

HEINZ-BETHGE-STIFTUNG FÜR ANGEWANDTE ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Schüler-Begleitheft zur Licht- und Elektronenmikroskopie

Mit der Mikroskopie zu vertieften Einblicken in die Mikrowelt von Natur und Technik



Das Schülerlabor "Elektronenmikroskopie"

im Saline-Technikum Halle (Saale) möchte Jugendlichen unterstützend zum Unterricht physikalische Grundkenntnisse auch in praktischer Anwendung vermitteln. Damit wird Lernen zum Erlebnis und das Verständnis theoretischer Kenntnisse leichter gemacht.

Das Schülerlabor ist eine gemeinsame Gründung des Fraunhofer-Institutes für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS), der Stadt Halle, des Saline-Technikums und mehrerer Stifterfirmen der Heinz-Bethge-Stiftung für angewandte Elektronenmikroskopie mit Unterstützung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Dieses Heft soll die Kurse im Schülerlabor begleiten und helfen, Gelerntes in Erinnerung zu behalten und zu vertiefen.

Einführung

Was ist Mikroskopie?

Mikroskopie ist allgemein die Technik zur Erzeugung der Abbildung von Strukturen, die zu klein sind, um direkt mit dem menschlichen Auge wahrgenommen zu werden.

Der Anfang der Lichtmikroskopie liegt bereits im 17. Jahrhundert. Die Entwicklung der Elektronenmikroskopie begann um 1930.

Mikroskopische Methoden, angefangen von der Lichtmikroskopie bis zur Elektronenmikroskopie, haben in fast allen Bereichen des menschlichen Lebens neue und oft epocheprägende Erkenntnisse ermöglicht. Auch in Zukunft werden vor allem die elektronenmikroskopischen Verfahren auf zahlreichen Gebieten unentbehrlich sein. Sie unterstützen beispielsweise die Entwicklung neuer Werkstoffe für die Technik, neuer Medikamente und Wirkstoffe für die Medizin oder dienen einem besseren Verständnis der Struktur und Wirkung von Bakterien.

Leistungsfähigkeit optischer Systeme

Schema: Auflösungen und Vergrößerungen von Mikroskopen



Vergrößerung

Die verschiedenen Mikroskoptypen decken dabei den Größenbereich vom normalen Sehvermögen des menschlichen Auges bis zu Strukturen kleiner als ein Atom ab. Der Vergrößerungsbereich liegt also zwischen 1fach bis hin zu mehreren millionenfach.



Optische Grundlagen

Linsen

Ein Mikroskop ist ein optisches Instrument, mit dem sehr kleine Dinge, die mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden können, untersuchbar werden (griech.: mikros = klein, skopein = betrachten). Hierfür ist das Zusammenspiel des Lichtes mit Linsen und dem Auge wichtig. Beim Durchgang eines Lichtstrahls durch die Grenzfläche zu einem anderen Medium wird dieser gebrochen.



Brechung des Lichts: Beim Übergang vom optisch dünnerem Medium (Luft, Brechungsindex n₁) zum Einfallslot hin, vom optisch dichterem Medium (Brechungsindex n₂) zum dünneren vom Einfallslot weg

Das Brechungsgesetz ist die Grundlage für alle optischen Instrumente.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_1}{n_2}$$

Ein Mikroskop besteht aus einer Kombination von Sammel- und Zerstreuungslinsen.

Sammellinsen (Konvexlinsen) vereinigen parallele Strahlen in einem Brennpunkt. Durch Zerstreuungslinsen (Konkavlinsen) werden parallele Strahlen zerstreut.

Eine wichtige Kenngröße ist die Brennweite f (in der Augenoptik wird anstelle der Brennweite f die Brechkraft in Dioptrien verwendet = Kehrwert der Brennweite 1/f [in Metern] – z. B. hat eine Linse mit 10 cm Brennweite eine Stärke von 1/0,1 m = 10 Dioptrien). Mit einer **Sammellinse** kann von einem Gegenstand ein verkleinertes, reelles Bild auf einem Schirm aufgefangen werden, sofern der Gegenstand außerhalb der doppelten Brennweite liegt. Zwischen einfacher und doppelter Brennweite wird der Gegenstand vergrößert abgebildet. Befindet sich der Gegenstand innerhalb der einfachen Brennweite ist das Bild vergrößert, aufrecht, aber virtuell (hier wirkt die Sammellinse als Lupe, Vergrößerungsglas).

Die Augenlinse wird benötigt, um Strahlen zu vereinigen und ein Bild zu erkennen.



Bildentstehung im "unbewaffneten" Auge und mit einer einfachen Sammellinse (Lupe)

Das zusammengesetzte Mikroskop

besteht im einfachsten Fall aus zwei auf einer gemeinsamen optischen Achse angeordneten Sammellinsen. Das Objektiv (Sammellinse, dem Objekt zugewandt) erzeugt ein reelles und vergrößertes Bild. Durch das Okular (ebenfalls Sammellinse) wird dieses Bild wie ein reeller Gegenstand mit einer Lupe nochmals vergrößert betrachtet. Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops V ist das Produkt aus dem Abbildungsmaßstab des Objektivs V_{ob} und der Lupenvergrößerung des Okulars V_{ok}.

 $V = V_{Ob} \cdot V_{Ok}$



Die Auflösung oder die Auflösungsgrenze d in der Mikroskopie ist der Abstand zweier gerade noch getrennt wahrnehmbarer Punkte. Er wird durch die halbe Wellenlänge des Lichtes begrenzt (*Ernst Abbé 1840-1905*):

d = λ / 2n sin α

Wellenlänge des Lichtes λ = 0,4–0,8 µm (400-800 nm), α ist der Öffnungswinkel des Objektivs, n.sin α ist die sog. Numerische Apertur (üblicherweise ~ 1), d. h. die Auflösungsgrenze ist d ~ 0,2 µm (= 200 nm).

Mit der Verbesserung der Mikroskope (hauptsächlich durch Abbé und Carl Zeiss in Jena) hat deren Auflösung bis Ende des 19. Jahrhunderts diese Grenze erreicht.

Während beim Transmissions-Lichtmikroskop das zu untersuchende Objekt durchstrahlt wird und daher dünn und transparent sein muß, können mit dem Auflichtmikroskop (auch Stereomikroskop) auch dickere, kompakte Objekte hinsichtlich der Oberflächenstruktur untersucht werden.

Der Kontrast ergibt sich aus dem Intensitäts- oder Helligkeitsverhältnis zwischen den Objektdetails. Er entsteht im Transmissions-Lichtmikroskop dadurch, dass Objektstellen mit größerer Dicke oder Dichte mehr Licht absorbieren oder streuen als dünnere, leichtere Stellen und daher im Bild dunkler erscheinen. Sind die natürlichen Dicken- oder Dichteunterschiede zu gering, kann der Kontrast durch verschiedene chemische und physikalische Verfahren verbessert werden (Färben, Ätzen, im Polarisationskontrast, Phasenkontrast oder im Fluoreszenzmikroskop). Im Auflichtmikroskop bewirkt das unterschiedliche Reflexionsvermögen von Objektstellen die Sichtbarkeit.

Linsenfehler

Alle Linsen haben grundsätzlich Abbildungsfehler, die die Bildqualität verschlechtern. Von besonderer Bedeutung sind der Öffnungsfehler (sphärische Aberration) und die Dispersion (chromatische Aberration).



Sphärische Aberration

Chromatische Aberration

Links: **Sphärische Aberration (Öffnungsfehler)** in den äußeren Zonen einer Sammellinse werden die Lichtstrahlen stärker gebrochen als in den achsennahen und treffen sich nicht mehr in einem Brennpunkt

Rechts: **Chromatische Aberration (Farbfehler)** weißes Licht wird in einer Linse nicht nur gebrochen, sondern auch in die verschiedenen Farben zerlegt; kurzwellige Anteile (violett) werden stärker abgelenkt als die langwelligen (rot)

In den Mikroskopen wird durch Linsenkombinationen (Kombination von Sammel- und Zerstreuungslinsen aus verschiedenen Glassorten) der Einfluß dieser Fehler reduziert.

Das Elektronenmikroskop

Grundlagen

Die Auflösung eines Mikroskops wird hauptsächlich durch die Wellenlänge der abbildenden Strahlung begrenzt (s. Gleichung auf S. 7). Soll das Auflösungsvermögen deutlich gesteigert werden, so muss an Stelle von sichtbarem Licht (mit λ = 400 – 800 nm) eine Strahlung mit wesentlich kürzerer Wellenlänge verwendet werden. Die Grundidee ist, Elektronenstrahlen mit einer deutlich kleineren Wellenlänge einzusetzen.

Entsprechend der Vorstellung des Dualismus von Welle und Teilchen (de Broglie 1924, Nobelpreis 1929) können Elektronen als Welle mit einer Wellenlänge λ_{e} aufgefaßt werden, die umso kleiner ist, je größer die Geschwindigkeit v der Elektronen ist:

$\lambda_e = h/m_e v$

(h = Plancksches Wirkungsquantum, m = Elektronenmasse)

Elektronen können einfach durch thermische Emission aus einem durch Stromdurchfluss erhitzten metallischen Draht erzeugt werden (wie es auch in einer normalen Glühbirne erfolgt).

Eine Vergrößerung der Geschwindigkeit der Elektronen auf höhere Geschwindigkeit (und damit kleinere Wellenlängen) erfolgt durch eine zusätzliche positiv geladene Anode, die die negativ geladenen Elektronen anzieht und beschleunigt.



In einer Glühbirne werden durch Erhitzen der Drahtwendel neben Licht und Wärme auch Elektronen emittiert.



Erzeugung von Elektronenstrahlen durch thermische Emission und Beschleunigung in einem elektrischen Feld zwischen Glühwendel und Anode

Die Ablenkung von Elektronenstrahlen ist nicht durch Glaslinsen möglich wie bei den Lichtstrahlen, sondern nur durch elektrische und magnetische Felder, wie in einer Elektronenstrahlröhre (Braunsche Röhre, alte Fernsehröhre). Da Elektronen an Luft stark gebremst werden, muß sich die gesamte Anordnung in einem Hochvakuum befinden.



Erzeugung und Ablenkung von Elektronenstrahlen

Die Geschwindigkeit v der Elektronen wächst mit der Beschleunigungsspannung U

 $m/2 \cdot v^2 = e \cdot U$ (Elektron als Teilchen)

und entsprechend der Betrachtung der Elektronen als Welle reduziert sich damit die Wellenlänge $\lambda_{_{\rm P}}$ (siehe Gleichung oben).

Bei Beschleunigung der Elektronen mit 100 kV beträgt die Wellenlänge 0,0037 nm, ist also um einen Faktor 10⁵ kleiner als die Wellenlänge sichtbaren Lichtes. Durch verschiedene Linsenfehler (speziell sphärische und chromatische Aberration) wird die theoretisch mögliche Verbesserung um einen Faktor 10⁵ aber nicht erreicht – sie ist aber immerhin noch um einen Faktor 10³ – 10⁴ besser als die der Lichtmikroskopie.

Die erreichbare Auflösung liegt im Größenbereich von 0,1 nm und bei Höchstauflösungsmikroskopen heute bei maximal 0,05 nm. Bessere Werte werden mit den Techniken der Raster-Tunnel-(bzw. Raster-Kraft-) Mikroskopie erhalten.



Historie der Verbesserung der Auflösung von Licht- und Elektronenmikroskopen

Arten von Mikroskopen

Die Elektronenmikroskopie existiert in einer großen Breite mit verschiedenen Hauptrichtungen. Diese Richtungen können ganz allgemein danach klassifiziert werden, ob eine Abbildung durch eine flächige Bestrahlung wie mit einer "Lampe" oder durch punktuelles Abtasten der Oberfläche wie mit einem "Finger" oder einer "Nadel" erreicht wird.



Typen der Elektronenmikroskopie (flächig, punktuell ohne und mit direktem Kontakt)

Typ 1 – Transmission: Bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) durchdringt ein aus einer Elektronenquelle emittierter Elektronenstrahl die (dünne) Probe – analog zur herkömmlichen Lichtmikroskopie.

Typ 2 – Reflexion bzw. Emission: Entweder wird ein stationärer Elektronenstrahl von der (kompakten) Probe reflektiert (Elektronen-Spiegelmikroskopie) oder aus der Probe werden durch Bestrahlung (mit Elektronen, Ionen oder ultraviolettem Licht – durch hv angedeutet) Elektronen zur Emission angeregt (Emissions-Elektronenmikroskopie, PEEM)

Typ 3 – Rasterstrahl: Ein fokussierter Elektronenstrahl wird über die Probe gescannt und erzeugt Sekundär- und Rückstreu-Elektronen. Hierbei wird das Bild Zeile für Zeile zusammengesetzt (Raster-Elektronenmikroskopie, REM)

Typ 4 – Rasterstrahl in Transmission: Der fokussierte rasternde Strahl durchdringt eine (dünne) Probe (Raster-Transmissions-Elektronenmikroskopie)

Typ 5 – rasternde Spitze: Eine mechanische Spitze wird über die Probe gescannt und tritt mit dieser aufgrund verschiedener physikalischer Eigenschaften in Wechselwirkung (Raster-Tunnelmikroskopie, Raster-Sondenmikroskopie).

Im folgenden werden nur die Raster-Elektronenmikroskopie und die Transmisssion-Elektronenmikroskopie betrachtet. Generell werden mit der Elektronenmikroskopie nur monochrome Bilder erhalten, farbige Darstellungen sind nachkoloriert.

Vor den mikroskopischen Untersuchungen sind Probenvorbehandlungen erforderlich.

Probenpräparationen

Die verschiedenen mikroskopischen Techniken erlauben Strukturaufklärungen bis in den subatomaren Größenbereich. Zur Ausnutzung dieser Möglichleit sind oft spezielle Probenvorbereitungen oder Präparationen erforderlich, die mitunter einen beträchtlichen Aufwand erfordern. Daher gilt in der Mikroskopie der Satz: "Gut präpariert ist halb mikroskopiert".



Schematische Darstellung von Mikroskopiearten zur Untersuchung der Oberflächen und des Inneren von Materialien

Das Schema illustriert, mit welchen Techniken Untersuchungen von Oberflächen und womit Analysen aus dem Inneren von Materialien durchgeführt werden können. Strukturen auf Oberflächen können durch spezielle Techniken verstärkt werden und dann auch Aussagen über die Materialmorphologie erlauben – diese können mit der Raster-Elekt-

ronenmikroskopie (REM, Scanning Electron Microscopy, SEM) und der Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy) direkt analysiert werden. Für Strukturen im Inneren werden ultradünne "Probenscheibchen" aus der Probe geschnitten, wofür es je nach Material verschiedene Verfahren gibt, wie zum Beispiel die Mikrotomie oder Ultramikrotomie (Ultramicrotomy) oder die Abdrucktechnik (Replica-Technique). Die Untersuchung erfolgt mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (Transmission Electron Microscopy) oder auch Rasterkraftmikroskopie.

Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Im Raster-Elektronenmikroskop wird das Bild nicht durch Linsen als Ganzes erzeugt, sondern wie in den alten Fernseh-Bildröhren nacheinander Punkt für Punkt und Zeile für Zeile zusammengesetzt (abgerastert).

Die Elektronenkanone erzeugt einen Elektronenstrahl, der im Hochvakuum durch die nachfolgenden elektromagnetischen Linsen als sehr kleiner Punkt auf die Probenoberfläche fokussiert wird. Mittels Ablenkspulen wird dieser Elektronenstrahl Zeile für Zeile über einen ausgewählten Probenbereich geführt. Dabei werden Elektronen aus der Probe emittiert, in einem Detektor aufgefangen und verstärkt. Synchron wird ein Elektronenstrahl in der Bildröhre der Auswerteeinheit des REM bewegt. Jeder auf der Bildröhre sichtbare Bildpunkt entspricht einem exakt definierten Punkt auf der Probenoberfläche. Je mehr Elektronen auf der Probe freigesetzt werden, umso heller ist der Punkt auf der Bildröhre. Die Vergrößerung lässt sich einfach durch das Verhältnis der Bildschirmgröße (Größe des Bildes) und der Größe des durch den Elektronenstrahl abgerasterten Probenbereiches einstellen (z. B. 10 cm Bildschirmgröße zu 0,1 mm Probengröße gibt eine Vergrößerung von 1 000 : 1).



Schematische Darstellung des Aufbaus eines REM



Erzeugung von meßbaren Sekundärprodukten im Wechselwirkungsvolumen (mit der Form einer "Anregungsbirne") beim Auftreffen/Eindringen des Primärelektronenstrahls (PE) auf die Probenoberfläche

Beim Auftreffen des Primärelektronenstrahls auf die Probe werden zahlreiche Sekundärprozesse angeregt, die vielfältige Informationen enthalten und für zahlreiche Untersuchungen genutzt werden können. Zur Vereinfachung sollen nur die Sekundärelektronen (SE) betrachtet werden. Deren Intensität hängt vom Neigungswinkel der jeweiligen Probenstelle zum einfallenden Primärelektronenstrahl ab und bewirkt so einen Kontrast: je größer der Winkel, um so mehr Sekundärelektronen entstehen und lassen Kanten hell erscheinen (Kanteneffekt, Topographiekontrast).



Kanteneffekt (Topographiekontrast) bei der Sekunärelektronenabbildung im REM; a) Schematische Darstellung

b) Kontrastreiche Abbildung von Bruchkanten in einem Kunststoff (Polykarbonat)

Neben der höheren Vergrößerung des Raster-Elektronenmikroskops ist ein weiterer deutlicher Vorteil, dass Objektdetails auch scharf und kontrastreich abgebildet werden, die sich in etwas unterschiedlicher Höhe befinden (die im Lichtmikroskop nicht gleichzeitig fukussiert werden können). Somit ist die Schärfentiefe ca. 100fach größer als im Lichtmikroskop.

Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Transmissions-Elektronenmikroskope sind im Prizip analog zu den Lichtmikroskopen aufgebaut und bestehen aus hintereinander geschalteten vergrößernden Linsen.



Schematische Darstellung des Strahlenganges in einem (Transmissions-) Lichtmikroskop und einem Transmissions-Elektronenmikroskop

Die aus der Kathode austretenden Elektronen werden zur Anode hin beschleunigt und außerdem durch den Wehneltzylinder am Ort der Anode gebündelt. Der divergente Elektronenstrahl wird durch die nachfolgenden elektromagnetischen Linsen so fokussiert, dass er die Probe als nahezu parallelen Strahl mit sehr geringer Ausdehnung durchstrahlt. Da sich Elektronen nur im luftleeren Raum ausbreiten können, herrscht in der Mikroskopsäule Hochvakuum. Während im Lichtmikroskop das



Bild direkt mit dem Auge durch das Okular betrachtet werden kann, müssen die Elektronenstrahlen auf einem Fluoreszenzschirm sichtbar gemacht werden.

Voraussetzung sind dünne, durchstrahlbare Proben, deren maximale Dicke d als Richtwert für leichte Materialien (organische Stoffe und Polymere) in erster Näherung den zweifachen Wert der angelegten Beschleunigungsspannung U nicht überschreiten soll, d. h. bei U = 200 kV eine maximale Dicke von 50 bis 250 nm.

Ehemaliges 100 kV Hochauflösungsmikroskop (JEOL 100 C), entlang der Mittelachse aufgeschnitten, lässt gut den Innenaufbau erkennen (im Schülerlabor aufgestellt).

Der Kontrast zwischen Strukturdetails ergibt sich bei amorphen Materialien ähnlich wie im Lichtmikroskop durch unterschiedlich starke Streuung oder Absorption der Strahlung (hier der Elektronen) und wird daher als Streuabsorptionskontrast oder Massen-Dicken-Kontrast bezeichnet. Er ist im Bild einmal schematisch und in einem Modellobjekt illustriert.



Streu-Absorptionskontrast (Massen- Dicken-Kontrast) im TEM Links Schema: Dünne (d₁) und leichte Materialien (Dichte ρ_1) streuen Elektronen weniger als dicke (d₂) und schwerere Objektstellen (Dichte ρ_2) und erscheinen im Bild heller. Rechts Modellobjekt: Dicke PS Teilchen und kleinere aber schwerere Goldpartikel streuen Elektronen stärker als der Trägerfilm aus Kohlenstoff und erscheinen im Bild dunkler. Moderne Transmissions-Elektronenmikroskope ermöglichen Strukturvisualisierungen auch durch vielfältige weitere Abbildungsarten und erlauben so die Erforschung von Mikrostrukturen bis "ins kleinste Atom".

Schülerlabor

im Saline-Technikum Halle (Saale) – außerschulischer Lernort für Elektronenmikroskopie



Bild 1: Transmissions-Elektronenmikroskop (aufgeschnitten) Bild 2: Raster-Elektronenmikroskop Bild 3: Blick in das Innere mit Licht- und Elektronenmikroskopen

Kontakt

Heinz-Bethge-Stiftung für angewandte Elektronenmikroskopie Halle (Saale) www.bethge-stiftung.de

Ansprechpartner: Prof. Dr. Goerg H. Michler (goerg.michler@physik.uni-halle.de) Dr. Stephan Grosser (stephan.grosser@imws.fraunhofer.de)

V.i.S.d.P.: Prof. Dr. Goerg H. Michler Bilder/Schemata: Prof. Dr. Goerg H. Michler, Heinz-Bethge-Stiftung; lichtmikroskop.net; pixabay; wikipedia

τ	ür	ħ.	int	> 0	f-f	en	en	Fr	aq	en								
T	ur		icc	ρn	CIN	er	tes	. a	m	Ro	inc	e						
u	na	VV	199															
																 _		
																 _		
																 _		
																-	_	
																 _		
																 _		



Unterstützer

HEINZ-BETHGE-STIFTUNG FÜR ANGEWANDTE ELEKTRONENMIKROSKOPIE

