird die Rekombination des Elektronen-Loch-Paares im Detektor verhindert, da die Ladungsträger zu unterschiedlichen Elektroden driften. Aus dem Ladungsunterschied der beiden Elektroden lässt sich auf die Energie des einfallenden Photons schließen, da die Anzahl der Elektronen-Loch-Paare proportional hierzu ist. Wie in Kapitel 3.4 beschrieben tritt die charakteristische Röntgenstrahlung auch aus deutlich tieferen Probenregionen als die Sekundärelektronen aus. Dies führt zu einer schlechteren Ortsauflösung der EDX als bei der Detektion der Sekundärelektronen. Typische mittels EDX erzielte Auflösungen liegen somit im Bereich von 0,1 µm bis 2 µm, abhängig von der Zusammensetzung der Probe und der Energie des primären Elektronenstrahls [118, 156]. Das hier verwendete EM Quanta 200 FEG von FEI mit einem Bruker Quantax 400 SDD X-Flash 4010 weist dabei eine Energieauflösung von 123 eV an der Mn-K_α-Linie auf.

Die so erzielten EDX-Spektren lassen sich auch quantitativ auswerten. Hierzu gibt es zwei unterschiedliche Vorgehensweisen. Bei einer Standard basierten Auswertung erfolgt ein Vergleich der Intensitäten der zu analysierenden Probe und einem geeigneten Standard. Beide Messungen müssen hierzu unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden [119]. Alternativ hierzu kann eine standardfreie P/B-ZAF-Methode zur Anwendung kommen [119, 157, 158]. Diese basiert auf dem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis (peak-to-background, P/B) und beinhaltet über eine Matrixkorrelation Korrekturen für die jeweiligen Ordnungszahlen (Z), die Absorption (A) und die Fluoreszenz (F) der auftretenden Elemente. Bei letzterer Methode handelt es sich um die heutzutage standardmäßig angewandte und meist in der SEM-EDX-Bediensoftware bereits implementierten Prozedur.

5. Apparativer Aufbau und Datenaufnahme

5.1. Lichtquellen

Als Lichtquellen wurden Synchrotronstrahlungsquellen sowie eine Quecksilber-Kurzbogenlampe genutzt. Bei den Synchrotronstrahlungsquellen handelt es sich hier namentlich um die Dortmunder Elektronenspeicherung-Anlage (DELTA) am Zentrum für Synchrotronstrahlung der TU Dortmund, Deutschland, und um die Advanced Photon Source (APS) am Argonne National Laboratory in Argonne, IL, USA. Auf alle drei Lichtquellen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

5.1.1. Die Strahllinie 11

Für diese Arbeit wurde unter anderem die Strahllinie 11 (BL 11) am DELTA genutzt. Diese wird vom Undulator U55 mit Synchrotronstrahlung versorgt. Der U55 ist dazu mit zwei Bänken alternierend in Nord-Süd-Ausrichtung angeordneter Permanentmagnete ausgestattet. Beim Durchqueren des Undulators werden die Elektronen so auf eine sinusförmige Bahn gezwungen. Die genaue Form dieser Bahn lässt sich mittels der einstellbaren Undulator-Lücke zwischen den Bänken regulieren.

Da die relativistischen Elektronen eine Beschleunigung erfahren, emittieren sie Synchrotronstrahlung. Zur Selektion der gewünschten Photonenenergie aus dem Undulatorspektrum dient ein Plan-Gitter-Monochromator (PGM). In ihm wird durch Verkippen eines planen Gitters und eines Spiegels die benötigte Photonenenergie gewählt. Dabei deckt die BL 11 einen Photonenenergiebereich von $h\nu = 50 \text{ eV} - 1500 \text{ eV}$ mit einer Auflösung im Routinebetrieb von $\frac{E}{\Delta E} = 3700$ ab. Dieser Strahl wird durch weitere Spiegel entlang der Strahllinie auf einen Bereich von $70 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ am Experiment fokussiert. Dabei wird

ein Fluss von bis zu 10^{13} Photonen pro Sekunde bei 100 mA Strahlstrom im Speicherring erreicht [159]. Die fokussierenden Spiegel entlang der Strahllinie sind elektrisch isoliert, so dass sich der zu ihnen fließende elektrische Strom messen lässt. Dieser Strom dient der Kompensation der durch den Photoeffekt aus dem Spiegel ausgelösten Elektronen. Er wird daher als Maß für den Photonenfluss am Spiegel genutzt.

5.1.2. Die Strahllinie 4-ID-C

Die Messungen an der APS erfolgten an der Strahllinie 4-ID-C. Gespeist wird diese von einem elektromagnetischen zirkular polarisierenden Undulator (CPU). Mittels horizontaler und vertikaler Spulen zwingt der CPU die Elektronen auf eine schraubenförmig Bahn. Die dabei abgegebene Synchrotronstrahlung weist eine zirkulare Polarisation von $p_c > 96\%$ auf. Mittels unterschiedlicher Bestromung der Spulen lässt sich so zwischen rechts und links zirkular polarisiertem, wie auch linear polarisiertem Licht wählen [160]. Der nachfolgende Sphärische-Gitter-Monochromator (SGM) ist für einen Energiebereich von $h\nu = 500\text{ eV} - 3000\text{ eV}$ ausgelegt und erzielt dabei eine Auflösung von bis zu $\frac{E}{\Delta E} = 2000$. Der Strahl von bis zu $1,8 \times 10^{12}$ Photonen pro Sekunde wird im Anschluss auf einer Fläche von $300\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ an der Probenposition fokussiert [161].

5.1.3. Die Quecksilber-Kurzbogenlampe

An der für die DELTA-Messungen genutzten PEEM-Kammer besteht mit einer 100 Watt Quecksilber-Kurzbogenlampe der Firma PTI, Inc. [162] die Möglichkeit auch außerhalb des Strahlbetriebes Messungen vorzunehmen. In ihr befinden sich zwei Elektroden in einem Abstand von wenigen Millimetern. Die Lampe ist dabei mit einem Quecksilber-Argon-Gemisch gefüllt, über das die Bogenentladung statt findet. Durch die Montage neben dem Anschlussflansch der Strahllinie (siehe Abbildung 5.2) wird die Geometrie Lichtquelle-Probe-PEEM weitgehend erhalten ohne die Kammer von der Strahllinie lösen zu müssen. Zur groben Justage ist die Lampe auf verschiebbaren Schlitten montiert. Zur feineren Ausrichtung lässt sich der Reflektor über drei Schrauben verstellen. Im Betrieb benötigt die Lampe eine Wasserkühlung, um die entstehende Wärme abzuführen. Mit ihrer charakteristischen Energie von $h\nu = 4,9\text{ eV}$ ist sie ideal für Untersuchungen mittels Schwellenwertemission, da die Austrittsarbeit der meisten Materialien im Bereich dieser Energie liegt.

5.2. Die Strahllinien-Endstationen

Für die Messungen am DELTA und an der APS wurden zwei unterschiedliche Aufbauten verwendet. Diese unterscheiden sich neben dem jeweilig verwendeten PEEM auch in den übrigen Komponenten. Auf diese beiden Strahllinien-Endstationen soll hier eingegangen werden.

5.2.1. Das DELTA-PEEM

Die am DELTA verwendete PEEM-Kammer ist in den Abbildungen 5.1 und 5.2 gezeigt. Sie besteht aus zwei Ultrahochvakuum-Kammern (UHV-Kammern), die mittels eines Vakuum-Schiebers voneinander separiert werden können. Beide UHV-Kammern sind zur Erzeugung der UHV-Bedingungen mit Turbomolekularpumpen und Scroll-beziehungsweise Membran-Vorpumpen ausgestattet.

Die Vorkammer im vorderen Bereich der Abbildung 5.1 dient zum Ein- und Ausschleusen der Probe, ohne dass das Vakuum in der Hauptkammer gebrochen werden muss. Durch eine Probenschleuse kann die auf den Probenhalter montierte Probe in die Vorkammer eingebracht werden. Nach dem Evakuieren der Vorkammer auf mindestens 5×10^{-8} mbar kann der Schieber zur Hauptkammer geöffnet werden und die Probe mittels des Transferstabes in die Hauptkammer eingebracht werden. Beim Transferstab handelt es sich um einen speziellen im Vakuum befindlichen Zwei-Achsen-Manipulator. Rechts oben in Abbildung 5.1 ist der in die Kammer ragende Teil des Transferstabes gezeigt. Über einen Magneten kann der rot hervorgehobene Teil bis zu 1,5 m entlang der Längsachse ausgefahren werden. Der mit einem Bajonettverschluss zur Aufnahme des Probenhalters ausgestattete, blau hervorgehobene Teil lässt sich kontinuierlich um die Längsachse drehen. Diese Bewegung ist nötig um den Probenhalter vom Transferstab zu lösen, nachdem er in die passende Aufnahme des Manipulators (Abbildung 5.1, links) geschoben wurde.

Wie in Abbildung 5.2 zu erkennen ist, liegt zwischen dem Staib PEEM 350-20 [163] und der Einfallsebene der Synchrotronstrahlung ein 60° -Winkel. Dieser garantiert den steilsten möglichen Einfallswinkel der Synchrotronstrahlung auf die Probe. Dies ist besonders für Proben mit ausgeprägter Topographie von Bedeutung, um den Schattenwurf gering zu halten. Die Geometrie der Objektivlinse verhindert dabei die Wahl eines noch steileren Winkels. Da die Turbomolekularpumpen Erschütterungen erzeugen, die sich negativ

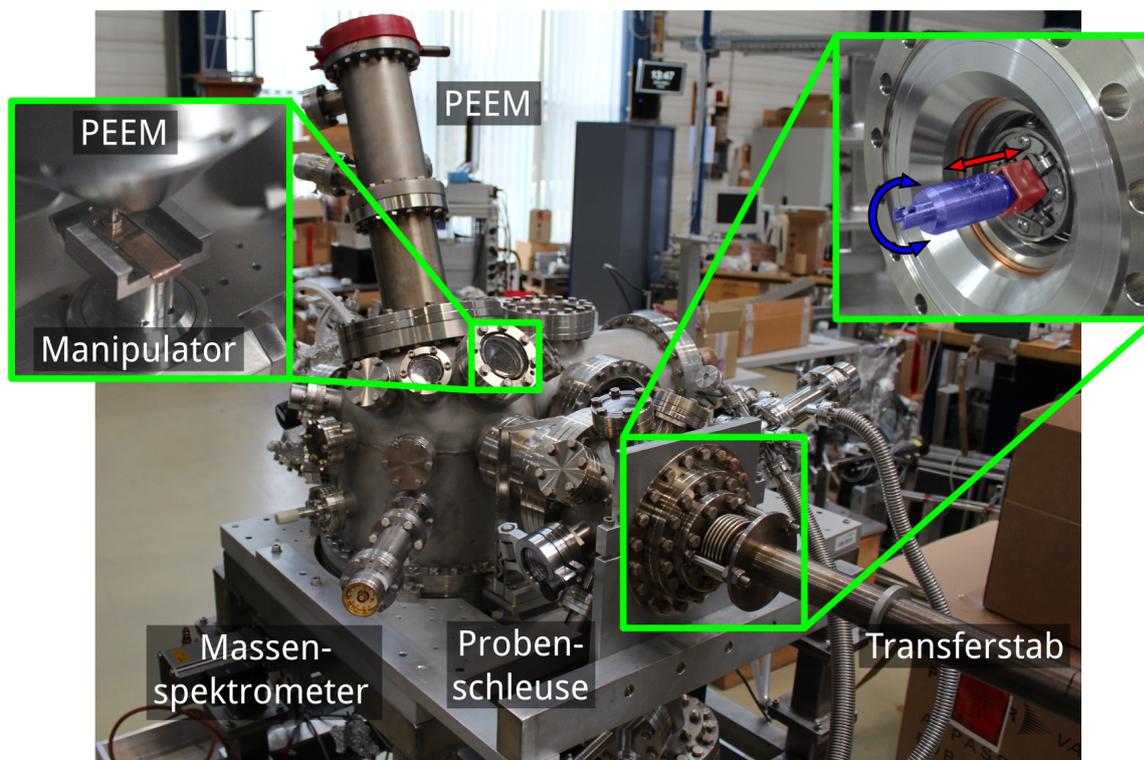


Abbildung 5.1.: UHV-Kammer mit Blick auf das PEEM (ohne CCD-Kamera und Abdeckung), das Massenspektrometer, die Probenschleuse und den Transferstab. Rechts ist das Innere des Transferstabes abgebildet. Der rot hervorgehobene Teil des Transferstabes ermöglicht eine Translation um bis zu 1,5 m. Der in blau hervorgehobene und mit einem Bajonettverschluss versehene Teil ermöglicht eine kontinuierliche Rotation um die Längsachse. Links ist der Blick in die Kammer auf die PEEM-Objektivlinse und den Manipulator mit der Aufnahmevorrichtung für den Probenhalter gezeigt.

auf die maximal erzielbare Auflösung des PEEM auswirken [150], werden sie während des Messbetriebs ausgeschaltet. Um das Vakuum hierbei nicht brechen zu müssen, lässt sich die Turbomolekularpumpe der Hauptkammer mit einem Vakuumschieber vom Rezipienten trennen. Der Druck von 10^{-9} mbar wird währenddessen ausschließlich von einer erschütterungsfreien Ionen-Getter-Pumpe gehalten.

Ebenfalls in der Hauptkammer befindet sich der in Abbildung 5.3 gezeigte Manipulator. Seine Basisplatte ist von der Horizontalen aus um 30° in Richtung des Anschlussflansches der Strahllinie gekippt. Dies ist für die Translationen des Manipulators von besonderer Wichtigkeit. So fällt die z-Translation des Manipulators mit der optischen Achse des

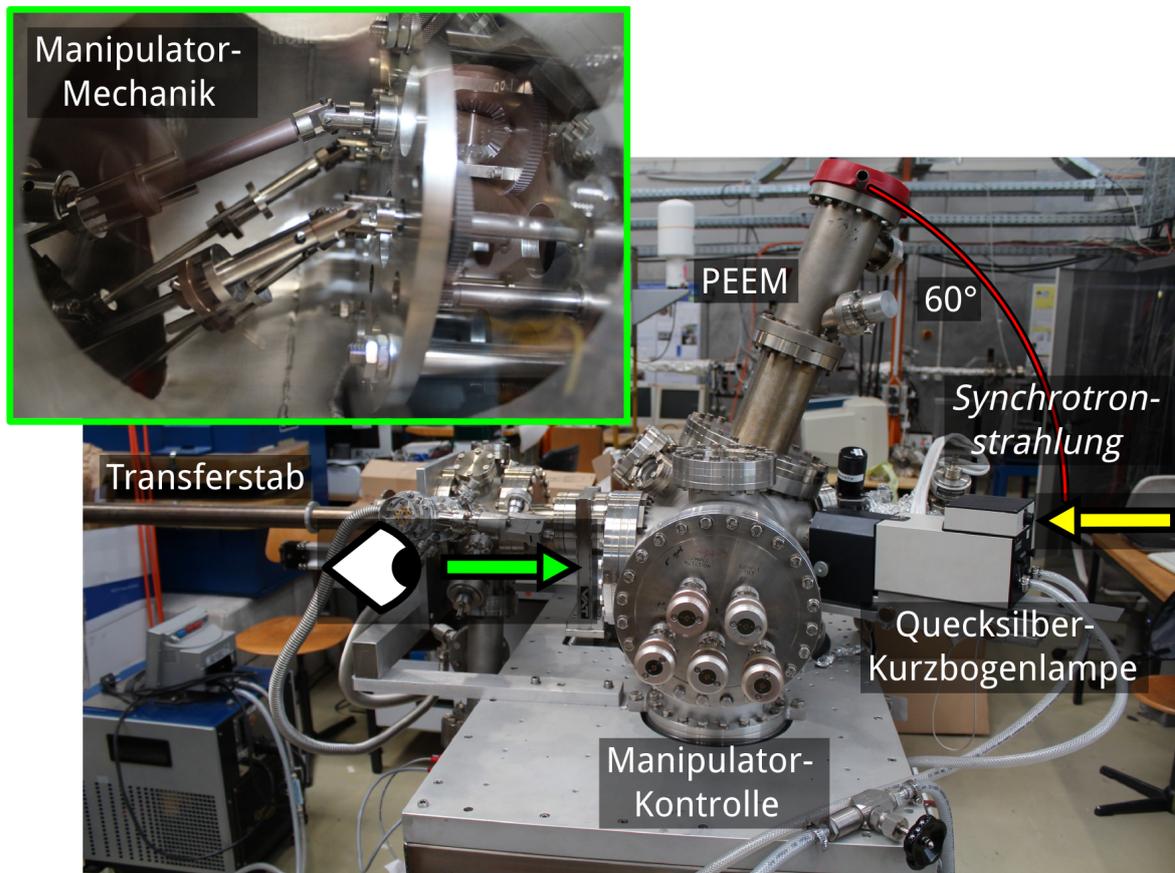


Abbildung 5.2.: UHV-Kammer mit Blick auf das PEEM, den Transferstab, die Quecksilber-Kurzbogenlampe und die Manipulator-Kontrolle. Die im Vakuum befindliche Manipulator-Mechanik (links oben) ist durch das seitliche Fenster (Blickrichtung: grüner Pfeil) zu erkennen. Der Anschlussflansch für die Strahllinie befindet sich hinter der Quecksilber-Kurzbogenlampe (gelber Pfeil).

PEEM zusammen, da selbige in einem 60° -Winkel zum Anschlussflansch der Strahllinie steht. Die Translationen entlang der x- und y-Richtung erfolgen dementsprechend orthogonal zur optischen Achse. Bei korrekter Probenausrichtung ist so eine Veränderung der Probenposition möglich, ohne die parallele Ausrichtung der Probennormalen zur optischen Achse des PEEM zu beeinträchtigen. Die Verkippung der Probe zwischen der zum Schleusen nötigen horizontalen Ausrichtung und der Messposition erfolgt mittels einer Wippe. Ihre Rotationsachse verläuft durch die Probenoberfläche und fällt mit der x-Achse zusammen. Auf dieser Wippe befindet sich die um die z-Achse rotierbare Aufnahmevorrichtung für den Probenhalter. Diese fünf Bewegungen werden manuell von außen vorgenommen. Hierzu dienen die in Abbildung 5.2 gezeigten Drehknöpfe der

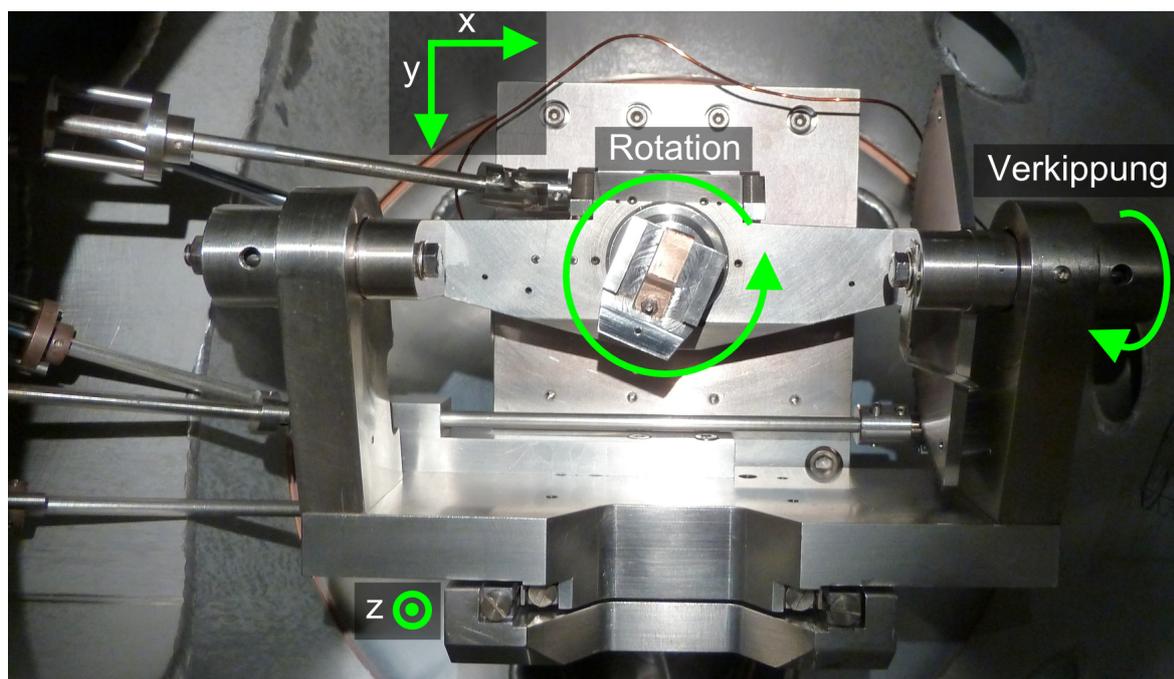


Abbildung 5.3.: Blick auf den Manipulator mit fünf Bewegungsfreiheitsgraden (Rotation, Verkippung, x-, y- und z-Translation). Mittig befindet sich die Aufnahmevorrichtung für den Probenhalter. Links sind die zur Bedienung benötigten Wellen zu sehen.

Manipulator-Kontrolle. Über eine Mechanik aus Zahnrädern, Wellen und Kardangelen wird die Rotation der Drehknöpfe auf die einzelnen Bewegungskomponenten übertragen.

Für den hier verwendeten Manipulator wird der in Abbildung 5.4 gezeigte Probenhalter verwendet. Der Hauptkörper des Probenhalters besteht aus einer 5 mm dicken Edelstahlplatte mit abgeschrägten Flanken. An ihm befindet sich der Ansatz für den Transferstab mit einem Pin, an dem der Bajonettverschluss ansetzt. Die plane Oberfläche des Hauptkörpers bietet die Möglichkeit, eine Probe mittels eines adhäsiven Mittels wie Kohlenstoff-Klebeband oder Leitsilber zu befestigen. Alternativ lässt sich die Probe mittels vier Schrauben und einer 5 mm durchmessenden Lochblende befestigen. Ein zusätzliche Abstandshalter, mit einer quadratischen Aussparung von 10,2 mm × 10,2 mm zur Probenaufnahme, stabilisiert dabei die Lochblende von unten.

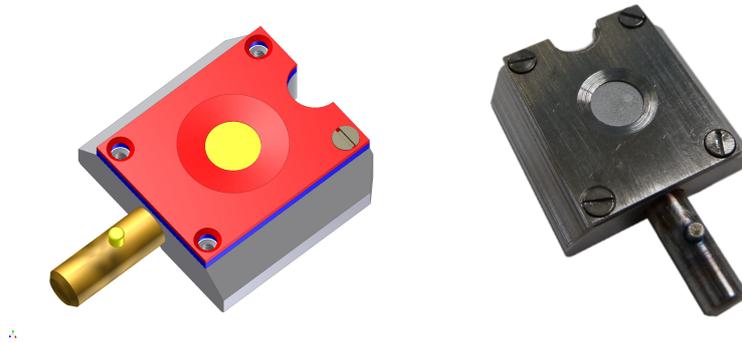


Abbildung 5.4.: Links: CAD-Zeichnung des Probenhalters bestehend aus einem Hauptkörper (grau), dem Ansatz für den Transferstab (gold), einem Abstandshalter (blau) und der Lochblende (rot). Der gelbe Bereich repräsentiert den sichtbaren Bereich der Probe [164]. Rechts: Probenhalter aus Edelstahl mit eingebauter Probe (grau).

5.2.2. Das APS-PEEM

Im Vergleich zu dem am DELTA verwendeten Aufbau, ist die in Abbildung 5.5 gezeigte Apparatur an der APS weniger umfangreich. Auch hier ist das PEEM gegen die Strahllinie verkippt. Das FOCUS IS-PEEM [165] liegt hierbei in der horizontalen Beschleuniger-Ebene. Der kubische Rezipient dient lediglich der Vakuumerzeugung und beinhaltet keinen separaten Manipulator. Viel mehr ist das PEEM mit einem integrierten Manipulator ausgestattet. Dieser ist mechanisch mit der Optik des PEEM verbunden und ermöglicht eine Positionierung der Probe mittels Piezomotoren. Prinzipiell soll dies Bewegung der Probe relativ zur Optik verhindern und der Aufbau so deutlich unempfindlicher gegen Schwingungen und Erschütterungen werden.

Da die Apparatur über keine Probenschleuse verfügt, muss das Vakuum gebrochen und einer der Kammerflansche geöffnet werden, um einen Probenwechsel vorzunehmen. Bei den hierbei verwendeten Probenhaltern handelt es sich um standardisierte Omicron Probenplatten in der PEEM-Ausführung. Bei diesen Probenplatten wird die Probe von der Rückseite eingebracht und mit einem Innen-Sicherungsring arretiert. Die Sicherung nach vorne erfolgt durch in die Probenplatten integrierte Lochblenden.

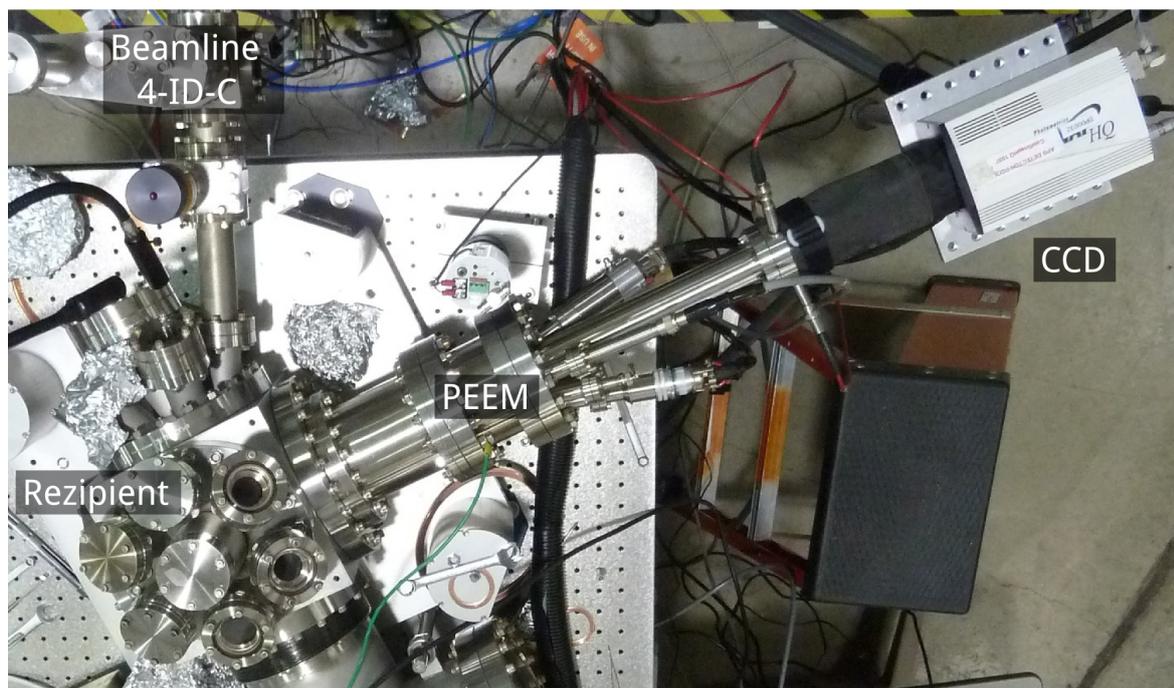


Abbildung 5.5.: Blick von oben auf den PEEM-Aufbau an der APS. Die Strahllinie 4-ID-C befindet sich im oberen Bildbereich. Das PEEM und die CCD-Kamera liegen horizontal in einer Ebene mit der Strahllinie.

5.3. Software

Im Folgenden soll kurz auf die zur Auswertung benutzte Software eingegangen werden. Ebenso sollen hier das selbst entwickelte Programm vorgestellt werden, das ein effektives Durchführen der Experimente ermöglicht.

Für die Auswertung und Nachbearbeitung wurde das Open Source Programm ImageJ verwendet [166, 167]. Dieses ermöglicht nicht nur die Bearbeitung von einzelnen Bildern, sondern erlaubt die gleichzeitige Bearbeitung ganzer Bildsequenzen, auch Bildstapel genannt. Die modulare und auf Java basierende Programmstruktur ermöglicht dabei eine Erweiterung und Anpassung auf individuelle Problemstellungen.

Zur Auswertung der PEEM Messungen muss die Intensitätsmodulation eines wählbaren Bildbereiches für eine ganze Bildsequenz betrachtet werden. Hierzu wurde eine speziell angepasste Version [150] der ImageJ-Erweiterung SpectrumExtractor [168] verwendet.

Vor dem Beginn dieser Arbeit war die individuelle Bildaufnahme sowie das Einstellen der einzelnen Strahllinien-Komponenten ein rein manueller Prozess. Für die Aufnahme eines

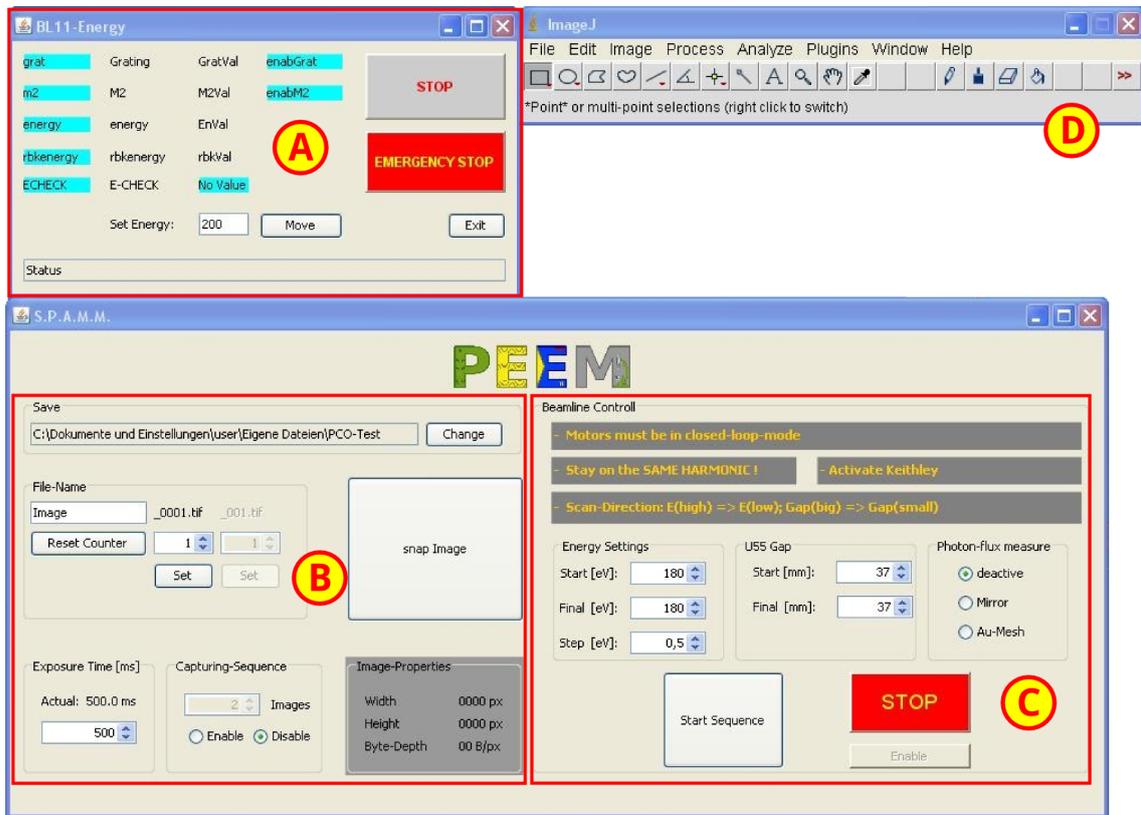


Abbildung 5.6.: S.P.A.M.M. Bedienoberfläche mit den Bereichen für die Monochromator-Steuerung und -Überwachung (A), den Kameraeinstellungen (B), den Einstellungen der Messparameter (C) und ImageJ (D).

einzelnen PEEM-Bildes musste die gewünschte Photonenenergie in der Monochromatorsteuerung eingestellt werden. Aus den tabellarisierten Werten der Undulator-Lücke musste danach der Wert gesucht werden, der die maximale Intensität für die gewünschte Energie liefert. Im Anschluss wurde die Undulator-Lücke auf diesen Wert eingestellt. Nun konnte die Aufnahme des PEEM-Bildes gestartet werden. Zeitgleich musste der Experimentator den Spiegelstrom zur späteren Normierung manuell mitschreiben. Nach dem Abspeichern des aufgenommenen PEEM-Bildes begann der Zyklus wieder mit der Einstellung der nächsten Photonenenergie am Monochromator, bis alle Bilder einer Sequenz aufgenommen wurden. Alle Arbeiten mussten dabei von einem erfahrenen Experimentator durchgeführt werden. Besonders für die vorzunehmenden Einstellungen am Monochromator und Undulator muss der Experimentator über hinreichende Erfahrung mit dem dazugehörigen Kontrollsystem verfügen. Da die typische Aufnahmezeit eines einzelnen PEEM-Bildes im Bereich von unter einer Minute bis zu einigen wenigen Minuten liegt, ist das bisherige Vorgehen sehr zeitintensiv und ermüdend. Dies be-

dingt eine relativ hohe Fehleranfälligkeit, insbesondere für länger währende Messungen über größere Energiebereiche. Ferner wird hierdurch fachkundiges Strahllinien-Personal für die Dauer der gesamten Messungen gebunden und externen Nutzern das eigenständige Durchführen von Experimenten nahezu unmöglich gemacht. Gerade für eine Nutzer-Einrichtung wie das DELTA ist dies suboptimal. Aus diesem Grunde wurde eine Kontroll- und Steuersoftware entwickelt, die sowohl die Strahllinien-Komponenten als auch die Bildaufnahme steuert.

Hierbei besteht die erste Herausforderung in der Kombination des DELTA-Kontrollsystems mit dem CCD-Kamera Treiber. Das DELTA-Kontrollsystem beruht dabei auf dem Open Source basierten Experimental Physics and Industrial Control System (EPICS) [169]. Im Gegensatz hierzu wird seitens des Herstellers lediglich ein proprietärer, strikt auf Windows basierender CCD-Kameratreiber zur Verfügung gestellt. Vorteilhafterweise wurde an der UC San Francisco mit dem μ Manager ein Open Source Software-Paket zur automatisierten Kontrolle optischer Mikroskope entwickelt [170]. Neben anderen CCD-Kameras kann dieses Paket auch die hier verwendete PCO CCD-Kamera ansprechen und steuern. Da es auf dem bereits für die Bildauswertung verwendeten ImageJ [166, 167] basiert, lässt es sich relativ einfach in das bestehende System einbinden. Basierend hierauf wurde mittels Java das in Abbildung 5.6 gezeigte Programm zur PEEM-Datenaufnahme mit μ Manager (Software for PEEM-data Acquisition with Micro-Manager, S.P.A.M.M.) entwickelt und implementiert [171].

Dieses Programm ermöglicht dem Benutzer zum einen die Parameter der Bildaufnahme wie Speicherort, Name der Sequenz, fortlaufende Nummerierung, Belichtungszeit pro Bild und Anzahl der Bilder je Photonenenergie festzulegen. Zum anderen legt der Benutzer die spektroskopischen Messparameter fest. Diese umfassen Startwert, Endwert und Schrittweite der Photonenenergie, die zur Energie korrespondierende maximale und minimale Undulator-Lücke, sowie die zu nutzende Methode der Photonenfluss-Messung. Zum Starten der Messung muss der Benutzer nur noch den „Start Sequence“-Knopf betätigen. Während der Messung kann die Energieeinstellung der Strahllinie und die Motoren über ein separates Fenster überwacht werden. Beide Fenster verfügen über ein Sicherheitsmechanismus zum manuellen Stoppen der Messung („STOP“). Im zweiten Fenster kann darüber hinaus eine Notabschaltung („EMERGENCY STOP“) durchgeführt werden. Dies führt zu einer instantanen Deaktivierung der Motoren.

Die Wahl der spektroskopischen Messparameter unterliegt hierbei zweier Einschränkungen. Zum einen kann aus programmiertechnischen Gründen innerhalb einer Messung

die Undulator-Harmonischen nicht gewechselt werden [172]. Zum anderen ist die Reproduzierbarkeit der Undulator-Lücke nur bei einer Verkleinerungen der Lücke gegeben. Beide Einschränkungen haben dabei eine gemeinsame Ursache, das Hystereseverhalten der Schrittmotoren des Undulators. Ein zuverlässiges und genaues Anfahren einer spezifischen Undulator-Lücke ist dadurch nur in der „Zufahr“-Richtung gewährleistet. Beim Wechseln der Undulator-Harmonischen wäre jedoch ein Vergrößern der Undulator-Lücke nötig. Für die Größe der Undulator-Lücke bedeutet dies, dass der Startwert (G_{Start}) nicht kleiner als der Endwert (G_{Ende}) sein darf:

$$G_{\text{Ende}} \leq G_{\text{Start}}. \quad (5.1)$$

Da die Undulator-Harmonische nicht gewechselt wird, darf auch der Startwert des Energiebereiches (E_{Start}) nicht kleiner als die Endenergie (E_{Ende}) sein:

$$E_{\text{Ende}} \leq E_{\text{Start}}. \quad (5.2)$$

Sollten beide Bedingungen (5.1) und (5.2) nicht erfüllt sein, so wird von einer Vertauschung der Reihenfolge bei der Eingabe ausgegangen. S.P.A.M.M. tauscht daher die jeweiligen Start- und Endwerte miteinander, teilt dies dem Nutzer mit und verfährt weiter, wie nach einer ordnungsgemäßen Eingabe. Wird hingegen lediglich eine der Bedingungen nicht erfüllt, beendet S.P.A.M.M. die Messesequenz mit einer Fehlermeldung.

Nach einer ordnungsgemäßen Eingabe prüft S.P.A.M.M., ob der gewählte Energiebereich innerhalb des hinterlegten Wertebereiches des aktuell im Betrieb befindlichen PGM-Gitters liegt. Ist dies nicht der Fall, so wird eine Fehlermeldung ausgegeben. Von einem automatischen Gitterwechsel wurde mit Absicht abgesehen, da diese Prozedur die Aufsicht erfahrenen Strahllinien-Personals benötigt. Wird der Energiebereich als zulässig erkannt, so beginnt das Programm eine Reihe von Sequenzen auszuführen. Die Anzahl dieser Sequenzen wird dabei aus dem Startwert, dem Endwert und Schrittweite der Photonenenergie berechnet. Die zu jeder Sequenz gehörigen Interaktionen sind in Abbildung 5.7 skizziert.

Im ersten Schritt einer jeden Sequenz wird die zu setzende Photonenenergie berechnet, indem die Photonenenergie der vorangegangenen Sequenz um einen Energieschritt vermindert wird. Über die JCA-Schnittstelle (Java Channel Access) [173] wird diese Energie an EPICS übergeben. Eine in EPICS implementierte Subroutine sorgt nun für die passende Verkipfung des Gitters und des Spiegels im PGM. Um den Photonenfluss

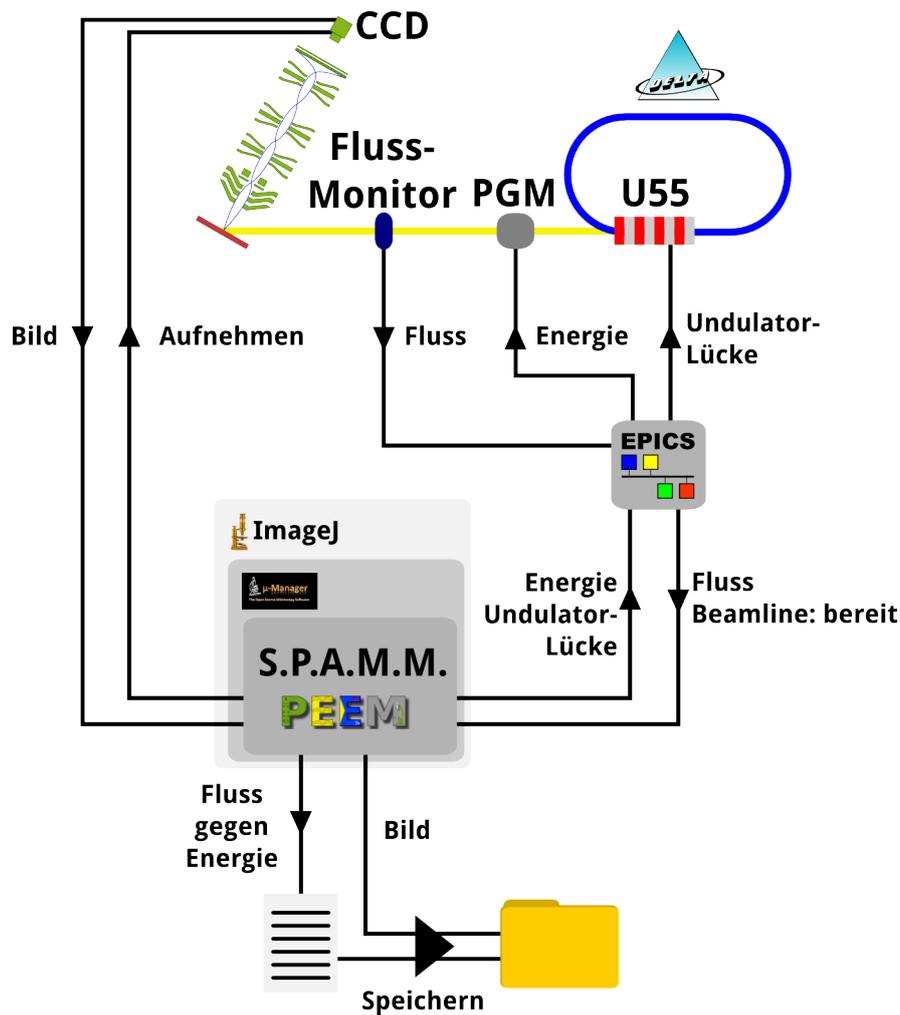


Abbildung 5.7.: Vereinfachte, graphische Darstellung der Interaktionen von S.P.A.M.M. mit den gesteuerten Komponenten.

für diese Energie zu maximieren, muss die korrekte Undulator-Lücke eingestellt werden. S.P.A.M.M. berechnet dies Undulator-Lücke aus der vorangegangenen Undulator-Lücke und der Schrittweite der Undulator-Lücke. Diese Schrittweite (ΔG) bestimmt sich dabei mittels linearer Interpolation aus der Energieschrittweite (ΔE) und den Startwerten und Endwerten der Undulator-Lücke, sowie der Photonenenergie:

$$\Delta G = \frac{G_{\text{Start}} - G_{\text{Ende}}}{E_{\text{Start}} - E_{\text{Ende}}} \cdot \Delta E. \quad (5.3)$$

Nachdem die Photonenenergie und Undulator-Lücke eingestellt sind und die dazugehörigen Motoren ruhen, beginnt S.P.A.M.M. mit der Aufnahme der vorher eingestellten

Anzahl von Bildern. Die Bilder werden unter dem vorgegeben Namen und Ort gespeichert. Als Namenszusätze werden die genutzte Photonenenergie und eine laufende Nummer verwendet, letztere nur wenn mehrere Bilder je Energie aufgenommen werden sollen. Gleichzeitig wird die zur späteren Normierung auf den Photonenfluss genutzte Größe gemessen. Hierbei handelt es sich um den Strom, der wahlweise zum letzten Spiegel der Strahllinie oder zu einem unmittelbar vor dem Experiment im Strahlengang befindlichen Goldnetz fließt. Dieser Messwert wird zusammen mit der Photonenenergie in eine für die gesamte Messreihe angelegten Textdatei geschrieben. Im Anschluss hieran wird mit der nächsten Sequenz begonnen, solange bis entweder die Endenergie erreicht ist oder die Messung vom Nutzer abgebrochen wird.

Aus der Entwicklung von S.P.A.M.M. ist ein weiteres Programm hervorgegangen. Dieses findet Anwendung bei Absorptionsexperimenten an der Photoelektronenspektroskopie-Kammer, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll. Eine nähere Beschreibung findet sich im Anhang B.

6. Datenbearbeitung und Identifizierbarkeit der MTB

In diesem Kapitel wird auf die Bearbeitung der aufgenommenen Daten näher eingegangen. Bevor sich das nachfolgenden Kapitel 7 mit den Entwicklung der Präparationmethode befasst, soll hier auf PEEM-Bilder erfolgreich präparierter Proben vorgegriffen werden. Anhand dieser wird beschrieben, wie sich die *M. magnetotacticum* mittels PEEM identifizieren lassen.

6.1. Datenbearbeitung der PEEM-Spektren

Im Folgenden soll auf die Bearbeitung der vom PEEM gelieferten Daten eingegangen werden. Zu diesem Zweck sind in Abbildung 6.1 einige Bilder einer PEEM-Sequenz natürlich oxidiertem Siliziums gezeigt. Für jedes Einzelbild wird dabei mit einer leicht andere Photonenenergie angeregt. Zu beachten ist dabei, dass sämtliche Aufnahmen mit den identischen Linseneinstellungen aufgenommen werden müssen. Eine Änderung der Linseneinstellung während der Messung hätte eine veränderte Abbildung der Probenoberfläche zur Folge. Da das Auswerteverfahren auf der Intensitätsänderung ein und der selben Stelle auf der Probe basiert, würde eine derartig veränderte Abbildung eine Auswertung nahezu unmöglich machen. Diese durch die energieabhängige Absorption der Probe verursachte Intensitätsänderung lässt sich in Abbildung 6.1 bereits anhand der leicht unterschiedliche Helligkeit der Bilder erahnen. Über die pure Helligkeitsverteilung in einem PEEM-Bild lässt sich an dieser Stelle jedoch noch keine zuverlässige Aussage über die Zusammensetzung der Probe treffen. So können chemische Stoffe, an den Absorptionskanten anderer Elemente heller erscheinen als diese Elemente selbst [142]. Zudem besteht die Möglichkeit die einzelnen Bilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufzunehmen. Dies könnte ebenfalls den subjektiven Effekt einer Intensitätsveränderung hervorrufen. Aus diesem Grunde ist eine individuelle Normierung der Bilder auf ihre

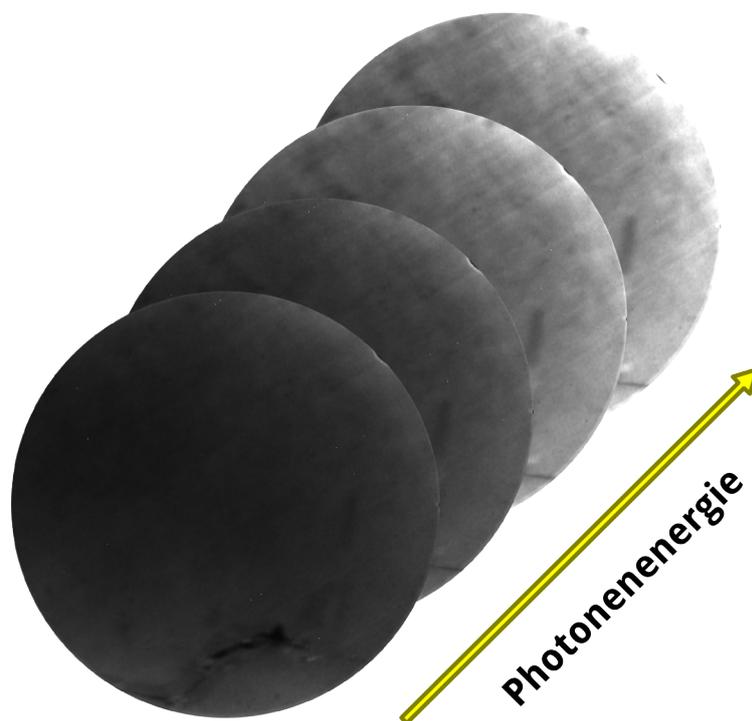


Abbildung 6.1.: Auswahl aus einer Sequenz von PEEM-Bildern einer natürlich oxidierten Silizium-Oberfläche. Jedes Bild wurde mit den gleichen Linseneinstellungen und Belichtungszeiten bei einer jeweils leicht unterschiedlichen Photonenergie nahe der Si-L-Absorptionskanten aufgenommen.

jeweilige Belichtungszeit wichtig. Dieser Schritt kann gegebenenfalls entfallen, sofern für alle Bilder der Sequenz die Aufnahmezeit konstant gehalten wird, wie es im hier gezeigten Beispiel der Fall ist.

Um die orts aufgelöste Intensitätsveränderung genauer zu untersuchen, muss die Bildsequenz in ein geeignetes Programm eingelesen werden. In dieser Arbeit wurde hierzu das in Kapitel 5.3 beschriebene ImageJ verwendet.

Abhängig von den experimentellen Gegebenheiten und der gewählten Vergrößerung, kann es während der Messung zu einer Bewegung der Probe relative zur Optik kommen, auch Drift genannt. Die häufigste Ursache hierfür sind thermisch bedingte Ausdehnungen des Manipulators sowie der restlichen Apparatur. Während der Messungen kann diese Drift meist nicht unterdrückt werden. An dieser Stelle der Datenbearbeitung lässt sich eine Drift der Probe jedoch meist kompensieren. Eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Drift-Kompensation ist dabei ein klar erkennbares Merkmal auf der Probe. Ferner muss dieses Merkmal in allen Bildern der Sequenz sichtbar sein. Mittels diesem

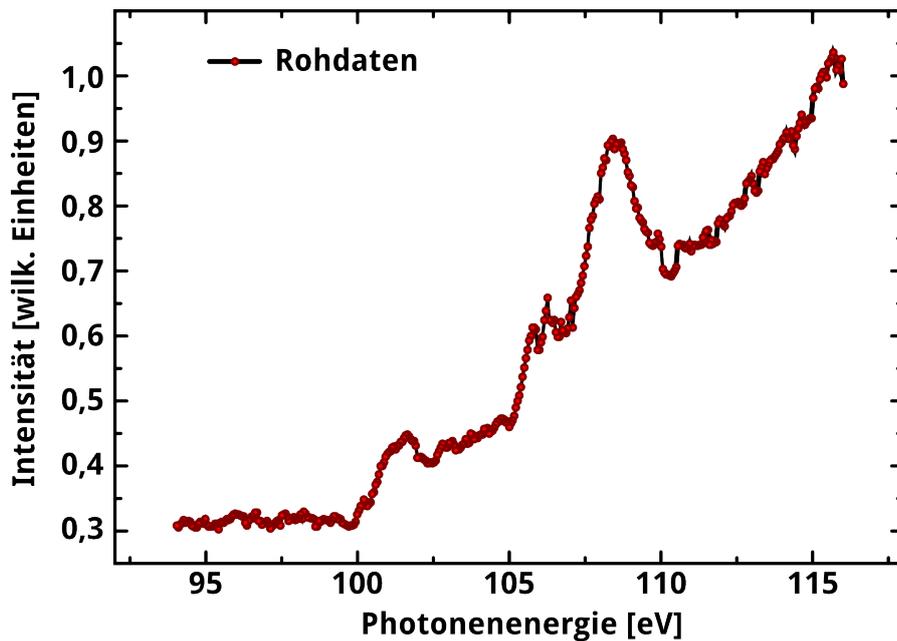


Abbildung 6.2.: Intensitätsverlauf einer Sequenz von PEEM-Bildern einer natürlich oxidierten Silizium-Oberfläche, wie teilweise in Abbildung 6.1 gezeigt. Die Schrittweite der Photonenergie zwischen den einzelnen Bildern beträgt 55 meV.

Merkmals wird im Folgenden jedes Einzelbild der Sequenz so verschoben, dass dieses Merkmal in allen Bildern des resultierenden Bildstapels genau übereinander liegt. Dies kann entweder manuell erfolgen oder automatisiert mittels Programmen wie StackReg für ImageJ [174].

Nach dieser gegebenenfalls nötigen Drift-Korrektur kann nun eine Region von besonderem Interesse (Region of Interest, ROI) aus dem Bildbereich ausgewählt werden. Den Intensitätsverlauf gegen die Photonenergie einer derartigen ROI aus der in Abbildung 6.1 gezeigten Sequenz ist in Abbildung 6.2 zu sehen. In diesem Intensitätsverlauf lassen sich bereits erste Intensitätsmodulationen erkennen. Einbrüche in der Intensität, wie beispielsweise oberhalb von $h\nu = 110$ eV, und der relativ verrauschte Kurvenverlauf können dabei nicht von der Bildaufnahme herrühren.

Ein Effekt der bis hierhin nicht berücksichtigt wurde ist die Abhängigkeit der Bildhelligkeit von der anregenden Photonenergie. Da eine Strahllinie als einstellbare Lichtquelle dient, gibt es zwei hauptsächliche Einflüsse auf die anregende Intensität. Zum einen ist dies der konstruktiv bedingte Helligkeitsunterschied der Strahllinie für

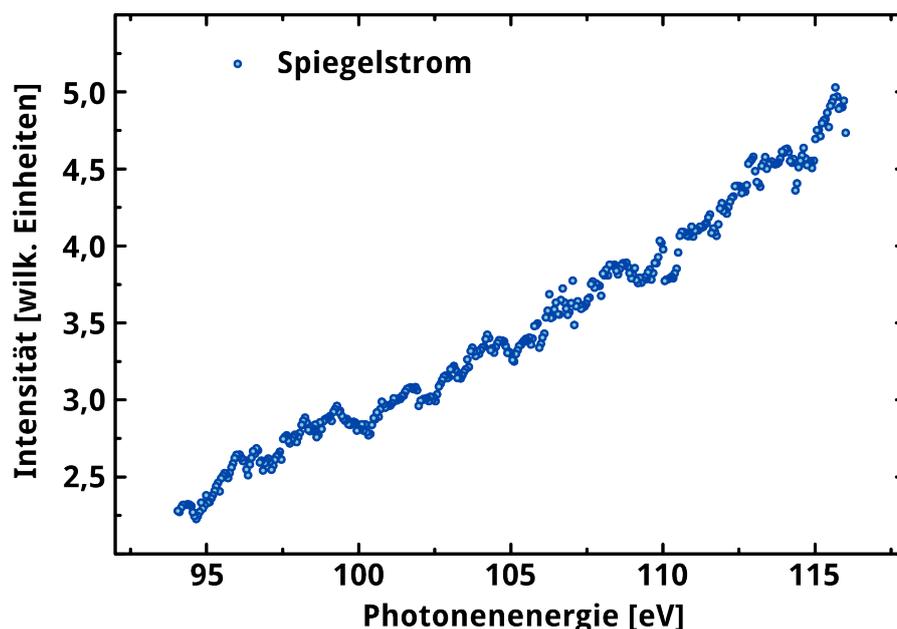


Abbildung 6.3.: Der von S.P.A.M.M. parallel zu den PEEM-Bildern aufgenommene Spiegelstrom, als Maß des Photonennflusses.

unterschiedliche Photonenergien. Zum anderen bewirkt der Abfall des im Speichering befindlichen Stroms eine Intensitätsabnahme, selbst bei konstant gehaltenen Strahleneinstellungen. Um die Messergebnisse um die Beiträge dieser beiden Effekte zu bereinigen, muss der Photonfluss während der Messung mitgeschrieben werden. In der in Kapitel 5.3 beschriebenen S.P.A.M.M.-Software wird der Photonfluss unter anderem indirekt über den Spiegelstrom des letzten Strahlspiegels gemessen. Dieser Spiegelstrom ist in Abbildung 6.3 als Funktion der Photonenergie gezeigt. Zur weiteren Normierung reicht dieser als proportionales Maß des Photonennflusses aus, da es hierbei nicht auf den exakten Wert des Photonennflusses ankommt.

Zur weiteren Normierung werden nun die Rohdaten aus Abbildung 6.2 durch die zugehörigen Werte des Spiegelstroms aus Abbildung 6.3 dividiert. Das hieraus entstehende, normierte Spektrum ist in Abbildung 6.4 gezeigt. Wie gut zu erkennen ist, konnten durch diesen Normierungsschritt Effekte, wie der Einbruch in der Intensität kurz hinter $h\nu = 110$ eV, beseitigt werden. Im so erzielte Spektrum sind nun die Absorptionssignale des reinen Silizium (ab 100 eV) sowie des Siliziumoxids (ab 105 eV) gut zu erkennen [175].

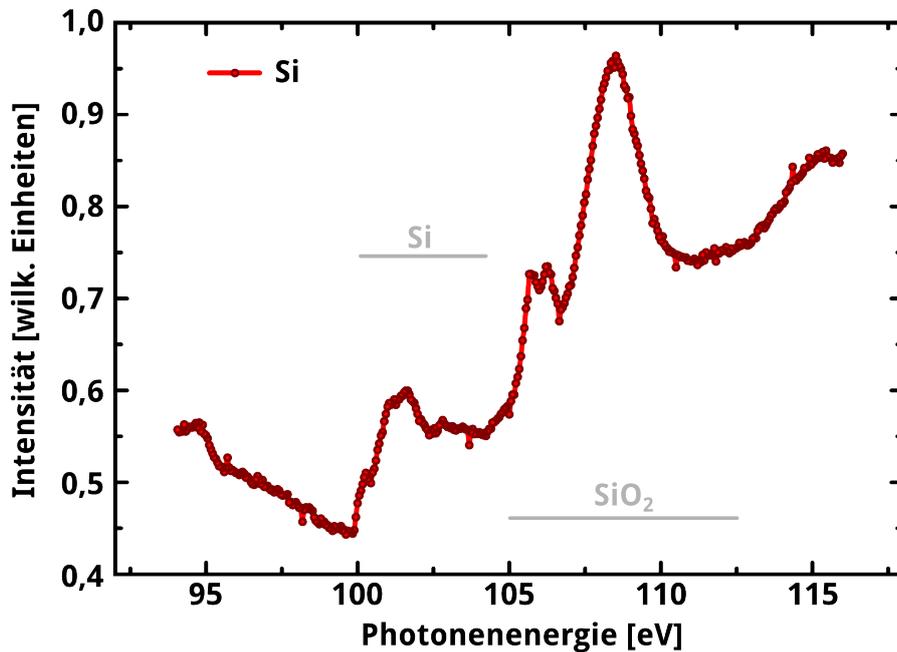


Abbildung 6.4.: PEEM-XAS Spektrum eines natürlich oxidierten Si-Wafers, nach Normierung auf den Spiegelstrom. Gut zu erkennen sind Beiträge des reinen Silizium ab 100 eV, sowie des Siliziumoxid ab 105 eV.

6.2. Identifizierbarkeit mittels PEEM

Um die *M. magnetotacticum* mittels PEEM weitergehend untersuchen zu können, müssen diese unter dem Mikroskop identifiziert werden. Dabei sind die Bakterien unter dem PEEM nicht so problemlos auszumachen wie beim SEM. Ursache hierfür ist die im Vergleich zum SEM geringer ausfallende Ortsauflösung dieser mikroskopischen Technik. Wie bakterienhaltige Oberflächen unter dem PEEM aussehen können, wird im Kapitel 7 gezeigt. Hier soll nun detaillierter auf die Identifizierbarkeit der *M. magnetotacticum* auf fertig präparierten Probenoberflächen eingegangen werden.

Hierzu zeigt Abbildung 6.5 einen Bereich einer Probe, die nach der finale Präparationsmethode aus Kapitel 7.3 präpariert wurde. Die freiliegenden Bakterien lassen sich hier als helle, in erster Näherung stabförmige Gebilde erkennen. Einige Individuen weisen darüber hinaus eindeutig die charakteristische und für Spirillen namensgebende, wendelförmige Gestalt auf (rote Pfeile). Bei der Mehrheit der Bakterien ist diese wendelförmige Gestalt jedoch weniger stark ausgeprägt. Diese sind deutlich schwächer geschwungen und weisen vielmehr eine leichte, ein bis zweifache „S“-Form auf (blaue Pfeile). Bei beiden Gruppen handelt es sich um relative große *M. magnetotacticum*,

die weitgehend frei von Salzresten vorliegen. Sie lassen sich daher relativ einfach als *M. magnetotacticum* zu identifizieren.

Wie sich im nachfolgenden Kapitel 7 zeigen wird, ist es nicht möglich die Probenoberfläche vollständig von Salzresten zu befreien und gleichzeitig einen nennenswerten Anzahl Bakterien beizubehalten. Demzufolge lassen sich auch in Abbildung 6.5 weiterhin Bereiche mit dünnen Salzresten auffinden. Innerhalb dieser Regionen lassen sich ebenfalls Strukturen finden, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um *M. magnetotacticum*

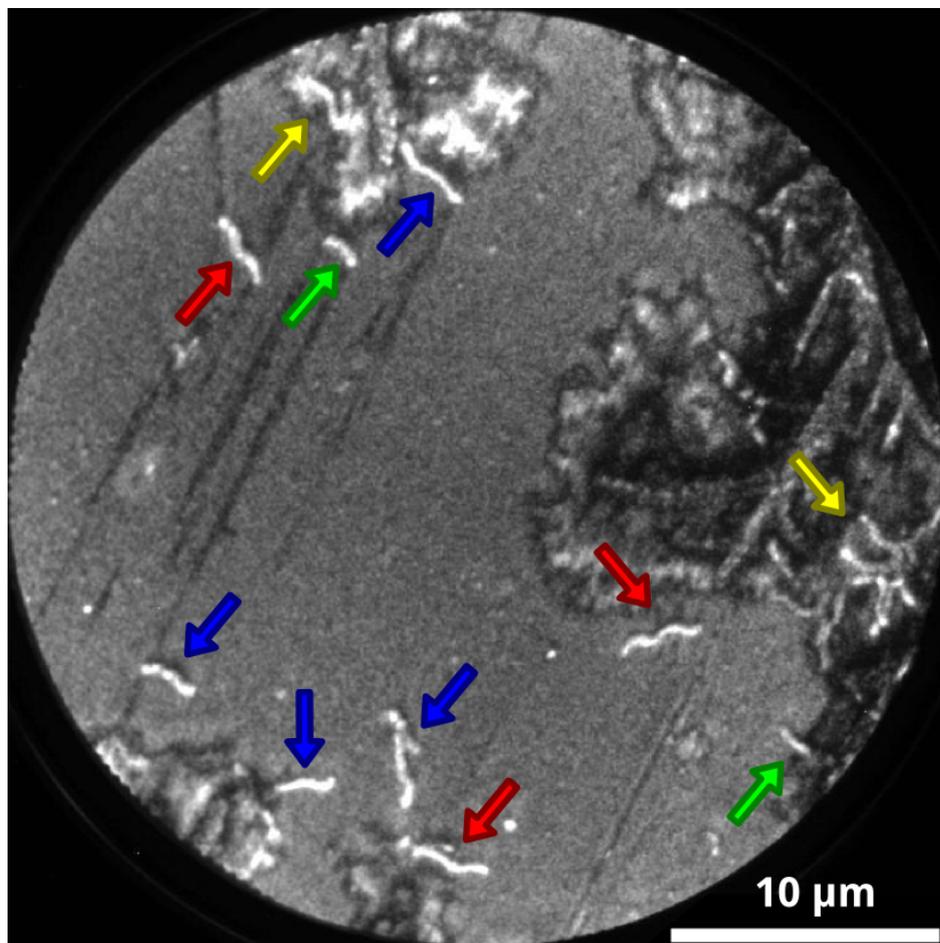


Abbildung 6.5.: PEEM-Bild von *M. magnetotacticum* in Schwellenwertemission. Gut zu erkennen sind die in sauberen Bereichen der Probenoberfläche hell erscheinenden Bakterien. Die Pfeile zeigen dabei auf wendelförmige (rote Pfeile), schwächer geschwungene (blaue Pfeile) sowie kleiner (grüne Pfeile) Bakterien. In den Randbereichen des Bildes sind minimale Salzreste mit eingeschlossenen Bakterien zu erkennen (gelbe Pfeile).

handelt (gelbe Pfeile). SEM-Aufnahmen wie in Abbildung 7.4 werden zeigen, dass sich die Bakterien teilweise stark verflochten in den Salzstrukturen anreichern. Diese Strukturen werden nicht weiter untersucht, da die Salze sowohl durch Aufladungen als auch durch das Verdecken der Bakterien die Messungen stören.

Als weitere Gruppe lassen sich noch relativ kleine *M. magnetotacticum* auffinden (grüne Pfeile). Eine Region mit mehreren dieser kleinen *M. magnetotacticum* ist in Abbildung 6.6 zusammen mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme gezeigt. Zum Vergleich sind in den beiden Aufnahmen ähnlich geformte Bakterien mit jeweils gleichfarbigen Kreisen markiert. Diese kleineren Bakterien variieren teilweise sehr in ihrer genauen Form. Im Allgemeinen treten sie jedoch in einer mehr oder minder stark ausgeprägten Sichelform

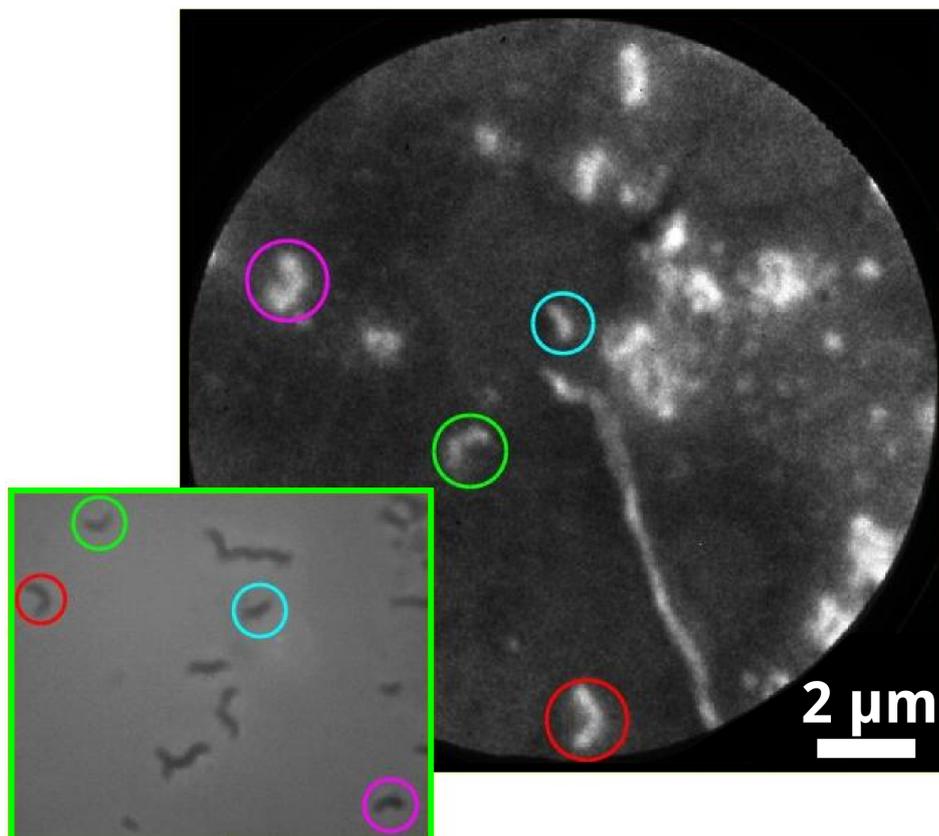


Abbildung 6.6.: Vergleich der präparierten Proben unter dem PEEM mit einer lichtmikroskopischen Aufnahme. Auch kleinere *M. magnetotacticum* können mit dem PEEM abgebildet werden. Die farbigen Kreise in den Bildern zeigen jeweils Bakterien ähnlicher Form. Da sich diese in ihrer jeweiligen Form stark unterscheiden können, ist es besonders in Regionen mit Salzresten schwierig diese klar auszumachen.

auf (blaue, grüne und violette Kreise). Einige zeigen Ansätze der typischen „S“-Form größerer Bakterien (rote Kreise). Diese Abweichungen zur Form der größeren Bakterien liegt zum einen in der Reproduktion der *M. magnetotacticum* durch Zellteilung. Die beiden dabei entstehenden Tochterzellen sind folglich kleiner und wiesen nur einen Teil der ursprünglichen Wendelform auf. Zum anderen ist die anscheinende Form des Bakteriums abhängig von der Rotation des Bakteriums um seine Längsachse. So handelt es sich bei die den hier gezeigten Bildern immer um zweidimensionale Abbildungen von dreidimensionalen Organismen auf einer Oberfläche. Zusammenfassend lassen sich somit selbst die nach der Zellteilung auftretenden, kleineren Bakterien mittels PEEM abbilden. Diese kleineren Bakterien sind für die weiteren Untersuchungen von untergeordnetem Interesse. Vielmehr wird im Folgenden das Hauptaugenmerk auf die größeren *M. magnetotacticum* gelegt, da sie die längeren Magnetosomen-Ketten aufweisen.

7. Probenpräparation und Probengüte

Die in dieser Arbeit verwendeten *M. magnetotacticum* Kulturen wurden über das Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [176] bezogen. Angeliefert werden diese aktiv wachsenden Kulturen in luftdicht versiegelten und mit einem flüssigen Nährmedium (siehe Kapitel A.1) gefüllten Reagenzgläsern. Zur weiteren Untersuchung müssen die Bakterien angereichert und auf eine geeignete Weise auf ein Substrat aufgebracht werden. In diesem Kapitel wird auf möglichen Methoden hierfür eingegangen. Anschließend werden die so präparierten Proben miteinander verglichen, um die bestgeeignete Präparation zu bestimmen.

7.1. Anreicherung

Im angelieferten Zustand sind die Bakterien nahezu homogen in dem Nährmedium verteilt, was zu einer relativ geringen Bakteriendichte führt. Wird eine Probe aus einem gerade entsiegelten Reagenzglas entnommen, lassen sich daher keine Bakterien unter dem Lichtmikroskop finden. Um Untersuchungen an *M. magnetotacticum* zu ermöglichen, muss somit die lokale Bakteriendichte mittels geeigneter Anreicherungsverfahren deutlich erhöht werden.

Im ersten Schritt der Anreicherung wird das magneto-aerotaktische Verhalten der Bakterien genutzt. Hierzu wird die Bakterienkultur einem Sauerstoff-Gradienten ausgesetzt. Praktisch geschieht dies, indem das luftdichte Reagenzglas geöffnet und vorsichtig, manuell geschwenkt wird. Das Schwenken wird solange fortgeführt, bis die obersten Schichten der Nährlösung von klar in einen violetten Farbton umschlagen. Dies führt zu einem Sauerstoff-Gradienten in der Nährlösung, der die Migration der *M. magnetotacticum* in Richtung OATZ in Gang setzt. Verschluss mit einer luftdurchlässigen, desinfizierten

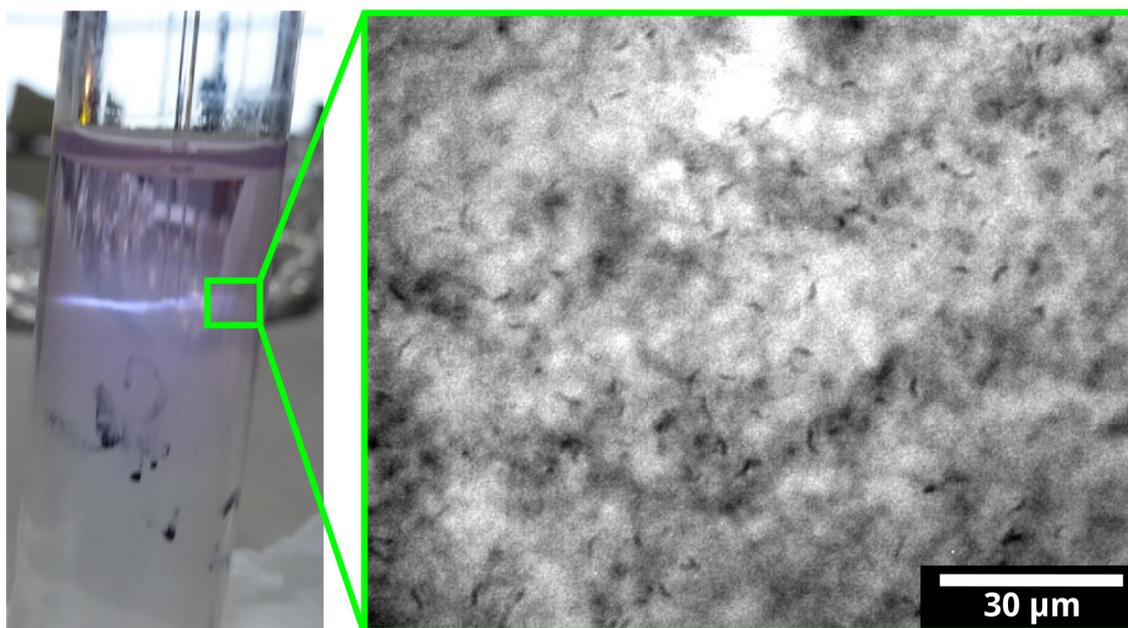


Abbildung 7.1.: Links: Ein Reagenzglas mit der bakterienhaltigen Nährlösung. Der obere Teil der ansonsten klaren Nährlösung hat sich nach dem Kontakt mit der Umgebungsluft leicht violett verfärbt. Die stark bakterienhaltige Schicht ist als dünne, milchige Bande mittig im Bild zu sehen. Rechts: Getrocknetes Extrakt aus der OATZ unter dem Durchlichtmikroskop. Die Bakterien sind als schwache, dunkle Stäbchen im Nährmedium zu erkennen.

Abdeckung, wird das so vorbereitete Reagenzglas aufrecht in einem abgedunkelten Behältnis bei Raumtemperatur gelagert. Nach 48 Stunden ist die Migration der Bakterien zum Großteil abgeschlossen. Wie links in Abbildung 7.1 zu sehen ist, hat sich ungefähr 1 cm unterhalb der Oberfläche des Nährmediums eine milchige, mit bloßem Auge sichtbare Bande ausgebildet. Diese enthält die *M. magnetotacticum*, die sich in der OATZ angereichert haben. Mittels einer mechanisch verstellbaren Mikroliter-Spritze kann nun die Bakterien-Nährmedium-Lösung vorsichtig aus der OATZ abgesaugt werden. Im rechten Teil von Abbildung 7.1 ist das an Luft getrocknete Extrakt unter dem Lichtmikroskop zu sehen. Neben den dunkel erscheinenden Bakterien wird die Aufnahme vom getrockneten Nährmedium dominiert. Für die weiteren Untersuchungen ist diese Struktur ungeeignet, da die festen Komponenten des Nährmediums die Bakterien von allen Seiten umgeben. Für die SEM-Aufnahmen sowie die PEEM-Aufnahmen werden Bakterien jedoch in einer möglichst rückstandsfreien Umgebung benötigt, um Abbildungsfehler und das Verdecken der Bakterien auszuschließen. Daher ist eine weitere Behandlung des Extraktes aus der OATZ nötig.

Eine mögliche Methode, wie sich eine Separation von Bakterien und Nährstoffrückständen realisieren lässt, ist die Lyophilisation oder Gefriertrocknung des Extraktes. Dabei wird das gesamte Extrakt zunächst tiefgefroren und anschließend bei konstanter Temperatur sublimiert. Das hierbei entstehende Lyophilisat weist jedoch eine schwammartige Struktur auf, die nur äußerst eingeschränkt für eine weitere Präparation geeignet ist. Zwar gelang es hiermit erstmals magnetotaktische Bakterien mittels PEEM abzubilden [150], diese lagen jedoch vereinzelt und auf dem Substrat weit verstreut vor. Die Dichte der erkennbaren Bakterien liegt somit weit unterhalb der, in den lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennbaren Bakteriendichte des Extraktes. Da nach Kapitel 2.1) nicht alle Bakterien Magnetosomen ausbilden, müsste eine zu große Anzahl an Proben präpariert werden, bis ein Magnetosomen ausbildendes Bakterium aufgefunden wird. Eine Methode, die eine derart geringe Anzahl an erkennbaren Bakterien liefert, eignet sich daher nicht für Untersuchung der Magnetosomen-Ketten.

Aufgrund ihrer deutlich höheren Bakteriendichte unter dem Lichtmikroskop erscheint das Lufttrocknungsverfahren vielversprechender als die Lyophilisation. Im Weiteren werden daher Möglichkeiten untersucht, diese Präparation zu verfeinern und die Rückstände des Nährmediums zu minimieren.

7.2. Wasch-Prozedur

Die in der Mikrobiologie übliche Prozedur zur Trennung von Bakterien von dem sie umgebenden Medium, ist das Durchführen einer speziellen Wasch-Prozedur [177]. Hierbei wird das Extrakt in ein Mikroreaktionsgefäß gefüllt und zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wird anschließend mit einer geeigneten Lösung resuspendiert. Um die Zellhülle während des Zentrifugierens nicht zu beschädigen, darf die relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force, RCF) nicht zu groß gewählt werden [178].

Nach einigen Versuchen mit unterschiedlichen relativen Zentrifugalbeschleunigungen hat sich eine RCF von 10 000 g als geeignet für die *M. magnetotacticum* herausgestellt. Beim Zentrifugieren mit dieser RCF bleiben die Bakterien unbeschädigt. Im Unterschied zu vielen anderen Spezies [179, 180], gelingt es hiermit nicht die *M. magnetotacticum* in einem festen Zellpellet anzureichern. Vielmehr sammelt sich eine gallertartige Masse am Boden des Mikroreaktionsgefäßes an. Oberhalb dieser findet sich eine wässrige Phase, die im weiteren Verlauf dekantiert wird. Da sich in der gallertartigen Masse noch unerwünschte Reste des Nährmediums befinden, wird diese Masse mit 1000 μL

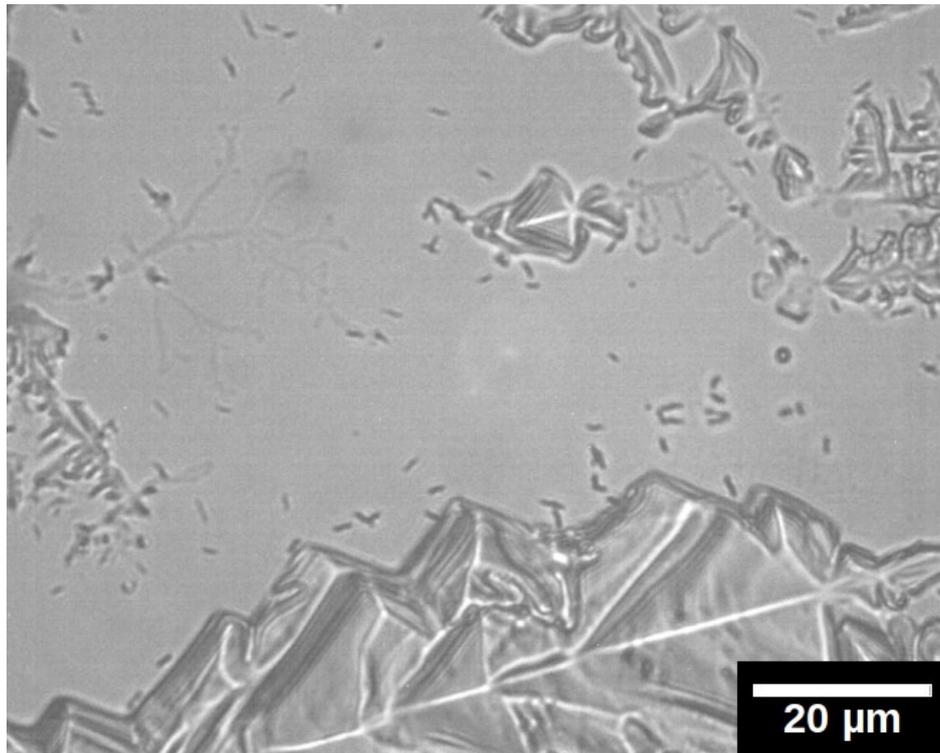


Abbildung 7.2.: Getrocknete Probe unter dem Durchlichtmikroskop. Die Bakterien sind als dunkle Stäbchen zu erkennen. Die kristallinen Salzreste sind sehr dominant. Ihre Formen reichen von großen Kristallen (Unterkante) bis hin zu feinen Zweigstrukturen (linkes, oberes Viertel).

phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Kapitel A.2) resuspendiert. Im Anschluss erfolgt ein erneutes Zentrifugieren, inklusive Dekantieren und Resuspendieren. Die genaue Prozedur sieht somit wie folgt aus:

- 15 Minuten zentrifugieren bei RCF=10 000 g und 4 °C
- Dekantieren
- Resuspendieren mit 1000 µL PBS
- 5 Minuten zentrifugieren bei RCF=10 000 g und 4 °C
- Dekantieren
- Resuspendieren mit 500 µL PBS

Wird die so angereicherte und gewaschene Bakterien-PBS-Lösung auf einen Objektträger aufgebracht, unterscheiden sich die Oberfläche deutlich von der Bakterien-Nährmedium-Lösung, wie in Abbildung 7.2 zu erkennen ist. Die Bakterien sind nun nicht mehr von den Rückständen des Nährmediums umgeben. Dafür sind nun deutlich unterschiedlich große Rückstände der Salze zu erkennen. Diese variieren hierbei in ihrer Größe, von sehr große Salzkristallen ($\gg 20 \mu\text{m}$) bis hin zu kleinen, sehr feinen Strukturen ($< 1 \mu\text{m}$). Insbesondere die feineren Strukturen lassen sich nur eingeschränkt mit dem Lichtmikroskop erkennen.

Für die weitere Untersuchung der Bakterien ist deren nähere Umgebung von besonderem Interesse. So können sich hier Strukturen ausgebildet haben, die nicht im Lichtmikroskop erkennbar sind. Für SEM- oder PEEM-Untersuchungen könnten diese die Bakterien jedoch verdecken oder die Abbildung anderweitig negativ beeinflussen. Aus diesem

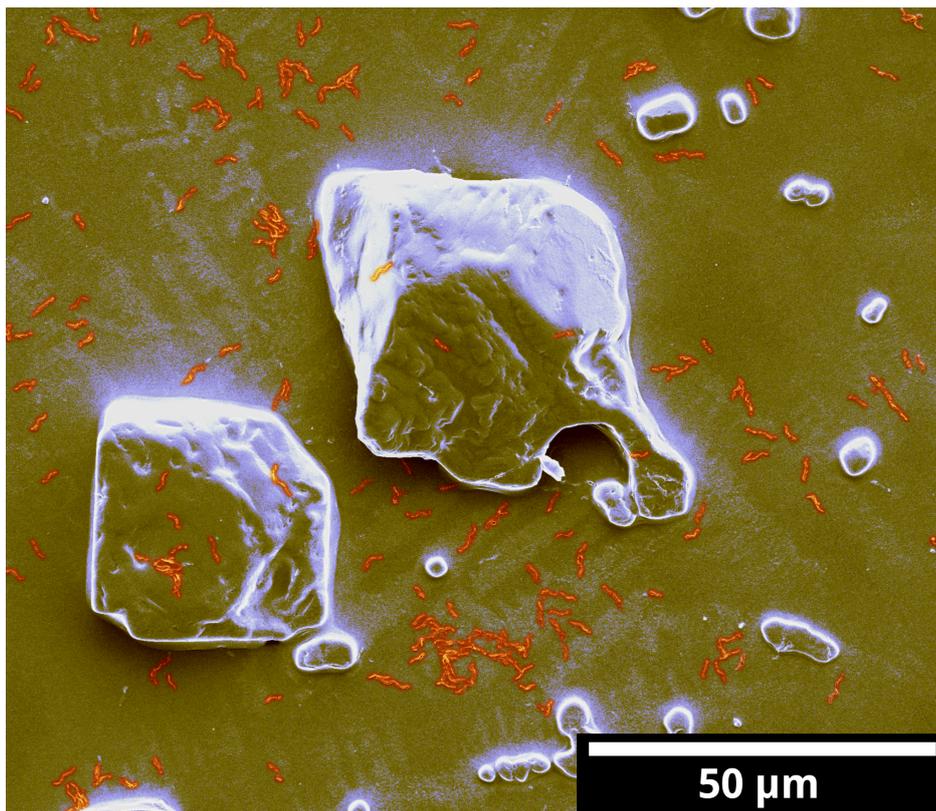


Abbildung 7.3.: Hohe Dichte von *M. magnetotacticum* auf Silizium mit großen Salzkristallen. Die bei der Trocknung entstehenden, dendritischen Salzstrukturen sind schwach in der Umgebung der Bakterien (rot) zu erkennen. Die großen Kristalle sind nicht vollständig im PBS gelöste Salze.

Grunde sollen nun die unterschiedlichen Salzstrukturen mittels SEM näher betrachtet werden. Hierzu wurden die Bakterien-PBS-Lösung analog zum Objektträger auf einen Silizium-Kristall aufgebracht. Um eine leitende Probenoberfläche zu garantieren und Aufladungen vorzubeugen, werden die Proben mit einer dünnen Goldschicht bedampft. Nach dem Einbringen in die SEM-Apparatur können so problemlos Aufnahmen wie in Abbildung 7.3 und Abbildung 7.4 aufgenommen werden.

Abbildung 7.3 zeigt dabei einen Bereich mit einer hohen Bakteriendichte. Dominiert wird der Bildausschnitt von zwei großen Salzkristallen, die zudem von mehreren kleineren Kristallen umgeben sind. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um Salzkristalle, die sich nicht im PBS gelöst haben. Auszuschließen ist, dass es sich um nachträgliche Verunreinigungen der Probenoberfläche handelt, da sich *M. magnetotacticum* auf diesen Kristallen befinden. Bei Verunreinigungen wie Staub oder ähnliches müssten sich die Bakterien ausschließlich unterhalb der Verunreinigung befinden. Äußerst schwach sind

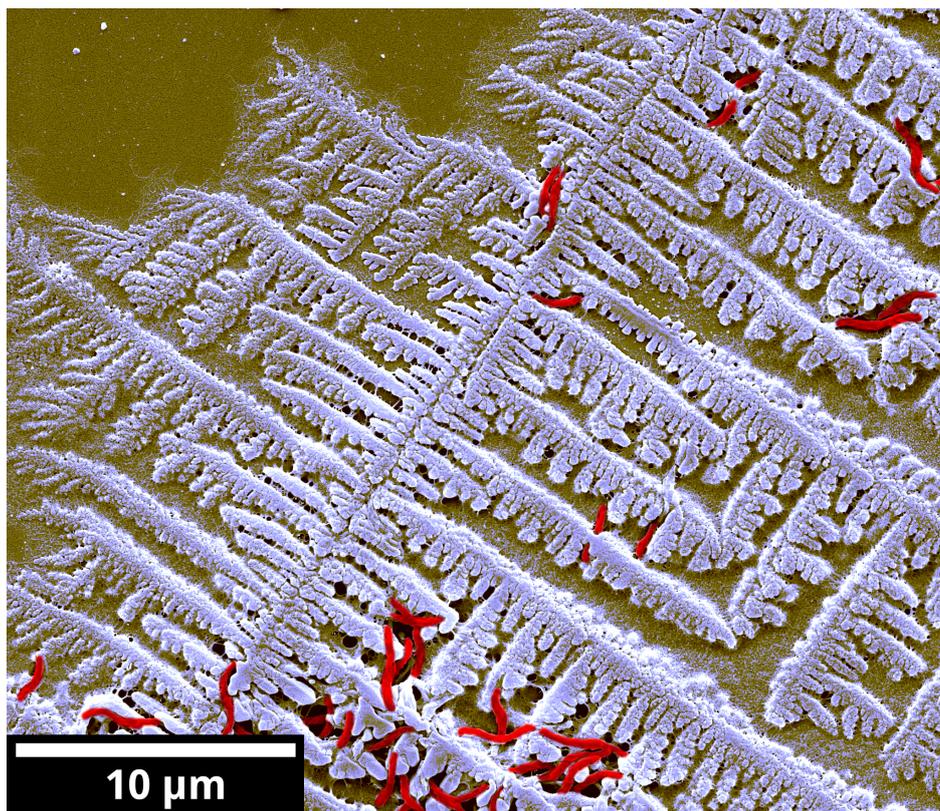


Abbildung 7.4.: SEM-Aufnahme einer goldbeschichteten Probe. Die bakterieneinhaltige Lösung wurde auf dem Silizium-Substrat getrocknet. Die Bakterien (rot) sind von dichten Salzkristallen (blau) umgeben und teilweise verdeckt.

hier weitere, flachere Strukturen zu erkennen. Sie bilden ein Netzwerk aus feineren Strukturen, sind aber nicht deutlich erkennbar.

Da diese Strukturen in der Größenordnung der *M. magnetotacticum* liegen, wurden auch diese genauer betrachtet. Abbildung 7.4 zeigt hierzu die SEM-Aufnahme einer weiteren Probe. Im Vergleich zu Abbildung 7.3 wurde hier eine noch dünnere Schicht Gold aufgebracht. Diese dünnere Schicht bedeckt die feinen Strukturen weniger als es vorher der Fall war. Somit sind nun die feinen, verästelten, dendritische Strukturen deutlich zu erkennen. Diese entstehen typischerweise beim Trocknen salzhaltiger Lösungen [181], wie dem Bakterien-PBS-Gemisch. In dieser Aufnahme lässt sich zudem die Vermischung der Bakterien mit diesen Salzresten sehr gut erkennen. So liegen die Bakterien zwischen den

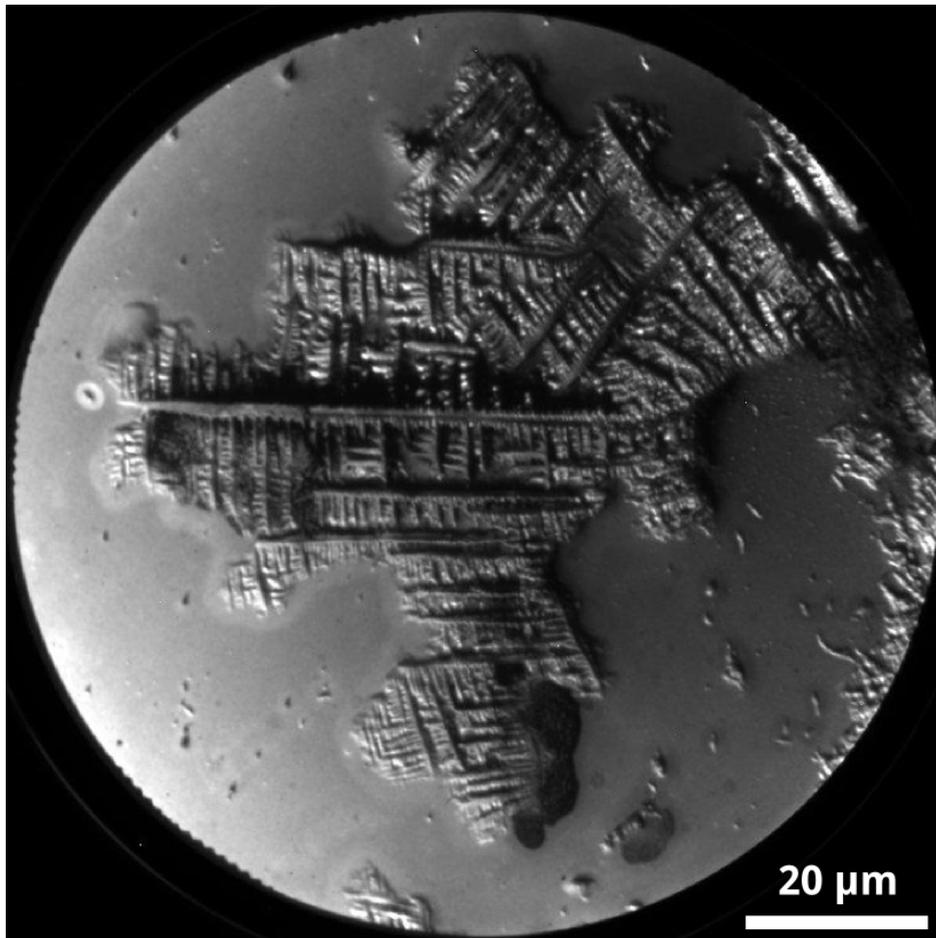


Abbildung 7.5.: PEEM-Bild einer mit Gold beschichteten Probe. Die großflächigen, dendritischen Salzstrukturen sind gut zu erkennen. In den relativ freien Zwischenräumen sind nur vereinzelte Bakterien auszumachen.

Salzkristallen. Viele Bakterien werden zudem vom Salz teilweise bis nahezu vollständig verdeckt.

Da neben den SEM-Messungen auch PEEM-Messungen durchgeführt werden sollen, ist eine Betrachtung der bisherigen Präparationsergebnisse mittels PEEM von Interesse. Abbildung 7.5 zeigt hierzu ein typisches PEEM-Bild dieser Proben. Ein Großteil des gesamten Bildes wird von den dendritischen Salzkristallen ausgefüllt. Abseits dieser Strukturen finden sich weitgehend strukturlose Flächen. Vereinzelt lassen sich dort, neben kleineren Salzresten, auch einzelne *M. magnetotacticum* erkennen. Wie auch bei

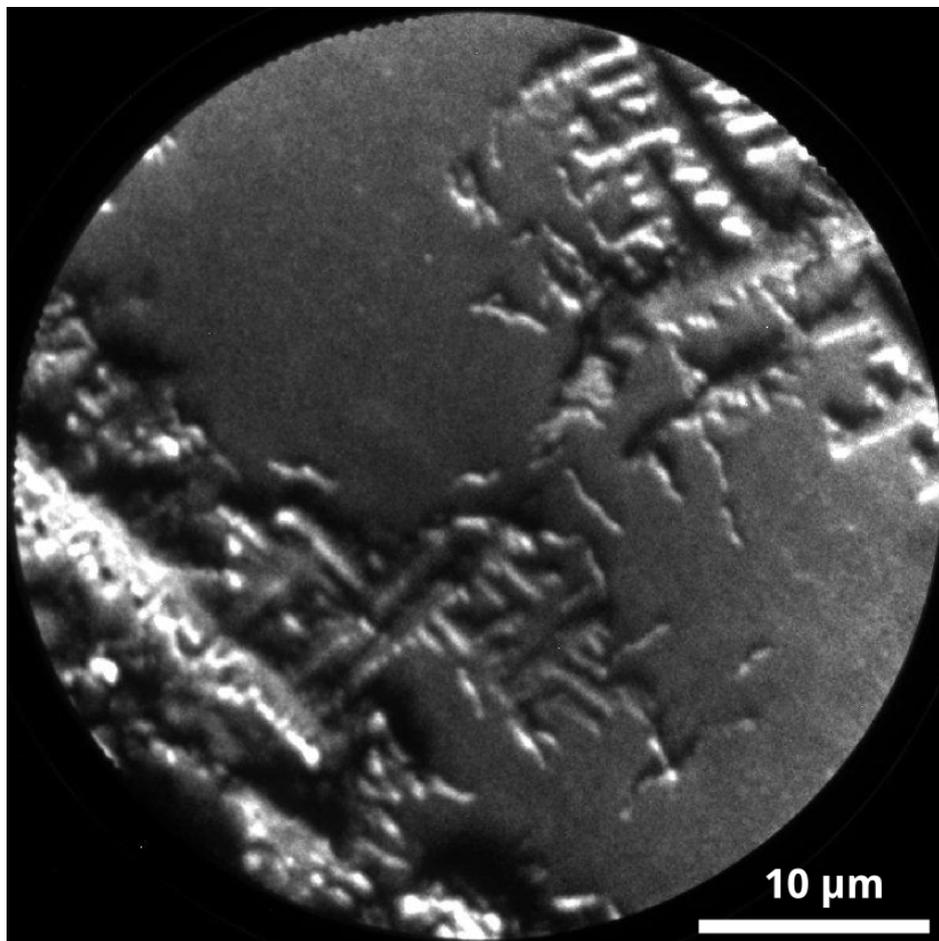


Abbildung 7.6.: PEEM-Detaillaufnahme einer mit Gold beschichteten Probe. Zwischen den Salzstrukturen sind die Bakterien deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu SEM-Bildern, wie Abbildung 7.4, lassen sich keine Bakterien zwischen den Verästelungen ausmachen. Im unteren, linken Bildbereich ist die Topographie so stark, dass sie sich bereits negativ auswirkt.

der in Abbildung 7.6 gezeigten Probenposition, lassen sich keine Bakterien auf den Salzresten erkennen. Lediglich in den Bereichen zwischen den dendritischen Salzresten ist eine größere Anzahl an Bakterien auffindbar. Der Grund hierfür liegt in der ausgeprägten Topographie der Probenoberfläche, auf die das PEEM deutlich empfindlicher reagiert als das SEM. So ist im unteren, linken Bildbereich von Abbildung 7.6 ein klares Abbilden des hell erscheinenden Astes nicht realisierbar. Des Weiteren kommt es zu einem teils starken Schattenwurf, der die Anregung einiger Oberflächenregionen verhindert.

Die Kombination aus natürlicher Anreicherung der Bakterien und der nachfolgenden Wasch-Prozedur hat somit zu einer höheren Bakteriendichte und zur Reduktion der Nährmedienrückstände geführt. Im Gegenzug treten nun getrockneter Salzurückstände auf, die eine Abbildung, insbesondere mittels PEEM, erschweren. Für alle bisher gezeigten Aufnahmen wurde die Probenoberfläche zudem mit einer Goldschicht bedampft, um Aufladungseffekten vorzubeugen. Diese Goldschicht verhindert jedoch einen Zugriff auf Informationen aus dem Bakterieninneren und damit auf die Magnetosomen-Kette, da sie nun zu tief unter der Probenoberfläche liegen. Im Folgenden Abschnitt werden daher weitere Nachbehandlungen der Probenoberfläche diskutiert, mit dem Ziel die Salzkonzentration zu verringern.

7.3. Nachbehandlungen

Der naheliegendste und denkbar einfachste Schritt der weiteren Oberflächenbehandlung, ist das Ablösen der Salzreste von der getrockneten Oberfläche, mittels destilliertem Wasser. Ausgangspunkt der im Folgenden beschriebenen Prozeduren sind nach dem oben beschriebenen Vorgehen präparierten, jedoch nicht mit Gold beschichtete Proben.

In ersten Tests wurden die Proben hierzu vollständig mit destilliertem Wasser bedeckt und in einem Becherglas geschwenkt. Diese lieferten nahezu unbedeckte Oberflächen, auf denen sich kaum noch Salzurückstände auffinden ließen. Neben den Salzen wurden hierbei jedoch auch die *M. magnetotacticum* von der Oberfläche entfernt.

Um ein vollständiges Ablösen der Bakterien von der Probenoberfläche zu verhindern, wird die Kontaktzeit des Wassers mit der Oberfläche reduziert. Hierzu wird die Probe zunächst in einem Winkel von ungefähr 30°, relativ zur Horizontalen, schräg gestellt. Mittels einer Mikroliterpipette werden nun die Salzreste wiederholt von oben beginnend mit 400 µL destilliertem Wasser abgeschwemmt.

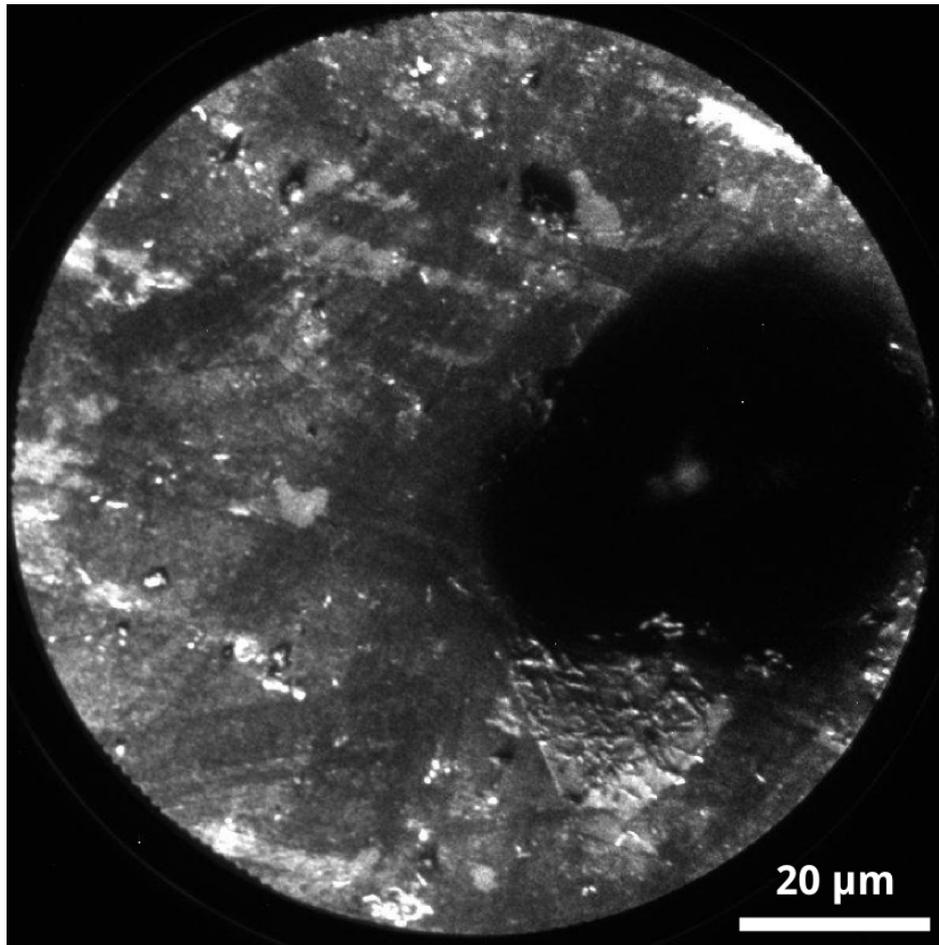


Abbildung 7.7.: PEEM-Aufnahme einer nicht beschichteten Probe. Die luftgetrocknete Bakterien-PBS-Lösung wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Neben dünneren Salzsichten (hellgrau) und kleineren Resten der Salzkristalle, deutet der dunkle Bildbereich auf eine Kombination aus Aufladung und Topographie hin, als Folge massiver Salzreste.

Ein Ausschnitt einer so präparierten Probe ist in Abbildung 7.7 gezeigt. Vor der Untersuchung mittels PEEM wurde diese Probe nicht mit Gold beschichtet. Im Unterschied zu Aufnahmen vor dem Abschwemmen sind nun keine großflächigen, dendritischen Salzstrukturen mehr zu erkennen. Vielmehr weisen nun viele Regionen dünnere Salzsichten auf, die in den PEEM-Bildern als hellgraue Bereiche erscheinen. Vereinzelt tauchen sehr dunkel erscheinende Strukturen auf, wie in der rechten Bildhälfte von Abbildung 7.7 zu sehen ist. Hierbei handelt es sich um einzelne größere Salzkristalle, wie sie in Abbildung 7.3 gezeigt sind. Diese verzerren die Abbildung nicht nur aufgrund ihrer ausgeprägten Topographie, sondern laden sich zusätzlich während der Aufnahme

auf. Neben einzelnen, größtenteils freiliegenden Bakterien sind auch andere, stärker strukturierte Bereiche erkennbar, wie zum Beispiel unterhalb des schwarzen Bereiches in Abbildung 7.7.

Abbildung 7.8 zeigt einen derartigen Bereich in einer höheren Auflösung. Es lassen sich nun Bakterien erkennen, die von den dünneren Salzsichten umschlossen sind (grün umrandete Bereiche). In den gleichen Regionen häufen sich zudem die mittleren und kleinen Salzreste an, die in Abbildung 7.8 als kontrastreiche Strukturen zu erkennen sind (gelb umrandete Bereiche). Bei diesen Regionen handelt es sich sehr wahrschein-

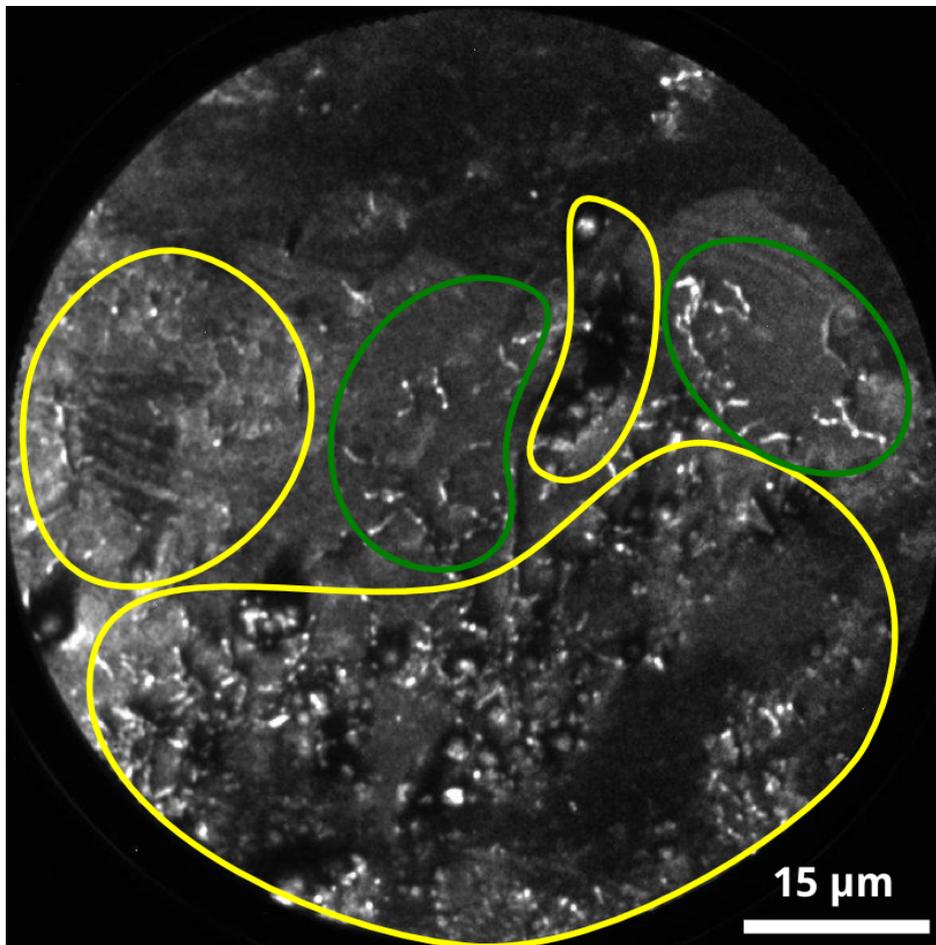


Abbildung 7.8.: PEEM-Aufnahme einer anderen Probenposition. Zwar sind hier keine derart großen Salzreste sichtbar, die Anzahl an mittleren und kleineren Salzreste ist dafür aber deutlich größer (gelb umrandete Bereiche). Auch sind von dünneren Salzsichten umschlossene Bakterien zu erkennen (grün umrandete Bereiche).

lich um vorher von dendritischen Salzresten bedeckte Oberflächenregionen. Die hier auffindbaren *M. magnetotacticum* waren zuvor unter den Salzresten vergraben. Nicht von der Oberfläche abgelöste Reste dieser Dendriten bleiben dabei als mittlere und kleine Salzreste zurück. Im direkten Vergleich mit den nicht abgeschwemmten Proben, sind die Oberflächen zwar deutlich ärmer an Rückständen, die Anzahl an freiliegenden Bakterien ist jedoch weiterhin äußerst gering.

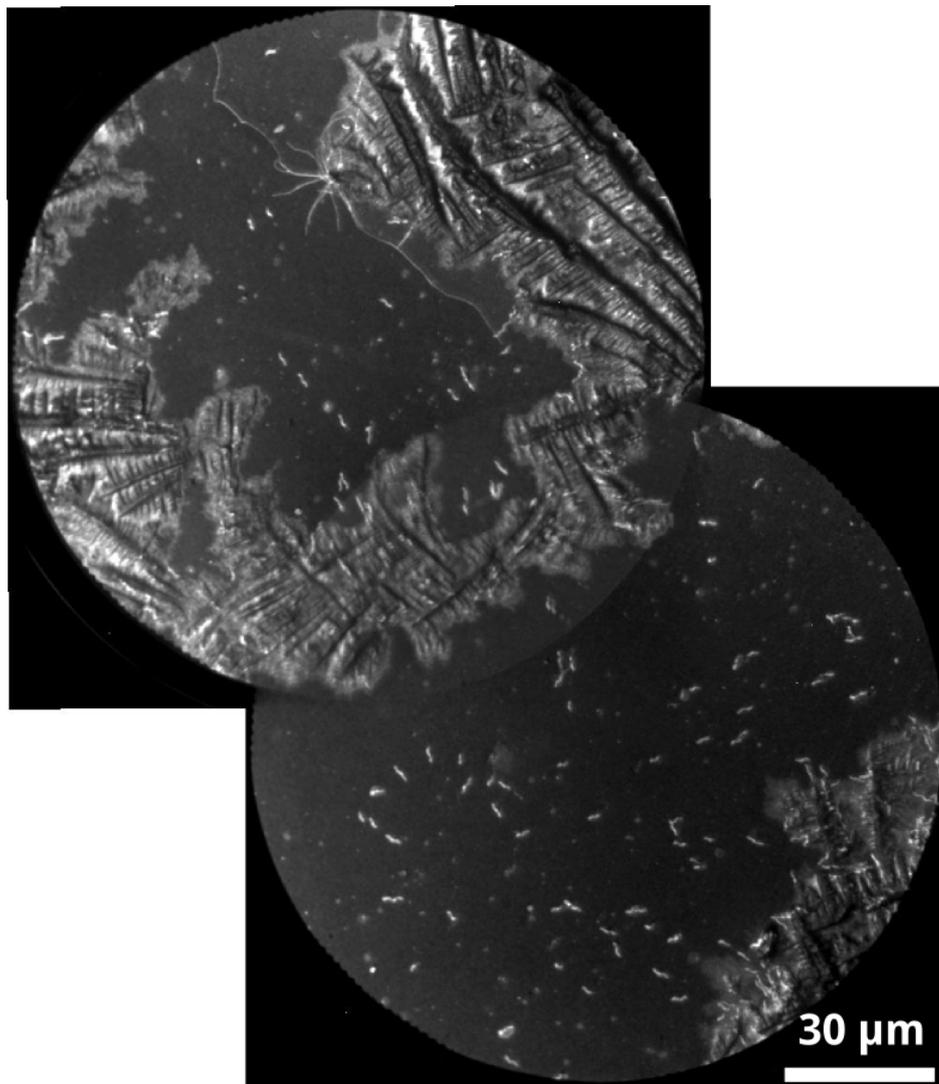


Abbildung 7.9.: Zusammengesetzte PEEM-Aufnahme einer nicht abgeschwemmten Probe. Vor dem Aufbringen der Bakterien-PBS-Lösung wurde die Lösung mit destilliertem Wasser versetzt. Gut zu erkennen sind größere, bakterienhaltige Bereiche ohne Salzreste.

Um die Anzahl der freiliegenden Bakterien zu erhöhen, wurde der gewaschenen Bakterien-PBS-Lösung unmittelbar vor dem Aufbringen auf das Substrat destilliertes Wasser zugesetzt. Als geeignet hat sich dabei ein Verhältnis von 10 Teilen destilliertem Wasser zu einem Teil Bakterien-PBS-Lösung erwiesen. Eine derart präparierte Probe ist in Abbildung 7.9 gezeigt. Dank der dünneren Lösung gibt es viele Bereiche in denen sich die Bakterien von den Salzresten abgesondert haben. Während bei den vorherigen Präparationen lediglich vereinzelte Bakterien abseits größerer Salzstrukturen auffindbar waren, konnte die Bakteriendichte in den jetzt auffindbaren Bereichen deutlich gesteigert werden. Ungeachtet dessen treten die dendritischen Salzstrukturen auch hier auf, mit den gleichen Nebeneffekten wie bereits oben beschrieben.

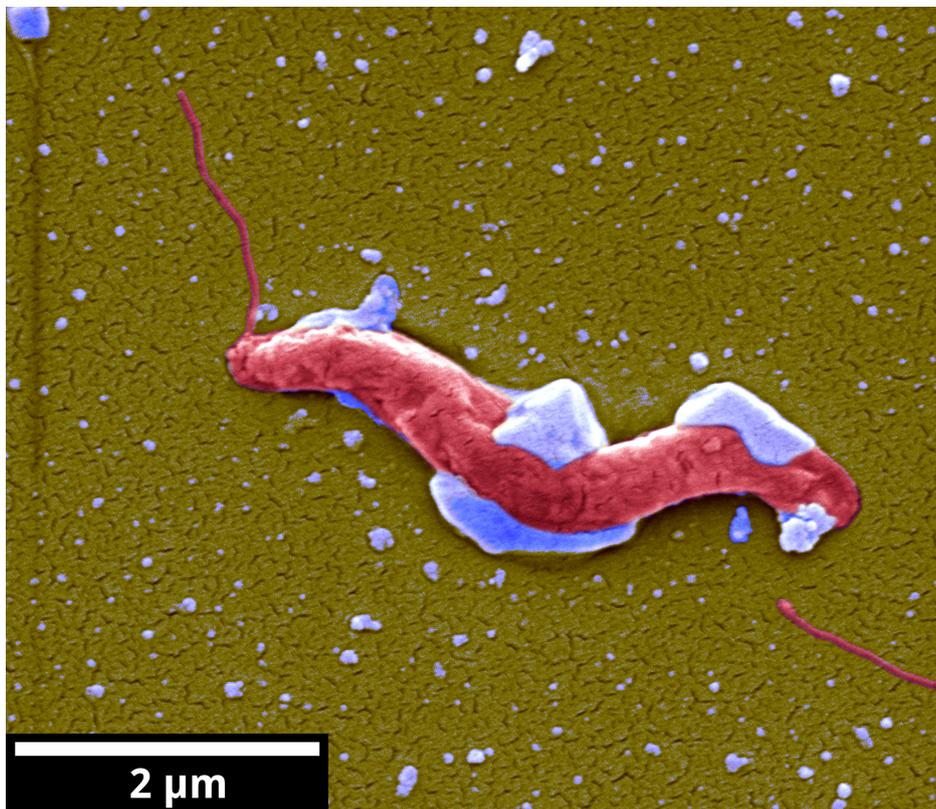


Abbildung 7.10.: SEM-Aufnahme einer Gold beschichteten Probe nach dem finalen Waschprozess. Am gut zuerkennenden *M. magnetotacticum* (rot) haften nur noch kleinere Salzreste (blau) an. Die umgebende Probenoberfläche ist nahezu frei von Salzresten. Ferner sind die beiden fadenförmigen polaren Flagellen gut an den beiden Enden des Bakteriums zu erkennen, wobei das rechte vom Körper abgetrennt ist.

Zusammenfassend liefert somit weder das Abschwemmen der getrockneten Probe noch das Versetzen der Bakterien-PBS-Lösung mit destilliertem Wasser für sich allein genommen das gewünschte Ergebnis. Eine sequenzielle Kombination dieser beiden Verfahren hingegen liefert Bereiche mit einer großen Anzahl von Bakterien und reduziert zugleich die verbleibenden Salzreste auf dünne Schichten. Dies zeigt beispielsweise Abbildung 7.10. In der direkten Umgebung des Bakteriums finden sich lediglich minimale Salzreste. Die Salzanhaftungen am Bakterium lassen sich nicht vermeiden. Wie die späteren Untersuchungen zeigen werden, stellen diese Anhaftungen lediglich einen untergeordneten Störfaktor dar. Die finale Präparationsmethode sieht somit wie folgt aus:

- Anreicherung nach Kapitel 7.1
- Waschen nach Kapitel 7.2
- Mischen der Bakterien-PBS-Lösung mit destilliertem Wasser (1:10)
- Lufttrocknen auf dem Substrat
- Abschwemmen mit $3 \times 400 \mu\text{L}$ destilliertem Wasser, 30° -Anstellwinkel

Das Präparationsergebnis dieser Methode ist für einen größeren Bereich der Probenoberfläche in Abbildung 7.11 mittels PEEM gezeigt. Über den gesamten Sichtbereich sind hier mehrere hundert *M. magnetotacticum* zu erkennen. Verglichen mit der Lyophilisation [150] liegt somit eine Steigerung der erkennbaren Bakteriendichte um mehrere 10 000 % vor.

Der abgebildete Bereich erscheint zudem weitgehend plan und weist, abgesehen von zwei Positionen (Pfeile), keine größeren topographischen Strukturen auf. Markant sind bei dieser Präparation Regionen mit heller Umgebung und dunkel erscheinenden Bakterien. Nicht repräsentativ für die gesamte Oberfläche dominieren diese Regionen in Abbildung 7.11. Die dunkler erscheinenden Regionen sind Bereiche salzlosen Siliziums. Diese erscheinen in der Schwellenwertemission dunkel grau, wie von anderen Aufnahmen, zum Beispiel in Abbildung 7.9, und von unbehandelten Silizium-Oberflächen wie in Abbildung 4.1(b) her bekannt. Bei den helleren Regionen handelt es sich hingegen um auf der Probe verbleibende dünne Salzsichten. Derartige dünne Salzsichten können die Austrittsarbeit der Oberfläche reduzieren [182]. Die dazugehörigen Regionen erscheint somit im direkten Vergleich heller, wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben.

Um die augenscheinliche Umkehrung des Kontrastes zwischen den Regionen mit und ohne Salzsicht zu ergründen, wird die Aufnahme Abbildung 7.12 herangezogen. In

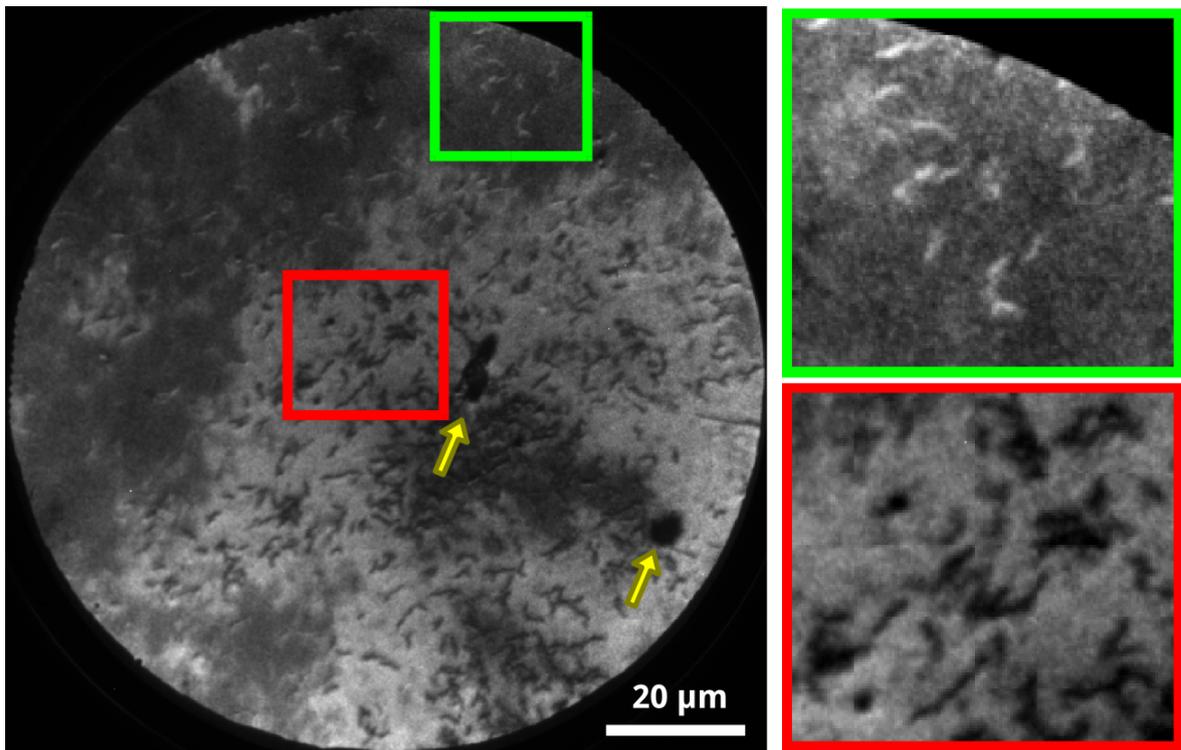


Abbildung 7.11.: Einfluss der Umgebung auf das Erscheinungsbild der Bakterien in der Schwellenwertemission. In nahezu rückstandslosen Regionen erscheinen die Bakterien hell (grüner Kasten). Hingegen erscheinen sie dunkel, sofern sie von dünneren Salzresten umgeben sind (roter Kasten). Diese dünnen Salzreste erscheinen im Vergleich zum Silizium heller. Die beiden markierten Regionen sind rechts vergrößert dargestellt. Topographische Merkmale sind mit Pfeilen markiert.

dieser Aufnahme ist der Effekt deutlicher zu erkennen. Die Bakterien in der rechten Bildhälfte wirken deutlich dunkler als die sie umgebene Oberfläche. Bei genauerer Betrachtung lässt sich jedoch feststellen, dass es sich hierbei um einen Schattenwurf der Bakterien selbst handelt. Von dem rechts einfallenden Licht wird die rechte Seite der Bakterien beleuchtet. Die linke Seite der Bakterien liegt hingegen im Schatten des Bakteriums. Dies führt dazu, dass die rechte Seite hell erscheint, die linke hingegen dunkel bleibt. Der Kontrast der beleuchteten Seite zur umgebenen Oberfläche ist dabei sehr gering, was es erschwert diesen Sachverhalt zu erkennen. In dieser Aufnahme fällt der Schattenwurf zudem besonders stark aus, da die Probe im Probenhalter leicht verkippt ist und der APS-Manipulator keine Korrekturmöglichkeit hierfür aufweist. Inwiefern sich die *M. magnetotacticum* auf oder unterhalb der hier gezeigten dünnen

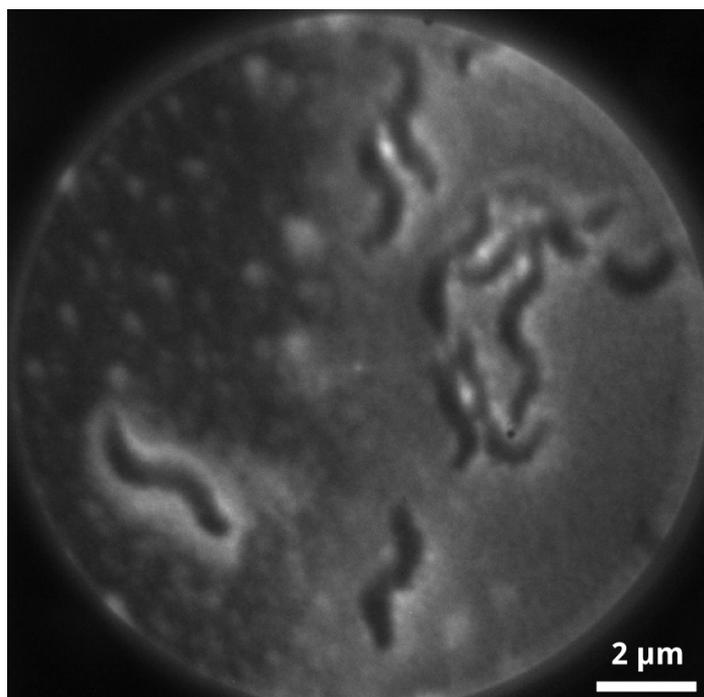


Abbildung 7.12.: PEEM-Bild aufgenommen mit einer Photonenenergie von $h\nu = 1350$ eV. Ähnlich wie in Abbildung 7.11 erscheinen einige Oberflächenregionen heller als anderen. Die *M. magnetotacticum* in hellen Regionen wirken auf den ersten Blick dunkler. Bei genauerer Betrachtung handelt es sich um einen Schattenwurf der Bakterien.

Salzschicht befinden, kann nicht final festgestellt werden. Um in weiteren Informationen über die reinen Bakterien zu erhalten, werden lediglich die Probenbereiche mit salzlosem Silizium als geeignete Probenbereiche eingestuft.

7.4. Alternative Methode

Das oben behandelte Verfahren gründet sich auf eine zentrifugenbasierte Wasch-Prozedur zur Anreicherung der Bakterien. Eine hierfür geeignete Zentrifuge ist jedoch nicht an jedem Standort aufzufinden. Insbesondere für die Messungen an der APS stand keine Zentrifuge für die Probenpräparation zur Verfügung. Fertig präparierte Proben wurden hierzu zwar mitgeführt, inwiefern diese den interkontinentalen Transport intakt und weiterhin verwendbar überstehen war jedoch fraglich.

Aus diesem Grunde wurde ein zweite Präparationsmethode entwickelt, die ohne Verwendung einer Zentrifuge durchgeführt werden kann. Wie in Kapitel 7.1 beschrieben, wird zunächst die Magneto-Aerotaxis der *M. magnetotacticum* ausgenutzt, um eine natürliche Anreicherung der Bakterien in einer Bande zu erzielen. Nun wird die Bakterien-Nährmedium-Lösung aus der Bande abpipettiert. Da die Konzentration des Nährmediums, wie in Abbildung 7.1 gezeigt, noch viel zu hoch ist, muss diese drastisch reduziert werden. Basierend auf den im vorherigen Abschnitt gesammelten Erkenntnissen, wird die Lösung hierzu mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:50 versetzt. Diese stärkere Verdünnung wurde gewählt, da die Nährmediumsreste deutlich ausgeprägter und zahlreicher sind als die Salzreste. Nachdem die so verdünnte Lösung auf dem Silizium getrocknet ist, wird sie wie bereits oben beschrieben abgeschwemmt.

Die so präparierte Probe weist eine weitgehend vergleichbare Oberflächenstruktur mit den mittels der Wasch-Prozedur präparierten Proben auf. Lediglich die Bakteriendichte fällt im direkten Vergleich geringer aus. Im Vergleich zu den lyophilisierten Proben sind die Dichten für beide Methoden immens angestiegen. Somit ist auch diese alternative Methode als Präparation für weitere Untersuchungen geeignet.

8. Einblick in intakte MTB

Nachdem nun eine geeignete Präparationsmethode für die Bakterien zur Verfügung steht, soll in diesem Kapitel untersucht werden, inwieweit ein Einblick in das intakte MTB möglich ist. Hierzu wird zunächst mittels PEEM die eisenhaltige Magnetosomen-Kette nachgewiesen und ihre magnetische Ausrichtung ergründet. Anschließend werden die Magnetosomen mit dem SEM direkt, im inneren der Bakterien abgebildet und mittels SEM-EDX chemisch analysiert.

8.1. PEEM-XAS

Für die PEEM-XAS Messungen wurden Experimente an der APS durchgeführt. Die hierfür angedachten Proben wurden in Dortmund präpariert und in Bezug auf ihre Oberflächenbeschaffenheit individuell mittels PEEM charakterisiert. Nach dem interkontinentalen Transport zur APS ließen sich mit dem dort befindlichen PEEM nahezu keine Bakterien mehr auf den Probenoberfläche auffinden. Die Oberflächenbeschaffenheit der Proben wich zudem sehr stark von ihrer in Dortmund bestimmten Oberflächenbeschaffenheit ab. Somit ist von massiven, durch den Transport bedingten Schäden der Proben auszugehen. Aus diesem Grunde wurden vor Ort, aus ebenfalls eingeführten Lebendkulturen, weitere Proben nach den in Kapitel 7.4 beschriebenen alternativen Methode präpariert.

Eine aus dieser Präparation resultierende Probe ist in Abbildung 8.1 gezeigt. Wie gut zu erkennen ist, konnte eine weitgehend rückstandsfreie Probenoberfläche erzielt werden. Die Bakterien erscheinen auch in dieser Aufnahme wieder als helle, wendelförmige Stäbchen. Relativ mittig im Bildbereich ist zudem eine ganzes Bündel von Bakterien zu erkennen. Im direkten Vergleich zu der anderen Präparationsmethode, ist die beschriebene, geringere Bakteriendichte ersichtlich. Im unteren, rechten Bildbereich lassen sich kleinere Reste des Nährmediums als hellgrauer Bereich erkennen. Diese sind für die

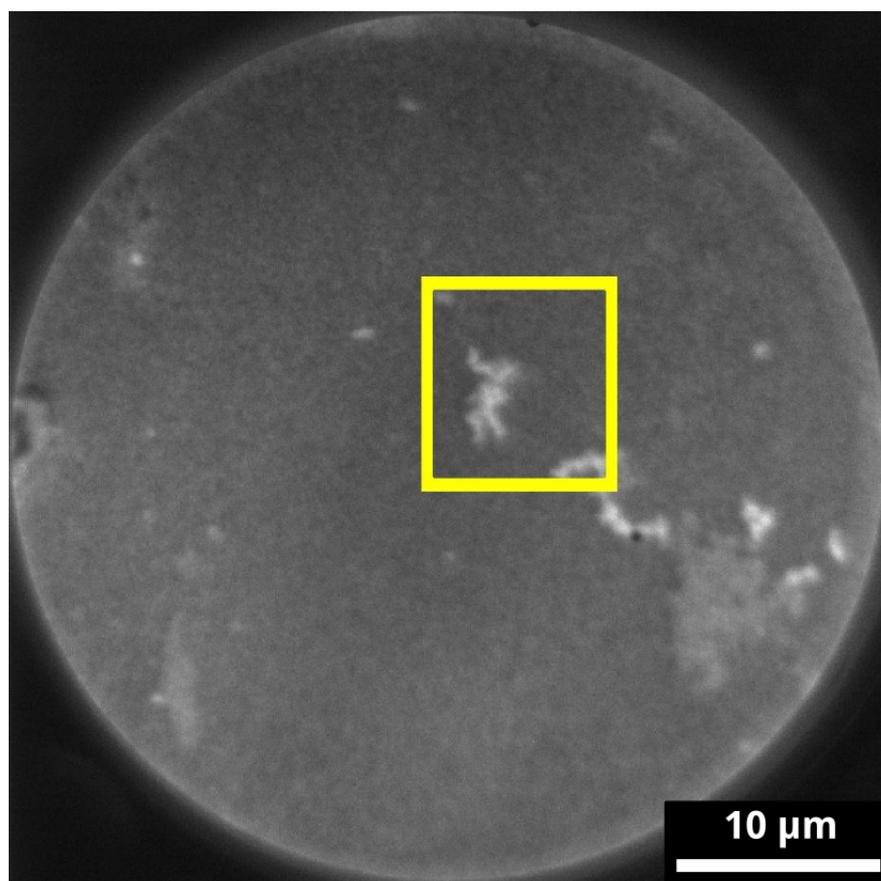


Abbildung 8.1.: Ein an der APS aufgenommenes PEEM-Bild bei $h\nu = 703 \text{ eV}$. Bis auf kleinere Stellen ist die Oberfläche sauber und eben. Eine Bakteriengruppe ist in der Mitte des Sichtfeldes gut zu erkennen (gelber Kasten).

nähere Untersuchung des zentralen Bakterienbündels nicht von Belang. Im Vergleich zu den mit Schwellenwertemission aufgenommenen Bildern wie Abbildung 6.5 erscheint dieses Bild ärmer an Details und weniger scharf. Ursache hierfür ist jedoch weniger die Probe selbst, sondern der Umstand, dass diese Aufnahme in Hochenergieemission aufgenommen wurde. Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, liegt die in diesem Modus erzielbare Auflösung unterhalb der mit Schwellenwertemission möglichen. Die oben beschriebene charakteristische Formgebung der Bakterien ist auch mit dieser verminderten Auflösung noch erkennbar, was eine Identifizierung erlaubt. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde der gelb umrandete Bereich in Abbildung 8.1 gewählt, da er eine Vielzahl von Bakterien enthält und weitgehend plan und frei von Rückständen erscheint. Über die einzelnen Linsen der PEEM-Optik wird die maximal nutzbare Vergrößerung für diesen Bereich eingestellt.

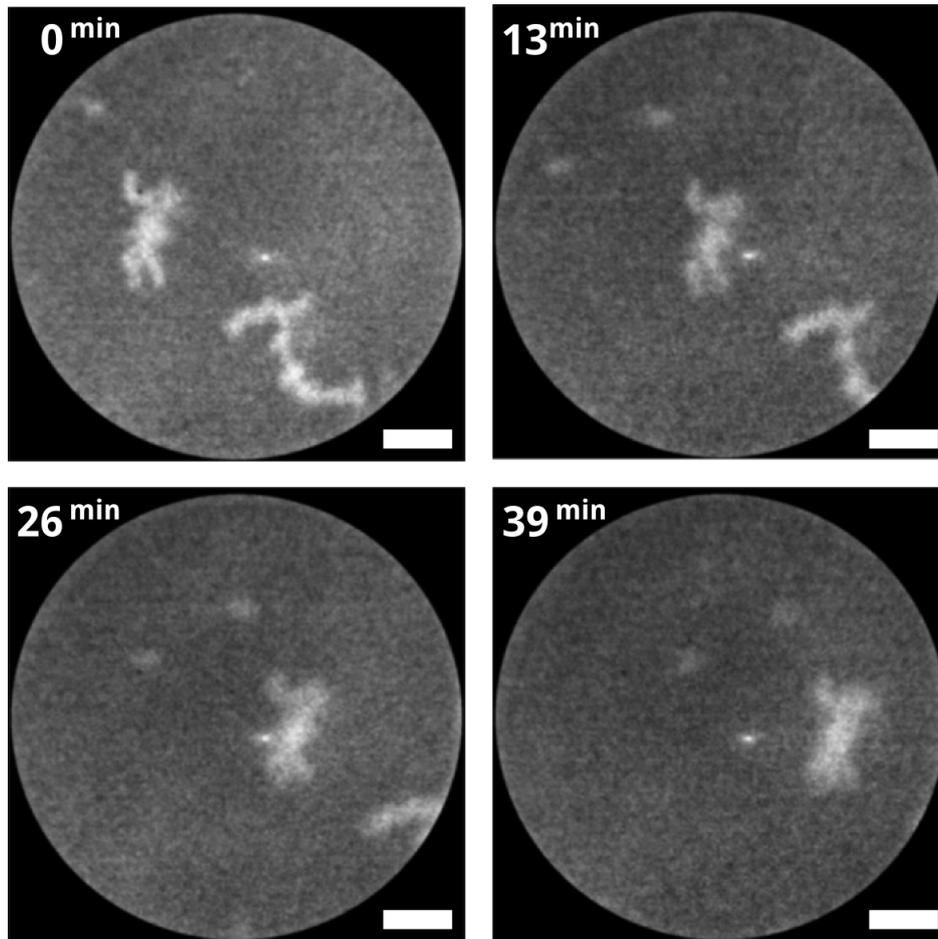


Abbildung 8.2.: Drift-Verhalten der Probe an der APS. Die einzelnen Bilder stammen aus einer Sequenz. Der zeitliche Abstand zur ersten Aufnahme ist jeweils angegeben. Neben der Drift in der Probenebene tritt hier zudem eine Veränderung des Abstandes zum Linsensystem auf, was das Bild unscharf werden lässt. Die Skala in den einzelnen Aufnahmen entspricht jeweils $3\ \mu\text{m}$.

Hierbei ist zu beachten, dass an der APS eine deutliche Probendrift zu verzeichnen ist. Um diese zu veranschaulichen sind in Abbildung 8.2 vier Aufnahmen einer Bildsequenz gezeigt, bei der jedes Bild mit einer leicht anderen Photonenenergie aufgenommen wurde. Wie zu erkennen ist, bewegt sich die Probe unter dem PEEM binnen 39 Minuten über den Großteil des Sichtbereiches. Dies führt soweit, dass die untere der beiden Bakterienanhäufungen den Bildbereich vollständig verlässt. Eine Untersuchung dieses Bereiches ist so nicht möglich, da er nicht in allen Aufnahmen erkennbar ist. Für alle Photonenenergien die nach mehr als 39 Minuten aufgenommen würden, gäbe es somit keine Informationen über die Helligkeit dieses Bereiches. Neben dieser Drift in

der Probenebene tritt noch ein weiterer Effekt auf. Im Verlauf dieser Sequenz wird das Abbild der Oberfläche zunehmend unschärfer. Dies ist auf eine weitere Probedrift orthogonal zur Probenebene und damit parallel zur Mikroskopachse zurückzuführen. Die Probe bewegt sich somit langsam aus dem Fokus des PEEM. Um ein Verlassen des zu untersuchenden Bereiches zu verhindern, kann die Probe zwischen zwei Aufnahmen verfahren werden. Dies erfordert ein Abbrechen der automatisierten Aufnahme und korrigiert lediglich die Drift in der Probenebene. Die Drift parallel zur Mikroskopachse lässt sich hierdurch nicht korrigieren, da der Manipulator keine Bewegung in diese Richtung ermöglicht. Da beide Drift-Effekte durch externe, thermische Störungen verursacht werden, treten sie während nachts durchgeführter Messungen weniger stark auf. Insbesondere der Drift parallel zur Mikroskopachse lässt sich so deutlich reduzieren. Für die weitere Untersuchung werden im folgenden Sequenzen verwendet, bei denen dieser zusätzliche, die Unschärfe verursachende Drift nicht auftritt um den Vergleich zwischen Bildern einer Sequenz zu ermöglichen.

Nach der Drift-Kompensation liegt das Bakterienbündel für alle Bilder der Sequenz an der gleichen, festbleibenden Position im Bild. In Abbildung 8.3 ist das Bakterienbündel als Superposition der gesamten Sequenz gezeigt. Durch die genaue Positionierung weist diese Superposition die gleiche Auflösung wie die einzelnen Bilder der Sequenz auf. Eine Fehlpositionierung oder nicht vollständige Drift-Kompensation würde hierbei die

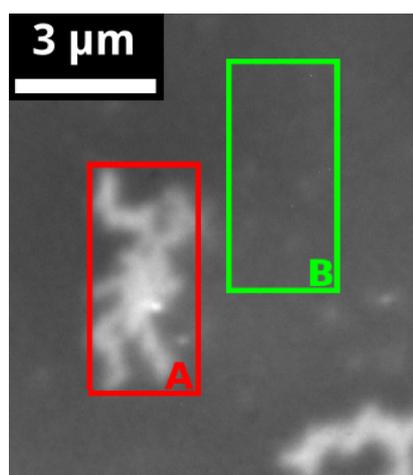


Abbildung 8.3.: Maximal mit der PEEM-Optik erzielte Vergrößerung der Bakteriengruppe in Abbildung 8.1. Die für die weiteren Untersuchungen gewählten beiden ROI sind mit einem roten (A), beziehungsweise grünen (B) Kasten hervorgehoben.

Unschärfe der Superposition deutlich erhöhen. Der in Abbildung 8.3 gezeigte Bildbereich entspricht dabei dem auswertbarem Bereich der Sequenz. Aufgrund der oben beschriebenen, starken Drift während aller Messungen ist lediglich der hier gezeigte Bereich der Probe in allen Bildern erkennbar. Ein Teil des im ersten Bild der Sequenz abgebildeten Probenbereiches verschwindet im Zeitverlauf aus dem Sichtfeld des PEEM. Andere, vorher nicht sichtbare Probenbereiche treten dafür neu in das Sichtfeld. Für die weitere Auswertung wurden nun zwei ROI festgelegt. Die ROI A in Abbildung 8.3 umfasst dabei das gesamte Bakterienbündel. Eine zweite ROI wurde neben dem Bakterienbündel gewählt. Diese ROI B beinhaltet dabei weder weitere Bakterien noch andere erkennbare Strukturen. Sie dient ausschließlich der späteren Referenzierung.

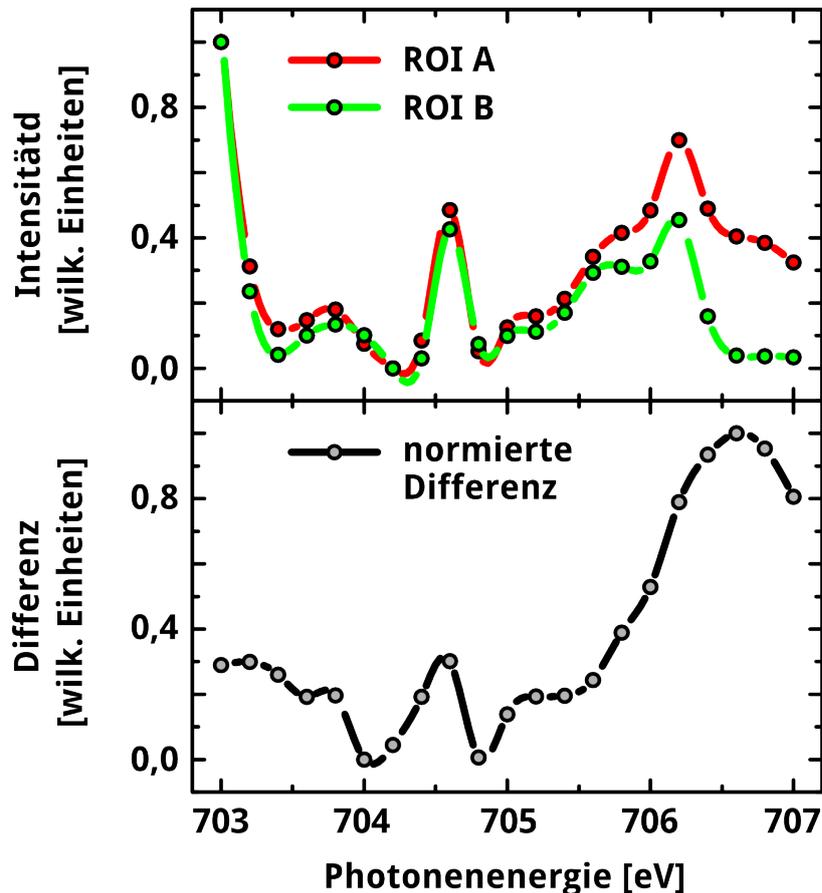


Abbildung 8.4.: Oben: Die aus den beiden ROI in Abbildung 8.3 extrahierte PEEM-XAS Spektren nahe der Eisen L_3 -Kante. Zur besseren Anschauung sind die Spektren jeweils auf ihre maximale Intensität normiert dargestellt. Unten: Die Differenz der beiden Spektren, normiert auf den Wertebereich [0,1].

Die in Analogie zu Kapitel 6.1 aus diesen beiden ROI extrahierten Spektren sind im oberen Teil von Abbildung 8.4 gezeigt. Um eine bessere Vergleichbarkeit dieser beiden Spektren zu ermöglichen, sind sie auf ihre jeweilige maximale Intensität normiert dargestellt. Für Photonenenergien unterhalb von 705 eV ist der qualitative Verlauf beider Spektren gleich. Erst oberhalb $h\nu = 705$ eV weichen beide Spektren in ihrem Verlauf voneinander ab. Da sich in der ROI A noch einige Bereiche des unbedeckten Substrats finden lassen, soll hier eine weitere Normierung erfolgen. Hierzu wird das Referenzspektrum der ROI B von der ROI A abgezogen. Im unteren Teil der Abbildung 8.4 ist die resultierende Differenz gezeigt. Wie deutlich erkennbar ist, beginnt die Differenz ab 705,6 eV zu steigen. Dieser Anstieg entspricht dem Anfang der Eisen L_3 -Kante [183]. Das schwankende Verhalten im Bereich um 704,5 eV kann auf einen kurzen Anstieg der gesamten Bildhelligkeit zurückgeführt werden. Die genaue Ursache für dieses Verhalten ließe sich auch nach Diskussion mit dem zuständigen Strahllinien-Wissenschaftler nicht abschließend klären. Als wahrscheinlichste Ursache gilt jedoch ein Störung seitens des Beschleunigers [184].

Die vorhandene Eisen L_3 -Kante ist dabei ein eindeutiger Hinweis, dass die Magnetosomen mittels PEEM zugänglich sind. Die Signalintensität fällt dabei zwar relativ schwach aus. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Magnetosomen nur einen kleinen Bruchteil des gesamten Bakteriums ausmachen.

Im folgenden soll weitergehend ergründet werden, inwiefern auch die magnetischen Eigenschaften der Magnetosomen-Kette mittels PEEM zugänglich sind. Zu diesem Zwecke wurden Messungen mit links zirkular polarisiertem (left circularly polarised, LCP) Licht durchgeführt. Das sich hieraus ergebene Spektrum ist in Abbildung 8.5 gezeigt. Im Unterschied zu den oben gezeigten Ergebnissen der Anregung mit linear polarisiertem Licht können hier drei Signalerhöhungen erkannt werden. Diese haben ihren Ursprung in der antiparallelen Anordnung der magnetischen Momente der Untergitter des Magnetit. Zum Vergleich werden die theoretischen Berechnung von Chen et al. [185] zur XAS-Signalform von Magnetit, bei Anregung mittels zirkular polarisiertem Lichts, herangezogen. Das Ergebnis dieser Berechnung ist ebenfalls in Abbildung 8.5 gezeigt. Die abweichenden Signalbreiten liegen hier an der durch die Messapparatur bedingte Linienverbreiterung. Für die beiden Maxima bei 706,8 eV und 708,6 eV lässt sich eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen der experimentellen Messung und der theoretischen Berechnung feststellen. Aus den Berechnungen der Zustandsdichten und Übergangsmatrixelemente [185] folgt, dass das rechte Maximum bei 708,6 eV hauptsächlich von den Fe^{3+} -Ionen des B-Untergitters stammt. Zu dem linken Maximum

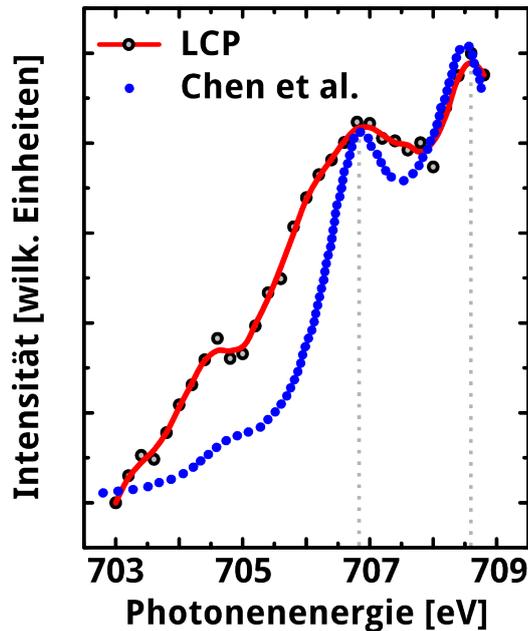


Abbildung 8.5.: PEEM-XAS Spektrum der *M. magnetotacticum* Gruppe in Abbildung 8.3, aufgenommen mit links zirkular polarisierter Synchrotronstrahlung (LCP). Die Lage der drei Signalerhöhungen aus den Berechnungen von Chen et al. [185] für Volumen-Magnetit stimmen hervorragend mit dem gemessenen Spektrum überein.

tragen hingegen die Fe^{2+} -Ionen des B-Untergitters dominant bei. Selbige Ionenspezies verursacht auch die Schulter bei 704,6 eV. Die gesamte Signalform setzt sich dabei aus allen Beiträgen der beiden Untergitter und der in diesem Energiebereich zugänglichen Endzustände zusammen. Daher ist keines der Maxima einzig einer Eisenionen-Spezies zuzuordnen. Der Unterschied in der Absorptionsenergie der Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen beträgt hier 1,8 eV und liegt somit in dem erwarteten Bereich von 1 eV bis 2 eV [185]. Für die Berechnungen von Chen et al. wurde ein Unterschied von 1,5 eV zwischen den reinen Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Beiträgen des B-Untergitters angenommen. Dieser Wert lässt sich durch das Experiment reproduzieren, unter Berücksichtigung einer Ungewissheit aufgrund der diskreten Messintervalle. Die Beiträge der Fe^{3+} -Ionen aus dem A-Untergitter sind für diese Helizität deutlich schwächer als die des B-Untergitters und führen zu keiner weiteren Signalerhöhung.

Aufgrund der Magnetisierung des A-Untergitters, welche der Magnetisierung des B-Untergitters entgegengesetzt ist, würden die Fe^{3+} -Ionen aus dem A-Untergitter erst bei Anregung mit rechts zirkular polarisiertem Licht ein das gesamte Signal dominierendes

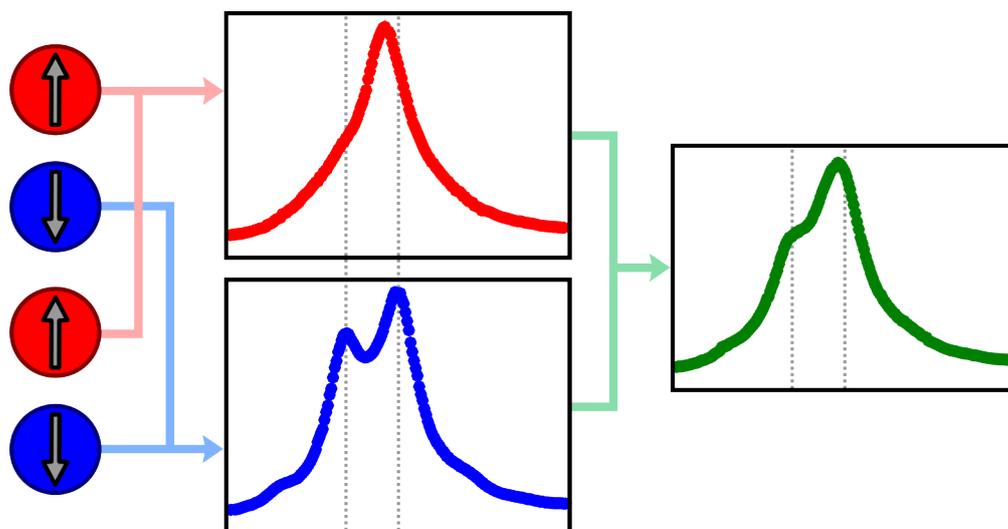


Abbildung 8.6.: Theoretische Komposition des Signals einer antiferromagnetisch ausgerichteten Magnetosomen-Kette (links). Die grauen Pfeile geben die makroskopische Magnetisierung an, die parallel zur Magnetisierung des B-Untergitters und antiparallel zur Magnetisierung des A-Untergitters ist. Bei Anregung mit zirkular polarisiertem Licht konstanter Helizität dominiert das A-Untergitter das Signal für die Hälfte der Magnetosomen (rot). Für die komplementären Hälfte dominiert das B-Untergitter (blau). Das messbare Spektrum ist eine Superposition der beiden Signale (grün). Die Position der Maxima des blauen Spektrums ist in allen Spektren durch gepunktete Linien gekennzeichnet.

Beitrag liefern. Dieses Signal hätte die Form des roten Signals in Abbildung 8.6. Das Signalmaximum läge dabei bei einer um 0,5 eV geringeren Photonenenergie als das Maximum der Fe^{3+} -Ionen aus dem B-Untergitter. Die Beiträge der Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen des B-Untergitters würden dabei abnehmen und nur noch untergeordnet zur Signalform beitragen. Diese beiden Signalformen der Eisen L_3 -Absorptionskante - ein beziehungsweise zwei Signalmaxima - sind charakteristisch für eine Magnetit-Domäne bei Anregung zirkular polarisiertem Licht.

Im Folgenden soll überlegt werden wie das Signal einer Magnetosomen-Kette mit antiferromagnetisch angeordneten Magnetosomen, wie in Abbildung 8.6, bei einer Anregung mit Licht konstanter Helizität aussehen würde. In diesem Modell ist die makroskopische Magnetisierung einer Hälfte der Magnetosomen parallel zum Helizitätsvektor und für die andere Hälfte antiparallel zu ihm. Für die Magnetisierung der Untergitter bedeutet dies nach Kapitel 2.2, dass für der Hälfte der Magnetosomen die Magnetisierung des

B-Untergitter parallel zum Helizitätsvektor verläuft. Diese Magnetosomen liefern ein Signal, in dem das B-Untergitter die Signalform dominiert. Ihr Signal ist in Abbildung 8.6 in blau dargestellt, mit den charakteristischen zwei Signalmaxima. In der andere Hälfte der Magnetosomen ist die Magnetisierung des A-Untergitter parallel zum Helizitätsvektor. Hier dominiert das A-Untergitter die Signalform. Das Signal dieser Magnetosomen ist in rot dargestellt, mit dem charakteristischen einfachem Signalmaximum. Wird nun über den Bereich der gesamten Kette gemessen, so ist das messbare Gesamtsignal als Superposition beider Einzelsignale gegeben. Diese Superposition des roten und blauen Signals ist in Abbildung 8.6 in grün eingezeichnet. Die gepunkteten Linien geben dabei die Positionen der Maxima, des durch das B-Untergitter dominieren Signals an. Hiermit wird ersichtlich, dass das Maximum des Gesamtsignals zu niedrigeren Photonenenergien verschoben ist, in Relation zu dem vom B-Untergitter dominieren Signal. Zudem ist das Maximum des Gesamtsignals deutlich breiter als die Maxima der beiden beitragenden Einzelsignale. Die vorher noch zu erkennende Schulter bei niedrigen Energien verschwindet nahezu vollständig. Auch das zweite Maximum des vom B-Untergitter dominieren, blauen Signals ist nur noch als wenig ausgeprägte Schulter in der Signalform erkennbar. Diese Form des Gesamtsignals stimmt nicht mit der in Abbildung 8.5 erkennbaren Signalform überein. Das hier gemessene Spektrum weist ausschließlich die Charakteristika eines Untergitters auf. Somit kann von einer ferromagnetischen Anordnung der einzelnen Magnetosomen innerhalb der Ketten ausgegangen werden.

Zusammen mit den zuvor gezeigten Messungen lässt sich somit schlussfolgern, dass die Magnetosomen innerhalb intakter *M. magnetotacticum* mittels PEEM detektiert werden können. Unter Verwendung einer geeigneten, zirkular polarisierten Strahlungsquelle ist ferner ein Zugriff auf die magnetischen Eigenschaften der Magnetosomen-Kette möglich.

8.2. Magnetosomen mittels SEM

In dem vorherigen Abschnitt konnte bereits gezeigt werden, dass die Magnetosomen-Ketten innerhalb intakter Bakterien mittels PEEM erreichbar sind. Hieran anschließend sollen nun komplementäre Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt werden. Im Vergleich zum PEEM bietet das SEM eine deutlich bessere Ortsauflösung. Bei den bisher publizierten SEM-Untersuchungen vom magnetotaktischen Bakterien gelang jedoch keine Abbildungen der Magnetosomen-Kette in intakte Bakterien. Lediglich von magnetische Kokken sind Aufnahmen mittels Sekundärelek-

tronenemission bekannt, die Anhaltspunkte auf die Magnetosomen-Kette liefern [186]. Hierbei wurden die Magnetosomen lediglich anhand von Wölbungen der Zellmembran identifiziert und nicht selbst abgebildet. Die verbreitetste Methode zur Abbildung von Magnetosomen mittels SEM ist daher ein Aufbrechen der Zellmembran. Aus den zerstörten Zellen werden die Magnetosomen extrahiert und unter dem SEM untersucht [187]. Alternativ lassen sich die Bakterien mittels aufwendiger Verfahren fixieren. Um die Magnetosomen freizulegen wird anschließend die obere Zellstruktur abgetragen. Dies geschieht mit einem fokussierten Ionenstrahl [188], mittels der Gefrierbruchtechnik [47] oder durch Anfertigung eines mechanischen Ultradünnschnittes [189]. Sowohl die Extraktion als auch die Freilegung liefern dabei keine Abbildungen der Magnetosomen in unbeschädigten Bakterien.

Nun soll gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Techniken eine direkte Abbildung der Magnetosomen in unbeschädigten Bakterien liefern. In der Abbildung 8.7 ist eine SEM-Aufnahme von *M. magnetotacticum* auf einen Siliziumkristall zu sehen. Sie wurden nach der in Kapitel 7.3 beschriebenen Methode präpariert. Ähnliche Aufnahmen wurden bereits in Kapitel 7 gezeigt. Bei diesen wurde eine Goldbeschichtung zur Verbesserung der Leitfähigkeit aufgebracht. Gleichzeitig reduziert dies jedoch die Untersuchungstiefe. Da auch weiterhin das Interesse dem Inneren der Bakterien gilt, wurde hier auf eine Beschichtung mit Gold verzichtet. In Abbildung 8.7 sind in zwei intakte *M. magnetotacticum* zu erkennen, die rot hervorgehoben sind. In ihrer Umgebung lassen sich einige Salzresten erkennen, die in der hier verwendeten Farbgebung leicht bläulich erscheinen. Insbesondere das linke Bakterium weist dabei einige Salzanhaftungen auf. Diese führen zu der unregelmäßig wirkenden Struktur des Bakteriums, verglichen mit dem rechten Bakterium. In beiden Bakterien ist zudem jeweils eine Kette aus hell erscheinenden Partikeln zu erkennen. Bei beiden *M. magnetotacticum* befindet sich diese im mittleren Teil der Bakterien, entlang der Längsachse. In Kapitel 8.3 wird nachgewiesen, dass es sich bei diesen kettenförmigen Strukturen eindeutig um die Magnetosomen-Ketten im Bakterieninneren handelt. Der Bildausschnitt der Magnetosomen-Kette des linken Bakteriums ist im grünen Kasten von Abbildung 8.7 noch einmal vergrößert dargestellt. Die einzelnen, mit blauen Pfeilen markierten Magnetosomen lassen sich hier eindeutig voneinander unterscheiden. Typisch für die Magnetosomen-Ketten ist dabei, dass die Magnetosomen an den Kettenenden kleiner sind als die sich in der Mitte befindlichen Magnetosomen, was gut in dieser Aufnahme zu erkennen ist. Ferner erscheint die Magnetosomen-Kette in der Vergrößerung unterbrochen zu sein. Die rechten drei Magnetosomen weisen dabei einen Abstand von 580 nm zur restlichen Kette auf. Grund

hierfür sind die oben bereits angesprochenen Anhaftungen von Salzresten am *M. magnetotacticum*. Diese reichen bereits aus um die Magnetosomen für das SEM zu verdecken. Ohne Salzanhaftungen ergäbe sich eine zusammenhängende Magnetosomen-Kette, wie sie das rechte *M. magnetotacticum* aufweist.

Die in dieser Arbeit entwickelten Präparationsmethoden ermöglichen es mit dem SEM direkt in das intakte *M. magnetotacticum* zu blicken. Hiermit lassen sich relativ schnell Informationen wie die Größe und Form der einzelnen Magnetosomen und die Länge der Magnetosomen-Kette gewinnen. Im Folgenden soll daher diese Charakteristika der Magnetosomen etwas näher betrachtet werden. Zur Bestimmung der Form wird eine Ellipse an den Umriss der Magnetosomen angepasst. Ihr Querschnitt entspricht dabei der vom Umriss umschlossenen Fläche. Als Länge des Magnetosoms wird die Hauptachse der Ellipse und als Breite die Nebenachse definiert. Diese Art der Analyse ermöglicht

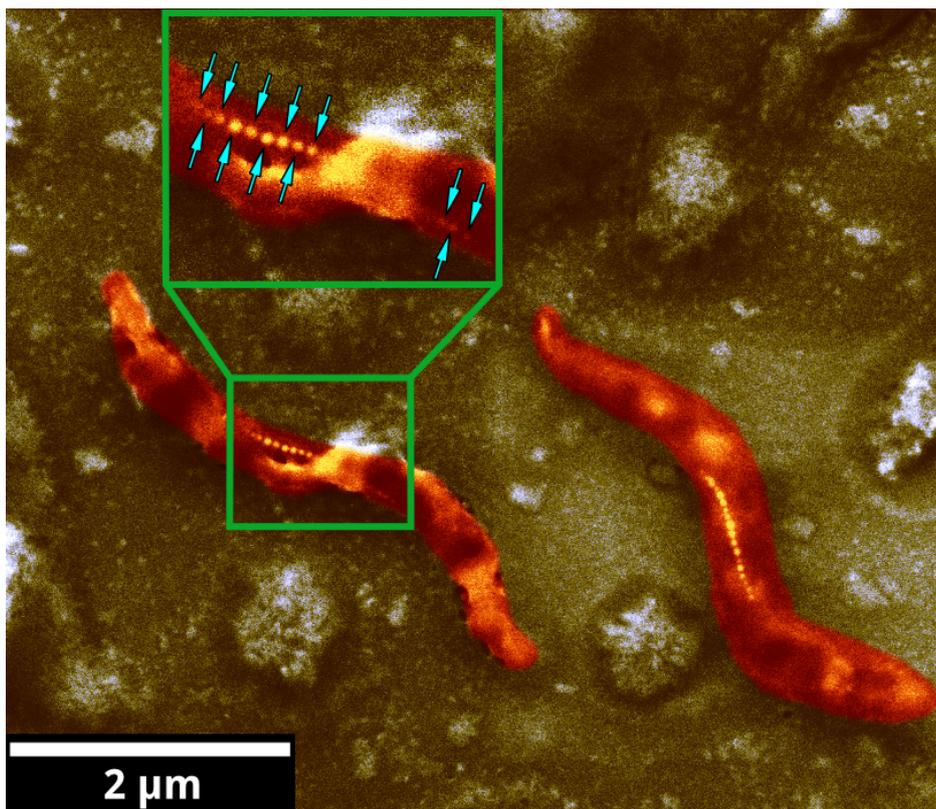


Abbildung 8.7.: SEM-Aufnahme zweier, rot hervorgehobener *M. magnetotacticum* auf Silizium. Das linke Bakterium ist teilweise mit Salzresten bedeckt (grüner Kasten). Diese verdecken einige Magnetosomen im Bakterium, so dass die Magnetosomen-Kette (blaue Pfeile) unterbrochen erscheint.

ein Quantifizierung der Form, die ansonsten bei einigen Formen schwer objektiv zu bestimmen ist [190]. Statistische Untersuchung zur Größenverteilung und Form sind dabei eine geeignete Methode Magnetosomen mehrerer unterschiedlicher Spezies auch Außerhalb der Zelle zu identifizieren [190]. Da diese unter vom Bakterium kontrollierten Bedingungen wachsen, sind die Histogramme der Größen- und der Formverteilung charakteristisch für einzelne Spezies und unterscheiden sich deutlich von synthetischen Magnetitkristallen.

Das Histogramm in Abbildung 8.8 zeigt die mittlere Größe der einzelnen Magnetosomen. Hierbei handelt es sich um den Mittelwert aus Breite und Länge der einzelnen Partikel. Das Maximum der mittleren Größe der Magnetosomen liegt im Bereich von 40 nm bis 45 nm. Die gesamte Verteilung ist relativ symmetrisch. Im Unterschied zu der von Devouard et al. berichteten Größenverteilung lässt sich hier keine scharfe Grenze zu großen Partikeln hin erkennen [190]. Ein Grund hierfür kann die in dieser Arbeit verwendeten, größere Probenmenge und damit bessere Statistik sein. Verglichen mit der Größenverteilung der Magnetosomen anderer Spezies sind die hier erfolgten Messungen und die Messungen von Devouard et al. recht ähnlich, da sie unter anderem auch das gleiche Maximum aufweisen.

Für das in Abbildung 8.9 gezeigte Histogramm wird aus der Länge und Breite der Magnetosomen ein Formfaktor als Quotient dieser beiden Größen berechnet. Das Maximum der etwas asymmetrischen Verteilung liegt bei 0,8 bis 0,85 und somit etwas

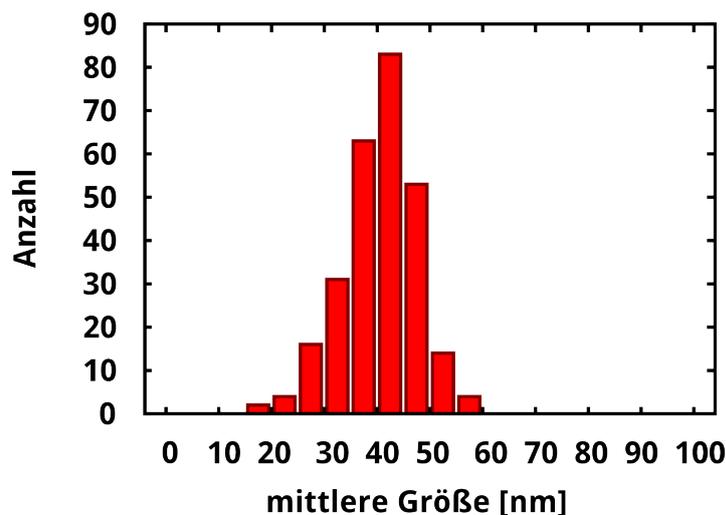


Abbildung 8.8.: Größenverteilung einzelner Magnetosomen von *M. magnetotacticum*.

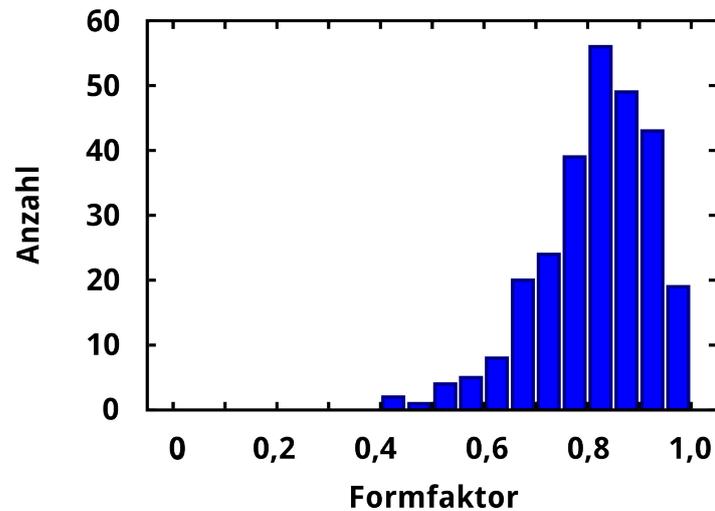


Abbildung 8.9.: Histogramm des Formfaktors einzelner Magnetosomen von *M. magnetotacticum*.

unterhalb der 0,85 bis 0,9 von Devouard et al. [190]. Die Verteilung beginnt dabei bei kleineren Werten, während die großen Formfaktoren größere Zählraten aufweisen, verglichen mit den Untersuchungen von Devouard et al. [190]. Wie schon bei der mittleren Größe kann dies ein Effekt der Statistik sein. Im Vergleich mit den Charakteristika der anderen Spezies oder synthetischer Magnetitkristalle sind beide Resultate aber konsistent.

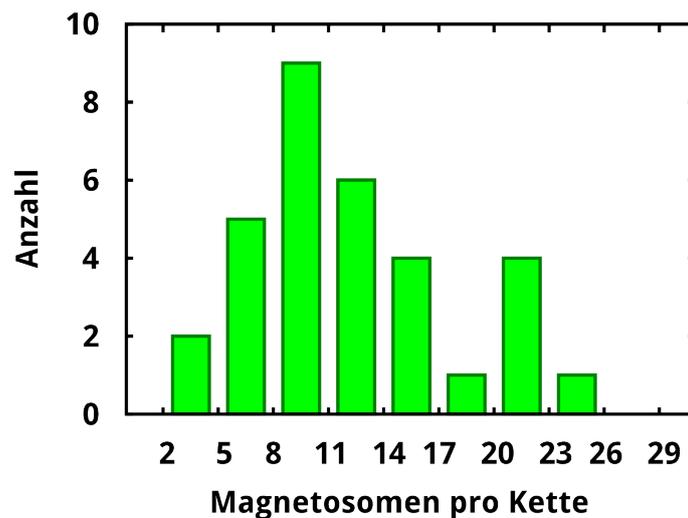


Abbildung 8.10.: Histogramm der Magnetosomen pro Magnetosomen Ketten individueller *M. magnetotacticum*.

Abschließend soll kurz die in Abbildung 8.10 gezeigte Anzahl der Magnetosomen pro Magnetosomen-Kette betrachtet werden, die die hier beschriebene Technik untersuchbar macht. Ein Maximum der Verteilung ist bei 8 bis 10 Magnetosomen zu erkennen. Sie ist asymmetrisch, so dass deutlich mehr Magnetosomen-Kette mit mehr als 11 Magnetosomen als Ketten von 8 oder weniger Magnetosomen auftreten. Für eine genauere Aussage ist jedoch eine noch größere Probenmenge von Nöten. Inwiefern dieses Histogramm auch charakteristisch für unterschiedliche Spezies ist, kann hier noch nicht geklärt werden, da derartige Daten von andern Spezies nicht existieren.

8.3. SEM-EDX Ergebnisse

Ergänzend zu den SEM-Aufnahmen soll nun energiedispersive Röntgenspektroskopie an den Proben durchgeführt werden. Abbildung 8.11 zeigt einen der hierfür verwendeten Bildbereiche. Zu erkennen sind hier vier rot eingefärbte *M. magnetotacticum* auf einem Siliziumträger. In der Umgebung dieser Bakteriengruppe lassen sich noch einige feine Salzreste finden. Zwischen den unteren drei Bakterien häufen sich diese jedoch an. Dies führt bis hin zu einer teilweisen Bedeckung der unteren Hälfte des mittleren Bakteriums. Trotzdem weist dieses Bakterium als einziges in diesem Bild eine sichtbare Magnetosomen-Kette auf.

Das Fehlen von Anzeichen für Magnetosomen-Ketten in den andern Bakterien kann unterschiedliche Gründe haben. Bekanntermaßen neigt ein Teil jeder *M. magnetotacticum*-Population dazu keine Magnetosomen auszubilden. Hierzu kann es eventuell noch zu einer Bedeckung mit einem dünnen Salzfilm kommen, der die Informationstiefe im Bakterium reduziert. Dies hätte zur Folge, dass sich die Magnetosomen-Kette aus den tiefsten Lagen im Bakterium nicht abbilden ließen.

Für die SEM-EDX Messungen wurden aus dem Bildbereich in Abbildung 8.11 zwei ROI ausgewählt. Ein Bereich umfasst dabei die abgebildete Magnetosomen-Kette. Diese ROI ist mittels eines schwarzen Kastens hervorgehoben. Im linken Bildteil ist zusätzlich eine Vergrößerung der Magnetosomen-Kette und der dazugehörigen ROI gezeigt. Hierin lassen sich die einzelnen Magnetosomen der Kette besser erkennen. Weiterhin wurde eine Referenzregion gewählt, die einen von Salz bedeckten Teil der Oberfläche umfasst. Dieser Bereich ist mit einem orangefarbenen Kasten markiert.

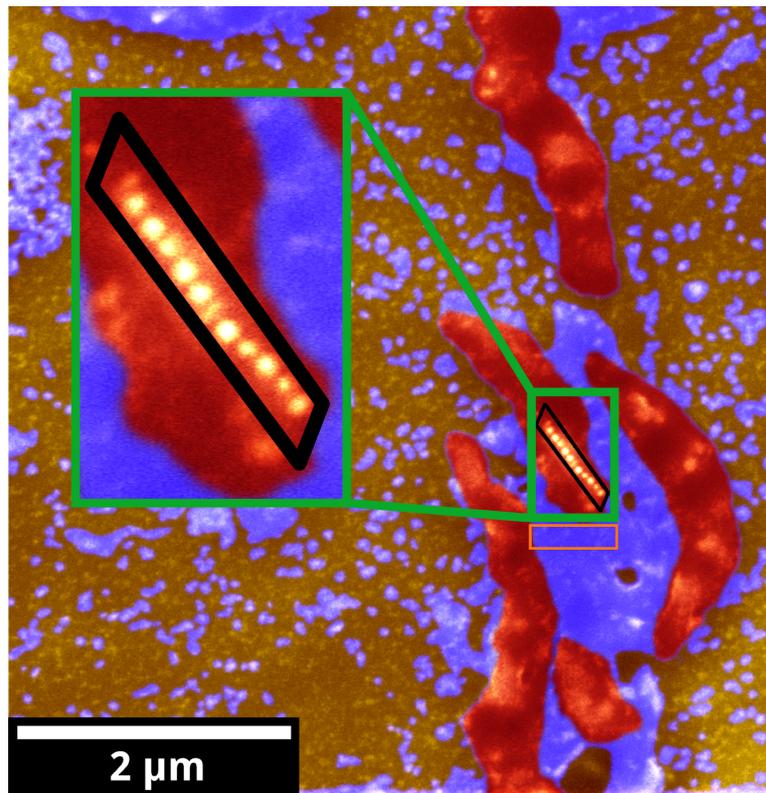


Abbildung 8.11.: SEM-Aufnahme einer Gruppe *M. magnetotacticum* (rot) auf Silizium (gelb). Der Bildbereich weist einige feine Salzreste (blau) auf. Insbesondere zwischen den unteren drei Bakterien häufen sich diese und führen zu einem teilweisen Verdecken des mittleren Bakteriums. Die für die in Abbildung 8.12 gezeigten SEM-EDX-Messungen gewählten Bereiche sind mit einem schwarzen beziehungsweise orangefarbenen Kasten markiert. Der Bereich der Magnetosomen-Kette ist im Ausschnitt nochmal vergrößert dargestellt.

Die Ergebnisse der SEM-EDX Messungen dieser beiden Bereiche sind in Abbildung 8.12 gezeigt. Im oberen Graphen sind die Spektren der beiden ROI gezeigt. Ihre Farben entsprechen dabei der zur Markierung der ROI gewählten Kastenfarben in Abbildung 8.11. Wie zu erkennen ist, sind in beiden Bereichen mit Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Natrium und Phosphor die für biologische Systeme charakteristischen Element anzutreffen. Darüber hinaus lässt sich ein klares Silizium-Signal erkennen, welches von dem Substrat herrührt. Von besonderem Interesse ist das Eisen-Signal als Hauptbestandteil der Magnetosomen. Daher ist der Energiebereich des Fe L_{α,β_1} -Signals hervorgehoben und in einer Ausschnittsvergrößerung gesondert dargestellt. Gut zu erkennen ist das auftretende Eisen-Signal in der ROI der Magnetosomen-Kette. Für die Referenzregion

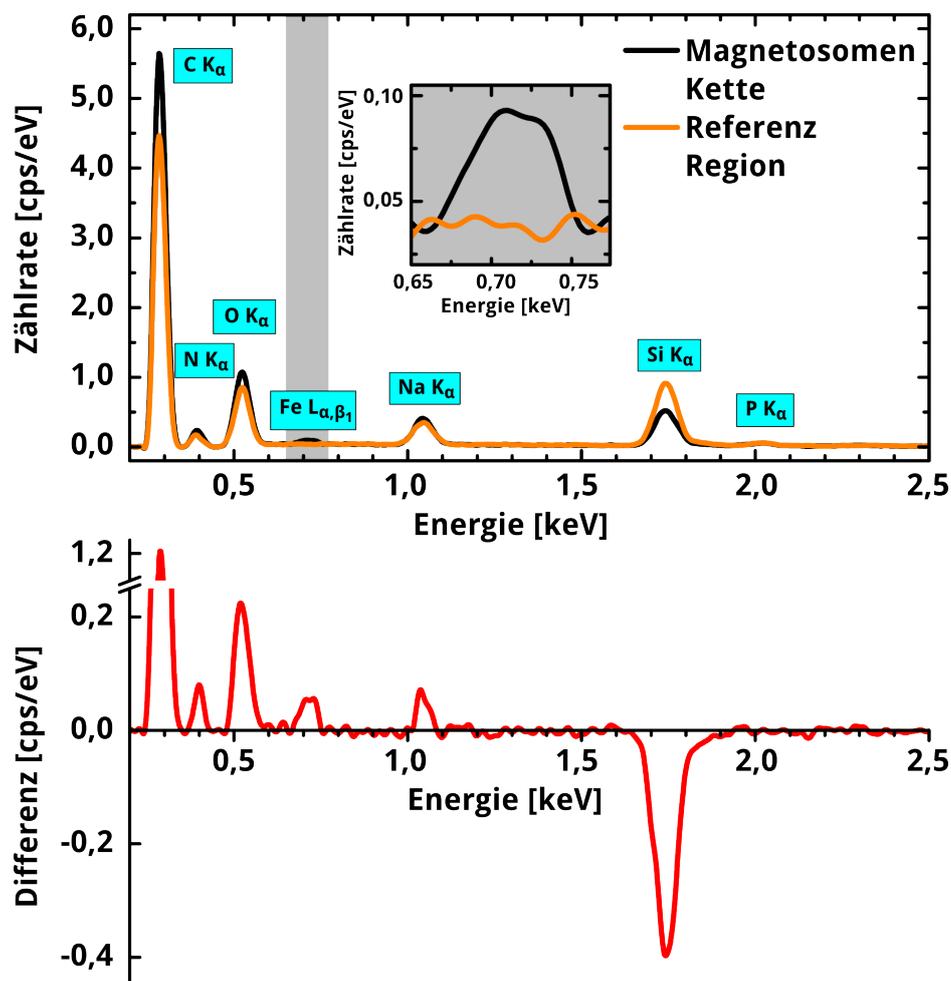


Abbildung 8.12.: Oben: SEM-EDX-Spektren der in Abbildung 8.11 eingezeichneten Regionen. Die schwarze Kurve ist aus der Region mit der Magnetosomen-Kette extrahiert. Die orangefarbene Kurve steht für einen Referenzbereich mit Salzresten. Der grau unterlegte Energiebereich des Eisensignals ist in der Einlage vergrößert dargestellt. Unten: Die Differenz der beiden oberen Spektren.

hingegen lässt sich kein Anzeichen von Eisen erkennen. Um die Unterschiede der beiden ROI deutlicher herauszustellen wird die Differenz der Magnetosomen-Kette in Bezug auf die Referenzregion gebildet. Sie ist im unteren Teil der Abbildung 8.12 aufgetragen. Am auffälligsten sind dabei zum einen der Anstieg des Kohlenstoff- und Sauerstoff-Signals für den im Bakterium liegenden Bereich der Magnetosomen-Kette. Die ist den organischen Verbindungen im Bakterieninneren geschuldet. Zum anderen fällt der Rückgang im Silizium-Signal auf, worauf später im genaueren eingegangen wird.

	Masse-%	C	N	O	Fe	Na	Si	P
Magnetosomen-Kette	71,0	n.n.	16,7	1,50	1,9	8,8	0,15	
Referenzbereich	70,8	0,2	17,5	n.n.	0,9	10,6	n.n.	
abgeschätzte Messunsicherheit	0,6	0,2	0,2	0,07	0,2	0,1	0,09	

Tabelle 8.1.: Aus der SEM-EDX-Spektroskopie ermittelte Masse-Prozente der unterschiedlichen Elemente in beiden Regionen in Abbildung 8.11. (n.n. = Werte unterhalb der Nachweisgrenze)

Die aus den beiden Spektren ermittelten Massen-Prozente sind in Tabelle 8.1 gelistet. Die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Masse-Prozent kann dabei typischerweise zu 1 % (rel.) bis 2 % (rel.) abgeschätzt werden [191]. Dabei sind die genauen Unsicherheiten abhängig von der Energie der detektierten Photonen und der energieabhängigen Effizienzkurve des Detektors bei diesen Energien. Eine elementspezifische Abschätzung ergibt dabei ungefähre Fehler von 0,6 % (m/m) für Kohlenstoff, 0,2 % (m/m) für Stickstoff, Sauerstoff und Natrium, 0,1 % (m/m) für Silizium, 0,09 % (m/m) für Phosphor und 0,07 % (m/m) für Eisen. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Elemente hängen dabei stark von der lokalen Verteilung der Elemente, dem Matrixmaterial und den analytischen Parametern ab. In erster Annäherung korreliert die jeweiligen Nachweisgrenzen mit dem angeregten Volumen, der Zusammensetzung der Matrix und der maximalen Austrittstiefe der Photonen. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Quantifizierung des Stickstoffs stark fehleranfällig ist. So fällt der Stickstoffanteil in der Magnetosomen-Kette unter die Nachweisgrenze obwohl das Signal in Abbildung 8.12 ansteigt. Das Problem hierbei ist der Untergrundabzug und das Fehlen von standardisierten Referenzmaterialien für diesen Energiebereich. Daher wurde der in der Software implementierte Parametersatz zur Quantifizierung verwendet. Dies führt für den hier vorliegenden Fall dazu, dass der Stickstoff nahe der Nachweisgrenze liegt und wenn nachweisbar mit einem immensen relativen Fehler behaftet ist.

Obwohl das Eisen-Signal in Abbildung 8.12 im Vergleich zu den anderen Signalen relativ klein erscheint, wird hier ersichtlich, dass es zu einem deutlichen Anstieg des Eisengehalts in der ROI der Magnetosomen-Kette kommt. So liegt dieser in der Referenzregion unterhalb der Nachweisgrenze und steigt auf 1,5 % (m/m) in der Magnetosomen-Kette. In Gegensatz zu diesem Anstieg des Eisens ist es mit der SEM-EDX nicht möglich Schwefel in der Probe nachzuweisen. Würden die *M. magnetotacticum* signifikante Mengen an Schwefel enthalten, so müsste sich ein Schwefel K_{α} -Signal bei 2,3 keV finden

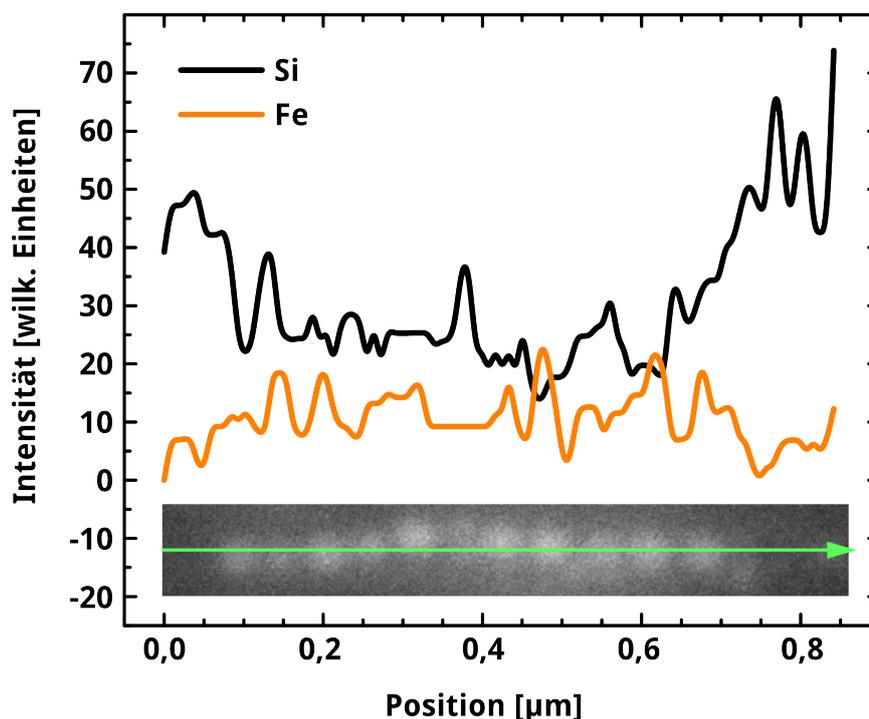


Abbildung 8.13.: Variationen der SEM-EDX-Signale von Silizium und Eisen entlang der im SEM-Bild gezeigten Magnetosomen-Kette.

lassen. Wie in Abbildung 8.12 zu erkennen, befindet sich im Energiebereich von 2,0 keV bis 2,5 keV kein erkennbares Signal außer das des Phosphors. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den die Magnetosomen formenden Kristallen um Greigit (Fe_3S_4) oder andere schwefelhaltige Verbindungen handelt, aus denen nach Kapitel 2 auch Magnetosomen gebildet werden können.

Nun soll näher auf den bereits oben erwähnten Rückgang des Silizium-Signals im Bereich der Magnetosomen-Kette eingegangen werden. Die Abbildung 8.13 zeigt hierzu die orts aufgelösten Variation der Signale von Silizium und Eisen entlang einer Magnetosomen-Kette. Zu erkennen ist eine gegenläufige Variation der beiden Signale. Steigt die Intensität des Eisen-Signals an, so schwächt das Silizium-Signal ab, et vice versa. Das Ausbleiben eines scharfen Kontrastes in den Signalverläufen liegt an der geringeren Ortsauflösung der EDX im Vergleich zum SEM. Sie ist durch das angeregte Volumen und die Austrittstiefe der emittierten charakteristischen Strahlung gegeben. Dies ist auch die Ursache für das reduzierte Silizium-Signal bei Anwesenheit der Magnetosomen. Das in ihnen enthaltene, schwere Eisen reduziert die mittels EDX maximal erzielbare Untersuchungstiefe. Somit werden nur noch die obersten Schichten des Sub-

strates mit EDX erfasst. Tiefere Substratschichten tragen daher nicht mehr zum Signal bei, was die Intensität des korrespondierenden Signals reduziert.

Die ist auch in Abbildung 8.14 zu erkennen. Hier sind die Signalvariation entlang einer Linie die zwei Magnetosomen-Ketten kreuzt aufgetragen. Neben Silizium und Eisen wurden hier zudem die Signale von Phosphor, Natrium, Sauerstoff und Kohlenstoff beobachtet. Für das Silizium-Signal kann wieder eine reduzierte Signalintensität in den grau hinterlegten Bereichen der Magnetosomen-Ketten erkannt werden. Im Bereich zwischen den Magnetosomen-Ketten steigt die Intensität des Silizium-Signals wieder an. In den selben Bereichen sinkt das Eisen-Signal wie erwartet, um beim Kreuzen der Magnetosomen-Ketten wieder anzusteigen. Für die Signale des Phosphors, Natriums und des Kohlenstoffes lässt sich keine Korrelation mit den Positionen der Magnetosomen erkennen. Jedoch zeigt das Sauerstoff-Signal das gleiche Variationsverhalten wie das

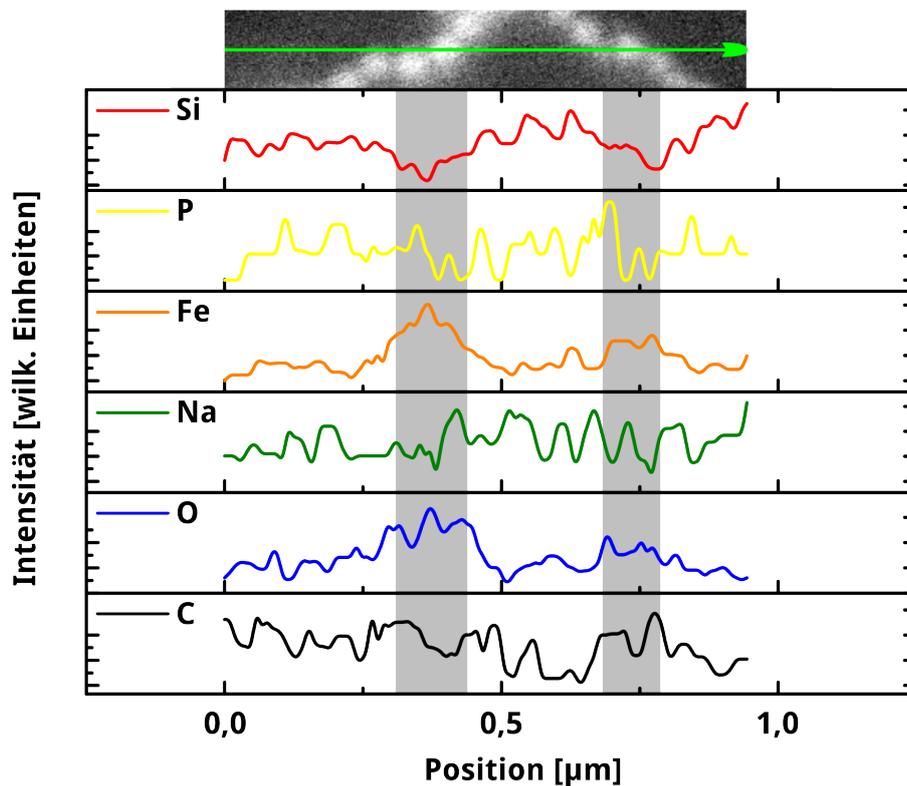


Abbildung 8.14.: SEM-EDX Signalintensitäten verschiedener Elemente entlang der grün eingezeichneten Linie im SEM-Bildausschnitt (oben). Die Bereiche in denen die Linie die beiden Magnetosomen-Ketten schneidet sind grau hinterlegt. Lediglich die Signalintensitäten von Silizium, Eisen und Sauerstoff korrelieren mit diesen Schnittpunkten.

Eisen-Signal. Neben dem Fehlen des Schwefels im SEM-EDX-Spektrum ist dies ein Beweis, dass die Magnetosomen von *M. magnetotacticum* aus dem Eisenoxyd Magnetit bestehen.

9. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden magnetotaktische Bakterien der Spezies *M. magnetotacticum* mittels PEEM und SEM-EDX untersucht. Diese Bakterien zählen zu den interdisziplinär interessantesten Mikroorganismen. Aktuelle und potentielle zukünftige Anwendungen finden sie neben der Geologie, Astrobiologie und Paleomagnetik vor allen in der Nanorobotik, der Medizintechnik und anderen Biowissenschaften. Hierbei ist ein Verständnis ihrer Magnetosomenstruktur und ihres Magnetsinnes von außerordentlicher Wichtigkeit. Ziel dieser Arbeit war es daher Methoden zu entwickeln, mit denen sich diese Bakterien relativ schnell und einfach präparieren lassen um das extrem schwierige Kultivieren der Bakterien zu umgehen. Gleichzeitig muss diese Methode Proben liefern, die sich durch ihre Oberflächenbeschaffenheit für mikroskopische Untersuchungen mit elektronenoptischer Bildgebung eignen. Mit diesen Proben wurden PEEM- und SEM-EDX-Untersuchungen durchgeführt um die Magnetosomen-Ketten im Inneren der Bakterien abzubilden und auf ihre chemische wie magnetische Struktur hin zu untersuchen.

Auf dem Weg hierzu wurde eine neue Software entwickelt, die im Vergleich mit dem bisherigen Vorgehen eine effektivere wie auch effizientere Durchführung der PEEM-Experimente ermöglicht. So wird die Anzahl der manuell durchzuführenden Arbeitsschritte am Experiment und der Strahllinie deutlich reduziert. Die Undulator-Lücke und die Position der Monochromatorelemente erfolgt hiermit ebenso vollautomatisch wie die Aufnahme der einzelnen PEEM-Bilder und des zugehörigen Photonennflusses. Dies reduziert die Fehleranfälligkeit deutlich und ermöglicht gleichzeitig eine schnellere Durchführung der Messungen.

Im Zuge der Entwicklung einer geeigneten Probenpräparation wurde zunächst das natürlich Verhalten der Bakterien ausgenutzt. So reichert sich *M. magnetotacticum* selbstständig durch die Magneto-Aerotaxis in der OATZ an. Allein hiermit lässt sich jedoch noch keine geeignete Probe präparieren. Wie hier gezeigt sind die Bakterien noch von zu vielen Nährmediumsrückständen umgeben. Eine Reduktion dieser Rückstände

konnte mittels eine Reihe von Waschprozeduren erzielt werden, die aus wiederholtem Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren bestehen. Als Nebenprodukt der Reduzierung der Nährmediumsrückstände treten hiernach vermehrt Salzreste auf der Probenoberfläche auf. Diese erschweren die Abbildung der Bakterien, da sie eng von den Salzresten umgeben sind und teils verdeckt werden. Eine Abbildung der *M. magnetotacticum* gelang in diesem Stadium nur mittels einer Goldbeschichtung der gesamten Probenoberfläche. Beschichtungen dieser Art sind jedoch nicht wünschenswert, da sie eine nähere Untersuchung des Bakterieninneren verhindern. Aus diesem Grunde wurden mehrere Nachbehandlungen der gewaschenen Bakterienlösung getestet, mit dem Ziel diese Salzreste zu minimieren. Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Behandlungen hat sich eine Kombination aus Verdünnung der Bakterienlösung mit anschließendem Abschwemmen der getrockneten Probenoberfläche als geeignetste Methode ergeben. So ließ sich eine hohe Dichte an freiliegenden Bakterien, bei gleichzeitiger Reduktion der verbleibenden Salzreste erzielen. Hierüber hinaus wurde zusätzlich eine alternative Methode entwickelt. Diese liefert Proben mit einer vergleichbaren Oberflächenbeschaffenheit zur oben beschriebenen Methode. Dabei kommt sie weitgehend ohne zusätzliche weitere Arbeitsschritte wie das Zentrifugieren aus. Der reduzierte Aufwand wirkt sich dabei zu Ungunsten der Bakteriendichte aus. Trotzdem liefert diese Alternative Proben mit einer höheren Bakteriendichte, als dieser Arbeit vorangegangene Präparationen.

Anknüpfend an die ersten Abbildung des *M. magnetotacticum* mittels PEEM [150] erfolgten weitere Untersuchungen an diesen Bakterien, präpariert nach den hier entwickelten Methoden. Da die Ortsauflösung in der Hochenergie-Emission verglichen mit der Schwellenwert-Emission geringer ist, wurde zunächst untersucht, wie sich die Bakterien in PEEM-Aufnahmen identifizieren lassen. Hierzu wurden mittels PEEM-Aufnahmen in Schwellenwert-Emission sowie mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen Kriterien zur Identifizierbarkeit und Verwendbarkeit der Bakterien für weitere Untersuchungen aufgestellt. Unter Verwendung dieser Kriterien ließen sich nun erstmals auch Messungen an *M. magnetotacticum* in Hochenergie-Emission durchführen. Aus PEEM-XAS Aufnahmen und den hieraus extrahierten Spektren an der Eisen-Kante ließ sich dabei die Zugänglichkeit der Magnetosomen-Ketten in den MTB mittels PEEM eindeutig nachweisen. Obwohl die Magnetosomen lediglich einen kleinen Bruchteil der Bakterien ausmachen, ist deren Eisen-Signal eindeutig erkennbar. Mittels zirkular polarisiertem Licht konnte darüber hinaus sogar auf die magnetische Struktur der Magnetosomen-Kette zugegriffen werden. Anhand des Vergleiches mit theoretischen Berechnungen beider Magnetit-Untergitter gelang es ferner Rückschlüsse auf die magnetische Orientie-

rung der einzelnen Magnetosomen in der Kette zu treffen. Demnach liegen die einzelnen Magnetosomen in der Magnetosomen-Kette in einer ferromagnetischen Anordnung vor.

Komplementär zu den PEEM-Untersuchungen wurden die *M. magnetotacticum*-Proben ebenfalls mittels SEM und SEM-EDX untersucht. Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit gab es dabei lediglich indirekte Nachweise der Magnetosomen-Kette mittels SEM [186]. In dieser Arbeit gelang es erstmals Partikelketten mittels SEM direkt innerhalb intakter MTB zu beobachten. Die weiteren Untersuchungen dieser Strukturen ergab dabei den Nachweis, dass es sich bei diesen um die Magnetosomen-Ketten der Bakterien handelt. Die erzielbare Auflösung erlaubt es dabei einzelne Magnetosomen innerhalb der Kette abzubilden. Mittels dieser Methodik lassen sich relativ schnell Informationen wie die Größe und Form der einzelnen Magnetosomen und die Länge der Magnetosomen-Kette gewinnen. Ohne die Magnetosomen extrahieren zu müssen, konnte so eine Analyse ihrer speziestypischen Charakteristika erfolgen. Die Ergebnisse ergaben dabei eine sehr gute Übereinstimmung mit vorherigen Analysen [190]. Zudem konnte so auch die typische Anzahl an Magnetosomen pro Individuum betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um eine Größe, die bei der Analyse extrahierter Magnetosomen nicht zugänglich ist. Mittels der SEM-EDX-Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Partikelketten in den SEM-Bildern eindeutig um die eisenhaltigen Magnetosomen handelt. Auch die chemischen Unterschiede, zwischen dem Bereich der Magnetosomen-Kette und dem Referenzbereiche, ließen sich durch das unterschiedliche Signalverhalten entlang der Magnetosomen-Kette klären. Hierdurch konnte ebenfalls auf die Komposition der Magnetosomen aus Magnetit geschlossen werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methodik erlaubt es demnach mittels SEM und einer präparierten Probe mehrere Aspekte eines MTB zu analysieren. Diese reichen von Form und Struktur des Bakteriums, der Kette und der einzelnen Magnetosomen bis hin zur chemischen Zusammensetzung. Die Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass ein Einblick in intakte Bakterien sowohl mittels PEEM als auch SEM möglich ist. Besonders für die Untersuchung neu entdeckter MTB-Spezies ist dies von Bedeutung. So sind bislang mehrere unterschiedliche Präparate erforderlich um an diese Information zu gelangen. Ein Kultivieren der Bakterien ist demnach nahezu unumgänglich, was sich für die meisten Spezies als äußerst schwierig erwiesen hat [44]. Folglich ging der Erkenntnisgewinn in diesem Feld zeitweise schleppend vonstatten [192]. Hier ist es nun möglich mit der selben Probe an diese Informationen zu gelangen und im Anschluss sogar PEEM-Messungen durchzuführen um die magnetischen Eigenschaften der Bakterien zu ergründen.

Nachdem in dieser Arbeit die wichtigen und grundlegenden Techniken sowohl entwickelt als auch demonstriert wurden und ein Einblick in die magnetische Struktur der Magnetosomen-Kette des *M. magnetotacticum* gelang, gilt es in folgenden Arbeiten diese auf die Breite der unterschiedlichen MTB-Spezies zu übertragen. So ist bereits bekannt, dass die Form und Größe der Magnetosomen charakteristisch für einzelne Spezies ist. Eine Untersuchung der Anzahl der Magnetosomen pro Kette verschiedener Spezies würde Aufschluss geben, ob es sich hier ebenfalls um eine derartige Charakteristik handelt. Ebenso wäre eine Weiterentwicklung der PEEM-Systeme hin zu einer besseren maximal erzielbaren Ortsauflösung wünschenswert. Hiermit ließen sich in Zukunft einzelne Magnetosomen individuell und im Zusammenspiel mit den andern Magnetosomen der Kette untersuchen.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Falkenberg, G. Fleissner, K. Schuchardt, M. Kuehbacher, P. Thalau, H. Mouritsen, D. Heyers, G. Wellenreuther und G. Fleissner, *Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds*, PLoS One **5**, e9231 (2010).
- [2] C. Wang, Q. Li, S. Wang, S. Qu und X. Wang, *Microstructure and self-sharpening of the magnetite cap in chiton tooth*, Mater. Sci. Eng., C **37**, 1 (2014).
- [3] R. Wiltschko, *Magnetic orientation in animals*, Springer, Berlin, 2012.
- [4] D. Schüler, *Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria*, FEMS Microbiol. Rev. **32**, 654 (2008).
- [5] K. J. Lohmann, S. D. Cain, S. A. Dodge und C. M. F. Lohmann, *Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles*, Science **294**, 364 (2001).
- [6] R. B. Frankel und R. P. Blakemore, Iron biominerals, in *Conference on Iron Biominerals (1989: University of New Hampshire)*, Plenum press, New York, 1991.
- [7] H. A. Lowenstam, *Lepidocrocite, an apatite mineral, and magnetite in teeth of chitons (Polyplacophora)*, Science **156**, 1373 (1967).
- [8] D. Faivre und D. Schüler, *Magnetotactic bacteria and magnetosomes*, Chem. Rev. **108**, 4875 (2008).
- [9] K. J. Lohmann und C. M. F. Lohmann, *Detection of magnetic field intensity by sea turtles*, Nature **380**, 59 (1996).
- [10] K. J. Lohmann, S. D. Cain, S. A. Dodge und C. M. F. Lohmann, *Regional magnetic fields as navigational markers for sea turtles*, Science **294**, 364 (2001).
- [11] C. V. Mora, M. Davison, J. M. Wild und M. M. Walker, *Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon*, Nature **432**, 508 (2004).

- [12] R. A. Holland, K. Thorup, M. J. Vonhof, W. W. Cochran und M. Wikelski, *Navigation: Bat orientation using Earth's magnetic field*, Nature **444**, 702 (2006).
- [13] J. L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink und B. J. Woodford, *Magnetite biomineralization in the human brain.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**, 7683 (1992).
- [14] J. Dobson und P. Grassi, *Magnetic properties of human hippocampal tissue—evaluation of artefact and contamination sources*, Brain Res. Bull. **39**, 255 (1996).
- [15] A. M. Hirt, F. Brem, M. Hanzlik und D. Faivre, *Anomalous magnetic properties of brain tissue at low temperature: The 50 K anomaly*, J. Geophys. Res. B: Solid Earth **111** (2006).
- [16] A. C. V. Araujo, F. Abreu, K. T. Silva, D. A. Bazylinski und U. Lins, *Magnetotactic Bacteria as Potential Sources of Bioproducts*, Mar. Drugs **13**, 389 (2015).
- [17] D. A. Bazylinski, A. J. Garratt-Reed und R. B. Frankel, *Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria*, Microsc. Res. Tech. **27**, 389 (1994).
- [18] R. Blakemore, *Magnetotactic Bacteria*, Science **190**, 377 (1975).
- [19] D. A. Bazylinski und S. Schübbe, *Controlled biomineralization by and applications of magnetotactic bacteria*, Adv. Appl. Microbiol. **62**, 21 (2007).
- [20] J. L. Kirschvink, *Paleomagnetic evidence for fossil biogenic magnetite in western Crete*, Earth Planet. Sci. Lett. **59**, 388 (1982).
- [21] J. L. Kirschvink und S.-B. R. Chang, *Ultrafine-grained magnetite in deep-sea sediments: Possible bacterial magnetofossils*, Geology **12**, 559 (1984).
- [22] N. Petersen, T. von Dobeneck und H. Vali, *Fossil bacterial magnetite in deep-sea sediments from the South Atlantic Ocean*, Nature **320**, 611 (1986).
- [23] H. Vali, O. Förster, G. Amaratidis und N. Petersen, *Magnetotactic bacteria and their magnetofossils in sediments*, Earth Planet. Sci. Lett. **86**, 389 (1987).
- [24] R. E. Kopp und J. L. Kirschvink, *The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria*, Earth Sci. Rev. **86**, 42 (2008).

- [25] D. F. McNeill und J. L. Kirschvink, *Early dolomitization of platform carbonates and the preservation of magnetic polarity*, J. Geophys. Res. B: Solid Earth **98**, 7977 (1993).
- [26] S.-B. R. Chang und J. L. Kirschvink, *Magnetofossils, the magnetization of sediments, and the evolution of magnetite biomineralization*, Annu. Rev. Earth Planet. Sci. **17**, 169 (1989).
- [27] D. S. McKay, E. K. Gibson Jr., K. L. Thomas-Keprta, H. Vali, C. S. Romanek, S. J. Clemett, X. D. F. Chillier, C. R. Maechling und R. N. Zare, *Search for Past Life on Mars: Possible Relic Biogenic Activity in Martian Meteorite ALH84001*, Science **273**, 924 (1996).
- [28] K. L. Thomas-Keprta, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, S. J. Clemett, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson und C. S. Romanek, *Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: Potential Martian magnetofossils*, Geochim. Cosmochim. Acta **64**, 4049 (2000).
- [29] D. C. Golden, D. W. Ming, R. V. Morris, A. J. Brearley, H. V. Lauer, A. H. Treiman, M. E. Zolensky, C. S. Schwandt, G. E. Lofgren und G. A. McKay, *Evidence for exclusively inorganic formation of magnetite in Martian meteorite ALH84001*, Am. Mineral. **89**, 681 (2004).
- [30] D. C. Golden, D. W. Ming, C. S. Schwandt, H. V. Lauer, R. A. Socki, R. V. Morris, G. E. Lofgren und G. A. McKay, *A simple inorganic process for formation of carbonates, magnetite, and sulfides in martian meteorite ALH84001*, Am. Mineral. **86**, 370 (2001).
- [31] B. Arató, Z. Szányi, C. Flies, D. Schüller, R. B. Frankel, P. R. Buseck und M. Pósfai, *Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker*, Am. Mineral. **90**, 1233 (2005).
- [32] R. B. Frankel und P. R. Buseck, *Magnetite biomineralization and ancient life on Mars*, Curr. Opin. Chem. Biol. **4**, 171 (2000).
- [33] K. L. Thomas-Keprta, S. J. Clemett, D. A. Bazylinski, J. L. Kirschvink, D. S. McKay, S. J. Wentworth, H. Vali, E. K. Gibson, M. F. McKay und C. S. Romanek, *Truncated hexa-octahedral magnetite crystals in ALH84001: presumptive biosignatures*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**, 2164 (2001).

- [34] E. Alphan ery, *Applications of magnetosomes synthesized by magnetotactic bacteria in medicine*, Front. Bioeng. Biotechnol. **2** (2014).
- [35] C. Plank, U. Schillinger, F. Scherer, C. Bergemann, J.-S. R emy, F. Kr tzt, M. Anton, J. Lausier und J. Rosenecker, *The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery*, Biol. Chem. **384**, 737 (2003).
- [36] D. Sch uler und R. B. Frankel, *Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**, 464 (1999).
- [37] B. Gleich und J. Weizenecker, *Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles*, Nature **435**, 1214 (2005).
- [38] M. R. Benoit, D. Mayer, Y. Barak, I. Y. Chen, W. Hu, Z. Cheng, S. X. Wang, D. M. Spielman, S. S. Gambhir und A. Matin, *Visualizing implanted tumors in mice with magnetic resonance imaging using magnetotactic bacteria*, Clin. Cancer Res. **15**, 5170 (2009).
- [39] D. A. Bazylinski und T. J. Williams, Ecophysiology of magnetotactic bacteria, in *Magnetoreception and magnetosomes in bacteria*, D. Sch uler (Hrsg.), Seiten 37–75, Springer, Berlin, 2007.
- [40] S. Martel, M. Mohammadi, O. Felfoul, Z. Lu und P. Pouponneau, *Flagellated Magnetotactic Bacteria as Controlled MRI-trackable Propulsion and Steering Systems for Medical Nanorobots Operating in the Human Microvasculature*, Int. J. Rob. Res. **28**, 571 (2009).
- [41] S. Dasdag und H. Bektas, *Magnetotactic Bacteria and their Application in Medicine*, J. Phys. Chem. Biophys. **4**, 2161 (2014).
- [42] P. Berthold, *Orientation in birds*, Birkh user, Basel, 2013.
- [43] R. Wiltschko und W. Wiltschko, *The magnetite-based receptors in the beak of birds and their role in avian navigation*, J. Comp. Physiol. A **199**, 89 (2013).
- [44] A. Postec, N. Tapia, A. Bernadac, M. Joseph, S. Davidson, L.-F. Wu, B. Ollivier und N. Pradel, *Magnetotactic bacteria in microcosms originating from the French Mediterranean coast subjected to oil industry activities*, Microb. Ecol. **63**, 1 (2012).

- [45] A. Hoell, A. Wiedenmann, U. Heyen und D. Schüler, *Nanostructure and field-induced arrangement of magnetosomes studied by SANSPOLE*, Physica B: Condens. Matter **350**, E309 (2004).
- [46] H. Moor, *Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie*, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. **64**, 546 (1964).
- [47] J. L. Martins, C. N. Keim, M. Farina, B. Kachar und U. Lins, *Deep-Etching Electron Microscopy of Cells of Magnetospirillum magnetotacticum: Evidence for Filamentous Structures Connecting the Magnetosome Chain to the Cell Surface*, Curr. Microbiol. **54**, 1 (2007).
- [48] K. H. Schleifer, D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig und M. Köhler, *The genus Magnetospirillum gen. nov. Description of Magnetospirillum gryphiswaldense sp. nov. and transfer of Aquaspirillum magnetotacticum to Magnetospirillum magnetotacticum comb. nov.*, Syst. Appl. Microbiol. **14**, 379 (1991).
- [49] T. Matsunaga, T. Sakaguchi und F. Tadakoro, *Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**, 651 (1991).
- [50] V. Morillo, F. Abreu, A. C. Araujo, L. G. de Almeida, A. Enrich-Prast, M. Farina, A. T. de Vasconcelos, D. A. Bazylinski und U. Lins, *Isolation, cultivation and genomic analysis of magnetosome biomineralization genes of a new genus of South-seeking magnetotactic cocci within the Alphaproteobacteria*, Front. Microbiol. **5** (2014).
- [51] T. J. Williams, C. T. Lefèvre, W. Zhao, T. J. Beveridge und D. A. Bazylinski, *Magnetospira thiophila gen. nov., sp. nov., a marine magnetotactic bacterium that represents a novel lineage within the Rhodospirillaceae (Alphaproteobacteria)*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**, 2443 (2012).
- [52] D. A. Bazylinski, T. J. Williams, C. T. Lefèvre, R. J. Berg, C. L. Zhang, S. S. Bowser, A. J. Dean und T. J. Beveridge, *Magnetococcus marinus gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (Magnetococcales fam. nov., Magnetococcales ord. nov.) at the base of the Alphaproteobacteria*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **63**, 801 (2013).

- [53] K. Zhou, W.-Y. Zhang, H.-M. Pan, J.-H. Li, H.-D. Yue, T. Xiao und L.-F. Wu, *Adaptation of spherical multicellular magnetotactic prokaryotes to the geochemically variable habitat of an intertidal zone*, Environ. Microbiol. **15**, 1595 (2013).
- [54] T. Sakaguchi, A. Arakaki und T. Matsunaga, *Desulfovibrio magneticus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles.*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 215 (2002).
- [55] C. T. Lefèvre, N. Menguy, F. Abreu, U. Lins, M. Pósfai, T. Prozorov, D. Pignol, R. B. Frankel und D. A. Bazylinski, *A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria*, Science **334**, 1720 (2011).
- [56] D. A. Bazylinski und R. B. Frankel, *Magnetosome formation in prokaryotes*, Nat. Rev. Microbiol. **2**, 217 (2004).
- [57] D. Schüler, *Die Biomineralisation von magnetischen Nanokristallen in magnetotaktischen Bakterien*, BIOspektrum **6**, 445 (2000).
- [58] C. T. Lefèvre, D. Trubitsyn, F. Abreu, S. Kolinko, L. G. P. Almeida, A. T. R. Vasconcelos, U. Lins, D. Schüler, N. Ginet, D. Pignol und D. A. Bazylinski, *Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes*, Environ. Microbiol. **15**, 2267 (2013).
- [59] U. Lins, C. N. Keim, F. F. Evans, M. Farina und P. R. Buseck, *Magnetite (Fe_3O_4) and greigite (Fe_3S_4) crystals in multicellular magnetotactic prokaryotes*, Geomicrobiol. J. **24**, 43 (2007).
- [60] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, B. R. Heywood, S. Mann, J. W. King, P. L. Donaghay und A. K. Hanson, *Controlled Biomineralization of Magnetite (Fe_3O_4) and Greigite (Fe_3S_4) in a Magnetotactic Bacterium*, Appl. Environ. Microbiol. **61**, 3232 (1995).
- [61] B. L. Taylor, I. B. Zhulin und M. S. Johnson, *Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria*, Annu. Rev. Microbiol. **53**, 103 (1999).
- [62] A. Omstedt, M. Edman, B. Claremar, P. Frodin, E. Gustafsson, C. Humborg, H. Hägg, M. Mörth, A. Rutgersson, G. Schurgers, B. Smith, T. Wällstedt und A. Yurova, *Future changes in the Baltic Sea acid-base (pH) and oxygen balances*, Tellus B **64** (2012).

- [63] R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. S. Johnson und B. L. Taylor, *Magneto-Aerotaxis in Marine Cocoid Bacteria*, Biophys. J. **73**, 994 (1997).
- [64] R. P. Blakemore, R. B. Frankel und Ad. J. Kalmijn, *South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere*, Nature **286**, 384 (1980).
- [65] R. B. Frankel, T. J. Williams und D. A. Bazylinski, Magneto-aerotaxis, in *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, D. Schüler (Hrsg.), Seiten 1–24, Springer, Berlin, 2007.
- [66] C. T. Lefèvre, M. Bennet, L. Landau, P. Vach, D. Pignol, D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, S. Klumpp und D. Faivre, *Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria*, Biophys. J. **107**, 527 (2014).
- [67] D. Maratea und R. Blakemore, *Aquaspirillum magnetotacticum sp. nov., a magnetic spirillum*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **31**, 452 (1981).
- [68] K. H. Schleifer, D. Schüler, S. Spring, M. Weizenegger, R. Amann, W. Ludwig und M. Köhler, *The genus Magnetospirillum gen. nov. Description of Magnetospirillum gryphiswaldense sp. nov. and transfer of Aquaspirillum magnetotacticum to Magnetospirillum magnetotacticum comb. nov.*, Syst. Appl. Microbiol. **14**, 379 (1991).
- [69] D. L. Balkwill, D. Maratea und R. P. Blakemore, *Ultrastructure of a Magnetotactic Spirillum*, J. Bacteriol. **141**, 1399 (1980).
- [70] D. A. Bazylinski, *Controlled biomineralization of magnetic minerals by magnetotactic bacteria*, Chem. Geol. **132**, 191 (1996).
- [71] D. Schüler und E. Baeuerlein, *Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of Magnetospirillum gryphiswaldense*, J. Bacteriol. **180**, 159 (1998).
- [72] D. A. Bazylinski, A. J. Dean, T. J. Williams, L. K. Long, S. L. Middleton und B. L. Dubbels, *Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2*, Arch. Microbiol. **182**, 373 (2004).
- [73] D. A. Bazylinski und R. B. Frankel, *Magnetosome formation in prokaryotes*, Nat. Rev. Microbiol. **2**, 217 (2004).

- [74] L. H. Böttger, *Mössbauerspektroskopie an Magnetospirillum gryphiswaldense und Eisen-Schwefel-Proteinen*, Dissertation, Universität zu Lübeck (2007).
- [75] R. Bruchhaus, Crystal Structures and Chemical Bonds in Transition Metal Oxides (TMO), in *Electronic oxides-correlation phenomena, exotic phases and novel functionalities: lecture notes of the 41st spring school 2010*, S. Blügel, T. Brückel, R. Waser und C. M. Schneider (Hrsg.), Seiten A1.1–A1.23, Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek, 2010.
- [76] R. J. Hill, J. R. Craig und G. Gibbs, *Systematics of the spinel structure type*, Phys. Chem. Miner. **4**, 317 (1979).
- [77] A. Yanase und K. Siratori, *Band structure in the high temperature phase of Fe_3O_4* , J. Phys. Soc. Jpn. **53**, 312 (1984).
- [78] G. Bihlmayer, Atomic Magnetism, in *Electronic oxides-correlation phenomena, exotic phases and novel functionalities: lecture notes of the 41st spring school 2010*, S. Blügel, T. Brückel, R. Waser und C. M. Schneider (Hrsg.), Seiten A2.1–A2.15, Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek, 2010.
- [79] M. Fleet, *The structure of magnetite*, Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. **37**, 917 (1981).
- [80] J. Tang, M. Myers, K. A. Bosnick und L. E. Brus, *Magnetite Fe_3O_4 nanocrystals: spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics*, J. Phys. Chem. B **107**, 7501 (2003).
- [81] S. Sasaki, *Fe^{2+} and Fe^{3+} ions distinguishable by x-ray anomalous scattering: Method and its application to magnetite*, Rev. Sci. Instrum. **66**, 1573 (1995).
- [82] I. Leonov, A. Yaresko, V. Antonov, M. Korotin und V. Anisimov, *Charge and Orbital Order in Fe_3O_4* , Phys. Rev. Lett. **93**, 146404 (2004).
- [83] M. Uhl und B. Siberchicot, *A first-principles study of exchange integrals in magnetite*, J. Phys. Condens. Matter **7**, 4227 (1995).
- [84] M. Penicaud, B. Siberchicot, C. Sommers und J. Kübler, *Calculated electronic band structure and magnetic moments of ferrites*, J. Magn. Magn. Mater. **103**, 212 (1992).

- [85] S. Blundell, *Magnetism in condensed matter*, Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [86] M. Ležaić, Crystal Field Theory and Jahn-Teller Effect, in *Electronic oxides-correlation phenomena, exotic phases and novel functionalities: lecture notes of the 41st spring school 2010*, S. Blügel, T. Brückel, R. Waser und C. M. Schneider (Hrsg.), Seiten A3.1–A3.22, Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek, 2010.
- [87] D. Huang, C. Chang, H.-T. Jeng, G. Guo, H.-J. Lin, W. Wu, H. Ku, A. Fujimori, Y. Takahashi und C. Chen, *Spin and Orbital Magnetic Moments of Fe_3O_4* , Phys. Rev. Lett. **93**, 077204 (2004).
- [88] A. R. Muxworthy und W. Williams, *Critical superparamagnetic/single-domain grain sizes in interacting magnetite particles: implications for magnetosome crystals*, J. R. Soc. Interface, rsif (2008).
- [89] D. J. Dunlop und Ö. Özdemir, *Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers*, Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
- [90] H. Hertz, *Ueber einen Einfluss des ultravioletten Lichtes auf die elektrische Entladung*, Ann. Phys. **267**, 983 (1887).
- [91] W. Hallwachs, *Ueber die Electricirung von Metallplatten durch Bestrahlung mit elektrischem Licht*, Ann. Phys. **270**, 731 (1888).
- [92] J. J. Thomson, *Cathode Rays*, Philos. Mag. **44**, 293 (1897).
- [93] A. Einstein, *Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt*, Ann. Phys. **322**, 132 (1905).
- [94] G. N. Lewis, *The Conservation of Photons*, Nature **118**, 874 (1926).
- [95] S. Hüfner, *Photoelectron spectroscopy: principles and applications*, Springer, Berlin, 2003.
- [96] L. Meitner, *Über die β -Strahl-Spektren und ihren Zusammenhang mit der γ -Strahlung*, Z. Phys. A: Hadrons Nucl. **11**, 35 (1922).
- [97] P. Auger, *Sur l'effet photoélectrique composé*, J. Phys. Radium **6**, 205 (1925).
- [98] R. Glocker und H. Schreiber, *Quantitative Röntgenspektroanalyse mit Kalterregung des Spektrums*, Ann. Phys. **390**, 1089 (1928).

- [99] M. O. Krause, *Atomic radiative and radiationless yields for K and L shells*, J. Phys. Chem. Ref. Data **8**, 307 (1979).
- [100] M. P. Seah und W. A. Dench, *Quantitative Electron Spectroscopy of Surfaces*, Surface and Interface Analysis **1**, 2 (1979).
- [101] J. Stöhr, H. A. Padmore, S. Anders, T. Stammler und M. R. Scheinfein, *Principles of x-ray magnetic dichroism spectromicroscopy*, Surf. Rev. Lett. **5**, 1297 (1998).
- [102] S. Anders, H. A. Padmore, R. M. Duarte, T. Renner, T. Stammler, A. Scholl, M. R. Scheinfein, J. Stöhr, L. Séve und B. Sinkovic, *Photoemission electron microscope for the study of magnetic materials*, Rev. Sci. Instrum. **70**, 3973 (1999).
- [103] K. W. Kim, Y. Kwon, K.-Y. Nam, J.-H. Lim, K.-G. Kim, K. S. Chon, B. H. Kim, D. E. Kim, J. Kim, B. N. Ahn, H. J. Shin, S. Rah, K.-H. Kim, J. S. Chae, D. G. Gweon, D. W. Kang, S. H. Kang, J. Y. Min, K.-S. Choi, S. E. Yoon, E.-A. Kim, Y. Namba und K.-H. Yoon, *Compact soft x-ray transmission microscopy with sub-50 nm spatial resolution*, Phys. Med. Biol. **51**, N99 (2006).
- [104] P. Fischer, T. Eimüller, G. Schütz, G. Denbeaux, A. Pearson, L. Johnson, D. Attwood, S. Tsunashima, M. Kumazawa, N. Takagi, M. Köhler und G. Bayreuther, *Element-specific imaging of magnetic domains at 25 nm spatial resolution using soft x-ray microscopy*, Rev. Sci. Instrum. **72**, 2322 (2001).
- [105] J. Stöhr und S. Anders, *X-ray spectromicroscopy of complex materials and surfaces*, IBM J. Res. Develop. **44**, 535 (2000).
- [106] H. Hopster und H. P. Oepen, *Magnetic Microscopy of Nanostructures*, Springer, Berlin, 2003.
- [107] B. H. Frazer, B. Gilbert, B. R. Sonderegger und G. De Stasio, *The probing depth of total electron yield in the sub-keV range: TEY-XAS and X-PEEM*, Surf. Sci. **537**, 161 (2003).
- [108] W. Kuch, *Abbildende magnetische Mikrospektroskopie*, Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002).
- [109] F. Schwabl, *Quantenmechanik (QM I)*, Springer, Berlin, 2007.
- [110] C. M. Schneider und G. Schönhense, *Investigating surface magnetism by means of photoexcitation electron emission microscopy*, Rep. Prog. Phys. **65**, R1785 (2002).

- [111] B. Heitkamp, *Charakterisierung magnetischer Materialien mit X-PEEM*, Berichte des Forschungszentrums Jülich **Jül-4068** (2003).
- [112] C. T. Chen, Y. U. Idzerda, H.-J. Lin, N. V. Smith, G. Meigs, E. Chaban, G. H. Ho, E. Pellegrin und F. Sette, *Experimental Confirmation of the X-Ray Magnetic Circular Dichroism Sum Rules for Iron and Cobalt*, Phys. Rev. Lett. **75**, 152 (1995).
- [113] P. J. Potts, *A Handbook of Silicate Rock Analysis*, Springer, Berlin, 2012.
- [114] D. J. Prior, A. P. Boyle, F. Brenker, M. C. Cheadle, A. Day, G. Lopez, L. Peruzzi, G. Potts, S. Reddy, R. Spiess, N. E. Timms, P. Trimby, J. Wheeler und L. Zetterstrom, *The application of electron backscatter diffraction and orientation contrast imaging in the SEM to textural problems in rocks*, Am. Mineral. **84**, 1741 (1999).
- [115] G. E. Lloyd, *Atomic number and crystallographic contrast images with the SEM: a review of backscattered electron techniques*, Mineral. Mag. **51**, 3 (1987).
- [116] R. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, Springer, Berlin, 2006.
- [117] A. Boyde, L. Lovicar und J. Zamecnik, *Combining confocal and BSE SEM imaging for bone block surfaces*, Eur. Cell. Mater. **9**, 33 (2005).
- [118] G. Gauglitz und T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy: Volume 1 and 2*, Wiley VCH, Weinheim, 2002.
- [119] J. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, A. D. Romig, Jr., C. E. Lyman, C. Fiori und E. Lifshin, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists*, Springer, Berlin, 2012.
- [120] F. Weigand, *XANES und MEXAFS an magnetischen Übergangsmetalloxiden Entwicklung eines digitalen Lock-In XMCD-Experiments mit Phasenschieber*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2003).
- [121] M. J. Lisowski, *Elektronen- und Magnetisierungsdynamik in Metallen untersucht mit zeitaufgelöster Photoemission*, Dissertation, Freie Universität Berlin (2005).
- [122] W. Heisenberg, *Zur Theorie des Ferromagnetismus*, Z. Phys. A: Hadrons Nucl. **49**, 619 (1928).

- [123] K. Kopitzki, *Einführung in die Festkörperphysik*, B. G. Teubner, Wiesbaden, 1993.
- [124] E. C. Stoner, *Collective electron ferromagnetism II. Energy and specific heat*, Proc. R. Soc. London, Ser. A **169**, 339 (1939).
- [125] E. C. Stoner, *Ferromagnetism*, Rep. Prog. Phys. **11**, 43 (1947).
- [126] A. Kaiser, *Magnetization Dynamics in Magnetically Coupled Heterostructures*, Dissertation, Universität Duisburg-Essen (2009).
- [127] H. Ohldag, *Exchange Coupling of Co and Fe on Antiferromagnetic NiO Investigated By Dichroism X-Ray Absorption Spectromicroscopy*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2003).
- [128] G. van der Laan, B. T. Thole, G. A. Sawatzky, J. B. Goedkoop, J. C. Fuggle, J.-M. Esteve, R. Karnatak, J. P. Remeika und H. A. Dabkowska, *Experimental proof of magnetic x-ray dichroism*, Phys. Rev. B **34**, 6529 (1986).
- [129] G. Schütz, W. Wagner, W. Wilhelm, P. Kienle, R. Zeller, R. Frahm und G. Materlik, *Absorption of Circularly Polarized X Rays in Iron*, Phys. Rev. Lett. **58**, 737 (1987).
- [130] C. Morrison, Clebsch-Gordan Coefficients, in *Angular Momentum Theory Applied to Interactions in Solids*, Seiten 19–23, Springer, Berlin, 1988.
- [131] H. Ebert, *Magneto-optical effects in transition metal systems*, Rep. Prog. Phys. **59**, 1665 (1996).
- [132] V. Solinus, *Photoemissionsmikroskopie bei Anregung mit ultravioletter Strahlung*, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1996).
- [133] H. Liebl, *Applied Charged Particle Optics*, Springer, Berlin, 2008.
- [134] G. F. Rempfer, *Unipotential electrostatic lenses: Paraxial properties and aberrations of focal length and focal point*, J. Appl. Phys. **57**, 2385 (1985).
- [135] N. B. Weber, M. Escher, M. Merkel, A. Oelsner und G. Schönhense, *Energy- and Time-Resolved Microscopy Using PEEM: Recent Developments and State-of-the-Art*, J. Phys. Conf. Ser. **100**, 072031 (2008).

- [136] N. D. Lang und W. Kohn, *Theory of Metal Surfaces: Work Function*, Phys. Rev. B **3**, 1215 (1971).
- [137] S. A. Nepijko, N. N. Sedov, G. Schönhense, M. Escher, X. Bao und W. Huang, *Resolution deterioration in emission electron microscopy due to object roughness*, Ann. Phys. **512**, 441 (2000).
- [138] S. A. Nepijko, N. N. Sedov und G. Schönhense, *Peculiarities of imaging one- and two-dimensional structures using an electron microscope in the mirror operation mode*, J. Microsc. **203**, 269 (2001).
- [139] S. Suzuki, Y. Watanabe, Y. Homma, S. Fukuba, S. Heun und A. Locatelli, *Work functions of individual single-walled carbon nanotubes*, Appl. Phys. Lett. **85**, 127 (2004).
- [140] O. Renault, R. Brochier, A. Roule, P.-H. Haumesser, B. Krömker und D. Funne-
mann, *Work-function imaging of oriented copper grains by photoemission*, Surf.
Interface Anal. **38**, 375 (2006).
- [141] M. D. v. Przychowski, G. K. L. Marx, G. H. Fecher und G. Schönhense, *A spatially
resolved investigation of oxygen adsorption on polycrystalline copper and titanium
by means of photoemission electron microscopy*, Surf. Sci. **549**, 37 (2004).
- [142] W. Swiech, G. H. Fecher, Ch. Ziethen, O. Schmidt, G. Schönhense, K. Grzelakow-
ski, C. M. Schneider, R. Frömter, H. P. Oepen und J. Kirschner, *Recent progress
in photoemission microscopy with emphasis on chemical and magnetic sensitivity*,
J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom. **84**, 171 (1997).
- [143] C. M. Schneider, *Soft X-ray photoemission electron microscopy as an element-
specific probe of magnetic microstructures*, J. Magn. Magn. Mater. **175**, 160
(1997).
- [144] L. Seidel, *Ueber die Theorie der Fehler, mit welchen die durch optische Instrumente
gesehenen Bilder behaftet sind, und über die mathematischen Bedingungen ihrer
Aufhebung.*, Abhandlungen der naturwissenschaftlich-technischen Commission bei
der Königl. Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München **1**, 227 (1857).
- [145] R. N. Watts, S. Liang, Z. H. Levine, T. B. Lucatorto, F. Polack und M. R.
Scheinfein, *A transmission x-ray microscope based on secondary-electron imaging*,
Rev. Sci. Instrum. **68**, 3464 (1997).

- [146] G. F. Rempfer und O. H. Griffith, *The resolution of photoelectron microscopes with UV, x-ray, and synchrotron excitation sources*, Ultramicroscopy **27**, 273 (1989).
- [147] L. de Broglie, *Recherches sur la théorie des quanta*, Annales de Physique **10**, 22 (1925).
- [148] W. Glaser, *Grundlagen der Elektronenoptik*, Springer, Berlin, 1952.
- [149] R. Könenkamp, R. C. Word, G. F. Rempfer, T. Dixon, L. Almaraz und T. Jones, *5.4 nm spatial resolution in biological photoemission electron microscopy*, Ultramicroscopy **110**, 899 (2010).
- [150] C. Keutner, *Photoemissions-Elektronenmikroskopie an Magnetospirillum magnetotacticum*, Diplomarbeit, Technische Universität Dortmund (2011).
- [151] X. M. Cheng und D. J. Keavney, *Studies of nanomagnetism using synchrotron-based x-ray photoemission electron microscopy (X-PEEM)*, Rep. Prog. Phys. **75**, 026501 (2012).
- [152] S. L. Flegler, J. W. Heckman und K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995.
- [153] P. F. Schmidt, W. J. Bartz und E. Wippler, *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*, expert Verlag, Renningen-Malsheim, 1994.
- [154] D. Joy, M. Prasad und H. Meyer, *Experimental secondary electron spectra under SEM conditions*, J. Microsc. **215**, 77 (2004).
- [155] T. E. Everhart und R. F. M. Thornley, *Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents*, J. Sci. Instrum. **37**, 246 (1960).
- [156] L. Reimer, *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*, Springer, Berlin, 2013.
- [157] J. Trincavelli und R. Van Grieken, *Peak-to-background method for standardless electron microprobe analysis of particles*, X-Ray Spectrom. **23**, 254 (1994).
- [158] F. Eggert, *Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse: mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop; ein Handbuch für die Praxis*, BoD, Norderstedt, 2005.

- [159] S. Döring, *Grundlagen zur Charakterisierung der Undulatorbeamline U55 (BL11) an der Synchrotronstrahlungsquelle DELTA*, Diplomarbeit, Universität Dortmund (2007).
- [160] J. W. Freeland, J. Lang, G. Srajer, R. Winarski, D. Shu und D. Mills, *A unique polarized x-ray facility at the Advanced Photon Source*, Rev. Sci. Instrum. **73**, 1408 (2002).
- [161] Argonne National Laboratory, *Beamline 4-ID-C: Soft X-ray Magnetic Studies*, <http://www.aps.anl.gov/Sectors/Sector4/4idc/> (15.05.2015).
- [162] *Arc Lamp Housing - OPERATION MANUAL*, Photon Technology International, Inc. (2007).
- [163] *User's Manual Photo Emission Electron Microscope PEEM - 350*, Staib Instrumente GmbH (2001).
- [164] F. Nickel, *Photoemissionsmikroskopie an magnetischen Systemen: Erste Messungen bei DELTA*, Diplomarbeit, Technische Universität Dortmund (2009).
- [165] FOCUS GmbH, *FOCUS IS-PEEM*, http://www.focus-gmbh.com/uhv-instruments/PEEM_NanoESCA/PEEM/PEEM.html (18.05.2015).
- [166] W. S. Rasband, *ImageJ*, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html> (1997-2014).
- [167] C. A. Schneider, W. S. Rasband und K. W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*, Nat. Methods **9**, 671 (2012).
- [168] M. Daniels, *SpectrumExtractor*, <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/spectrum-extractor.html> (2004).
- [169] A. Johnson, *Experimental Physics and Industrial Control System (EPICS)*, <http://www.aps.anl.gov/epics/> (1994-2014).
- [170] A. D. Edelstein, M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale und N. Stuurman, *Advanced methods of microscope control using μ Manager software*, J. Biol. Methods **1**, e10 (2014).
- [171] C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Automatized PEEM measurements at the PGM Beamline 11 using the novel, self-developed S.P.A.M.M. Software*, 9th DELTA User Meeting & Annual Report 2013, 9 (2013).

- [172] B. Büsing, *Entwicklung von Methoden zur Untersuchung der zeitlichen Stabilität der U55-Beamline an DELTA*, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (2014).
- [173] K. Evans, Jr., *Java and JCA*, EPICS “Getting Started” Lecture Series (2004).
- [174] P. Thévenaz, U. Rüttimann und M. Unser, *A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity*, IEEE Trans. Image Process. **7**, 27 (1998).
- [175] S. Y. Turishchev, V. A. Terekhov, E. V. Parinova, O. Korolik, A. Mazanik und A. Fedotov, *Surface modification and oxidation of Si wafers after low energy plasma treatment in hydrogen, helium and argon*, Mater. Sci. Semicond. Process. **16**, 1377 (2013).
- [176] Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <http://www.dsmz.de/> (13.05.2015).
- [177] K. Riederer, K. Cruz, S. Shemes, S. Szpunar und J. T. Fishbain, *MALDI-TOF identification of Gram-negative bacteria directly from blood culture bottles containing charcoal: Sepsityper[®] kits versus centrifugation–filtration method*, Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **82**, 105 (2015).
- [178] D. N. Singh, A. Kumar, M. P. Sarbhai und A. K. Tripathi, *Cultivation-independent analysis of archaeal and bacterial communities of the formation water in an Indian coal bed to enhance biotransformation of coal into methane*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **93**, 1337 (2012).
- [179] S. Kleta, M. Nordhoff, K. Tedin, L. H. Wieler, R. Kolenda, S. Oswald, T. A. Oelschlaeger, W. Bleiß und P. Schierack, *Role of F1C fimbriae, flagella, and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 on atypical enteropathogenic E. coli infection*, Infect. Immun. **82**, 1801 (2014).
- [180] S. Thamphiwatana, W. Gao, D. Pornpattananangkul, Q. Zhang, V. Fu, J. Li, J. Li, M. Obonyo und L. Zhang, *Phospholipase A2-responsive antibiotic delivery via nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection*, J. Mater. Chem. B **2**, 8201 (2014).

- [181] M. D. Choudhury, T. Dutta und S. Tarafdar, *Pattern formation in droplets of starch gels containing NaCl dried on different surfaces*, Colloids Surf., A **432**, 110 (2013).
- [182] H.-C. Ploigt, C. Brun, M. Pivetta, F. Patthey und W.-D. Schneider, *Local work function changes determined by field emission resonances: NaCl/Ag(100)*, Phys. Rev. B **76**, 195404 (2007).
- [183] S. Brück, M. Paul, H. Tian, A. Müller, D. Kufer, C. Praetorius, K. Fauth, P. Audehm, E. Goering, J. Verbeeck, G. Van Tendeloo, M. Sing und R. Claessen, *Magnetic and electronic properties of the interface between half metallic Fe₃O₄ and semiconducting ZnO*, Appl. Phys. Lett. **100**, 081603 (2012).
- [184] D. J. Keavney, Persönliche Korrespondenz (2013).
- [185] J. Chen, D. J. Huang, A. Tanaka, C. F. Chang, S. C. Chung, W. B. Wu und C. T. Chen, *Magnetic circular dichroism in Fe 2p resonant photoemission of magnetite*, Phys. Rev. B **69**, 085107 (2004).
- [186] M. Hanzlik, M. Winklhofer und N. Petersen, *Spatial arrangement of chains of magnetosomes in magnetotactic bacteria*, Earth Planet. Sci. Lett. **145**, 125 (1996).
- [187] A. Hashim, M. Molčan, J. Kovač, Z. Varchulová, H. Gojzewski, M. Makowski, P. Kopčansky, Z. Tomori und M. Timko, *The influence of morphology on magnetic properties of magnetosomes*, Acta Phys. Pol. A **121**, 1250 (2012).
- [188] M. Bennet, L. Bertinetti, R. K. Neely, A. Schertel, A. Körnig, C. Flors, F. D. Müller, D. Schüler, S. Klumpp und D. Faivre, *Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles*, Faraday Discuss. **181**, 71 (2015).
- [189] C. Jogler, G. Wanner, S. Kolinko, M. Niebler, R. Amann, N. Petersen, M. Kube, R. Reinhardt und D. Schüler, *Conservation of proteobacterial magnetosome genes and structures in an uncultivated member of the deep-branching Nitrospira phylum*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **108**, 1134 (2011).
- [190] B. Devouard, M. Posfai, X. Hua, D. A. Bazylinski, R. B. Frankel und P. R. Buseck, *Magnetite from magnetotactic bacteria: Size distributions and twinning*, Am. Mineral. **83**, 1387 (1998).
- [191] A. von Bohlen, Persönliche Korrespondenz (2014).

- [192] L. Yan, S. Zhang, P. Chen, H. Liu, H. Yin und H. Li, *Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application*, Microbiol. Res. **167**, 507 (2012).
- [193] ATCC, <http://www.atcc.org> (21.05.2015).
- [194] D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, S. Döring, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Structural investigation of the three-layer system MgO/Fe/GaAs (001) by means of photoelectron spectroscopy and diffraction*, Phys. Rev. B **88**, 045313 (2013).
- [195] C. Kolczewski und K. Hermann, *Ab initio DFT cluster studies of angle-resolved NEXAFS spectra for differently coordinated oxygen at the V₂O₅ (010) surface*, Surf. Sci. **552**, 98 (2004).
- [196] D. Zerulla, D. Mayer, K. Hallmeier und T. Chassé, *Angular-resolved XANES measurements of the polar and azimuthal orientation of alkanethiols on InP (110)*, Chem. Phys. Lett. **311**, 8 (1999).

Anhang

A. Substanzen

A.1. Nährmedium

Das Nährmedium der magnetotaktischen Bakterien setzt sich aus den folgenden chemischen Substanzen zusammen. Die Hauptzusammensetzung des Nährmediums ist in Tabelle A.1 aufgelistet.

Die Zusammensetzungen von Wolfe's Vitamin Lösung, Wolfe's Mineral Lösung und der 0,01 M Eisen-Chinasäure sind in den Tabellen Tabelle A.2, Tabelle A.3 und Tabelle A.4 gelistet. Wolfe's Vitamin Lösung Wolfe's Mineral Lösung können dabei auch fertig über die ATCC bezogen werden [193].

Destilliertes Wasser	1,0 L
Wolfe's Vitamin Lösung (Tabelle A.2)	10,0 mL
Wolfe's Mineral Lösung (Tabelle A.3)	5,0 mL
0,01 M Eisen-Chinasäure (Tabelle A.4) ...	2,0 mL
0,1 % Resazurin	0,45 mL
KH_2PO_4	0,68 g
NaNO_3	0,12 g
Ascorbic acid	0,035 g
Tartaric acid	0,37 g
Succinic acid	0,37 g
Sodium acetate	0,05 g
Agar	1,3 g

Tabelle A.1.: Zusammensetzung des Magnetospirillum-Nährmediums.

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin Hydrochlorid	10,0 mg
Thiamin	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
Calcium-D-Pantothenat	5,0 mg
Vitamin B12	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Thioctsäure	5,0 mg
Destilliertes Wasser	1,0 L

Tabelle A.2.: Zusammensetzung von Wolfe's Vitamin Lösung. (ATCC: Vitamin Supplement, catalog no. MD-VS)

Nitrilotriessigsäure	1,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,0 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01 g
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,01 g
Destilliertes Wasser	100 mL

Tabelle A.3.: Zusammensetzung von Wolfe's Mineral Lösung. (ATCC: Trace Mineral Supplement, catalog no. MD-TMS)

FeCl ₃	0,27 g
Chinasäure	0,19 g
Destilliertes Wasser	100 mL

Tabelle A.4.: Zusammensetzung der 0,01 M Eisen-Chinasäure.

A.2. Phosphatgepufferte Salzlösung

Die Zusammensetzung der phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ist in Tabelle A.5 angegeben. Mittels HCl wird diese Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht und anschließend mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL aufgefüllt.

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Destilliertes Wasser	800 mL

Tabelle A.5.: Zusammensetzung der phosphatgepufferte Salzlösung.

B. NEMeSUS

Basierend auf ähnlichen Subroutinen wie sie in S.P.A.M.M. verwendet werden, wurde eine weitere Software entwickelt. Diese ermöglicht die Durchführung von Röntgenabsorptionsspektroskopie an der dedizierten Photoelektronenspektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) UHV-Kammer. Die Bedienoberfläche diese NEMeSUS (NEXAFS & EXAFS Measurement Software for Undulator based Synchrotron radiation) genannte Software ist in Abbildung B.1 gezeigt.

Wie auch schon in S.P.A.M.M. wird die JCA-Schnittstelle zur Steuerung der EPICS-Komponenten mittels Java genutzt. NEMeSUS ist jedoch selbstständig lauffähig und benötigt keine weiteren Programme wie ImageJ oder μ Manager, da keine proprietäre

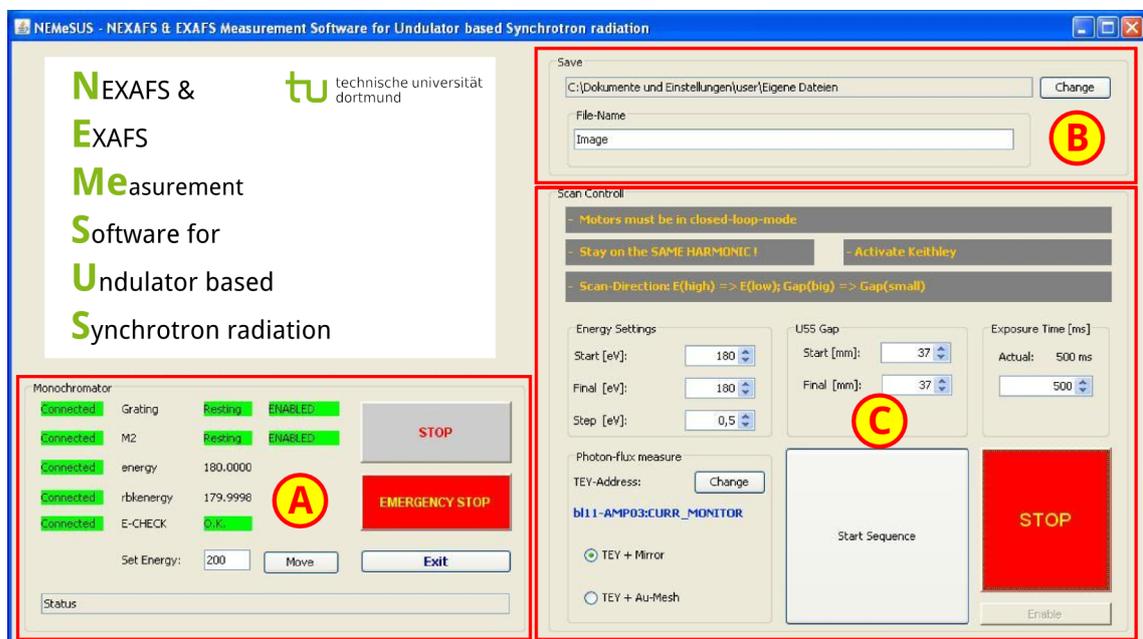


Abbildung B.1.: NEMeSUS Bedienoberfläche mit den Bereichen für die Monochromator-Steuerung und -Überwachung (A), den Speichereinstellungen (B) und den Einstellungen der Messparameter (C).

Hardware angesprochen wird. Die Subroutinen zur Monochromator-Steuerung und -Überwachung konnten direkt aus S.P.A.M.M. übertragen werden. Bei den Speichereinstellungen müssen hier keine Bilder gespeichert werden. Anstelle dessen wird nun eine einzige Datei erzeugt, in der die Photonenenergie, das Maß für den Photonenfluss und der Strom zur Probe tabellarisch gespeichert werden. Der Strom zur Probe entspricht der Gesamtelektronenausbeute und somit der Probenabsorption. Die Adresse des für die Strommessung genutzten Gerätes sowie die Messzeit pro Energieschritt lassen sich vom Benutzer einstellen. Für die Einstellungen der Photonenenergie und des Undulators gelten mit (5.1) und (5.2) die gleichen Bedingungen wie bei S.P.A.M.M..

Nach der Implementierung von NEMeSUS konnten ohne weitere Modifikation an der XPS-Kammer erste Absorptionsmessungen durchgeführt werden. Eine der ersten Messergebnisse ist in Abbildung B.2 gezeigt. Zum Testen der gesamten Prozedur wurde hier eine natürlich oxidierte Silizium-Probe untersucht. Gut zu erkennen ist die dem reinen Si zugehörigen $L_{2,3}$ -Kante bei 100 eV, sowie der zum Oxid gehörige Beitrag bei 106 eV [175].

Mittels NEMeSUS können so die bisher an der XPS-Kammer möglichen, höchst oberflächensensitiven Experimentiertechniken um die tiefer reichende Absorptionsspektroskopie

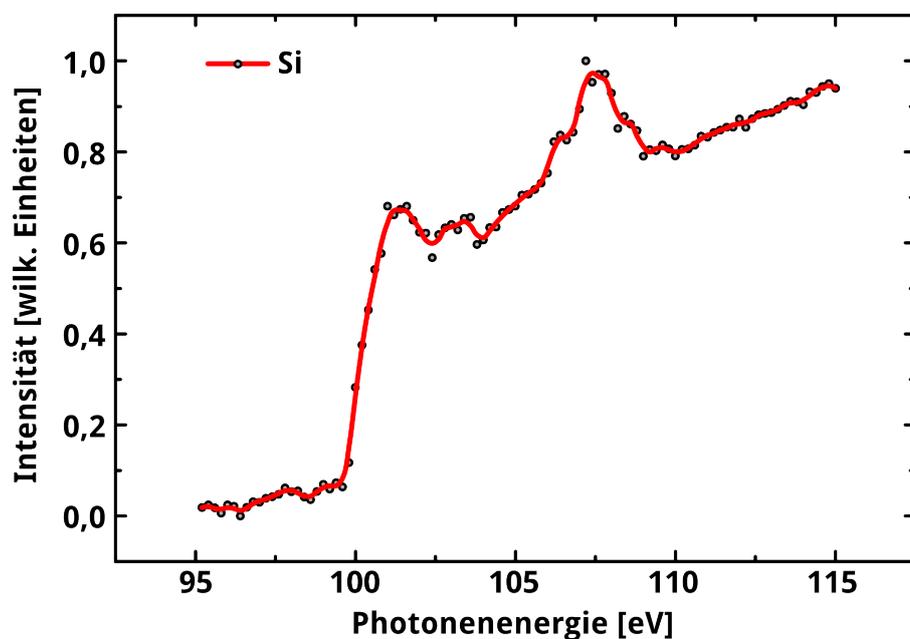


Abbildung B.2.: NEXAFS-Spektrum eines natürlich oxidierten Si-Wafers, aufgenommen mittels NEMeSUS.

erweitert werden. Für die Absorptionsmessungen ist kein Eingriff in die Proben-Detektor-Geometrie der XPS nötig. Auch muss die Probe nicht relativ zum Synchrotronstrahl bewegt werden. Somit kann die identische Probestelle mit beiden Techniken untersucht werden. Während XPS eine konstante Photonenenergie benötigt, findet bei der Absorptionsspektroskopie jedoch eine variierende Photonenenergie Verwendung. Daher ist eine zeitgleiche Untersuchung mit Absorptionsmessungen und XPS nicht möglich. Die Möglichkeit von sequenziellen Untersuchungen bleibt davon aber unberührt.

Da die Kammer für die Photoelektronenbeugung (X-ray photoelectron diffraction, XPD) [194] mit einem Fünf-Achsen-Manipulator ausgestattet ist, lässt sich ab sofort auch winkelaufgelöste Absorptionsspektroskopie durchführen [195]. Dies ist insbesondere für Messungen an Molekülstrukturen auf Festkörperoberflächen von Interesse [196], welche in Zukunft vermehrt geplant sind.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden auf Anfrage von Prof. Dr. Patrick Linder, Direktor der Abteilung Mikrobiologie und Molekulare Medizin, Universität Genf, für sein in Vorbereitung befindliches Buch *Le Monde Des Bactéries Illustré - Les microbes comme vous ne les avez jamais vus* zur Verfügung gestellt.

Artikel

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, S. Döring, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Structural investigation of the three-layer system MgO/Fe/GaAs(001) by means of photoelectron spectroscopy and diffraction*, Phys. Rev. B **88**, 045313 (2013).

K. Skaja, F. Schönbohm, D. Weier, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Thermal stability of an ultrathin hafnium oxide film on plasma nitrided Si(100)*, Surf. Sci. **66**, 104-109 (2013).

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO absorbate and the MgO/Fe on GaAs(001) surface by means of XPS and XPD*, NSTI-Nanontech 2013, **Vol. 1**, 105-108 (2013).

C. Keutner, A. von Bohlen, U. Berges, P. Espeter, C. M. Schneider und C. Westphal, *Photoemission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy of Magnetospirillum magnetotacticum's Magnetosome Chains*, Ana. Chem. **86**, 9590-9594 (2014).

C. Keutner, A. von Bohlen, U. Berges, P. Espeter, C. M. Schneider und C. Westphal, *Insight into bacteria: magnetosomes chains under photoemission electron and scanning electron microscopes*, NSTI-Nanontech 2015, **Vol. 1**, 1-4 (2015).

D. Krull, M. F. Tesch, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges, H.-Ch. Mertins und C. Westphal, *Structure and magnetic characterization of the interfacial regimes of MgO/Fe/GaAs(001)*, (Eingereicht).

C. Keutner, P. Roese, U. Berges, P. Espeter und C. Westphal, *Photoemission electron microscopy as a tool to study steel grains*, (Eingereicht).

F. Schönbohm, T. Lühr, D. Handschak, K. Skaja, D. Weier, U. Berges, S. Döring, C. Keutner und C. Westphal, *Thermal stability of ultra thin HfO₂ films and structure determination of HfSi₂ islands on Si(110)*, (In Vorbereitung).

F. Schönbohm, T. Lühr, D. Handschak, K. Skaja, D. Weier, U. Berges, S. Döring, C. Keutner und C. Westphal, *Thermal stability of a ZrO₂ /HfO₂ mixed layer on Si(100) investigated by XPS*, (In Vorbereitung).

Andere Veröffentlichungen

C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *PEEM at the TGM Beamline (BL 12) at DELTA: adaptation, modification, and first images*, Sixth DELTA User-meeting, 65 (2010).

C. Keutner, U. Berges, C. M. Schneider und C. Westphal, *Commissioning and first experiments at the PEEM at the TGM Beamline 12*, Seventh DELTA User-meeting, 82 (2011).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, S. Döring, D. Weier, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the three layer system MgO/Fe/GaAs(001)*, Seventh DELTA User-meeting, 84 (2011).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO absorbate and the MgO/Fe interface by means of XPS and XPD*, 8th DELTA User-meeting, 21 (2012).

K. Schennetten, S. Hannig, D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Development and testing of a SiPM-Camera for XPS using P47/ZnO:Ga-scintillator*, 8th DELTA User-meeting, 17 (2012).

C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Automatized PEEM measurements at the PGM Beamline 11 using the novel, self-developed S.P.A.M.M. Software*, 9th DELTA User Meeting & Annual Report 2013, 9 (2013).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *A photoelectron diffraction study of the Fe/GaAs(4x2)-interface*, 9th DELTA User Meeting & Annual Report 2013, 19 (2013).

P. Roesse, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Grain size determination of multiphase steels via photoemission electron microscopy*, 9th DELTA User Meeting & Annual Report 2013, 23 (2013).

C. Jansing, H. Wahab, M. C. Gilbert, D. Handschak, E. Diemke, C. Keutner, U. Berges, C. Westphal, H. Timmers und H.-C. Mertins, *Reflection Spectroscopy across the C 1s edges of Graphene/SiC*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 17 (2014).

H. Wahab, G. Xu, C. Jansing, M. Gilbert, M. Tesch, J. Jin, H.-C. Mertins, C. Keutner, U. Berges und H. Timmers, *Graphene oxide characterisation with reflection spectroscopy*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 19 (2014).

C. Keutner, U. Berges, D. Handschak, F. Schönbohm, P. Espeter, N. Wöhrle, R. Berendakova, V. Buck und C. Westphal, *PEEM and XPS experiments on B-doped diamonds*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 21 (2014).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Characterization of the interfacial regime of Fe/GAs(001) – Is a surface reconstruction really necessary for an epitaxial Fe growth?*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 25 (2014).

L. Madalaye, L. Brosda, C. Keutner, D. Handschak, U. Berges und C. Westphal, *Preparation of thin tetraphenylporphyrin layers in UHV and their characterization with XPS*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 29 (2014).

P. Espeter, C. Keutner, D. Handschak, U. Berges und C. Westphal, *XPS-study of mechanical exfoliated molybdenum disulphide*, 10th DELTA User Meeting & Annual Report 2014, 31 (2014).

Konferenzbeiträge

C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *PEEM at the TGM Beamline (BL 12) at DELTA*, Sixth DELTA User-meeting (2010).

S. Döring, C. Keutner, F. Schönbohm, U. Berges, D. E. Bürgler, M. Gorgoi, F. Schäfers, C. M. Schneider und C. Westphal, *Standing-wave exited hard x-ray photoemission studies on a Au-sandwiched Fe/MgO interface*, DPG-Frühjahrstagung, Dresden (2011).

C. Keutner, U. Berges, C. M. Schneider und C. Westphal, *Commissioning and first experiments at the PEEM at the TGM Beamline 12*, Seventh DELTA User-meeting (2011).

C. Keutner, U. Berges, C. M. Schneider und C. Westphal, *Photoemission electron microscopy of magnetotactic bacteria*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2012).

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, S. Döring, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the three layer system MgO/Fe/GaAs(001)*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2012).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO absorbate and the MgO/Fe interface by means of XPS and XPD*, 8th DELTA User-meeting (2012).

C. Keutner, U. Berges, P. Espeter, A. von Bohlen, D. J. Keavney, C. M. Schneider und C. Westphal, *Researches on iron containing bacteria with PEEM*, DPG-Frühjahrstagung, Regensburg (2013).

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO absorbate and the MgO/Fe on GaAs(001) surface by means of XPS and XPD*, DPG-Frühjahrstagung, Regensburg (2013).

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO absorbate and the MgO/Fe interface on a Fe/GaAs(001) substrate by means of XPS and XPD*, Nanotech 2013 – 16th Annual, Washington, DC (2013).

C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Automatized PEEM measurements at the PGM Beamline 11 using the novel, self-developed S.P.A.M.M. Software*, 9th DELTA User Meeting (2013).

D. Handschak, T. Lühr, F. Schönbohm, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Investigation of the MgO adsorbate and the MgO/Fe interface on a GaAs(001) surface by means of XPS and XPD*, 9th DELTA User Meeting (2013).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *A photoelectron diffraction study of the Fe/GaAs(4x2)-interface*, DPG-Frühjahrstagung, Dresden (2014).

F. Schönbohm, T. Lühr, D. Handschak, P. Espeter, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *XPD structure determination of HfSi₂ islands grown on Si(110) surfaces*, DPG-Frühjahrstagung, Dresden (2014).

C. Keutner, U. Berges, D. Handschak und C. Westphal, *New PEEM and NEXAFS/EXAFS experiments at the synchrotron source DELTA: Ready for user*, DPG-Frühjahrstagung, Dresden (2014).

L. Madalaye, L. Brosda, C. Keutner, D. Handschak, U. Berges und C. Westphal, *Preparation of thin tetraphenylporphyrin layers in UHV and their characterization with XPS*, 10th DELTA User Meeting (2014).

C. Keutner, U. Berges, D. Handschak, F. Schönbohm, P. Espeter, N. Wöhr, R. Berendakova, V. Buck und C. Westphal, *PEEM and XPS experiments on B-doped diamonds*, 10th DELTA User Meeting (2014).

P. Espeter, U. Berges, D. Handschak, C. Keutner, P. Roese und C. Westphal, *XPS study of mechanical exfoliated molybdenum disulphide*, 10th DELTA User Meeting (2014).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Characterization of the interfacial regime of Fe/GaAs(001) - Is a surface reconstruction really necessary for an epitaxial Fe growth?*, 10th DELTA User Meeting (2014).

C. Jansing, H.-Ch. Mertins, M. C. Gilbert, H. Wahab, H. Timmers, E. Diemke, L. Brosda, D. Handschak, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Substrate differentiation by reflection spectroscopy of graphene on silicon carbide*, 10th DELTA User Meeting (2014).

C. Keutner, A. von Bohlen, U. Berges, P. Espeter, C. M. Schneider und C. Westphal, *PEEM and SEM of Magnetospirillum magnetotacticum's Magnetosome Chains*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2015).

C. Hilscher, U. Berges, D. Handschak, C. Keutner, L. Brosda, P. Espeter und C. Westphal, *Preparation of Graphene using the confinement controlled sublimation method*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2015).

P. Espeter, D. Handschak, C. Keutner, P. Roese, U. Berges und C. Westphal, *XPS study of mechanical exfoliated molybdenum disulphide*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2015).

U. Berges, C. Keutner und C. Westphal, *Characterizing Measurements at the U55-Beamline at DELTA*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2015).

D. Handschak, F. Schönbohm, T. Lühr, C. Keutner, U. Berges und C. Westphal, *Is a surface reconstruction really necessary for an epitaxial Fe growth on a GaAs(001) surface?*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (2015).

C. Keutner, A. von Bohlen, U. Berges, P. Espeter, C. M. Schneider und C. Westphal, *Insight into bacteria: magnetosomes chains under photoemission electron and scanning electron microscopes*, Nanotech 2015 – 18th Annual, Washington, DC (2015).

Danksagung

Mein herzlichster Dank gebührt an dieser Stelle all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Westphal bedanken, der mir die Anfertigung dieser Dissertation in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Er hatte immer ein offenes Ohr und Zeit für hilfreiche Diskussionen und Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Rhode bedanken, der sich die Zeit genommen hat, als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Bei Dr. Ulf Berges möchte ich mich dafür bedanken, dass er sein mannigfaltiges Wissen rundum den Betrieb von Strahllinien und andere technische Dinge mit mir geteilt hat. Ohne seine Ratschläge und den ein oder anderen Kniff, den er mir gezeigt hat, wäre die praktische Umsetzung der Experimente so nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Alex von Bohlen vom Dortmunder ISAS. Dank ihm war es möglich die Bakterien auch unter dem Raster-Elektronenmikroskop zu studieren. Zudem hat er mich mit seinem Sinn für die Ästhetik dieser Bilder angesteckt.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit der letzten Jahre. Insbesondere sind dies Sven Döring, Ulf Berges, Frank Schönbohm, Dominique Krull, Patrick Mehring, Tobias Lühr, Lothar Brosda, Philipp Espeter und Peter Roesse. Nicht nur standen sie fachlichen Diskussionen immer aufgeschlossen gegenüber, auch wären die langen Messzeiten ohne sie überhaupt nicht möglich gewesen. Aber auch abseits der Wissenschaft haben sie für eine spitzen Atmosphäre gesorgt und die ein oder andere Konferenzen deutlich angenehmer gemacht.

Den Kollegen vom Zentrum für Synchrotronstrahlung und der Advanced Photon Source danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ohne die vielen Fachleute und Helfer wären Experimente an solchen Großgeräten nicht durchführbar.

Für das unkomplizierte Fertigen so mancher Komponenten bedanke ich mich bei den mechanischen und elektronischen Werkstätten, sowohl bei DELTA als auch des Fachbereichs Physik, sowie beim Konstruktionsbüro des Fachbereichs Physik.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei einigen Menschen abseits der Forschungslandschaft bedanken.

Insbesondere und zuallererst gilt ein großer Danke meinen Eltern. Sie haben mich immer auf meinem Lebensweg unterstützt. Auch in manch schwieriger Phase meiner Doktorandenzeit standen sie zu mir und haben manche der damit verbundenen Launen erduldet.

Meinen Freunden möchte ich für den Freizeitausgleich zum Büroalltag danken. Sie haben mich stets daran erinnern, dass es abseits der Arbeit auch durchaus noch ein anderes Leben gibt.