Leibniz Universität Hannover

Fakultät für Mathematik und Physik

Institut für Radioökologie und Strahlenschutz

Ortsaufgelöste Analyse von Radionuklid-getracerten Wurzelschnitten mittels Massenspektrometrie

Masterarbeit

Eingereicht von

Annika Klose

Matrikelnummer: 2932780

14.07.2020

Erstprüfer: Prof. Dr. Clemens Walther

Zweitprüfer: Prof. Dr. Georg Steinhauser

Betreuerin: Dr. Beate Riebe

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Ich versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt und alle wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommenen Aussagen als solche gekennzeichnet habe und dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

Hannover, den 14.07.2020

_____

Annika Klose

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. Clemens Walther bedanken für die Möglichkeit, meine Masterarbeit am Institut für Radioökologie und Strahlenschutz über die Methodenentwicklung zur Analyse von Pflanzenproben an der SIMS zu schreiben. Ebenso vielen Dank für die Anschaffung des Kryo-Mikrotoms, das sich als sehr nützlich erwiesen hat.

Bei Prof. Dr. Georg Steinhauser möchte ich mich dafür bedanken, dass er das Amt des Zweitprüfers übernommen hat.

Dr. Beate Riebe möchte ich für die umfangreiche Betreuung, die Aufzucht der Pflanzen und die Vermittlung von hilfreichen Kontakten danken.

Nicht zu vergessen meine Co-Betreuer Marcus Mandel und Manuel Raiwa, für ihre Anleitung, Unterstützung und Hilfe bei technischen Problemen.

Dann möchte ich noch Julia Stadler danken, die mich bei der Pflanzenaufzucht in den Hydro-Kulturen unterstützt hat und mit mir ihre Erfahrungen mit Europium geteilt hat.

Außerdem möchte ich mich bei den restlichen Trans-LARAs Annika Gust und Simon Pottgießer bedanken, denen ich alle Fragen stellen konnte, die mir einfielen.

Und Sandra Reinhard für die Hilfe bei den ICP-MS-Messungen und deren Auswertung, sowie Anica Weller für die Versuchsdurchführung an der Laserablation.

Dem Institut für Zellbiologie und Biophysik und dort insbesondere Dr. Frederike Ruhe für die Erlaubnis deren Mikrotom benutzen zu dürfen.

Und abschließend dem ganzen Institut für die freundliche Aufnahme und die nette Zeit zusammen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Botanische Grundlagen 3
2.1 Aufbau der Wurzel 4
2.2 Nährstoffaufnahme der Pflanze 6
3. Schnittherstellung 10
3.1 Handschnitt 10
3.2 Mikrotom 10
3.3 Kryo-Mikrotom 11
4. Massenspektrometrie 12
4.1 ICP-MS 12
4.2 Laserablation-ICP-MS 13
4.3 SIMS 14
4.3.1 Ionisation 15
4.3.2 Massenseparation 16
4.3.3 Detektion 17
4.3.4 GCIB 17
4.3.5 Pflanzen in der SIMS 17
5. Methoden 19
5.1 Probenvorbereitung 19
5.1.1 Tracer 19
5.1.2 Pflanzenaufzucht 20
5.1.3 Eingießen der Pflanzen 21
5.1.4 Einfrieren der Pflanze 25
5.2 Messtechnik 26
5.2.1 ICP-MS 26
5.2.2 Laserablation 28
5.2.3 SIMS 29
6. Ergebnisse und Vergleich 32
6.1 Qualität der Proben 32
6.1.1 Probe in Agar 32
6.1.2 Probe in PEG 33
6.1.3 Probe in Epoxidharz 34
6.1.4 Schnittdicke und Temperatur am Kryo-Mikrotom 35

6.2 Ergebnisse ICP-MS 48
6.3 Ergebnisse Laserablation 51
6.4 SIMS-Messung 53
6.4.1 Analyse der Spektren 53
6.4.2 Analyse der Ionenbilder 62
7. Diskussion 69
7.1 Diskussion der Schnittherstellung 69
7.2 Diskussion der Messergebnisse 70
7.2.1 ICP-MS 70
7.2.2 LA-ICP-MS 71
7.2.3 SIMS 72
8. Zusammenfassung und Ausblick 76
9.Literaturverzeichnis 79
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 81
11. Anhang 85
11.1 Zusammensetzung Hoagland 85
11.2 Ablaufprotokoll Kryo-Stage 85
11.3 Analyse mit ICP-MS 86

1. Einleitung

Durch die Nutzung der Kernenergie zur Stromerzeugung in Deutschland fielen bislang circa 8.380 Mg SM (Megagramm Schwermetall) an hochradioaktiven und circa 114.00 m^3 an sonstigen radioaktiven Abfällen an (BMU, 2015). Diese Abfälle müssen über eine Million Jahre in Endlagern deponiert werden. Bei der Auswahl des Standortes einer möglichen Endlagerstätte spielen daher verschiedene Faktoren eine große Rolle. Insbesondere die langlebigen Radionuklide stellen hohe Anforderungen an die Langzeitstabilität des Endlagers. Sollte wider Erwarten doch eine Freisetzung dieser Nuklide stattfinden, wenn zum Beispiel der Abfallbehälter aufgrund von Wasserzutritt korrodiert, so gelangen die Radionuklide in die Umwelt. Aus dem Nahfeld des Endlagers können die Radionuklide in das Fernfeld migrieren und gelangen dabei in die Wurzelzone. In diesem Fall ist es wichtig zu wissen, ob die Radionuklide von Nutzpflanzen aufgenommen werden und ob sie sich in den essbaren Teilen der Pflanze akkumulieren. Um das zu untersuchen, wurde das Projekt TransLARA vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Das Projekt TransLARA steht für die Untersuchung des „Transport- und Transferverhaltens langlebiger Radionuklide entlang der kausalen Kette Grundwasser-Boden-Oberfläche-Pflanze unter Berücksichtigung langfristiger klimatischer Veränderungen“. Im Projekt werden unter anderem Kartoffeln, Karotten, Erbsen und Weizen mit vier Radionukliden ^{99}Tc, ^{125}I, ^{243}Am und ^{238}Pu getracert und in vier verschiedenen Böden aufgezogen. Nach der Ernte werden die Transferfaktoren der Wurzeln, Blätter und Früchte bestimmt. Der Transferfaktor ist das Verhältnis zwischen der Aktivität in der Pflanze und der Aktivität des Bodens. Aufgrund der Relevanz dieser Thematik, auch in anderen Ländern, wurden schon viele ähnliche Experimente durchgeführt. So betrachtet Choi den Transfer von ^{99}Tc aus dem Boden in die Sojabohne (Choi, 2014), Mousny den Transfer von ^{99}Tc in Erbsen (Mousny, 1981), Weng den Transfer von Iod in Chinakohl (Weng, 2008) und Livens den Unterschied zwischen der Aufnahme von ^{239,240}Pu und ^{241}Am in Gräsern (Livens, 1994). Bei allen Arbeiten wurde festgestellt, dass die Konzentration der Radionuklide von den Blättern zur Frucht abnahm.

Da es bislang kaum Forschungsergebnisse zur räumlichen Verteilung von Radionukliden in Pflanzen gibt, soll im Rahmen dieser Arbeit ebendiese Verteilung des Tracers in Wurzelquerschnitten untersucht werden. Dafür wird zunächst eine Methode entwickelt, damit die Pflanzen mit dem Sekundärionenmassenspektrometer (SIMS) analysiert werden können. Für SIMS-Messungen ist es notwendig, dass sich die Probe nicht im Vakuum verändert und die Oberfläche glatt ist. Da die Wurzeln in direktem Kontakt mit dem Tracer stehen, wird in dieser Arbeit hauptsächlich mit diesen experimentiert. Um einen höheren Transfer in die Pflanze zu erhalten, werden diese im Gegensatz zu den Pflanzen des TransLARA-Projekts auch in Hydrokulturen aufgezogen. Als Radionuklid wird ^{243}Am beziehungsweise sein Homolog Europium (^{151}Eu und ^{153}Eu) verwendet und die Erbse ist die zu untersuchende Nutzpflanze. Werden die Orte der maximalen Akkumulation identifiziert und dem entsprechenden Zellgewebe zugeordnet, lassen sich daraus Rückschlüsse über den Transportweg in die Pflanze und durch die Pflanze ziehen.

Für andere Elemente wie Gadolinium und Yttrium wurde eine solche Analyse schon durchgeführt (Saatz, 2016). Gadolinium und Yttrium gehören genau wie Europium zu den Seltenen Erden und lassen sich auf Grund ihrer ähnlichen Eigenschaften, wie der Dreiwertigkeit, gut vergleichen. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass sich Europium in ähnlichen Geweben akkumuliert, und auch das Americium wird aufgrund der chemischen Vergleichbarkeit zum Europium dort erwartet.

Für die Analyse wird zum einen die Laserablations- und zum anderen die Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) verwendet. Bei der SIMS handelt es sich um ein Verfahren, dass die Probenoberfläche untersucht. Sie ist mit einem Flugzeit-Massenanalysator ausgestattet, wodurch im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Verfahren bei einer Messung ein größerer Massen-zu-Ladungsbereich detektiert werden kann und nicht nur die Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z-Verhältnisse) bestimmter, zuvor ausgewählter Elemente. Vor der Messung müssen die Proben speziell vorbereitet werden, da die Messung im Vakuum (in einem Bereich von 10^{-8} bis 10^{-10} mbar) stattfindet. Bei der Probenvorbereitung werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz ist die Methode der Einbettung in spezielle Einbettmedien wie Polyethylenglycol (PEG) oder Epoxidharzen, die bei Untersuchungen am Elektronenmikroskop eingesetzt werden (Finck, 1960), (Luft, 1961). Der zweite Ansatz stellt die Methode der Einbettung in ein Kryo-Medium und des Einfrierens in einem Kryo-Mikrotom dar. Vorteil dieser Methode ist, dass extrem dünne und glatte Schnitte möglich sind und das Zellgewebe der Wurzel intakt bleibt. Damit lassen sich die gemessenen Tracer-Ionen zweifelsfrei dem Gewebetyp zuordnen.

Die Arbeit ist in die vier Teile Theorie, Methoden, Ergebnisse und Diskussion unterteilt. Im Theorieteil werden der Aufbau der Wurzel und die Transportwege in der Pflanze sowie die ortsaufgelöste Massenspektrometrie vorgestellt. Danach folgt, im Methodenteil, ein Überblick über die Pflanzenaufzucht, den verwendeten Tracer und die Einbettungsmaterialien und –methoden. Die Ergebnisse gliedern sich in die Anfertigung der Dünnschnitte am Kryo-Mikrotom und die massenspektrometrischen Verfahren mit der Inductively Coupled Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS), Laserablations-ICP-MS und SIMS, wobei letztere im Vordergrund der Untersuchung steht. In der anschließenden Diskussion werden die Ergebnisse in den Zusammenhang mit anderen Arbeiten gestellt und bewertet.

2. Botanische Grundlagen

Die Entwicklung von Pflanzen verläuft in mehreren Stufen und dauert je nach Pflanzenart unterschiedlich lange, grundsätzlich sind die Stufen aber für alle Arten gleich. Einige Tage nach der Aussaat beginnt die Keimung der Sämlinge. Danach wachsen sie weiter, vergrößern und vermehren dabei ihre Blätter und gelangen in die vegetative Phase. Die Bildung von Blütentrieben (Sprossen) und –knospen beginnt, sobald durch Fotosynthese genügend Zucker zur Verfügung steht. Nach dem Erblühen werden die Blüten durch Insekten oder den Wind bestäubt und befruchtet. Einige Pflanzen wie Erbsen und Bohnen sind Selbstbefruchter, das heißt, sie benötigen keine Bestäuber. Erst danach kann der Fruchtkörper gebildet werden und reifen. Die Phasen können sich durchaus überschneiden und wiederholen (Krug, 2002).

Der Ertrag der Pflanze hängt von ihrem Entwicklungsverlauf ab, so ist zum Beispiel in der Auflaufphase die Konzentration von Wasser und Salz und die Temperatur entscheidend für eine große Anzahl an Pflanzen. Für das Wachstum des Sprosses sind einige Substanzen von großer Bedeutung: genügend Wasser, aber auch Kohlenstoff als Grundelement der Kohlenhydrate, und in geringerem Maße Eiweiße, Fette und Mineralien. Die Kohlenhydrate werden durch die Fotosynthese produziert und je nach Verwendungszweck und Bedarf in die Wurzeln oder in die Blätter transportiert, um diese zu vergrößern. Der restliche Teil wird für weitere Stoffwechselreaktionen wie zum Beispiel die Zellatmung verwendet. Je größer der Blattflächenindex, umso mehr Sonnenstrahlung wird absorbiert und desto größer ist die Stoffproduktionsleistung (Krug, 2002).

2.1 Aufbau der Wurzel

Die Wurzeln vereinnahmen ungefähr 10 % der gesamten Pflanzenmasse und werden durch den Spross mit Kohlenhydraten versorgt, welche zum Wachstum und zur Energieproduktion benötigt werden. Ein Teil der dünnen Wurzeln wird ständig neu gebildet und ersetzt altes Wurzelgeflecht. Die wichtigsten Aufgaben der Wurzeln sind die Verankerung im Boden, die Aufnahme, Weiterleitung und Speicherung von Wasser und Nährstoffen aus dem Boden und die erneute Bildung von Sprosstrieben zur Erhaltung und Vermehrung. Zu Beginn der Pflanzenentwicklung wird mehr Wurzelmasse gebildet, um Wasser und Nährstoffe zu speichern. Die Wurzeln beginnen abzusterben, wenn entweder die Samen oder die Früchte angelegt werden. Beginnt die Pflanze einen neuen Zyklus, so werden auch wieder neue Wurzeln gebildet. Das Wurzelwachstum ist stark von den Umweltbedingungen abhängig. So werden bei dichtem Boden weniger und dickere Wurzeln gebildet. Eine hohe Salzkonzentration hemmt das Wurzelwachstum. Das maximale Wachstum wird bei genügend Sonnenlicht, optimaler Temperatur, lockerem und wasser- und nährstoffreichem Boden erreicht. Dabei muss eine stetige Sauerstoffversorgung und eine geringe Konzentration von Kohlenstoffdioxid und Schadstoffen vorhanden sein. Junge Wurzeln haben eine bessere Aufnahmefähigkeit als ältere (Krug, 2002).

Die Wurzel dient der Wasser- und Nährstoffaufnahme der Pflanze. Um das möglichst effektiv zu tun, ist ihre Oberfläche durch viele Wurzelhaare vergrößert. Gleichzeitig ist sie von einem Schutzgewebe umgeben, das den Wasserverlust verringert. Die Wurzel dient der Pflanze auch als Verankerung im Boden und als Speicher für Reservestoffe, wie Saccerose, Stärke, etc.

Wenn eine Pflanze eine Pfahlwurzel mit kleineren Seitenwurzeln ausbildet, so nennt man dies eine allorrhize Bewurzelung, diese ist charakteristisch für dikotyle Pflanzen. Das Gegenteil ist die homorrhizen Bewurzelung, dort werden die Wurzeln seitlich angelegt und sind gleichrangig (Erbsen und Bohnen). Die Wurzelhaare werden an der Wurzelspitze ausgebildet und sind hauptsächlich für die Nährstoffaufnahme zuständig. Durch ihre hohe Anzahl ist die Oberfläche stark vergrößert, was die Aufnahme begünstigt. Durch die als Statolithen wirkenden Amylo-Plasten kann die Pflanze die Erdanziehung wahrnehmen und ihr Wurzelwachstum gezielt nach unten richten. Diese Eigenschaft wird als positiver Gravitropismus bezeichnet (Kück, 2014).

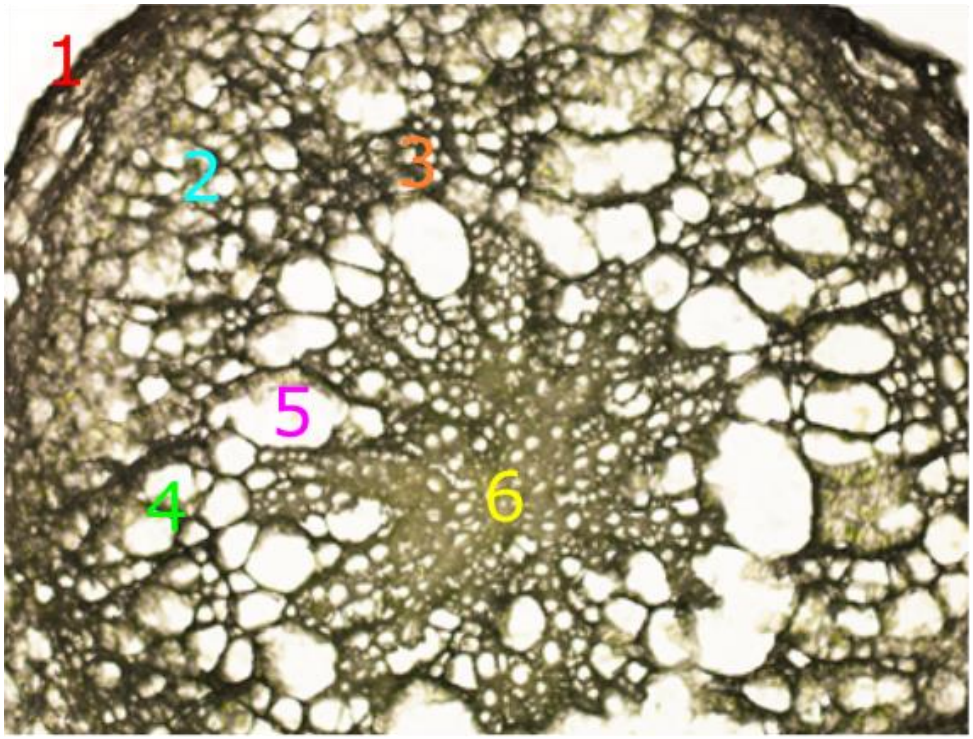

Abbildung 1: **Querschnitt einer Karottenwurzel mit Zuordnung der Gewebe 1** Rhizodermis, **2** Wurzelrinde, **3** Endodermis, **4** Xylem, **5** Phloem, **6** Parenchym

Die Wurzel einer Pflanze besteht aus verschiedenen Zelltypen, die unterschiedliche Funktionen haben (Abb. 1). Die Rhizodermis bildet die äußerste Membran der Wurzel. Durch sie müssen sämtliche Nährstoffe diffundieren. Am wichtigsten für die Aufnahme dieser Makro- und Mikronährstoffe sind die Wurzelhaare, die eine Oberflächenvergrößerung der Rhizodermis darstellen. Die aufgenommenen Nährstoffe werden durch die Wurzelrinde bis zur Endodermis transportiert. Diese bildet eine Grenzmembran zum Zentralzylinder, die nicht mehr für alle Nährstoffe passierbar ist. Dadurch können schädliche Stoffe (Schwermetalle, Bakterien) nicht ins Innere der Pflanze gelangen. Im Zentralzylinder (Parenchym) befinden sich die Leitungsbahnen Xylem und Phloem, die Wasser und Nährstoffe in die Blätter und Glukose vom Blatt in die Wurzel transportieren. Dabei besteht das Xylem aus abgestorbenen und verholzten Zellen und transportiert Wasser und anorganische Salze aufwärts. Das Phloem besteht aus sogenannten Siebröhren und transportiert organische Substanzen wie Glucose aus den Blättern in die Wurzeln (Kück, 2014).

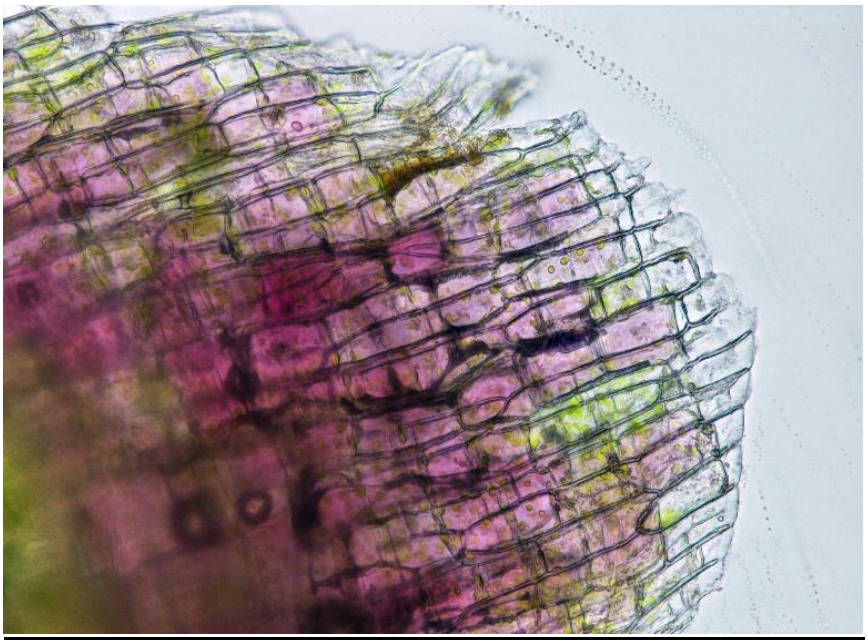

Abbildung 2: **Längsschnitt durch die Wurzelspitze der jungen Karottenwurzel.** Gut erkennbar sind die einzelnen Zellen mit ihren Organellen.

2.2 Nährstoffaufnahme der Pflanze

Es gibt viele Elemente, die für das Überleben der Pflanze notwendig sind. Kohlenstoff und Sauerstoff werden dabei größtenteils von den Blättern in Form von CO_2 und O_2 aufgenommen. Alle anderen Nährstoffe werden von den Wurzeln in Form von Ionen aufgenommen, zum Beispiel NO_3^-, K^+, Ca^{2+}, $H_2PO_4^-$ und viele mehr. Wasser wird über die Blätter und größtenteils über die Wurzeln aufgenommen (Weiler, 2008).

Der Stoffwechsel der Pflanze reguliert die Aufnahme und das Verhalten von Spurenelementen im Boden. Ihre Aufnahme hängt von mehreren Faktoren ab: Der chemischen Aktivität des Elements im Boden, den konkurrierenden Ionen, dem Redoxpotential und der Absorptionskapazität der Wurzel. Nach der Absorption werden die Ionen durch spezifische Proteine in die Zellen transportiert, verstoffwechselt und eingelagert. Ihr Verhalten ist damit analog zu dem Verhalten von Makro-Nährstoffen. Beim Verzehr der Pflanze gelangen die Spurenelemente in den Konsumenten (D. Cataldo, 1983).

Da Wurzeln nur gelöste chemische Spezies aufnehmen können, setzt die Bodenchemie die obere Grenze für die Nährstoff- und Spurenelementaufnahme. Die Konzentration und Speziation der Elemente in der Bodenlösung hängt von geochemischen und biologischen Faktoren ab. Es ist noch nicht genau verstanden, wie sich das komplexe dynamische Gleichgewicht an der Grenzschicht Boden/Wurzel auf die Aufnahme von Spurenelementen in die Wurzel auswirkt. Bekannt ist aber, dass die Pflanzen durch ihren Stoffwechsel die Form der Spurenelemente ändern, und sie in den Wurzeln, Blättern, Stielen und Früchten speichern können. Dabei kann es zu einer Aufkonzentration möglicher Giftstoffe in den Pflanzenzellen kommen. (D. Cataldo, 1983).

Der Boden um die Wurzel der Pflanze ist ein Drei-Phasen-Gemisch bestehend aus Bodenwasser, Lufteinschlüssen und einer festen Bodenphase (Abb. 3a). Die Bodenpartikel bestehen zumeist aus Tonmineralien oder Humus. An ihnen sind circa 90 % aller Anionen oder Kationen aus dem Bodenwasser adsorbiert. Nur ein sehr geringer Teil (circa 2 %) der von der Pflanze benötigten Ionen sind im Bodenwasser gelöst und verfügbar. Deshalb besteht die Ionenaufnahme aus drei Schritten (Abb. 3b). Erstens Austauschdesorbtion an den Bodenpartikeln, zweitens Diffusion der Ionen in den Apoplasten und drittens Ionenaufnahme in den Symplasten der Wurzelzellen (Weiler, 2008). Der Apoplast verfügt über ein großes Sorptions- und Reduktionsvermögen. In hydroponischen Studien wurde gezeigt, dass Elemente wie Cadmium, Nickel, Chrom und Plutonium irreversibel in der Zellwandfraktion gebunden werden, wenn die Konzentration 10 µM übersteigt (D. Cataldo, 1983).

Die Pflanzenzelle besteht grob aus dem Apoplasten, welcher den extrazellulären Raum und die Zellwand darstellt und dem Symplasten, welcher den intrazellulären Raum bildet, genauer das Cytoplasma (Abb. 3c). Das Plasmalemma ist die Membran, die beide voneinander trennt und besteht aus einer Lipiddoppelschicht. Diese ist nur für Wasser, Kohlenstoffdioxid und Stickstoff permeable, andere Ionen oder Makromoleküle gelangen durch zum Teil spezifische Proteine in das Cytoplasma hinein oder hinaus. Es gibt Porenproteine, Kanalproteine, Translokatoren und Pumpproteine. Im Cytoplasma befinden sich Zellkern, Zellorganellen und die Vakuole, ein Stoffspeicher, der mit Wasser gefüllt ist und weitere Moleküle aufnehmen kann.

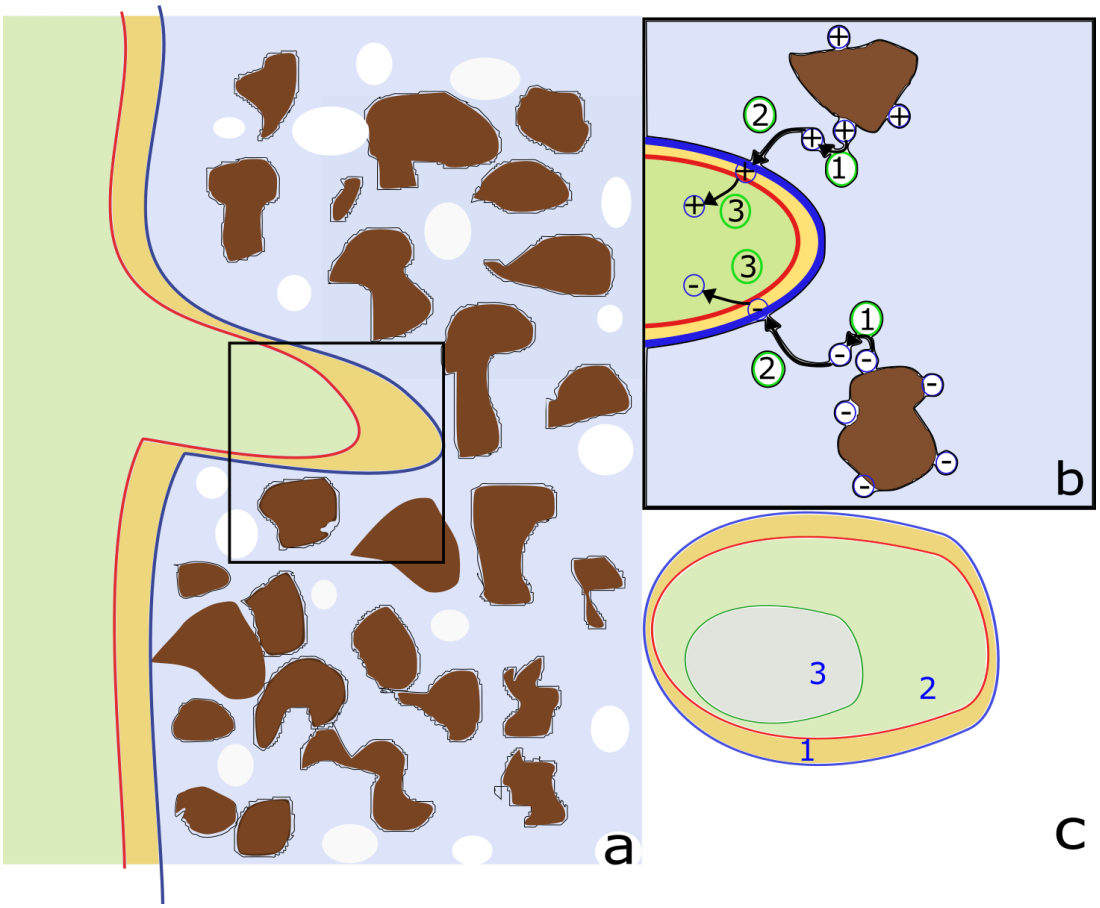

Abbildung 3: **Nährstoffaufnahme durch die Wurzel** in (a) ist ein Ausschnitt aus der Rhizosphäre gezeigt, das Wurzelhaar liegt zwischen den drei Phasen des Bodengemischs, in braun die Bodenpartikel, in weiß die Bodenluft und in blau das Bodenwasser. (b) zeigt eine Vergrößerung des Wurzelhaars mit den Mechanismen der Mobilisierung und Ionenaufnahme (schwarze Zahlen): ① Ionenaustauschdesorption ② Diffusion in den Apoplasten ③ Aufnahme in den Symplasten. In (c) ist die Wurzelzelle schematisch dargestellt. 1 ist die Zellwand, 2 das Cytoplasma getrennt durch das Plasmalemma (rot) und 3 die Vakuole getrennt durch den Tonoplast (grün).

Die Nährstoffaufnahme der Wurzel erfolgt in drei Schritten.

1. Schritt: Um die an Bodenkolloide gebundenen Ionen zu ersetzen, gibt die Pflanze Protonen und Bicarbonat (HCO_3^-) in das Bodenwasser ab. Diese Ionen entstehen bei der Zellatmung der Wurzel:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Dabei ersetzt das Proton die Kationen und das Bicarbonat die Anionen.

Aber auch durch die Dissoziation von organischen Säuren werden Protonen frei:

$$R\text{-}COOH \rightleftharpoons H^+ + R\text{-}COO^-$$

Zudem werden durch H^+-ATPasen (Kanalproteine) Protonen aus der Zelle in das Bodenwasser transportiert.

2. Schritt: Die sich in der Bodenlösung befindenden Ionen gelangen durch Diffusion durch die Rhizodermis in den Apoplasten. Dieser Transportweg ist nicht selektiv, sodass die Ionenverteilung von Bodenwasser und Apoplasten nahezu identisch ist. Das bedeutet aber auch, dass Schwermetalle und andere toxische Substanzen zusätzlich zu

den Nährstoffen mit aufgenommen werden. Sie alle können bis zur Endodermis gelangen. Da sie sich noch im Apoplasten befinden, werden sie dort an den Casparyschen Streifen an der Diffusion in den Zentralzylinder und damit in den Rest der Pflanze gehindert.

3.Schritt: Die sich im Apoplasten befindenden Ionen werden selektiv und zum Teil auch aktiv über Ionenkanäle und Translokatoren in den Symplasten transportiert. Die Aufnahme findet gegen den Konzentrationsgradienten und im Austausch gegen Protonen statt, sodass es zu einer Anreicherung in der Zelle kommt. Diese Prozesse sind aber nicht vollständig selektiv, sodass zum Beispiel durch die K^+-Kanäle auch Rb^+ gelangt. Einige Schwermetalle gelangen so trotzdem in den Symplasten und lösen dort die Entstehung von Phytochelatin (Abb. 4) aus, welches sich mit dem Schwermetall zum Komplex verbindet und in der Vakuole eingelagert wird. Die Ionen im Symplasten können durch die Endodermis diffundieren und gelangen damit in den Zentralzylinder, wo sie mit dem Wasserstrom im Xylem nach oben in die restliche Pflanze transportiert werden (Weiler, 2008).

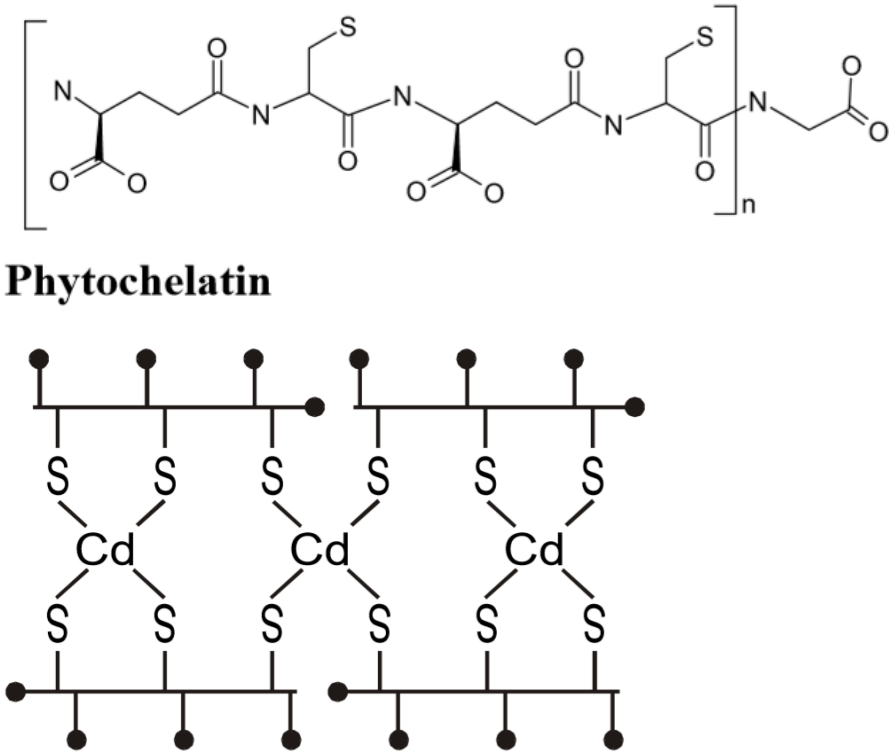

Abbildung 4: **Phytochelatin-Komplex** (PC, oben) und die Bindung von Cadmium an die Schwefelatome des PC (unten) *(Schmöger, 2000)*

Da Europium zu den Schwermetallen gehört, sollte es, falls es in den Symplasten gelangt, dort die Bildung von PC auslösen und sich analog zum Cadmium an dessen Schwefelatome binden. Der gebildete Komplex wird dann in die Vakuole transportiert und dort gelagert.

3. Schnittherstellung

Seit der Entwicklung des Mikroskops im 17. Jahrhundert wurden immer komplexere Organismen und Strukturen untersucht. Während bei vielen durchsichtigen Wasserorganismen die inneren Strukturen ohne Vorbereitung sichtbar sind, müssen vor der Untersuchung von höheren Pflanzen oder Tieren bestimmte Methoden angewendet werden, um ihre innere Struktur sichtbar zu machen. Ein Beispiel einer solchen Methode ist die Anfertigung eines Dünnschnitts des Präparats. Dieser Dünnschnitt kann unter dem Mikroskop betrachtet werden, um Erkenntnisse über den Aufbau zu gewinnen (Henkel, 2020). Dünnschnitte eignen sich aber nicht ausschließlich für mikroskopische Analysen, sondern auch für ortsaufgelöste massenspektrometrische Messungen wie der SIMS.

3.1 Handschnitt

Eine Methode, um einen Dünnschnitt herzustellen, ist der Handschnitt. Dabei wird das Objekt zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten und mit einem scharfen Skalpell geschnitten. Es ist darauf zu achten, dass das Skalpell gleichmäßig scharf ist und nicht mit Druck geführt werden muss. Für den Anfänger ist es ratsam, einen auskeilenden Schnitt zu machen, das heißt, das Skalpell so zu führen, dass es in der Mitte des Objekts schräg herauskommt. Dadurch entsteht am Rand eine extrem dünne Stelle. Grundsätzlich sind Schnittdicken von 10 µm erreichbar (Henkel, 2020).

Diese Methode eignet sich nur bedingt für das Schneiden von Radionuklid-getracerten Pflanzen, da die Verletzungsgefahr durch die Klinge bei Anfängern hoch ist.

3.2 Mikrotom

Eine sicherere Methode ist das Schneiden mit einem Mikrotom. Zudem bieten Mikrotome den Vorteil, dass die Schnittdicke präzise eingestellt und bis auf 0,5 µm verringert werden kann. Dafür müssen Objekte, die am Mikrotom geschnitten werden sollen, zuvor eingebettet werden. Es gibt viele verschiedene Mikrotomtypen, allen gemein ist der Messerhalter mit Klinge und der Objekthalter, die aufeinander zubewegt werden (Henkel, 2020).

An dieser Stelle soll nur kurz das Mikrotom des Instituts für Zellbiologie und Biophysik (LUH) vorgestellt werden, da es für einige Versuche verwendet wurde. Das EMS 5000 Oscillating Tissue Slicer (Abb. 5 links) der Firma Fisher Scientific ist ein Mikrotom mit einer festen Messerposition und einer beweglichen Probenposition. Wie der Name Oscillating schon sagt, vibriert die Messerklinge während des Schnitts und kann so auch festes Gewebe schneiden. Schnittdicke, Schnittgeschwindigkeit und Oszillationsgeschwindigkeit können variabel eingestellt werden.

3.3 Kryo-Mikrotom

Das Kryo-Mikrotom „Thermo Scientific CryoStar NX50 Kryostat“ (Abb. 5 rechts) von Thermo Fisher Scientific besteht aus einer Kühlkammer, die auf -25 °C gekühlt wird. In dieser Kammer befinden sich der Probenkopf, der Schneideapparat und die Cryobar, auf welcher die Proben gelagert, aber auch auf der Schnellgefrierstation auf -57 °C heruntergekühlt werden. Letztere ist wichtig, damit der Kryo-Kleber schnell gefriert und die Gewebemorphologie durch verminderte Eiskristallbildung erhalten bleibt. Die Temperatur der Probe auf dem Probenkopf kann beliebig eingestellt und bis auf -43 °C abgesenkt werden. Mit dem Handrad an der rechten Seite wird der Probenhalter auf und ab bewegt und die Probe geschnitten. Der Schneideapperat besteht aus der Rasierklinge und dem Schnittstrecker, einer Glasplatte, die über dem Messer liegt und ein Aufrollen des Schnitts verhindern soll. Die Schnittdicke wird in zwei Bereiche eingeteilt, den Trimmschnitt (5-500 µm) für gröbere Schnitte, unter anderem dafür genutzt, um den Kleber über der Probe wegzuschneiden, und den Feinschnitt (0,5 µm bis 100 µm) für die eigentlichen Schnitte. Eine Umdrehung des Handrades bewegt das Messer um die eingestellte Schnittdicke in Richtung Probe (Thermo Fisher Scientific, 2012).

Abbildung 5: links: **Mikrotom** EMS 5000; rechts: **Kryo-Mikrotom** NX50

4. Massenspektrometrie

Die Analysen in dieser Arbeit wurden hauptsächlich mit der Sekundärionen Massenspektrometrie (SIMS) durchgeführt. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, sind auch die induktiv gekoppelte Plasma- Massenspektrometrie (ICP-MS) und Laserablation-ICP-MS (La-ICP-MS) eingesetzt worden.

Bei der Massenspekrometrie wird die Probe in ihre Bestandteile, meist atomare oder molekulare Ionen, zerteilt und diese dann anhand ihrer Masse- zu- Ladungsverhältnisse identifiziert. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Geräte mit ihren verschiedenen Messmethoden vorgestellt werden.

4.1 ICP-MS

Das verwendete induktiv gekoppelte Massenspektrometer iCAP Q des Herstellers Thermo Fisher selektiert die Ionen mittels Quadrupol. Dazu wird die zuvor aufgeschlossene und verdünnte Probe in wässriger Lösung in den Autosampler gestellt. Über einen Schlauch gelangt etwas Probenflüssigkeit in den Zerstäuber, wo diese mittels Argongasstrom in feine Tröpfchen vernebelt wird. Der Nebel gelangt dann in die Plasmakammer. Dort findet im Argonplasma die Atomisierung und Ionisierung statt. Mit Hilfe von Ionenoptiken gelangen die Ionen in den Hochvakuumbereich des Massenanalysators. Dort erfolgt die Selektion durch einen Quadrupol. Dieser besteht aus vier Metallstäben, wobei die diagonalen Stäbe dieselbe Polung haben. Die angelegten Spannungen werden so eingestellt, dass nur die zu untersuchenden Ionen transmittiert werden, alle anderen werden abgelenkt und neutralisiert. Der Detektor ist ein Sekundärionenvervielfacher. Ein auftreffendes Ion schlägt Elektronen aus dem Detektormaterial. Diese werden beschleunigt und generieren mehr Elektronen, welche dann beschleunigt und letztendlich detektiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist der harte Ionisierungsprozess im Argonplasma. Dadurch werden Moleküle aufgebrochen und so etwaige isobare Molekülinterferenzen unterdrückt (Hölzer, 2018), (Gross, 2013).

4.2 Laserablation-ICP-MS

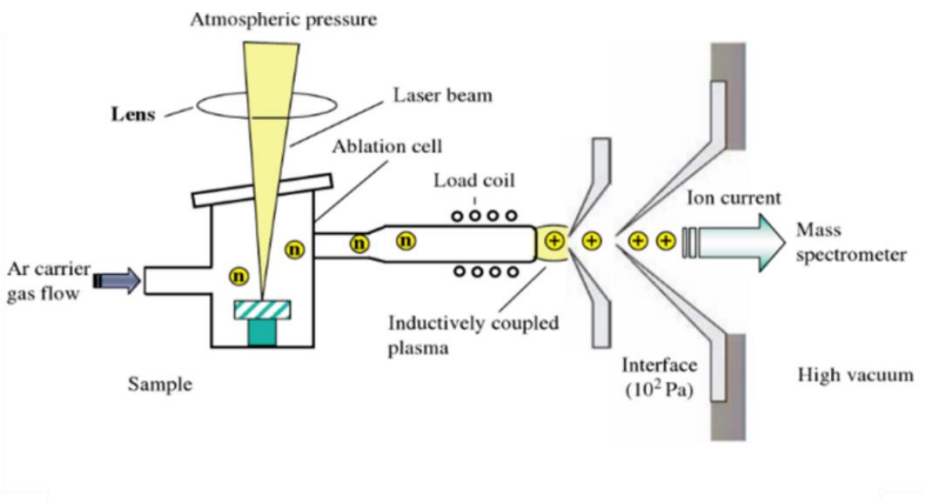

Abbildung 6: **Laserablation mit ICP-MS gekoppelt** *(Becker, 2007)*

Bei diesem Verfahren können feste Proben untersucht werden. Dazu wird die Probenoberfläche von einem fokussierten Laser abgerastert. Durch den Energieübertrag werden Atome, Moleküle und ihre Ionen aus der Oberfläche herausgelöst. Nach dem Laserpuls werden diese freien Teilchen von einem Xenongasstrahl in das Argonplasma der ICP-MS geleitet. Die Analyse des Masse-zu-Ladungsverhältnisses erfolgt dann analog zu Kapitel 4.1. Das in dieser Arbeit verwendete System besteht aus dem Laser TELEDYNE PHOTON MASCHINES, LSX-213 G2+ und der ICP-MS 8900 ICP-MS TRIPLE QUAD des Herstellers Agilent Technologies. Während die ICP-MS ICAP Q nur einen Quadrupol zur Massenselektion besitzt, besteht die TRIPLE QUAD aus zwei Quadrupolen und einem dazwischenliegenden Oktupol. Im ersten Quadrupol werden Analyt und interferierende Ionen (Ionen desselben Masse-zu –Ladungsverhältnisses) transmittiert. Diese gelangen in den Oktupol, wo sie mit dem Reaktionsgas (hier Helium) reagieren. Verlassen können den Oktupol nur der Analyt und nicht-interferierende Fragmente. Im zweiten Quadrupol findet dann die finale Massenselektion statt (Agilent).

In Abbildung 6 ist ein schematischer Aufbau der Laserablation gezeigt. Statt Argon als Transportgas wird im verwendeten System Xenon benutzt. Der Laser wird über die Software mit der ICP-MS gekoppelt. Die Software triggert dann Laserpuls, Gasfluss und den Start der Massenanalyse. Dadurch ist gewährleistet, dass immer nur die Ionen eines Pixels (Laserpulses) analysiert werden. Bei der anschließenden Auswertung ergeben sich daraus ortsaufgelöste Ionenbilder der Probenoberfläche, die die Verteilung des ausgewählten Ions zeigen. Die Pixelgröße kann von circa 4 µm bis 200 µm variiert werden. Vorteile gegenüber der ICP-MS- Analyse von Flüssigkeiten sind, neben der lateralen Auflösung, die einfache Probenvorbereitung (die Probe muss nicht aufgeschlossen und verdünnt werden), die Analyse von schwerlöslichen Proben, wie Keramiken und Metalllegierungen, und die verminderte Zerstörung der Probe (Becker, 2007), (Agilent), (Kuhn, 2005).

4.3 SIMS

Die Sekundärionenmassenspekrometrie (englisch: *Secondary Ion Mass Spectrometry*, kurz SIMS) ist ein analytisches Verfahren, bei welchem ein fokussierter Primärionenstrahl auf die Probe gerichtet wird und dort durch Stoßkaskaden Sekundärteilchen aus der Oberfläche geschlagen werden. Die Sekundärteilchen bestehen aus neutralen und geladenen Molekülen und Atomen und bilden eine Wolke über der Probenoberfläche (Abb. 7).

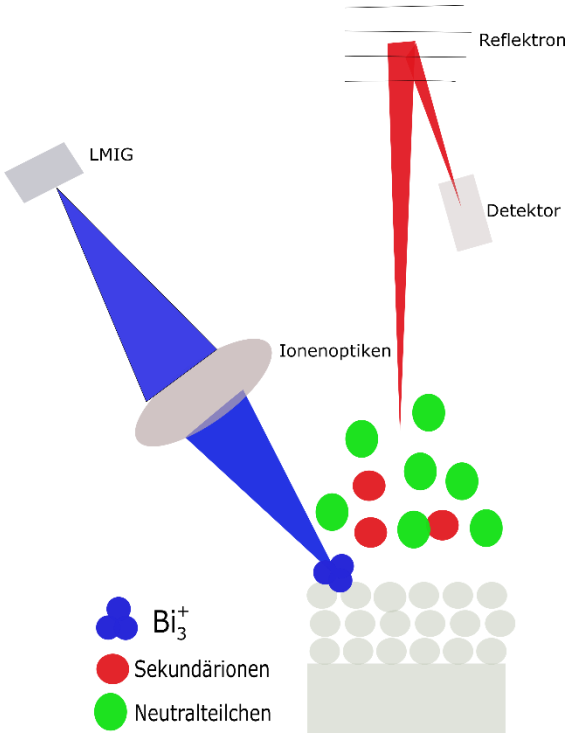

Abbildung 7: **Schematischer Aufbau der ToF-SIMS 5** Der Primärionenstrahl schlägt Sekundärteilchen aus der Oberfläche heraus, die ionisierten Teilchen werden in den Flugzeitmassenanalysator beschleunigt und separiert, bevor sie auf den Detektor treffen.

Nur circa ein Prozent der Sekundärteilchen sind ionisiert und werden durch das elektrische Feld des Analysators in das Flugzeitmassenspektrometer (englisch: *Time of Flight*, kurz ToF) beschleunigt (Becker, 2007). Im Flugzeitmassenanalysator können die Ionen feldfrei driften. Die leichteren Ionen haben eine höhere Geschwindigkeit als die schwereren. Dadurch werden sie im ToF separiert und erreichen zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor. Am Ende wird aus der Flugzeit die Masse der eintreffenden Ionen bestimmt. Dabei wird mit der ToF-SIMS ein wesentlich größerer Massenbereich gemessen als beispielsweise mit der ICP-MS, welche nur bestimmte, zuvor eingestellte Massen misst. Die Analyse der Wurzelschnitte wurde mit der TOF-SIMS 5 des Herstellers IONTOF durchgeführt. Für die Untersuchung der Proben wurde unter anderem die Kryo-Stage verwendet. Für die Kühlung der Kryo-Stage befindet sich jeweils ein Tank für flüssigen Stickstoff an der Messkammer und an der Loadlock. Die Probe auf der Kryo-Stage kann somit in beiden Vakuumkammern gekühlt werden, was ein Auftauen der Probe verhindert.

Im Folgenden sollen die einzelnen Schritte und Komponenten der SIMS näher erläutert werden.

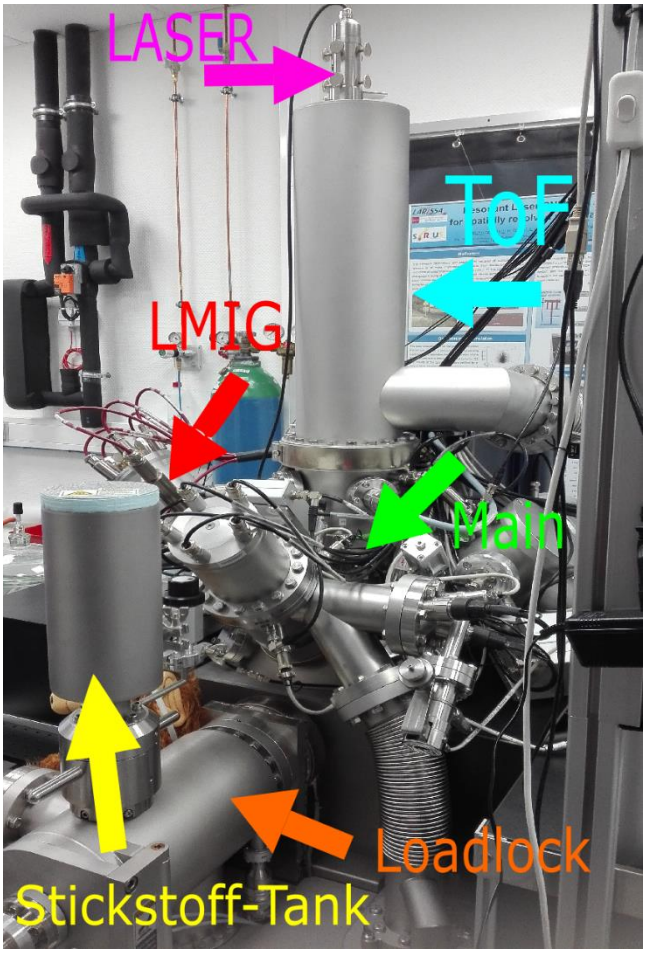

Abbildung 8: ToF-SIMS des IRS mit Beschriftung der einzelnen Komponenten

4.3.1 Ionisation

Die LMIG (Liquid Metal Ion Gun) ist die Primärionenquelle. Der Emitter besteht aus Bismuth und besitzt eine feine Spitze, aus der die Ionen, in diesem Fall Bi_3^+, in einem dünnen Ionenstrahl abgegeben werden (Abb. 9a&d). Dazu wird der Emitter mit 3 A geheizt und dadurch flüssig. Die Extraktionspannung von 10 kV formt daraus eine feine Spitze, über die die Ionen emittiert werden. Der Emissionsstrom wird auf 0,8 µA eingestellt. Bei der Einstellung der LMIG ist die Einstellung der korrekten Höhe der Probe von großer Bedeutung. Dafür wird die Höhe (z-Achse) so verändert, dass das Bild der Kamera mit dem Bild der Sekundärelektronen übereinstimmt. Danach wird der sogenannte Acceptance Circle zentriert. Über die Schärfe des Acceptance Circles kann auf der Probe die korrekte Höhe angesteuert werden. Durch verschiedene Ionenoptiken wird der Strahl auf die Probe fokussiert und in zeitliche Pakete, sogenannte Bunches, geteilt. Je nachdem, wie die LMIG eingestellt wird, besitzt das spätere Massenspektrum entweder eine hohe laterale Auflösung (60 nm) der Oberfläche (Fast Imaging Mode, kurz FI-Modus) oder eine hohe Massenauflösung (größer 10000) im Spektrum (Spectrometry Mode). Für den FI-Modus wird der Primärionenstrahl in Bunches mit einer Pulslänge von 100 ns und einem Fokus von weniger als 150 nm eingeteilt. Im Spectrometry Modus ist die Pulslänger geringer als 1 ns und der Fokus ist zwischen 3 bis 10 µm groß. Da die

untersuchten Proben aus organischem Material bestanden und daher nichtleitend waren, wurde der Ionenstrahl so eingestellt, dass er die Pixel des Messbereichs zufällig abgerastert hat. Damit wird die lokale Aufladung der Probe etwas minimiert. Dennoch musste die Floodgun ebenfalls verwendet werden. Die Floodgun ist eine Elektronenkanone, die nach dem Sputtern Elektronen auf die Probe leitet, um die Oberfläche zu neutralisieren (Abb. 9c).

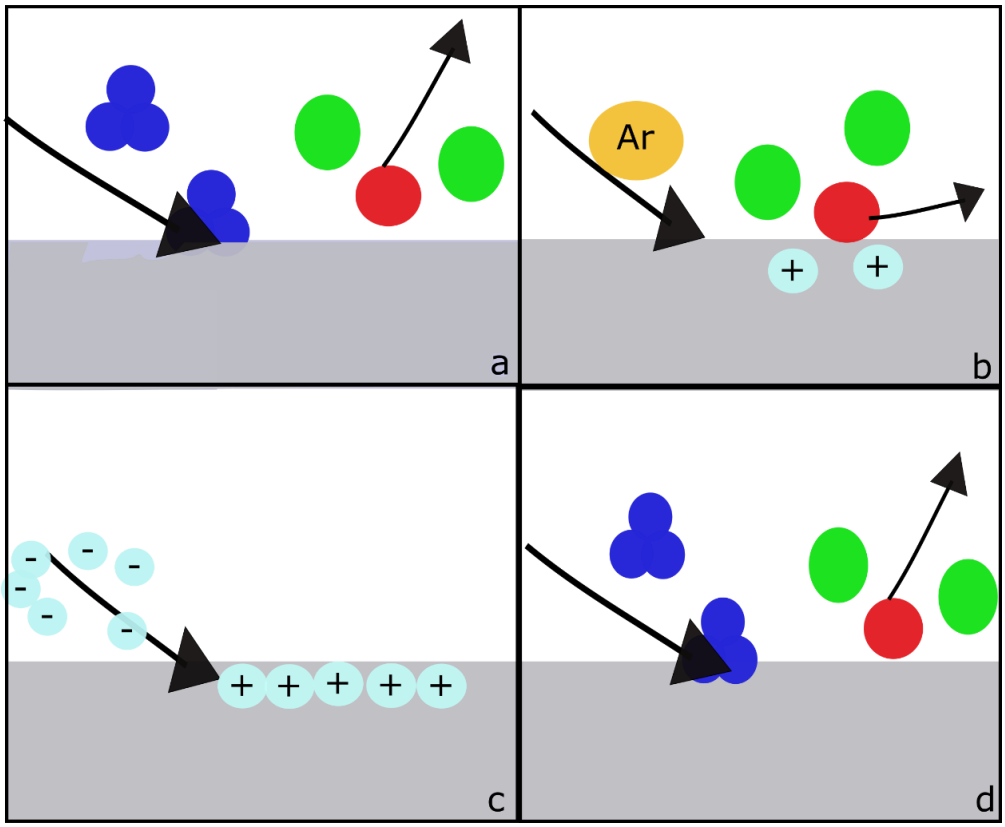

Abbildung 9: **Schematische Darstellung des Sputtervorgangs** (a) Primärionenpuls (Bi_3^+, blau) trifft auf die Probenoberfläche und schlägt Sekundärteilchen (Ionen, rot und Neutralteichen, grün) heraus, dabei wird die Oberfläche positiv aufgeladen. (b) Argoncluster der GCIB tragen Oberfläche ab, die Oberfläche bleibt positiv aufgeladen. (c) Elektronen der Floodgun neutralisieren die Oberfläche vor dem nächsten Primärionenpuls (d).

4.3.2 Massenseparation

Die Ionen jedes Pixels werden durch den ToF-Analysator separiert und im Detektor detektiert. Dadurch entstehen genaue Ionenbilder der Oberfläche sowie das Massenspektrum.

Die erzeugten Sekundärionen werden über das elektrische Feld des Extraktors in den ToF-Analysator beschleunigt. Ihre kinetische Energie nach dem Extraktor beträgt dann:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m * v^2 = U * z, \tag{1}$$

mit der Extraktorspannung U und der Ladung z.

Für die Flugzeit der Ionen folgt daraus:

$$t_{Flug} \sim \sqrt{m/_z} \tag{2}$$

Das bedeutet, im ToF-Analysator, wo die Ionen feldfrei driften, separieren sie sich aufgrund ihres unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisses. Dafür ist es wichtig, dass der Primärionenstrahl gepulst und nicht kontinuierlich die Oberfläche absputtert, damit die Ionen detektiert werden, bevor die nächsten Ionen die Driftstrecke erreichen.

Am Ende des ToF-Analysatorss befindet sich das Reflektron, ein Ionenspiegel, der dank eines statischen elektrischen Feldes Ionen höherer Energie stärker abbremst als Ionen niedriger Energie. Das liegt daran, dass höherenergetische Ionen tiefer in dieses $\vec{E}$-Feld eindringen und sich ihre Flugstrecke verlängert. Im Detektor können dann alle Ionen derselben Masse zur gleichen Zeit detektiert werden (Alikhanov, 1957), (Bosco, 2016).

4.3.3 Detektion

Der Detektor ist ein Kanalelektronenvervielfacher (KEV). Im Gegensatz zum Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) besteht er aus einer kontinuierlichen Dynode und nicht aus mehreren hintereinander geschalteten. Das eintreffende Ion wechselwirkt mit der Kathode und schlägt ein oder mehrere Elektronen heraus. Diese Elektronen werden entlang der Dynode weiterbeschleunigt und schlagen jeweils ein bis drei weitere Elektronen aus der Oberfläche heraus. Auf diese Weise entsteht eine Elektronenlawine, die zu einem Spannungsimpuls führt. Der Spannungsimpuls erzeugt im dahinterliegenden Szintillationskristall einen Lichtpuls. Dieser wird von einer Photodiode detektiert. Damit kann jedes eintreffende Ion registriert werden. Anhand der verschiedenen Flugzeiten kann dann den Ionen die entsprechende Masse zugeordnet werden.

4.3.4 GCIB

Neben der LMIG gibt es noch zwei weitere Primärionenquellen, die DSC (Dual-Source Column) und die GCIB (Gas Cluster Ion Beam). In dieser Arbeit wurde davon nur mit der GCIB gearbeitet. Die GCIB erzeugt Argoncluster, die auf die Oberfläche treffen und die obersten Schichten großflächig abtragen (Abb. 9b). Damit die entstandenen Sekundärionen nicht die Messung verfälschen, werden zwei Techniken angewendet. Zum einen werden diese durch ein elektrisches Feld unterdrückt. Zum anderen ist der Ablauf der Messung zeitlich so abgestimmt, dass am Extraktor zwischen den Pulsen der LMIG keine Spannung anliegt. Mit der GCIB können Verunreinigungen auf der Probenoberfläche entfernt oder eine leichte Unebenheit der Probe beseitigt werden. Die Argoncluster weisen eine geringe Eindringtiefe in die Probe auf und führen zu keiner chemischen Reaktion mit den Atomen der Oberfläche. Bei organischen Proben kann die GCIB ebenfalls zur Tiefenprofilierung verwendet werden (Hamann, 2017).

4.3.5 Pflanzen in der SIMS

Bei pflanzlichen Proben befindet sich im Spektrum auf fast jedem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) einen Peak, was die Analyse erschwert (Abb. 10). Der Grund dafür ist die Struktur der organischen Verbindungen $C_xH_yO_z$. Wird ein solches Molekül vom Primärionenstrahl getroffen, kann es in verschiedene Fragmente zersplittern. Der Verlust eines Wasserstoffatoms aus dem Molekül erzeugt einen Peak auf dem Masse-zu-Ladungsverhältnis $m/z_{Molekül}$ -1 (Gross, 2013). Ein Beispiel ist die Fragmentierung des Lignins (Saito, 2006). Im Massenspektrum erzeugt diese Fragmentierung mehreren Peaks, unter anderem auf den m/z= 43, 137, 151 und 181.

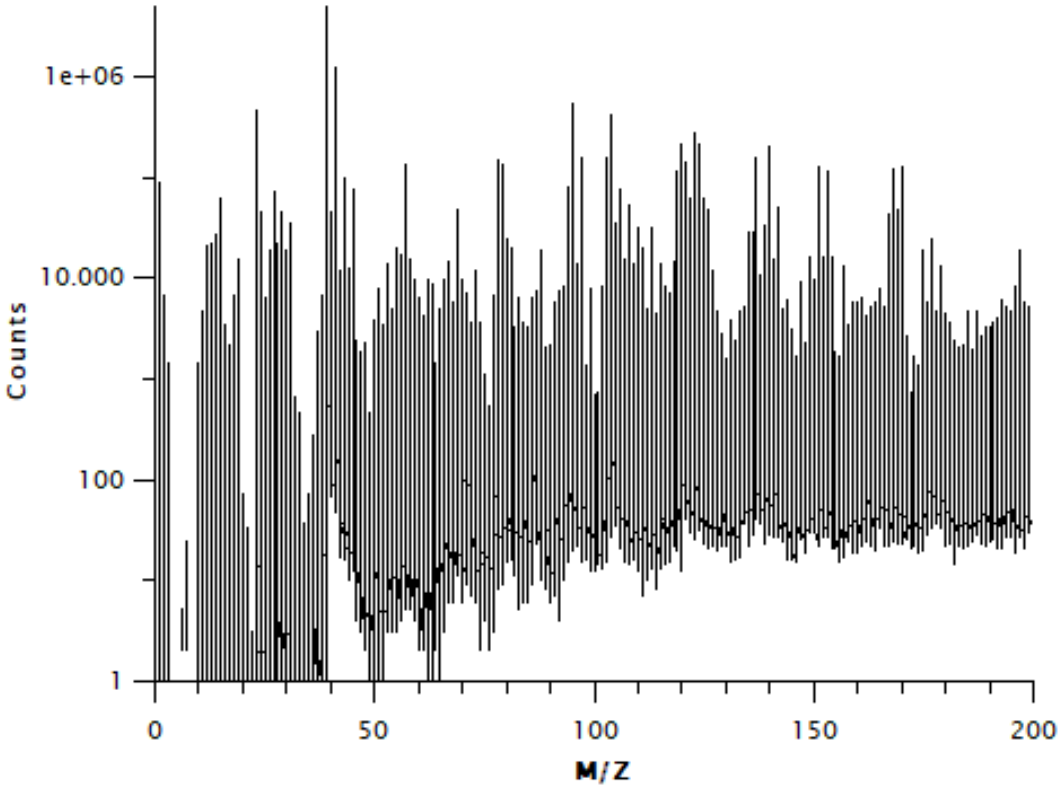

Abbildung 10: **Spektrum einer Pflanzenprobe**, es handelt sich um den Wurzelquerschnitt einer Erbse. Durch das organische Material befindet sich auf jedem m/z-Verhältnis ein Peak.

5. Methoden

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden vorgestellt. Die Probenvorbereitung gliedert sich in die Pflanzenaufzucht, die Verwendung des Tracers und die Einbettung der Probe in verschiedene Materialien in unterschiedlichen Verfahren. Bei der Messtechnik werden die angewendeten massenspektrometrischen Verfahren erläutert.

5.1 Probenvorbereitung

Bevor die Proben analysiert werden können, müssen sie entsprechend vorbereitet werden. Darum soll es in diesem Kapitel gehen. Zunächst wird die Aufzucht der Erbsen und Bohnen beschrieben. Darauf folgt die Charakterisierung des Tracers und der unterschiedlichen Einbettungsmaterialien. Am Ende wird die Methode der Kryo-Einbettung erklärt.

5.1.1 Tracer

In den Versuchen wurde Europium als stabiles Homolog für Americium verwendet. Europium gehört zu den Lanthanoiden und hat die Ordnungszahl 63. Europium besitzt zwei stabile Isotope, ^{151}Eu (Vorkommen 47,8 %) und ^{153}Eu (Vorkommen 52,2 %). Mit einer Dichte von 5,245g/cm^3 gehört es zu den Schwermetallen. Für die Tracerlösung wurde Europium(III)nitrat in Hoagland-Lösung gelöst. Es liegt als zwei- oder dreiwertiges Kation in der Lösung vor und wird als solches von der Pflanze aufgenommen, in Phytochelatin-Komplexen gebunden und in der Vakuole eingelagert (Weiler, 2008). Die Europium-Konzentration in der Tracerlösung wurde variiert (5 mmol/L und 10 mmol/L), die Konzentrationen liegen Größenordnungen über einer praktisch verwendbaren Americium-Konzentration. Die Aktivität von 5 mmol/L Americium angesetzt in 500 ml Hoagland (typisches Gießvolumen während des Tracerns) beträgt:

$$Aktivität_{243_{Am}} = Spez.Aktivität * Masse \tag{3}$$

$$A_{243_{Am}} = 7{,}6\,{}^{MBq}/_{kg} * 0{,}6075g \tag{4}$$

$$A_{243_{Am}} = 4{,}6GBq \tag{5}$$

Bei dieser hohen Aktivität ist es sinnvoll, zunächst die Messmethode zu optimieren, sodass geringere Tracer-Konzentrationen benötigt werden. Die Optimierung kann aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften mit stabilem Europium durchgeführt werden. Zudem bietet stabiles Europium gegenüber ^{243}Am den Vorteil, dass es zwei Isotope besitzt und ^{243}Am nur eins. Bei SIMS-Messungen auf pflanzlichen Proben ergibt sich für nahezu jedes m/z-Verhältnis ein Peak. Das monoisotope ^{243}Am kann dann nur schwer vom Organik-Untergrund unterschieden werden. Abhilfe könnte da eine Mischung aus zwei verschiedenen Americium-Isotopen wie zum Beispiel ^{243}Am und ^{241}Am schaffen. Die Optimierung des Verfahrens sollte aber dennoch zunächst mit inaktiven Isotopen erfolgen. Für Europium gilt, dass Doppelpeaks auf den m/z = 151 und m/z = 153 und ein Verhältnis von 48 % zu 52 % zwischen einem Peak auf 151 und einem Peak auf 153 auf die Anwesenheit der Isotope ^{151}Eu und ^{153}Eu hindeutet. Dieses

Verhältnis lässt sich auch auf die m/z = 167 und m/z = 169 (EuO) beziehungsweise m/z = 168 und m/z = 170 (EuOH) anwenden, um Europium sicher zu identifizieren.

5.1.2 Pflanzenaufzucht

Für die Experimente wurden Bohnen und Erbsen verwendet. Die Bohnen wurden in Töpfen aufgezogen, während die Erbsen in Hydrokulturen aufwuchsen. Der Umstieg auf Hydrokulturen erfolgte, da die Transferfaktoren für diese Methode höher sind als für Topfpflanzen. Eine hohe Traceraufnahme begünstigt die Messung mit der SIMS.

5.1.2.1 Bohnen

In insgesamt fünf Töpfen wurden Bohnen aufgezogen. Sobald sie in der vegetativen Phase waren (vgl. Kapitel 2), wurden sie über 18 Tage mit Europium getracert. Das Europium wurde den Pflanzen in Form von low-Phosphate-Hoagland-Lösung (Anhang: Kapitel 11.1) mit 5 mmol/L $Eu(NO_3)_3$ zur Verfügung gestellt, in dem sie circa jeden zweiten Tag mit 50 ml pro Topf gegossen wurden. Nachdem die Bohnen Schoten gebildet hatten, wurden sie geerntet und für drei Tage in der Gefriertrocknung getrocknet. Danach wurde ein Teil der Wurzeln und Blätter in Epoxidharz eingegossen.

5.1.2.2 Erbsen

Die Erbsen wurden in einer Hydrokultur mit high-Phosphate-Hoagland aufgezogen (Abb. 11). Nach 3 Wochen wurden die erste Versuchsreihe mit einer Europium-haltigen low-Phosphate-Hoagland getracert ($[Eu^{3+}]$ = 5 mmol/L; Tracerdauer fünf Tage). Die zweite Versuchsreihe wurde nach 4 Wochen getracert ($[Eu^{3+}]$ = 5 mmol/L und $[Eu^{3+}]$ = 10 mmol/L; Tracerdauer acht Tage). Nach der Ernte wurde ein Teil der Pflanzen für Messungen mit der ICP-MS getrocknet, ein Teil zur Konservierung eingefroren und der Rest am Kryo-Mikrotom eingebettet und geschnitten.

Abbildung 11: **Aufzucht der Erbsen in Hydrokultur**

5.1.3 Eingießen der Pflanzen

Um die Pflanzen für die Messungen im Vakuum vorzubereiten, wurden verschiedene Einbettungsmaterialien verwendet. Die Einbettung in Agar ist die schnellste und günstigste Methode, um Pflanzenproben einzugießen. Polyethylenglykol (PEG) bildet nach dem Aushärten robustere Blöcke als Agar. In der Elektronenmikroskopie wird ein anderes Material verwendet: Epoxidharz. Es zeichnet sich durch eine in weiten Bereichen einstellbare Härte und hohe Strapazierfähigkeit aus.

5.1.3.1 In Agar

Agar-Agar wird aus verschiedenen Rotalgenarten gewonnen und besteht zu circa 70 % aus Agarose und 30 % aus Agaropektin. Es wird größtenteils in der Lebensmitteltechnologie und in der Mikrobiologie verwendet (Lang, 2013).
Für die Einbettung eines Erbsenstiels wurden 2,5 %, für eine Erbsenwurzel 4,9 % Agar in Wasser gelöst und in der Mikrowelle erwärmt, bis es geleetierte. Danach wurde das Agar in eine Form gegossen und die Probe hineingelegt. Nach kurzer Zeit im Kühlschrank wurde es dann zu einem gallertartigen Block und konnte am Mikrotom geschnitten werden.

5.1.3.2 In PEG

Polyethylenglykol (PEG) wird als Ersatz für Paraffin als Einbettungsmedium genutzt. Anders als bei der Paraffin-Methode, bei der aggressive Reagenzien wie Xylol benötigt werden, wird für die PEG-Methode nur PEG in verschiedenen Polymerisaten benötigt. Zudem ist PEG in allen Polymerstufen wasserlöslich, weshalb das Einbettungsprotokoll wesentlich einfacher ist. PEG wird anhand der Kettenlänge klassifiziert und mit dem jeweiligen Molekulargewicht bezeichnet. Bei Raumtemperatur ist PEG 400 zum Beispiel flüssig, während PEG 2000 oder PEG 4000 paraffinartig sind. In der Routinehistologie wird für die Einbettung ein Einkammer-Einbettautomat mit Vakuum-Infiltrations-Prozessor verwendet. Dieser führt die Schritte des Einbettungs-Protokolls (Tab. 1) nahezu vollautomatisch durch. Die Blöcke können dann analog zu Paraffinblöcken an Mikrotomen geschnitten werden. Allerdings haften sie schlecht auf Objektträgern und müssen aufgrund der hygroskopischen Eigenschaft des PEGs speziell aufbewahrt werden (Lang, 2013).

Tabelle 1: Einbettprotokoll für PEG *(Lang, 2013)*

Beispiel eines Einbettungs-Protokolls		
Fixierung	Formaldehyd 4 %	
Auswaschen des Fixativs	Leitungswasser	
Entwässe-rung	PEG 400/Wasser 1:1	30 min
	PEG 400/Wasser 3:1	30 min
	PEG 400	30 min
Infiltration	PEG 1000	30 min, 40 °C
	PEG 1550/PEG 4000 1:9	30 min, 58 °C
Ausgießen	PEG 1550/PEG 4000 1:9	58 °C

Eine weitere Möglichkeit wäre, PEG 1500 mit 1 % Glycerin und destilliertem Wasser zu vermischen, um die Schneidbarkeit zu verbessern. In dieses Gemisch wird die Probe eingelegt und dann bei 50-55 °C im Trockenschrank für drei bis vier Tage entwässert. Durch die lange Wärmebehandlung bei dieser Methode besteht die Gefahr, dass die Probe schrumpft oder verhärtet und damit einzelne Strukturen nicht mehr klar erkennbar sind. Außerdem schwimmt die Probe auf diesem Gemisch und müsste mit einer Nadel in der Mitte der Lösung fixiert werden. Außerdem kann PEG 2000 spröde werden, wenn es zu schnell abkühlt (Gruber, 1989).
Da am Institut kein Einbettautomat zur Verfügung stand und zudem nur PEG 2000 vorhanden war, wurde ein vereinfachtes Protokoll durchgeführt, um das Material zu testen.
Dazu wurde ein Karottenstück direkt eingegossen, ein weiteres kurz dehydriert. Die Entwässerung fand in drei Schritten zu je fünf Minuten statt: zuerst wurde das Karottenstück in 30 % Ethanol eingelegt, dann in 60 % Ethanol, und zum Schluss in 95 % Ethanol. Das PEG wurde bei 50 °C geschmolzen und dann in Förmchen gegossen.

5.1.3.3 In Epoxidharz

Das Epoxidharz erhielt seinen Namen nach dem Epoxid-Dreiring, einer ringförmigen Struktur bestehend aus einem Sauerstoffatom und zwei Kohlenstoffatomen, welche den Kern bildet. Durch Polymerisation und Quervernetzung entsteht ein fester Block, der chemisch stabil ist. Es gehört zur Materialgruppe der belastbaren Kunststoffe und wird vielfältig eingesetzt. In der Mikrotomie wird es als Einbettungsmedium verwendet. Dazu muss es natürlich schneidbar sein. Damit einhergehend gibt es zahlreiche Probleme, die auftreten können, wie eine schlechte Schneidbarkeit, Löcher im Schnitt oder ungleichmäßig gehärtete Blöcke, der Grund dafür ist meistens ein unpassendes Mischungsverhältnis oder eine unvollständige Dehydration. Die Mischung wird dann bei 60 °C im Ofen ausgehärtet (Lang, 2013).

Das Epoxidharz, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht aus drei verschiedenen Komponenten: Dem Harz Araldite Gy 502 (Modified Bisphenol A Epoxy, Electron Microscopy Science), dem Härter Dodecenyl Succinic Anhydride (DDSA, Electron Microscopy Science) und dem Beschleuniger DMP-30 (2,4,6-Tris-(dimethyl-aminomethyl)-phenol, Electron Microscopy Science). Araldite ist ein gelbliches, stark viskoses aromatisches Epoxidharz mit einer Dichte von 1,13 g/ml. Es bildet die Grundsubstanz des Einbettmediums. DDSA ist eine farblose Flüssigkeit und besteht aus dem Anhydrid der Bernsteinsäure mit einer Dichte von 1,005 g/ml. Der Anteil des DDSAs im Gemisch bestimmt die Härte des fertigen Blocks. Dem Gemisch aus Araldite und DDSA werden 1,5-2 % DMP-30 zugefügt. DMP-30 beschleunigt den Aushärtungsprozess und beeinflusst Farbe und Sprödigkeit. Die Härte des getrockneten Harzes lässt sich durch verschiedene Mischungsverhältnisse individuell einstellen. Die Zutaten werden leicht erwärmt, damit sie sich leichter vermischen, in Silikonförmchen gegossen und schließlich bei 60 °C für mehrere Tage im Ofen ausgehärtet.
Laut Hersteller ergibt folgende Mischung einen festen, schneidbaren Block: 20 ml Araldite 502 + 22 ml DDSA + 0,63-0,84 ml (1,5-2 %) DMP-30. Diese Mischung soll im Ofen bei 60 °C 24-48 Stunden aushärten (Electron Microscopy Science, 2018).
Nach Finck ist das beste Mischungsverhältnis wie folgt: 10 ml Araldite + 10 ml DDSA + 0,2 ml BDMA (N-Benzyldimethylamine, ein anderer Beschleuniger). Die Mischung wird zunächst für 18 Stunden bei 40 °C und dann für 2-4 Tage bei 55 °C gehärtet (Finck, 1960). Und bei Luft werden gute Resultate erzielt, wenn das Epoxidharz 12 Stunden bei 60 °C aushärtet. Noch bessere Resultate werden bei einer Staffelung von 12 h a 35 °C, 12 h a 45 °C, 12 h a 60 °C erzielt. Es kann direkt im Anschluss geschnitten werden (Luft, 1961).
Die erste Versuchsreihe wurde mit dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis durchgeführt. Da die entstandenen Blöcke jedoch zu hart zum Schneiden waren, wurden im Folgenden die Verhältnisse von Harz (Araldite 502) und Härter (DDSA) variiert (von 1:0,1 bis 1:1), um das optimale Verhältnis zu erreichen, bei welchem die Probe gut eingebettet und der Block schneidbar ist. Die Proben waren drei Tage bei 60 °C im Ofen. Tabelle 2 zeigt die genauen Verhältnisse. Weiche, schneidbare Blöcke entstanden bei einem Verhältnis von Araldite zu DDSA von 1:0,43 bis 1:0,48, diese Mischungen sind in der Tabelle hervorgehoben.

Tabelle 2: Variation der Verhältnisse von Araldite und DDSA

Verhältnis	Araldite (ml)	DDSA (ml)	DMP-30 (%)	tatsächliches Verhältnis Araldite : DDSA
1:0,1	1,07	0,12	0,5	1:0,11
1:0,2	1,06	0,22	0,5	1:0,21
1:0,3	0,97	0,33	0,5	1:0,34
1:0,4	**0,98**	**0,42**	**0,5**	**1:0,43**
1:0,5	**1,09**	**0,51**	**0,5**	**1:0,47**
1:0,5	**1,03**	**0,49**	**1,5**	**1:0,48**
1:0,6	1,09	0,58	1,5	1:0,53
1:0,7	1,14	0,73	1,5	1:0,64
1:0,8	1,06	0,82	1,5	1:0,77
1:0,9	1,11	0,94	1,5	1:0,85
1:1	1,02	0,99	1,5	1:0,97

Die in Abbildung 12 gezeigten Proben sind das Resultat aus den Mischungen in Tabelle 2. Die unterschiedliche Färbung ist auf die unterschiedliche Menge an DMP-30 zurückzuführen.

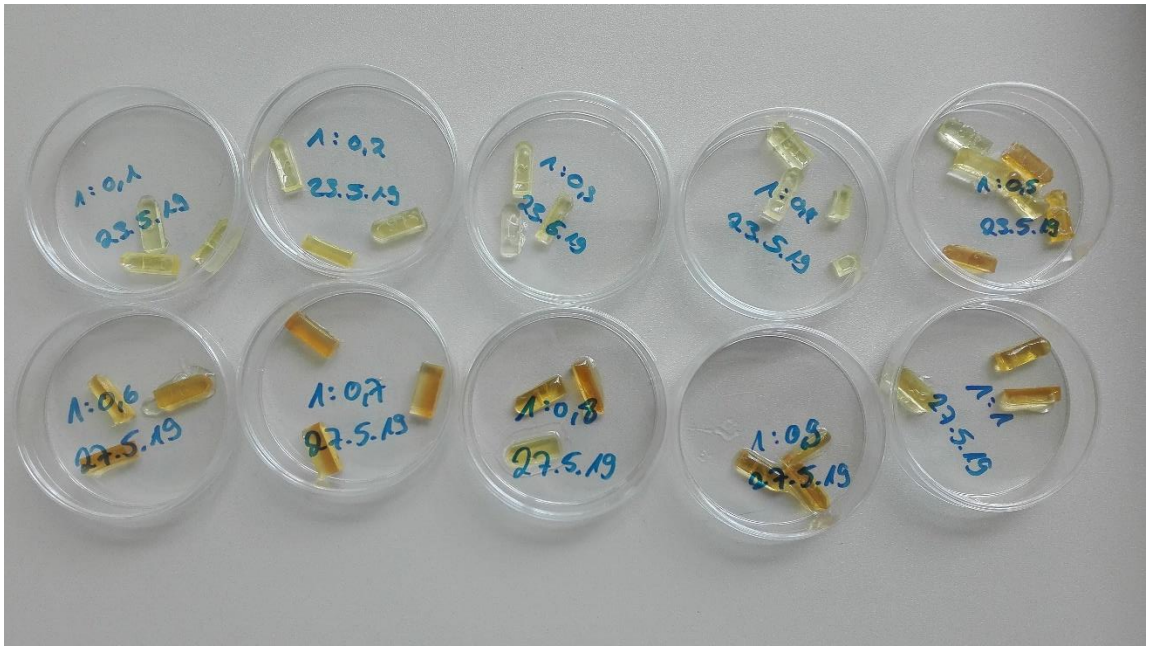

Abbildung 12: **Variation des Verhältnisses von Araldite und DDSA**, analog zur Tabelle

In sämtlichen weiteren Versuchsreihen wurde ein Araldite-zu-DDSA-Verhältnis von 1:0,5 mit circa einem Prozent DMP-30 angemischt, um die Proben optimal einbetten und schneiden zu können.

5.1.4 Einfrieren der Pflanze

Mit dem in Kapitel 3.3 vorgestellten Kryo-Mikrotom war es möglich, die extrem ebenen Schnitte für die SIMS-Analyse herzustellen. Das Mikrotom lässt sich bei unterschiedlichen Temperaturen betreiben, je nach Gewebeart und gewünschter Schnittdicke muss diese Temperatur angepasst werden. Zum Beispiel: Karottenwurzel, 20 µm Schnittdicke, optimale Temperatur -16 °C; 14 µm Schnittdicke, Temperatur -12 °C.

Direkt nach der Ernte der Pflanzen wird ein Teil von ihnen am Kryo-Mikrotom eingebettet. Beim Einbetten wird auf die Orientierung der Probe geachtet (Querschnitte) und pro Einbettung möglichst viele dünne Wurzeln verwendet (mit der Kryo-Stage der SIMS kann nur ein Schnitt pro Tag gemessen werden). Nach dem Einbetten wird der Probenhalter in der Halterung festgemacht und dann geschnitten. Sobald eine Stelle gefunden wurde, die einen oder mehrere vollständige Wurzelquerschnitte zeigt (Kontrolle mit Mikroskop), wird der nächste Schnitt auf ein Glasplättchen aufgebracht und dieses auf der Kryo-Stage befestigt. Danach wird die Kryo-Stage in die Vakuumkammer der SIMS eingeschleust und der Schnitt kann gemessen werden. Der Vorteil an dieser Methode ist, dass sehr dünne und ebene Schnitte angefertigt werden können.

Abbildung 13: **Blick in die Kühlkammer des Mikrotoms** unten links: Probe wird auf Kryobar gefroren, oben links: Proben warten auf weitere Benutzung, Mitte oben: Probe auf Probenhalter beim Schneiden

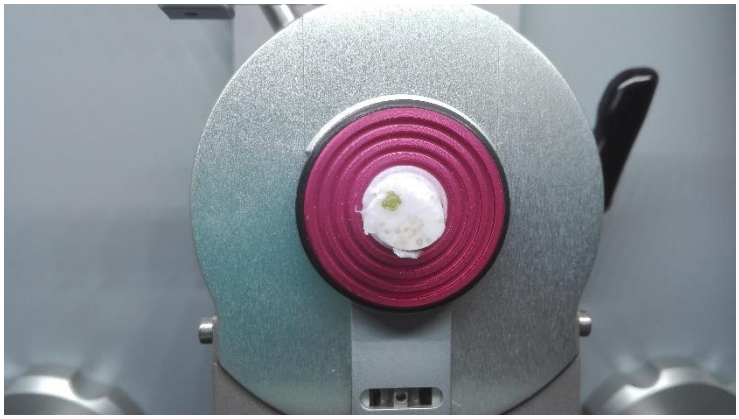

Abbildung 14: **Probenkopf mit Probe**

5.2 Messtechnik

Im Kapitel „Messtechnik“ werden die drei unterschiedlichen Messmethoden behandelt. Es wird die individuelle Probenvorbereitung und die Durchführung der Messung beschrieben.

5.2.1 ICP-MS

Die zuvor getrockneten Pflanzenteile wurden in kleinen Mengen (maximal 0,49 g) in konzentrierte HNO_3 gelöst und mittels Mikrowelle aufgeschlossen. Danach wurde das Gemisch eingedampft und in 2%iger HNO_3 aufgenommen. Die Probenlösungen wurden entsprechend verdünnt. Zugleich wurden Europium-Standards angesetzt, die im erwarteten Bereich der Europium-Konzentration in der Probe liegen. Die verdünnten Proben und die Standards wurden mit der ICP-MS gemessen.
Aus den Messwerten der Standards wurde eine Kalibriergerade erstellt. Dabei wurde statt der Absolutcounts das Verhältnis des um den Untergrund bereinigten Europium-Signals zum ^{129}Xe-Signal verwendet. Für beide Isotope identifiziert der Ausreißer-F-Test nach DIN32646 Standard 3 als Ausreißer. Die um diesen Standard bereinigte Kalibriergerade besteht für beide Isotope den Linearitäts-Mandel-Test nach DIN32646.

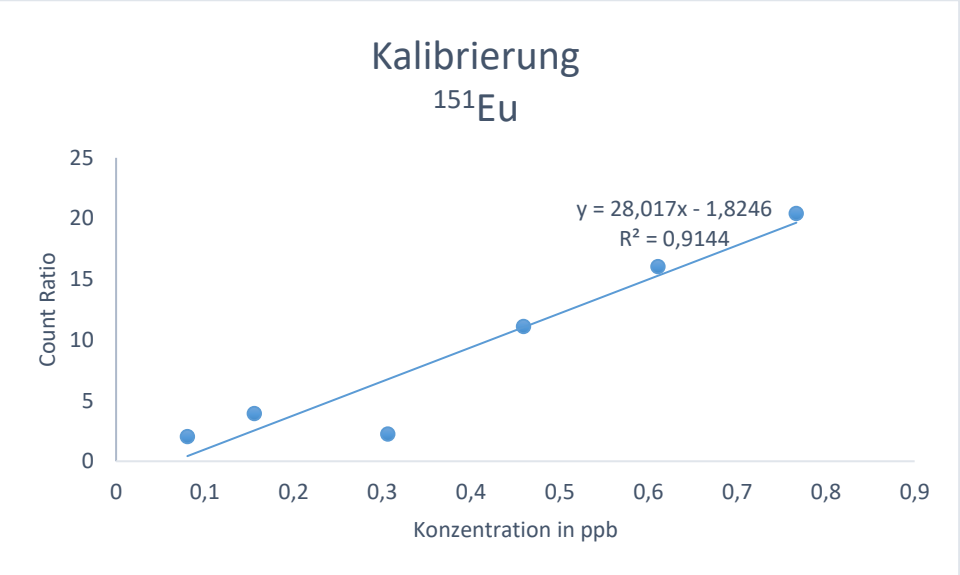

Abbildung 15: **Kalibriergerade ^{151}Eu** Standard 3 wird nach DIN32646 als Ausreißer identifiziert

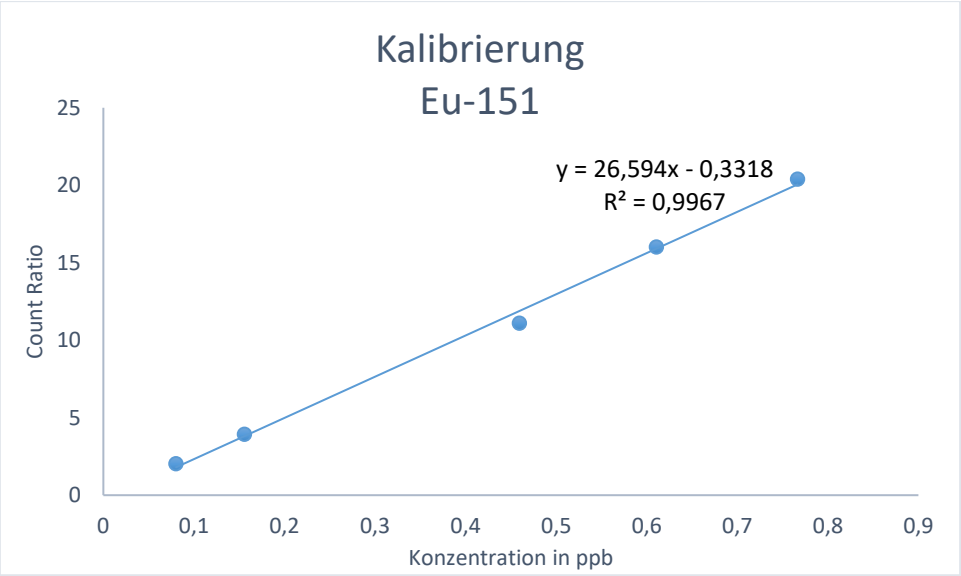

Abbildung 16: **Kalibriergerade ^{151}Eu ohne Standard 3** *nach DIN32646 kein Ausreißer mehr vorhanden*

Die Geradengleichung für ^{151}Eu lautet:

$$y = 26{,}594x - 0{,}3318 \tag{6}$$

$$Count\ Ratio = 26{,}594\ {}^{1}/_{ppb} * c - 0{,}3318 \tag{7}$$

Mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 = 0,9967.

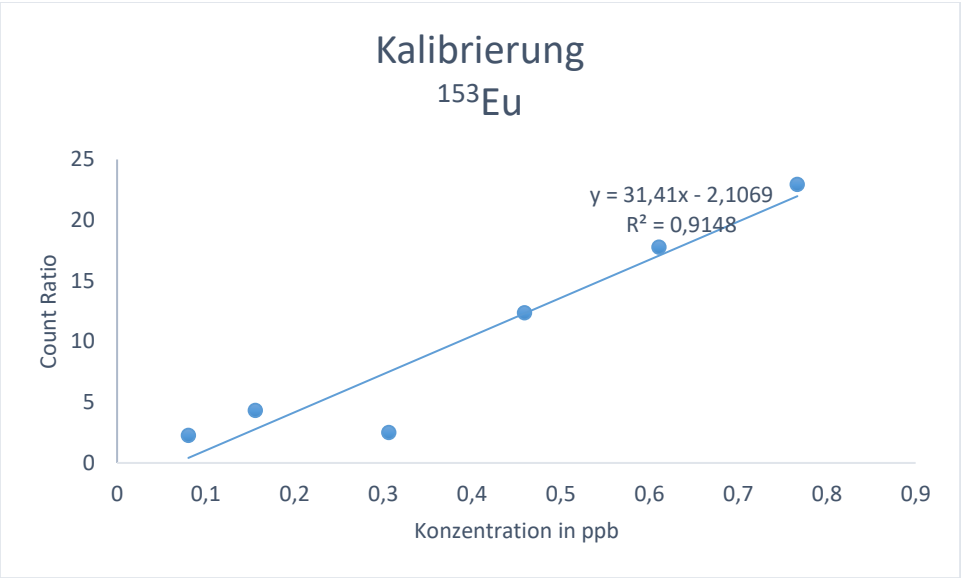

Abbildung 17: **Kalibriergerade ^{153}Eu** Standard 3 wird nach DIN32646 als Ausreißer identifiziert

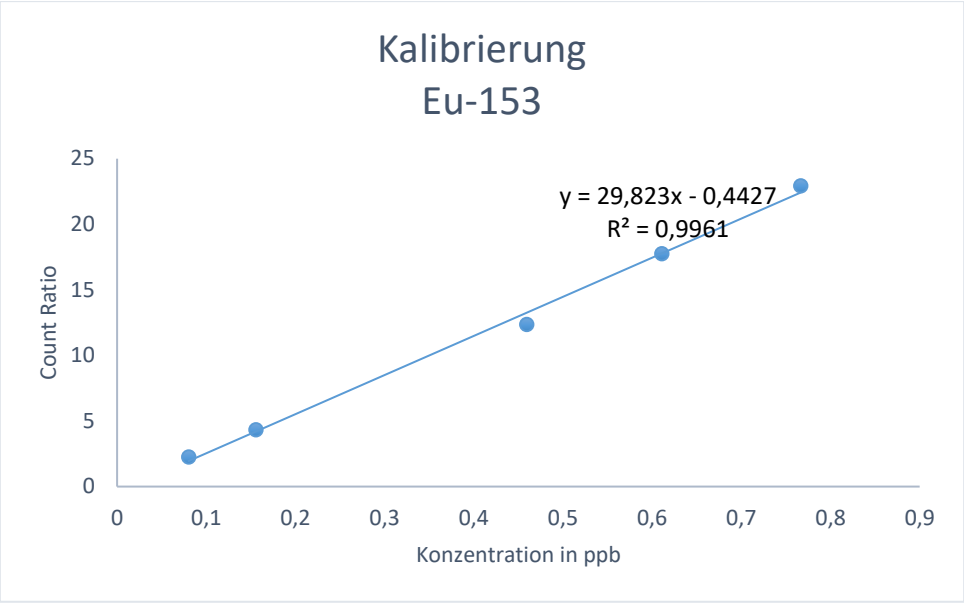

Abbildung 18: **Kalibriergerade ^{153}Eu ohne Standard 3** nach DIN32646 kein Ausreißer mehr vorhanden

Die Geradengleichung für ^{153}Eu lautet:

$$y = 29{,}823x - 0{,}4427 \tag{8}$$

$$Count\ Ratio = 29{,}823\ {}^{1}/_{ppb} * c - 0{,}4427 \tag{9}$$

Mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 = 0,9961.

Dennoch ist das Bestimmtheitsmaß für beide Isotope nicht optimal. Auch der Offset weicht mit -0,33 und -0,44 von dem theoretischen Wert Null ab. Das liegt daran, dass die Konzentrationen der Standards für ICP-MS-Messungen schon relativ hoch sind, um den Offset zu verringern müssten noch Standards geringerer Konzentration gemessen werden. Da diese Messung lediglich dem Abschätzen des Europiumgehaltes in der Pflanze diente, sind diese Werte trotzdem ausreichend. Zudem wurden die Standards so gewählt, dass sie den Bereich der Probenkonzentrationen abdecken, was den Fehler in der Konzentrationsbestimmung der Probe minimiert.

5.2.2 Laserablation

Die Probe, die für die Messung an der LA-ICP-MS hergestellt wurde, stammt vom oberen Teil der Erbsenwurzel knapp unterhalb des Übergangs in den Stiel. Die untersuchte Wurzel stammte von einer Erbse, die mit 10 mmol/L Europium getracert worden war. Der Schnitt wurde bei -15 °C am Kryo-Mikrotom angefertigt und besaß eine Dicke von 50 µm, damit genügend Material für die Ablation vorhanden war. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop wurde der beste für die Messung ausgewählt. Da die Probenkammer des Lasers zwar evakuiert, aber nicht gekühlt werden kann, wurde der Schnitt aufgetaut und getrocknet. Dies führte zum Zerreißen des Schnitts, was auf dem Kamerabild des Lasersystems durch die vielen Löcher klar zu erkennen ist (Abb. 31a). Der Objektträger wurde dann im Probenhalter

des Lasersystems befestigt und in der Probenkammer wurde ein Vakuum erzeugt. Danach wurde der Messbereich und die Anzahl der Messpunkte festgelegt und an der gekoppelten ICP-MS die gewünschten Isotope (^{151}Eu, ^{153}Eu, ^{31}P) ausgewählt. Der Rest der Messung wurde dann von der Software automatisch durchgeführt.

5.2.3 SIMS

Mit der SIMS wurden zwei verschiedene Arten von Proben gemessen. Zum einen die Epoxidharzproben und zum anderen die Kryo-Proben. Beiden Proben gemein war die anfängliche Tauglichkeitsprüfung unter dem Mikroskop.

Der ausgewählte Epoxidharzschnitt wurde mit Graphittape auf 0,5 x 1 cm große Aluminiumblöcke geklebt, die sich dann sowohl im Rasterelektronenmikroskop als auch in der SIMS analysieren ließen. Für die SIMS-Messung wurde der Aluminiumblock mit der Probe auf dem sogenannten Backmount festgeklemmt. Der Backmount ist ein weiterer Probenhalter der SIMS und besitzt mehrere Messpositionen für verschiedene Proben. Er wurde anschließend in die Vakuumkammer eingeschleust und die LMIG eingestellt. Danach wurde zur Probe navigiert und die richtige Höhe angesteuert. Da es sich sowohl bei der Pflanze als auch beim Harz um nichtleitende Proben handelt, wurde die Floodgun benutzt, um die Aufladung der Oberfläche zu minimieren. Dabei musste das elektrische Potential der Oberfläche angepasst werden, damit die Ionen direkt von der Oberfläche beschleunigt werden und nicht die Ionen, die sich oberhalb dieser befinden. Das funktioniert automatisch oder manuell. Bei der manuellen Einstellung wird eigentlich der Acceptance Circle scharf gestellt. Da das auf den unebenen Harzproben nicht immer möglich war, wurde stattdessen oft auf ein maximales Ionensignal optimiert. Aufgrund von Höhenunterschieden auf der Probe kann mitunter nicht der gesamte Messausschnitt gemessen werden, dann muss die Ionenausbeute der gewünschten Region maximiert werden. Die Messpunkte werden zufällig gesputtert, um die lokale Aufladung zu minimieren. Dann wird die erste Probemessung im Spectrometry Modus gestartet und das entstandene Spektrum kalibriert. Dazu wurden hauptsächlich die Ionen der Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Natrium, Kalium und Bismuth, sowie die Molekülionen CH^+, CH_2^+ und CH_3^+ benutzt, da diese in der Probe in großen Mengen vorhanden sind und das Bismuth der LMIG zum Teil auf der Oberfläche appliziert wird. Danach kann die eigentliche Messung gestartet werden. Im entstehenden Spektrum werden für die Pflanzenanalyse relevante Peaks markiert, zum Beispiel Natrium. Kalium, Phosphor, Calcium und dazu noch sämtliche Peaks bei m/z-Verhältnissen 151, 153, 167, 169, 168 und 170 (erwartet für $^{151}Eu^+$, $^{153}Eu^+$, $^{151}EuO^+$, $^{153}EuO^+$, $^{151}EuOH^+$, $^{153}EuOH^+$).

Die Epoxidharzschnitte lassen sich gut mit der SIMS messen, Peaks von häufig vorkommenden Ionen wie Na^+ sind eindeutig zuzuordnen. Allerdings führt die starke Unebenheit der Probenoberfläche zu einer Verbreiterung der Peaks, dadurch lassen sich Spurenelemente wie P^+, aber auch Eu^+, nicht mehr eindeutig identifizieren. Der Grund für die Verbreiterung ist, dass Ionen des gleichen Masse-zu-Ladungsverhältnisses und gleicher Initialenergie, aber unterschiedlicher Höhe, aufgrund der Flugzeitdifferenz zu leicht verschiedenen Zeiten im Detektor registriert werden. Das Reflektron vermindert zwar Flugzeitunterschiede aufgrund von verschiedenen Initialenergien, kann diese Effekte aber nicht komplett kompensieren. Ein verbreiteter Peak bedeutet einen Informationsverlust, da dieser aus einem Peak oder mehreren sich überlappenden Peaks

bestehen kann, die dann nicht mehr zu unterscheiden sind. Durch die Bruchstücke der organischen Verbindungen ($C_xO_YH_z$, etc) in der Pflanze befindet sich auf fast jedem m/z-Verhältnis ein Peak, was eine genaue Suche nach einem Isotop erschwert und es umso wichtiger macht, dass zwei Peaks auf einem m/z-Verhältnis klar getrennt sind.
Der Messablauf der Kryo-Probe ist etwas komplizierter, als der Messablauf des Backmounts. Am Mikroskop wird ein passender Schnitt ausgewählt und der nächste Schnitt der Probe auf ein 1x1cm großes Glasplättchen aufgebracht, dabei schmilzt der Kryo-Kleber kurz an und klebt beim erneuten Abkühlen fest. Die Kryo-Stage wird im Kryo-Mikrotom auf -25°C abgekühlt und das Glasplättchen unter dem Metallrahmen des Probenhalters festgespannt. Dann wird die Kryo-Stage in einer Styroporbox zum SIMS transportiert, um ein Auftauen auf dem Weg zu verhindern. Da die Kryo-Stage keine Einstellmöglichkeiten für die LMIG besitzt (Faraday Cup und A-Grid), müssen diese Einstellungen zuvor am Backmount vorgenommen werden. Am SIMS wird dann die Kryo-Stage nach dem Protokoll (Anhang: Kapitel 11.2) eingeschleust, dieses ist aufwändiger als das des Backmounts. Ist die Kryo-Stage in der Messkammer, ist es wichtig, dass der Kontakt zum Kühlfinger hergestellt ist. Schon ein leichtes Auftauen (von -100°C auf -70°C) führt zum Ausgasen des Wassers und in Folge dessen zu einer Verschlechterung des Vakuums. Im Extremfall ist dann keine Messung mehr möglich, bis das Vakuum wieder ausreichend hergestellt ist, da der Extraktor aufgrund der angelegten Hochspannung nur unterhalb von $2 * 10^{-5}$ mbar funktioniert. Zum Verfahren auf der Probe muss dieser Kontakt jedoch kurz unterbrochen werden. Auch diese Probe ist nichtleitend und entstehende Aufladungen werden mit der Floodgun neutralisiert. Der weitere Messablauf ist identisch zur Harzprobe. Da die Kryo-Probe kleinere Unebenheiten als die Harzprobe aufweist, sind die Peaks deutlich schmaler und Doppelpeaks getrennt. Kleinere Höhenunterschiede und eine mögliche dünne Eisschicht auf der Probe können mit der GCIB geebnet beziehungsweise entfernt werden. Dazu wurde bei der Messung nach dem Sputtern mit der LMIG mit der GCIB gesputtert und dann die Oberfläche mit der Floodgun neutralisiert (Abb. 9). Die Kryo-Proben wurden ebenfalls im Spectrometry Modus gemessen. Für einzelne Proben wurde das SIMS auch auf den FI-Modus umgestellt. Mit der Kryo-Stage kann nur ein Schnitt pro Tag gemessen werden, da die Kryo-Stage erst komplett auftauen und trocknen muss, bevor sie erneut eingefroren werden kann. Ansonsten sublimiert das Eis im Vakuum und eine Messung ist nicht möglich. Um trotzdem eine Vielzahl an Wurzelquerschnitten messen zu können, wurden mehrere dünne Wurzeln pro Probe eingegossen.
Am Ende der experimentellen Phase wurde eine Kryo-Probe auf einen Aluminiumblock aufgebracht und aufgetaut. Der Schnitt ist dabei etwas zerrissen, konnte dafür aber auf dem Backmount analysiert werden und vereinte damit die Vorteile der Messungen auf dem Backmount, wie das unkomplizierte Einschleusen und die größere Anzahl an Messplätzen, und die geringe Topographie der Schnitte am Kryo-Mikrotom.

5.2.3.1 Kryo-Stage

Da die Proben im Kryo-Mikrotom eingefroren werden und beim Auftauen zerreißen, wurde die Kryo-Stage der ToF-SIMS verwendet. Die Kryo-Stage wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt beziehungsweise mit einem Piezo-Element erhitzt und lässt sich dadurch von +600 °C bis -150 °C variabel einstellen. Die Probe, die sich auf einem kleinen Glasplättchen befindet, wird mit dem Metallrahmen festgespannt (Abb. 19).

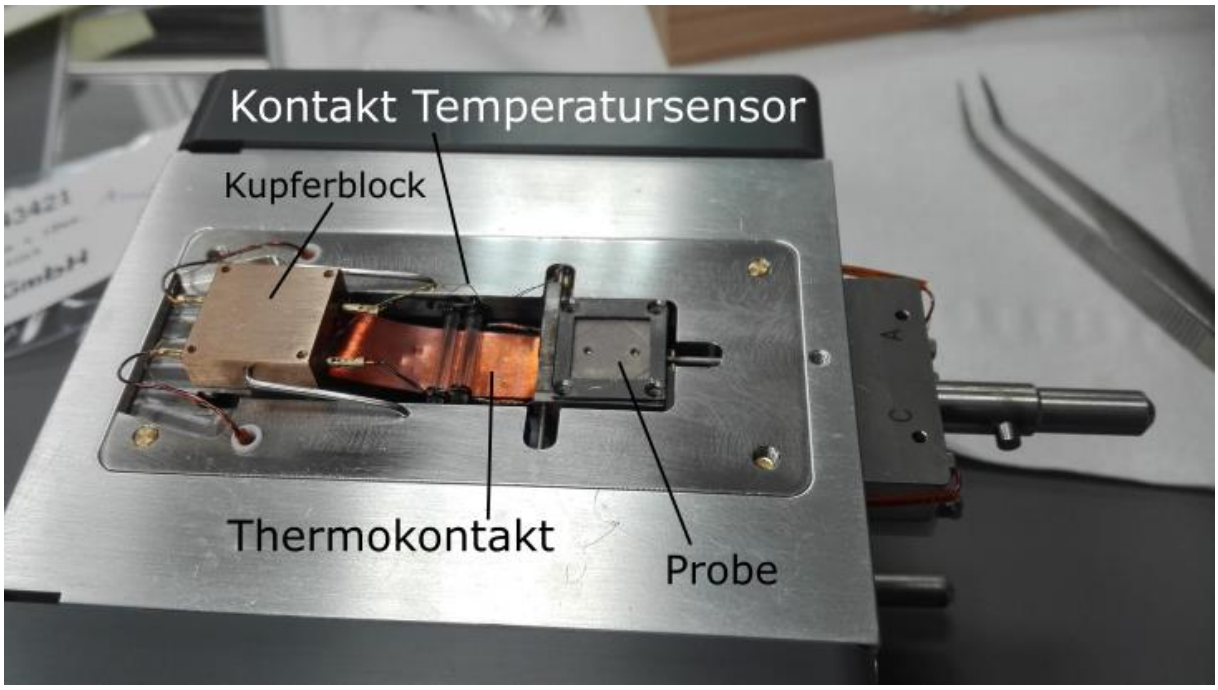

Abbildung 19: **Kryo-Stage beschriftet**

Die Kühlung der Probe auf der Kryo-Stage findet über den Kupferblock statt. Dieser hat Kontakt zum Kühlfinger, welcher mit flüssigem Stickstoff aus den Behältern gekühlt wird. Der Thermokontakt bildet die Verbindung zwischen Kupferblock und Probe und überträgt die Temperatur. Ein dünner Draht, der unter dem Metallrahmen der Probe festgespannt wird übermittelt die Temperatur der Probe an die Software (Abb. 19, Kontakt Temperatursensor).

Das Protokoll zur Verwendung der Kryo-Stage befindet sich im Anhang Kapitel 11.2.

6. Ergebnisse und Vergleich

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus der Methodenentwicklung und den Messungen erläutert und verglichen. Die Ergebnisse der Methodenentwicklung beziehen sich sowohl auf die Qualität der Probeneinbettung als auch auf die Qualität der Schnitte. Die verschiedenen Materialien werden miteinander verglichen. Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Messgeräten durchgeführt. Die Ergebnisse daraus sind nicht direkt zu vergleichen, werden aber in Bezug zueinander gesetzt.

6.1 Qualität der Proben

Bei der Qualität der Proben werden zuerst die verschiedenen Einbettungsmaterialien Agar, PEG und Epoxidharz hinsichtlich der Schneidefähigkeit und Vakuumstabilität miteinander verglichen. Danach folgt eine genaue Analyse der Schnitttechnik am Kryo-Mikrotom. Es wird die optimale Schnittdicke und jeweilige Schneidetemperatur ermittelt.

6.1.1 Probe in Agar

Mit dem Mikrotom waren 100 µm dicke Schnitte des Erbsenstiels möglich. Bei kleineren Schnittdicken fiel die Probe beim Schneiden aus dem Einbettmedium heraus. Die Einbettung war demnach nicht vollständig. Aufgrund des großen Wasseranteils im Agar muss es in Wasser gelagert werden, sonst trocknet es aus. Diese Form der Lagerung führt zu einer begrenzten Haltbarkeit. Danach beginnt das Agar zu schimmeln. Damit werden sowohl die Probe als auch die Schnitte unbrauchbar. Da die Proben später im Vakuum des SIMS gemessen werden sollen, wurde die Vakuumstabilität getestet. Dazu wurde die Probe für zwei Tage im Vakuum der Gefriertrocknung gelassen. Durch das Vakuum wurde das Agar styroporähnlich und bröselig (Abb. 20). Damit ist dieses Einbettmedium nicht geeignet für Analysen mit der SIMS.

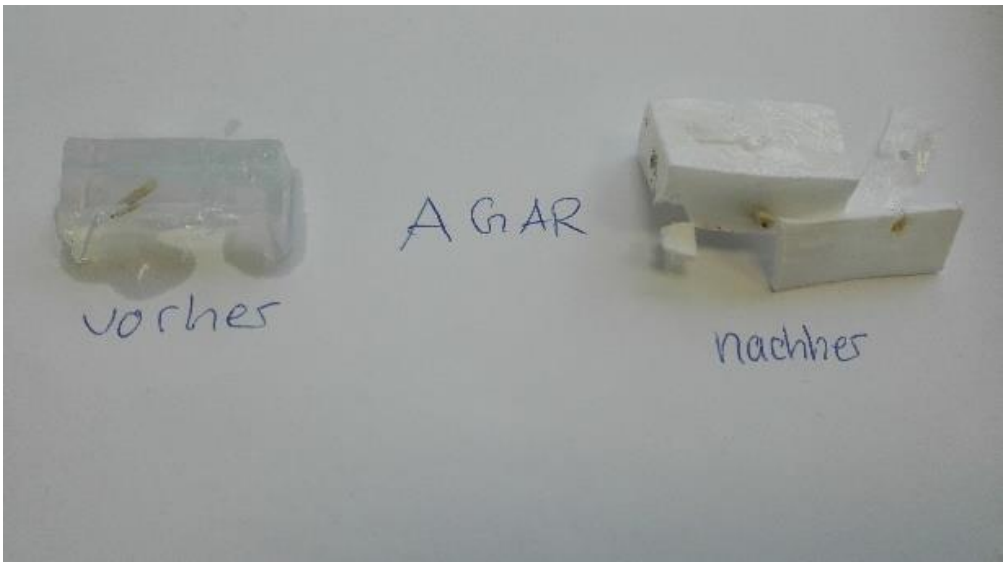

Abbildung 20: **Vakuumtest des Agars** links: Agar davor, rechts: Agar danach, Styroporähnlich, nicht geeignet für Messung in der SIMS

6.1.2 Probe in PEG

Nach dem Aushärten waren beide Proben nicht vollständig eingebettet (Abb. 21), sondern ließen sich mit dem Finger herausdrücken. Das könnte daran gelegen haben, dass die Dehydrierung nicht ausreichend war. PEG lässt sich nicht in Ethanol lösen, somit bildete das Ethanol eine Grenzschicht zwischen Karotte und PEG. Zudem wurde die Infiltrationsdauer zu stark reduziert, sodass das PEG nicht vollständig die Probe durchtränken konnte. Obwohl die Proben im PEG mechanisch nicht stabil waren, wurde die Schneidbarkeit überprüft. Dabei war festzustellen, dass das PEG zu porös und spröde war, um gute Schnitte zu produzieren. Das deutet darauf hin, dass die Abkühlung zu schnell ging und dass reines PEG 2000 zum Einbetten nicht geeignet ist. Der Test der Vakuumstabilität wurde für dieses Material ebenfalls in der Gefriertrocknung durchgeführt. Durch das Vakuum hat sich das PEG nicht verändert, Aussehen, Schneidbarkeit und Stabilität blieben unverändert. Deshalb würde sich PEG prinzipiell für Messungen im Vakuum eignen. Da die Ergebnisse nicht überzeugen konnten, wurde von einer Optimierung abgesehen und der Fokus auf ein erfolgversprechenderes Verfahren gelegt.

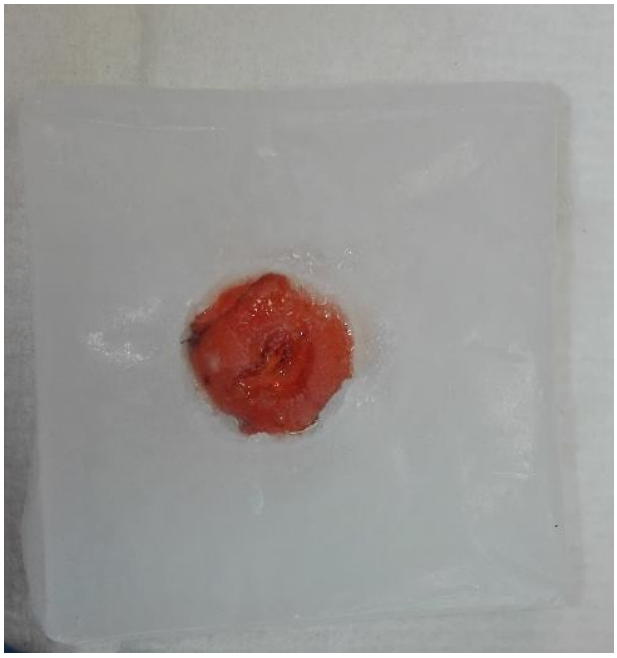

Abbildung 21: **Probe in PEG** eingebettet, die Ränder der Karotte sind kaum mit dem PEG verbunden

6.1.3 Probe in Epoxidharz

In der ersten Versuchsreihe wurde das Epoxidharz mit einem Verhältnis von Araldite : DDSA von 1:1 und 2 % DMP-30 angemischt und die frische Probe eingebettet. Nach drei Tagen bei 60 °C im Ofen wurden die Proben aus den Förmchen gelöst und auf ihre Schneidbarkeit geprüft. Auffällig war, dass sich die Probe an der Oberfläche des Harzes befand und dort auskristallisiert war (Abb. 22). Dennoch war die Probe fest eingebettet. Allerdings war das Epoxidharz zu hart, um mit dem Skalpell oder dem Mikrotom geschnitten zu werden.

Abbildung 22: **Karotte in Epoxidharz** Verhältnis 1:1, Probe schwimmt auf dem Harz und kristalliert an der Oberfläche

Daraufhin wurde das Verhältnis von Alraldite zu DDSA von 1:0,1 bis 1:1 variiert, um herauszufinden, ob es eine schneidbare Mischung gibt. In einem Verhältnisbereich von 1:0,4 bis 1:0,5 waren die fertigen Epoxidharzblöcke mit dem Skalpell und dem Mikrotom schneidbar. Ein Epoxidharzblock dieser Mischung wurde zwei Tage dem Vakuum der Gefriertrocknung ausgesetzt, um die Vakuumstabilität zu testen. Das Harz blieb durch das Vakuum unverändert und konnte deshalb für Messungen in der SIMS verwendet werden.

In den folgenden Experimenten wurde das Epoxidharz immer in einem Verhältnis von 1:0,5 angemischt.

Es wurden unter anderem Blätter, Frucht und Wurzeln von mit Europium getracerten Bohnen (getrocknet) sowie Karottenwurzeln (frisch) eingegossen. Besonders bei den frischen, aber auch bei den getrockneten Blättern bildeten sich Luftblasen um die Probe herum. Diese Luftblasen führen zu Problemen beim Schneiden, da der Schnitt sowohl beim Schneiden von Hand als auch mit dem Mikrotom an diesen Stellen abreißt. Die Wurzelproben der Bohne ließen sich besser schneiden, mit dem Mikrotom waren 300 µm dicke Schnitte problemlos möglich.

Betrachtet man diese Schnitte unter dem Mikroskop, so fällt auf, dass die Struktur der Wurzel überhaupt nicht erhalten blieb (Abb. 23). Zudem besitzt die Oberfläche des Schnitts starke Unebenheiten, sodass Abbildung 23 aus mehreren scharfen Einzelbildern zusammengesetzt werden musste.

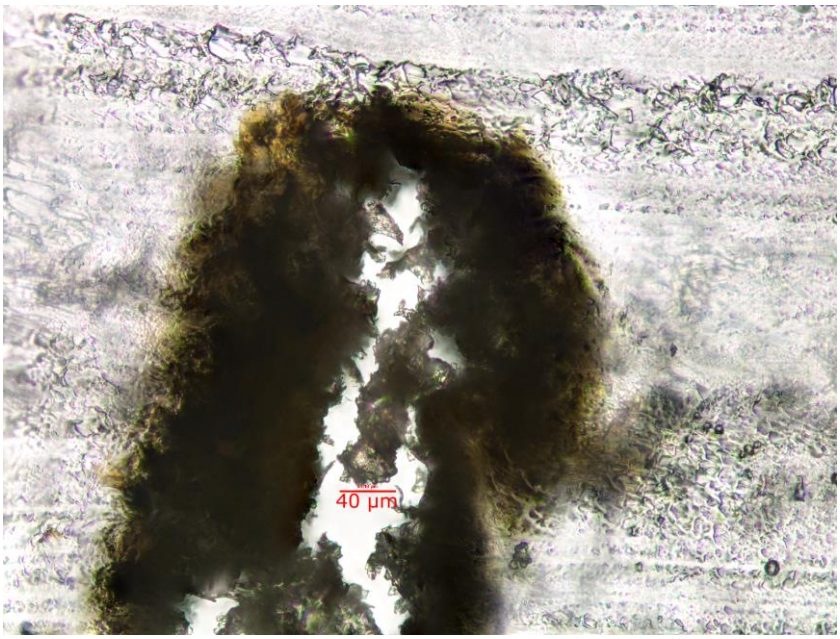

Abbildung 23: **Bohne in Epoxidharz** Die Struktur der Wurzel ist nicht mehr zu erkennen

Trotz der offensichtlichen Rauhigkeit der Oberfläche wurde dieser Schnitt mit der SIMS auf Europium untersucht.

Von den drei Einbettungsmaterialien ist das Epoxidharz am besten für SIMS-Analysen geeignet. Da die Struktur der Wurzel nicht erhalten bleibt und der Schnitt zusätzlich eine (für SIMS-Messungen) zu starke Topographie aufweist, wurde diese Methode aber durch die Kryo-Methode ersetzt.

6.1.4 Schnittdicke und Temperatur am Kryo-Mikrotom

Am Kryo-Mikrotom wurden die Schnittdicke und die Temperatur der Probe variiert, um eine gute Schnittqualität zu erreichen. Dabei gilt grundsätzlich, dass die Temperatur umso geringer sein muss, je dünner der Schnitt werden soll. Im Gegensatz zu den Handschnitten sind die Schnitte am Mikrotom viel ebener, dünner und gleichmäßiger reproduzierbar. Handschnitte benötigen viel Geschick, Erfahrung und Übung. Durch das Einfrieren der Probe bleibt die Struktur der Wurzel erhalten und die unterschiedlichen Gewebearten sind sowohl mit dem Mikroskop als auch mit der SIMS erkennbar. Je dicker der Schnitt (Schnittdicke größer 50 µm), umso geringer ist der Kontrast zwischen verschiedenen Zellen. Werden die Schnitte dünner (Schnittdicke kleiner 10 µm), dann wird das Gewebe beim Schneiden zum Teil schwer beschädigt, oder es sind keine Schnitte mehr möglich. Zur folgenden Charakterisierung der Schnitte wurde eine Legende erstellt (Abb. 24). Schnitt 1 ist 5 µm dick und wurde bei -30 °C geschnitten. Man erkennt, dass gar kein ganzer Schnitt entstanden ist, sondern nur Raspel und Späne, die Struktur der Wurzel wurde zerstört und der Schnitt ist nicht verwendbar. Grund für so ein Ergebnis ist eine zu hohe Schnitttemperatur oder wie in diesem Fall eine zu geringe Schnittdicke. Schnitt 2 hat eine Dicke von 20 µm und wurde bei -20 °C geschnitten. Dieser Schnitt wurde vom Schnittstrecker nicht ausreichend gestreckt, sodass er sich aufgerollt und umgeklappt hat. Dieser Schnitt lässt sich nicht auf einen Objektträger aufbringen und ist deshalb unbrauchbar. Rollt sich der Schnitt auf, so ist die Temperatur zumeist zu niedrig für die Schnittdicke. Das Aufrollen gibt es in unterschiedlich starken

Ausprägungen, so rollt sich manchmal nur der Rand ein bisschen auf und der Schnitt kann dann doch noch verwendet werden. Wenn die Temperatur optimal zur Schnittdicke eingestellt wurde, dann entsteht ein perfekter Schnitt, wie Schnitt 3. Dieser Schnitt wurde bei -5 °C geschnitten und war 50 µm dick. Solche Schnitte eignen sich hervorragend für die Analyse mit Mikroskop und SIMS. Bei Schnitt 4 sieht man die letzte Möglichkeit eines nicht nutzbaren Schnittes. Er wurde bei -5 °C geschnitten und ist 5 µm dick. Durch eine zu hohe Temperatur für diese Schnittdicke wurde der Schnitt beim Schneiden gestaucht. Taucht dieses Problem auf, so ist es oft der Fall, dass in einer Serie mehrerer Schnitte ein nutzbarer entsteht, aber nicht immer. Die in den Fotos gezeigten Schnitte stellen jeweils ein Extrem dar. In den meisten Schnitten sind diese Merkmale nicht so stark ausgeprägt oder zum Teil auch vermischt.

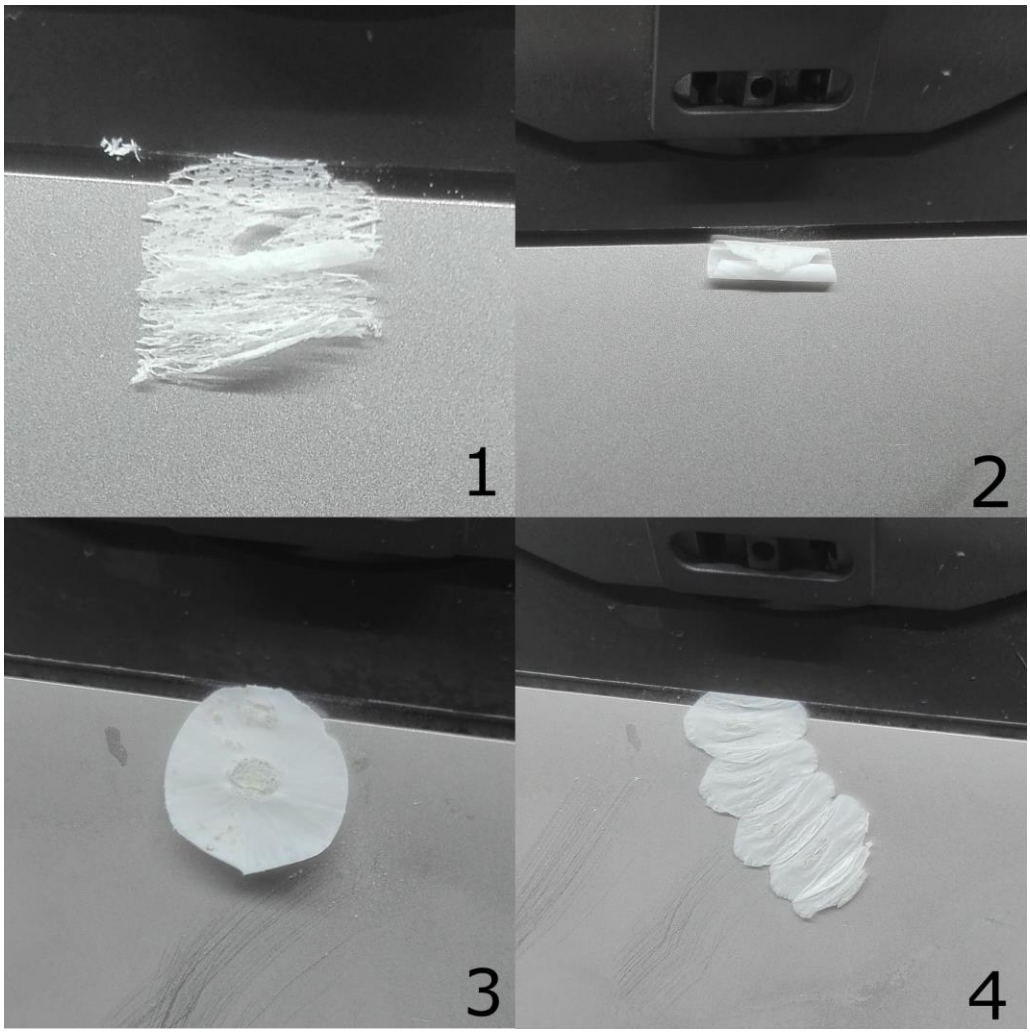

Abbildung 24: **Schnitte am Mikrotom** Unterschiedliche mechanische Eigenschaften abhängig von Temperatur und Schnittdicke **1)** Späne und Raspel (Temperatur zu hoch oder Schnitt zu dünn) **2)** Aufrollen und Umklappen des Schnittes (Temperatur zu niedrig) **3)** optimaler Schnitt, gut nutzbar **4)** Schnitt wird gestaucht (Temperatur zu hoch)

Im Folgenden wurde die optimale Temperatur für verschiedene Schnittdicken gesucht. Dazu wurden dünne Wurzeln eingegossen, geschnitten und mit dem Mikroskop die fertigen Schnitte angeschaut. Was allen Schnitten gemein ist, sind die Löcher im Gewebe, diese können beim Schneiden entstehen, sind aber größtenteils auf das Auftauen des Schnittes unterm Mikroskop zurückzuführen (Abb. 25). Auf dem oberen

Bild sind kaum Löcher erkennbar, während nach circa zwei Minuten der Wurzelquerschnitt mehr Löcher als intakte Gewebeteile aufweist. Das erschwert die genaue Zuordnung der unterschiedlichen Strukturen. Für die SIMS-Proben muss daher sichergestellt werden, dass sie nicht zwischendurch auftauen, beim Aufbringen auf die Kryo-Stage, beim Transport, etc.

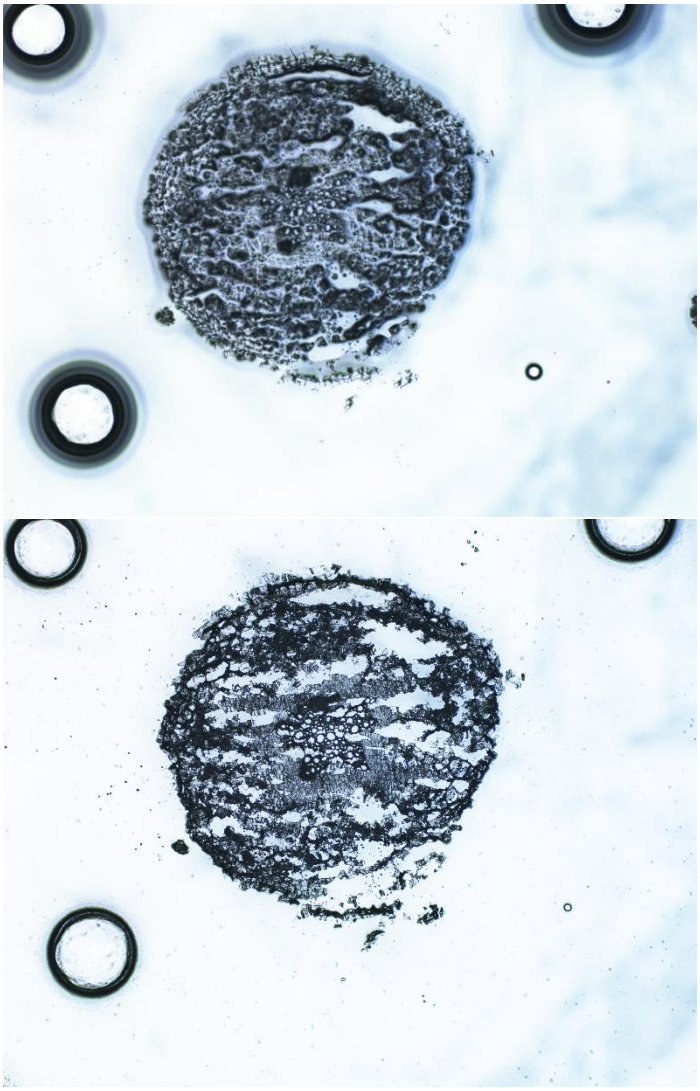

Abbildung 25 **Auftauen des Schnittes unterm Mikroskop** Oben: nach dem Schneiden, es sind kaum Löcher im Gewebe Unten: circa 2 Minuten später, Gewebe ist deutlich zerrissen

Die Schnittdicke der Karottenquerschnitte in Abbildung 26 beträgt 10 µm und die Vergrößerung ist 100-fach. Grundsätzlich gilt für diese Schnittdicke, dass sie zu gering ist, um genügend Informationen über die Strukturen in der Wurzel zu liefern.

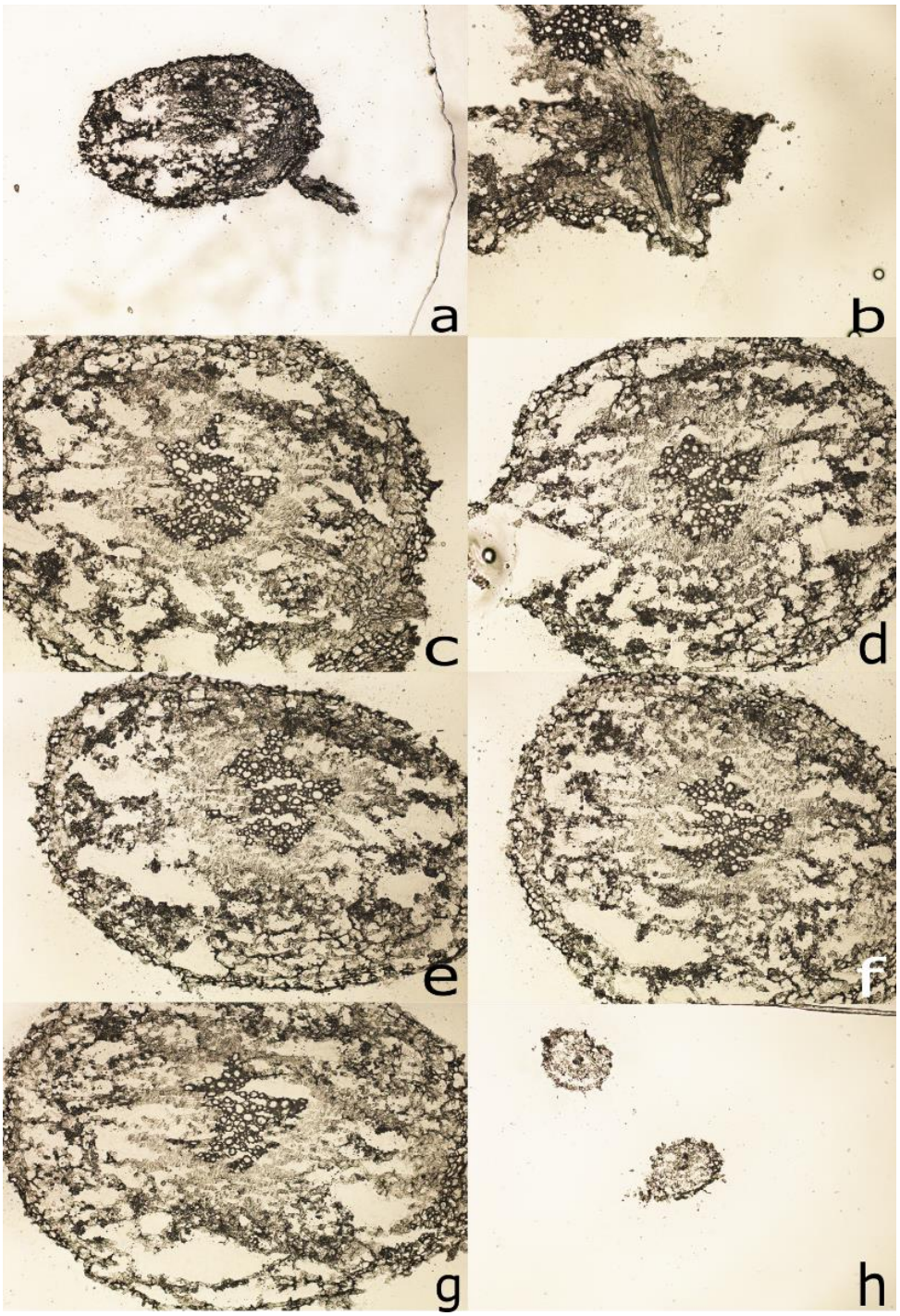

Abbildung 26: **Karottenwurzel** 10 µm, 10 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -15 °C (d) -16 °C; bestes Ergebnis (e) -18 °C (f) -20 °C (g) -25 °C (h) -30 °C

Tabelle 3: Schneideeigenschaften der Karottenwurzel bei 10 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen

Abbildung	Temperatur	Schneideeigenschaften
a	-5 °C	Es entstehen Späne beim Schneiden, nicht nutzbar
b	-10 °C	Es entstehen Späne beim Schneiden, nicht nutzbar
c	-15 °C	Lässt sich gut schneiden und auf Objektträger aufbringen
d	**-16 °C**	**Leichtes Aufrollen, bestes Ergebnis**
e	-18 °C	Schneidegeschwindigkeit bestimmt Aufrollen vs. Stauchen des Schnitts
f	-20 °C	Schnitt rollt sich stark auf, viele Schnitte, bis ein nutzbarer entsteht
g	-25 °C	Schnitt rollt sich auf wie bei -20 °C
h	-30 °C	Schnitt reißt und ist gestaucht

Tabelle 3 stellt die Schneideeigenschaften in Abhängigkeit der Schneidetemperatur für 10 µm dicke Schnitte dar. Es gab bei jeder Temperatur Schwierigkeiten beim Schneiden. Ist die Temperatur zu hoch, wie bei -5 °C und -10 °C, so entstehen beim Schneiden Späne (vgl. Abb. 24, Bild 1). Dies ist auch in den Bildern a und b der Abbildung 26 erkennbar, die Schnitte sind unförmig und die Strukturen der Karottenwurzel nicht definierbar. Bei -15 °C und -16 °C ließ sich die Probe sehr gut schneiden und die Schnitte wurden kaum gestaucht. Die unterschiedlichen Strukturen in der Wurzel sind in c und d der Abbildung 26 leicht zu bestimmen. Bei tieferen Temperaturen (e bis f, Abb. 26) werden die Schnitte beim Schneiden stark gestaucht (vgl. Abb. 24 Bild 4). Es wurden Schnittserien hergestellt, in welchen erst der fünfte oder sechste Schnitt verwendbar war, dennoch ist die Stauchung deutlich in den Mikroskopie-Bildern zu sehen.

Am Ende lässt sich sagen, dass die optimale Schneidetemperatur für 10 µm-Schnitte -16 °C beträgt.

Die in Abbildung 27 gezeigten Karottenquerschnitte wurden 50-fach vergrößert und besitzen eine Dicke von 14 µm. Allerdings ist diese Schnittdicke ebenfalls zu gering, um die Strukturen der Wurzel klar dazustellen.

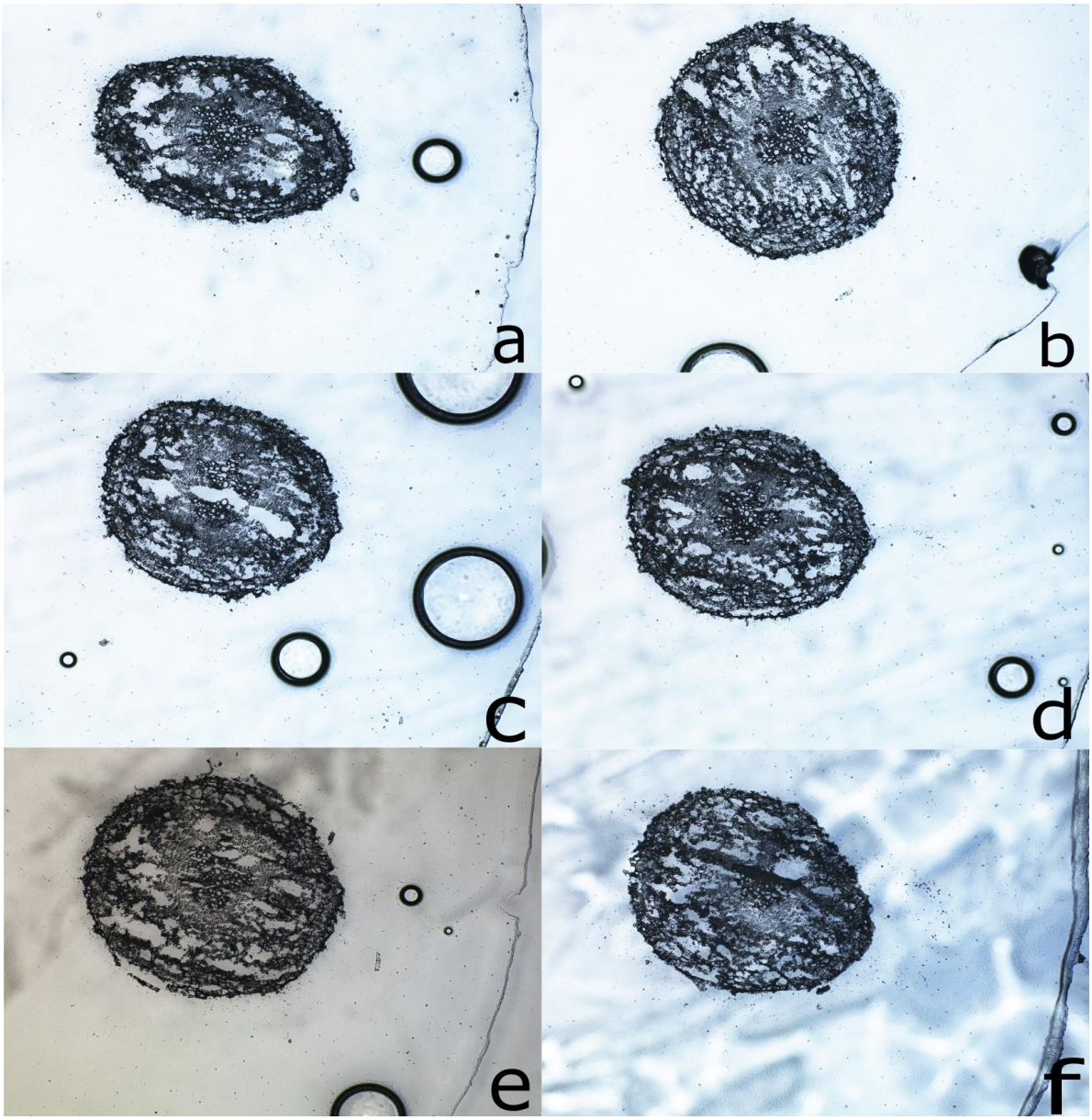

Abbildung 27: **Karottenwurzel** 14 µm, 5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -12 °C; bestes Ergebnis (d) -16 °C (e) -20 °C (f) -30 °C

Tabelle 4: Schneideeigenschaften der Karottenwurzel bei 14 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen

Abbildung	Temperatur	Schneideeigenschaften
a	-5 °C	Starke Stauchung des Schnitts, schwer den Schnitt auf Objektträger zu bekommen
b	-10 °C	Rollt sich etwas auf, aber nicht so stark wie -16 °C
c	**-12 °C**	**Jeder Schnitt nutzbar, kaum Aufrollen**
d	-16 °C	Viele Schnitte gestaucht, Schnitte rollen sich auf
e	-20 °C	Starkes Aufrollen/ Umklappen der Schnitte, erst nach einigen Versuchen entsteht nutzbarer Schnitt
f	-30 °C	Aufrollen und Umklappen beim Schneiden, kein Schnitt verwendbar

In Tabelle 4 sind die Schneideeigenschaften der 14 µm dicken Schnitte in Abhängigkeit von der Schneidetemperatur dargestellt. Für diese Schnittdicke ist eine Temperatur von -5 °C zu hoch. Die Schnitte werden beim Schneiden stark gestaucht, es ist schwierig, diese Schnitte auf den Objektträger aufzubringen und die Stauchung ist auch deutlich in der Probe (Abb. 27a) zu erkennen. Bei -10 °C und -16 °C rollt sich der Schnitt am Rand etwas auf, ist aber dennoch verwendbar und liefert ein gutes Ergebnis unter dem Mikroskop (Abb. 27b und d). Allerdings ist der Schnitt bei -10 °C weniger gestaucht und damit besser. Die Schnitte in Abbildung 27c wurden bei -12 °C gemacht. Es enstanden perfekte Schnitte (vgl. Abb. 24 Bild 3) am Mikrotom. Bei Temperaturen von -20 °C und -30°C klappen die Schnitte um und rollen sich auf (vgl. Abb. 24 Bild 2). Es ist schwierig, Schnitte auf den Objektträger zu applizieren und nur nach Schnittserien ensteht ein verwendbarer Schnitt. Zudem sind diese Schnitte gestaucht, wie in Abbildung 26e und f zu erkennen ist.

Das beste Ergebnis unter dem Mikroskop und auch beim Schneiden bei 14 µm liefert eine Schneidetemperatur von -12 °C.

Die folgende Abbildung 28 zeigt Querschnitte einer Erbsenwurzel bei 50-facher Vergrößerung und einer Schnittdicke von 20 µm. Diese Schnittdicke ist optimal für Analysen am Mikroskop und an der SIMS, da die verschiedenen Strukturen gut zu unterscheiden sind und genügend Material zur Analyse mit der SIMS vorhanden ist.

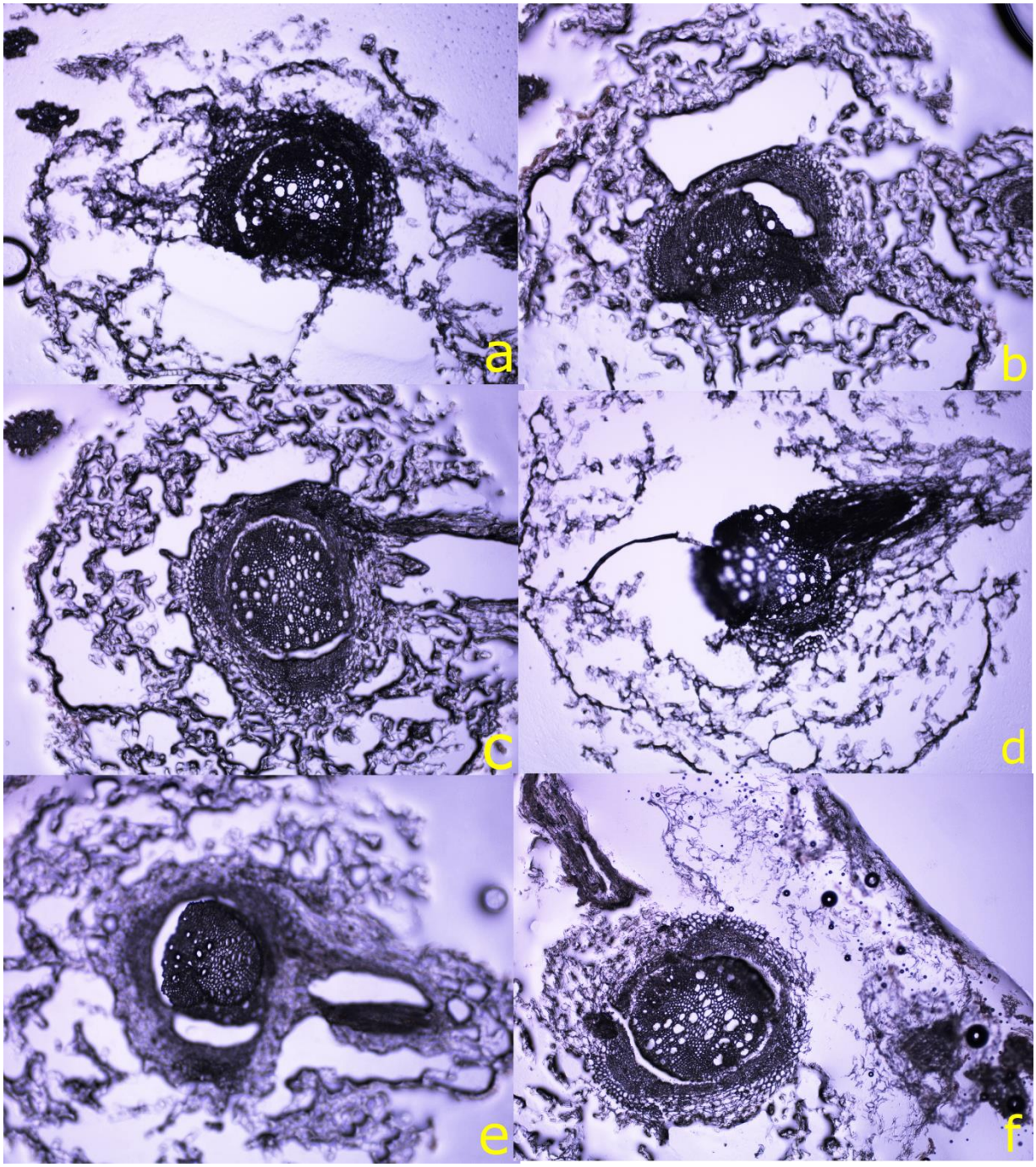

Abbildung 28: **Erbsenwurzel** 20 µm, 5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -15 °C; bestes Ergebnis (d) -18 °C (e) -20 °C (f) -30 °C

Tabelle 5: Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel bei 20 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen

Abbildung	Temperatur	Schneideeigenschaften
a	-5 °C	Schnitte rollen sich auf, schwer, einen guten Schnitt zu bekommen
b	-10 °C	Am Ende etwas krümelig
c	**-15 °C**	**Optimaler Schnitt**
d	-18 °C	Schnitt klappt um
e	-20 °C	Schnitt optimal, aber beim Aufbringen auf Objektträger starkes Aufrollen, Schnitt wird dadurch oft unbrauchbar
f	-30 °C	Aufrollen und Umklappen, nicht nutzbar

Die Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel bei einer Schnittdicke von 20 µm bei unterschiedlichen Temperaturen sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Temperatur von -5 °C ist für diese Schnittdicke unpassend, da sich alle Schnitte aufrollen und es schwierig war, einen nutzbaren Schnitt auf den Objektträger aufzubringen. In Abbildung 28a ist das Aufrollen deutlich an den dunklen Flecken in der Mitte zu sehen, insbesondere im Vergleich zu Abbildung 27c. Bei -10 °C enstanden am Rand Späne, da aber die Probe in der Mitte eingebettet war, waren die Schnitte trotzdem verwendbar, allerdings, wie das Mikroskopie-Bild (Abb. 28b) zeigt, nicht optimal. Der perfekte Schnitt dieser Schnittdicke entstand bei einer Schneidetemperatur von -15 °C. Jeder Schnitt am Mikrotom war nutzbar und am Mikroskop sind die Strukturen der Wurzel gut zuzuordnen (Abb. 28c). Tiefere Temperaturen ab -18 °C führen am Mikrotom zum Aufrollen und Umklappen der Schnitte, zum Teil tritt dieses Phänomen erst auf, wenn der Schnittstrecker angehoben wird, um den Schnitt auf den Objektträger zu applizieren. Entsprechend schlecht sind die Ergebnisse unter dem Mikroskop (Abb. 28d bis f).

Da die Schnittdicke von 20 µm optimal für die folgenden Analysen ist, wurden alle Schnitte für die SIMS mit ebendieser Dicke und der ermittelten perfekten Temperatur von -15 °C hergestellt.

Abbildung 29 zeigt die Mikroskopie-Bilder der Erbsenwurzel mit einer Schnittdicke von 50 µm und 50-facher Vergrößerung. Allgemein ist festzustellen, dass diese Schnittdicke zu dick ist, um das Wurzelgewebe klar erkennen zu können. Besonders die Zellen des Zentralzylinders und die direkt daneben sind kaum zu unterscheiden. Beim Auftauen entstehen Zellklumpen, die die vormals ebene Schnittoberfläche unregelmäßig machen. Für Analysen in der SIMS ist diese Schnittdicke nicht optimal.

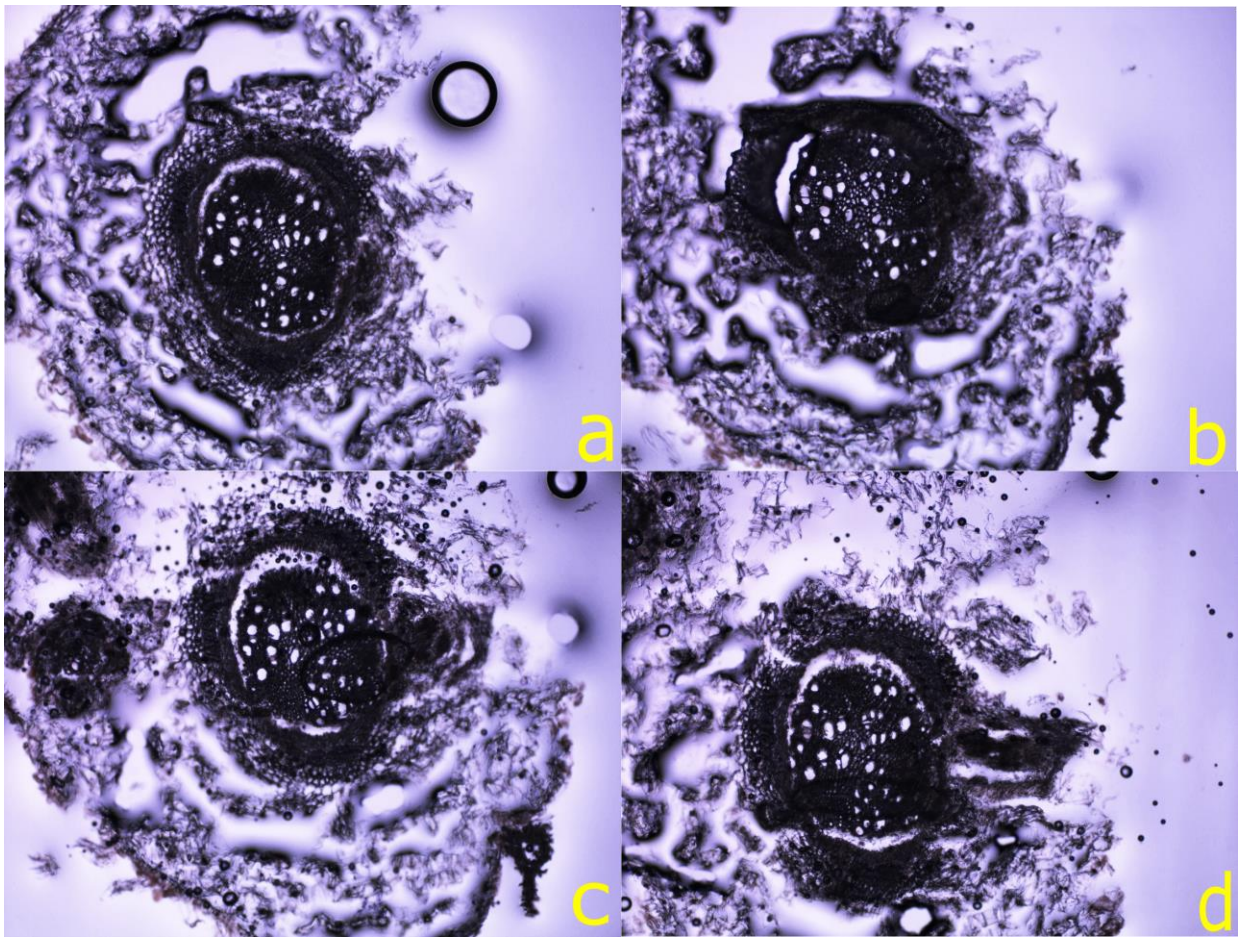

Abbildung 29: **Erbsenwurzel** 50 µm, 5 X (a) -10 °C; bestes Ergebnis (b) -15 °C; bestes Ergebnis (c) -20 °C (d) -30 °C

Tabelle 6: Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel bei 50 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen

Abbildung	Temperatur	Schneideeigenschaften
	-5 °C	Nicht schneidbar, Probe löst sich vom Probenhalter, zu dick und zu warm!
a	**-10 °C**	**Analog zu -15 °C**
b	**-15 °C**	**Optimaler Schnitt, kein Aufrollen**
c	-20 °C	Analog zu -30 °C, aber Aufrollen nicht so stark
d	-30 °C	Grundsätzlich nutzbarer Schnitt, rollt sich aber auf, sobald der Schnittstrecker hoch geklappt ist

Tabelle 6 stellt die Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel in Abhängigkeit von der Schneidetemperatur bei einer Schnittdicke von 50 µm dar. Während die Mikroskopie-Bilder (Abb. 29) für alle Temperaturen nahezu identisch sind, unterscheiden sich die Schnitte stark in ihrer Herstellung. Bei -5 °C war es unmöglich, die Probe zu schneiden, da die Schnittdicke zu groß war und die Probe dem mechanischen Druck durch das Messer nicht standhalten konnte und sich vom Probenhalter löste. Bei 10 °C und -15 °C war die Probe sehr gut zu schneiden und die entstandenen Schnitte zeigen sehr klar die unterschiedlichen Strukturen der Wurzel. Durch die Dicke der Schnitte ist es aber schwierig, das komplette Bild scharf zu stellen, da sich verschiedene Ebenen bilden, das starre Gewebe des Zentralzylinders ist topographisch höher als die wasserhaltige Wurzelrinde, die beim Auftauen und Trocknen schrumpft. Bei Temperaturen von -20 °C und -30 °C rollt sich der Schnitt nach dem Schneiden beziehungsweise nach dem Anheben des Schnittstreckers auf und wird in den meisten Fällen unbrauchbar.

Ein gutes Schneideergebnis ergibt sich für Schneidetemperaturen von -10 °C und -15 °C.

Zum Abschluss wurde der Einfluss der Probenart (Wurzel oder Frucht) auf die optimale Schneidetemperatur untersucht. Dafür wurden statt von einer dünnen Wurzel Schnitte vom Fruchtkörper einer Karotte hergestellt. Aufgrund der größeren Fläche der Probe und einem daraus resultierenden anderen Kleber-zu-Probe-Verhältnis wurde eine andere optimale Temperatur erwartet. Die in Abbildung 30 gezeigten Karottenquerschnitte sind 20 µm dick und 50-fach vergrößert. Zum Vergleich: Die optimale Schneidetemperatur für die dünne Wurzel bei 20 µm beträgt -15 °C.

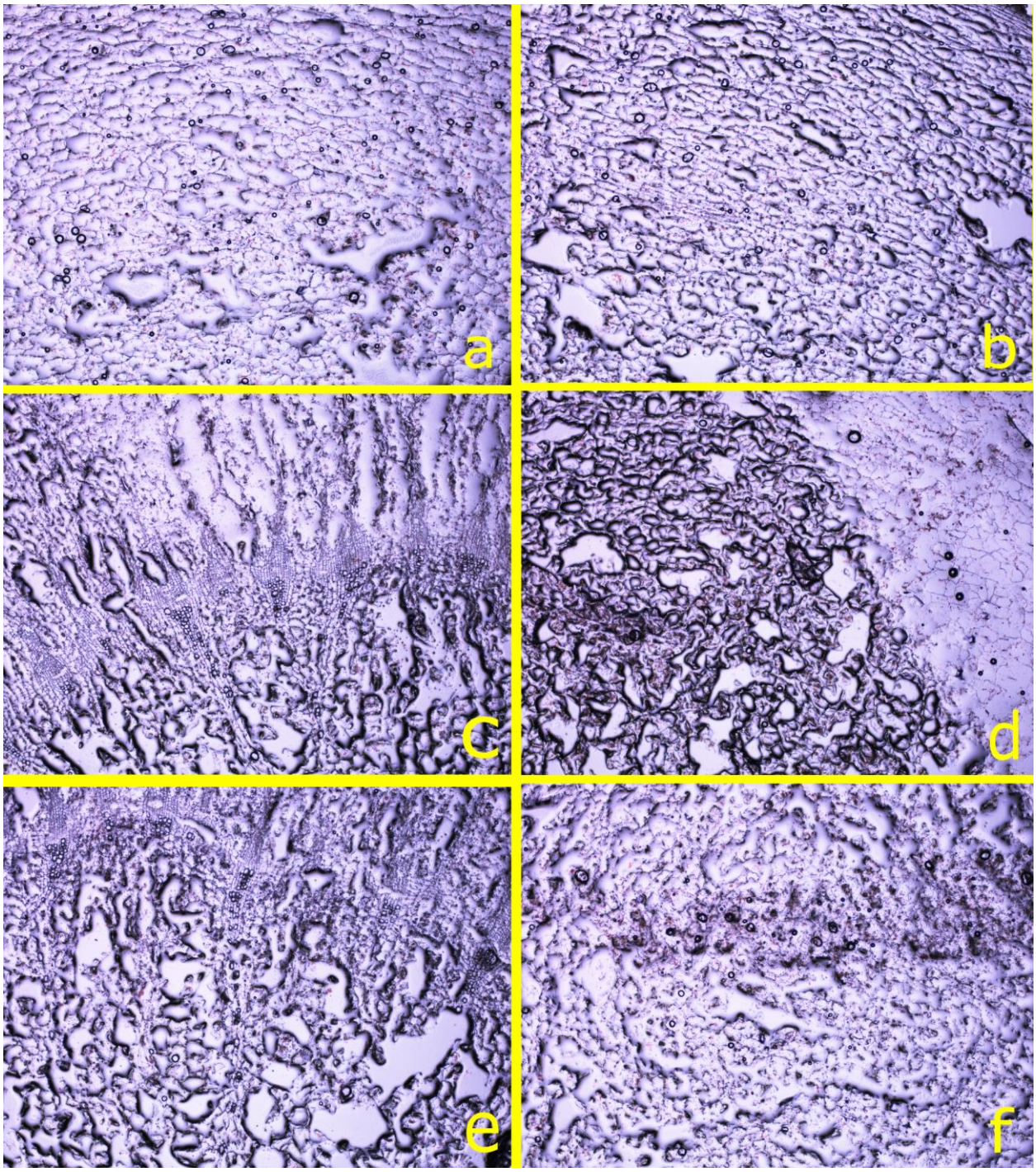

Abbildung 30: **Karotten Fruchtkörper** 20 µm,5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -14 °C (d) -15 °C; bestes Ergebnis (e) -20 °C (f) -30 °C

Tabelle 7: Schneideeigenschaften der Karotte bei 20 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen

Abbildung	Temperatur	Schneideeigenschaften
a	-5 °C	Schnitt ist instabil, dehnt sich, geht beim Aufbringen auf das Glas kaputt
b	-10 °C	2. Schnitt gut
c	-14 °C	Genauso wie -15 °C
d	**-15 °C**	**1. Schnitt nutzbar**
e	-20 °C	2. Schnitt nutzbar
f	-30 °C	Schnitte rollen sich auf

Tabelle 7 zeigt die Schneideeigenschaften des Karottenfruchtkörpers bei einer Schnittdicke von 20 µm in Abhängigkeit von der Schneidetemperatur. Aufgrund der Größe der Probe ist auf den Mikroskopie-Bildern nur ein Ausschnitt des Karottenquerschnitts zu sehen (Abb. 30), dieser Ausschnitt ist nicht immer derselbe, so zeigen die Bilder a, b und f die Wurzelrinde; c und d den Übergang zwischen Wurzelrinde und Zentralzylinder mit der Endodermis in der Mitte; und e zeigt den Zentralzylinder der Wurzel. Durch das Auftauen des Schnitts sind auch in diesen Bildern Löcher zu sehen. Die Größe der Probe führt dazu, dass die Schnitte sehr instabil sind und schnell zerreißen und zerbröseln. Besonders stark tritt dieser Effekt bei -5 °C auf. Am stabilsten ist der Schnitt bei -14 °C und -15 °C, diese Schnitte lassen sich leicht auf den Objektträger aufbringen. Bei -10 °C und -20 °C entstehen nach einigen Versuchen in Schnittserien ebenfalls verwendbare Schnitte. Nur bei -30 °C wird ein starkes Aufrollen des Schnittes beobachtet, weshalb es schwierig war, einen verwendbaren Schnitt herzustellen.

Grundsätzlich ist bei dieser Probe keine große Temperaturabhängigkeit zu beobachten. Sehr gute Schnitte entstehen bei -15 °C, aber die Unterschiede auf den Mikroskopie-Bildern sind minimal.

6.2 Ergebnisse ICP-MS

Die Europium-Konzentrationen der getracerten Pflanzen liegen oberhalb der Nachweisgrenze (Anhang: Kapitel 11.3). Sie wurden mit Hilfe der Geradengleichung der jeweiligen Kalibriergeraden berechnet (Kapitel 4.2.1). Die Geradengleichung für ^{151}Eu lautet:

$$Count\ ratio = 26{,}594 \frac{1}{ppb} * Konzentration - 0{,}3318 \tag{10}$$

Umgestellt nach der Konzentration ergibt sich folgende Formel:

$$Konzentration\ (^{151}Eu) = \frac{Count\ ratio + 0{,}3318}{26{,}594\, {}^{1}/_{ppb}} \tag{11}$$

Diese berechneten Konzentrationen werden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die ursprüngliche Konzentration in der Pflanze zu erreichen. Die Ergebnisse sind in der ersten Spalte der Tabelle 8 dargestellt.

In der zweiten Spalte dieser Tabelle steht der Massenanteil berechnet mit der Formel:

$$Massenanteil\ ^{151}Eu = \frac{(Count\ ratio\ der\ Probe + 0{,}3318)}{26{,}594 \frac{1}{ppb}} \tag{12}$$

Der Vertrauensbereich in der dritten Spalte der Tabelle wurde mit der Methodenvalidierung nach DIN32645 berechnet. Dazu wurde zunächst die Reststandardabweichung

$$SD_y = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} * \left[\sum(y-\bar{y})^2 - \frac{[\sum(c-\bar{c}) * (y-\bar{y}]^2}{\sum(c-\bar{c})^2}\right]} \tag{13}$$

mit n= Anzahl der Standards = 5, y = Count ratio und c = Konzentration,

die Abweichung der Steigung:

$$c_{Abw} = \sqrt{\frac{{SD_y}^2}{\sum(c-\bar{c})^2}} \tag{14}$$

und der Mittelwert der Count ratios:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i}{n} \tag{15}$$

bestimmt.

Daraus ergibt sich dann der Vertrauensbereich:

$$Vb_i = \frac{SD_y}{m} * t_{f_{1;P}} * \sqrt{\frac{1}{n} + 1 + {c_{Abw}}^2 * \frac{(y_i - \bar{y})^2}{m^2 * {SD_y}^2}} \tag{16}$$

Mit $\mathrm{m} = 26{,}594\ {}^{1}/_{ppb}$ und $t_{f_{1;P}}$ dem 95% Vertrauensniveau.

Analog für ^{153}Eu:

Die Geradengleichung lautet:

$$Count\ ratio = 29{,}823 \frac{1}{ppb} * Konzentration - 0{,}4427 \tag{17}$$

Umgestellt nach der Konzentration ergibt sich folgende Formel:

$$Konzentration\ (^{153}Eu) = \frac{Count\ ratio + 0{,}4427}{29{,}823\ ^{1}/_{ppb}} \tag{18}$$

Diese berechneten Konzentrationen werden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die ursprüngliche Konzentration in der Pflanze zu erreichen. Die Ergebnisse sind in der vierten Spalte der Tabelle 8 dargestellt.

In der fünften Spalte dieser Tabelle steht der Massenanteil berechnet mit der Formel:

$$Massenanteil\ ^{153}Eu = \frac{(Count\ ratio\ der\ Probe + 0{,}4427)}{29{,}823 \frac{1}{ppb}} \tag{19}$$

Der Vertrauensbereich in der sechsten Spalte der Tabelle wurde mit der Methodenvalidierung nach DIN32645 berechnet:

$$Vb_i = \frac{SD_y}{m} * t_{f_{1;P}} * \sqrt{\frac{1}{n} + 1 + c_{Abw}{}^2 * \frac{(y_i - \bar{y})^2}{m^2 * SD_y{}^2}} \tag{20}$$

Mit $\mathrm{m} = 29{,}823\ ^{1}/_{ppb}$ und $t_{f_{1;P}}$ dem 95% Vertrauensniveau.

Tabelle 8: Europium-Konzentrationen der Erbsenteile, Massenanteil und Vertrauensbereich

	^{151}Eu			^{153}Eu		
Probenart	**Konzentration mg/g**	**Massen-anteil**	**Vertrauens-bereich**	**Konzentration mg/g**	**Massen-anteil**	**Vertrauens-bereich**
Blatt Kontrolle	0,3	0,014	0,068	0,3	0,017	0,073
Blatt 5mmol	29,8	0,172	0,068	32,9	0,173	0,073
Blatt 10mmol	31,6	0,153	0,068	34,4	0,152	0,073
Wurzel 5mmol	68,0	0,115	0,068	74,4	0,116	0,073
Wurzel 10mmol	86,3	0,103	0,068	94,9	0,104	0,073
Wurzel Kontrolle	0,6	0,014	0,068	0,6	0,016	0,073
Wurzel Kontrolle	1,1	0,025	0,068	1,2	0,027	0,073
Wurzel 5mmol	67,4	0,104	0,068	73,9	0,105	0,073
Blatt 5mmol	4,7	0,189	0,068	5,1	0,187	0,073

In Tabelle 8 sind die Messergebnisse der ICP-MS-Messung dargestellt. Die Wurzel akkumuliert mit 86,3 mg/g mehr als doppelt so viel Europium als die Blätter der Erbse mit 31,6 mg/g. Bei der Verdopplung des Tracers von 5 mmol/L auf 10 mmol/L wurde keine Verdopplung der Europium-Konzentration in der Wurzel gemessen.

Aus den bestimmten Konzentrationen lässt sich das Isotopenverhältnis bestimmen.

Tabelle 9: Berechnung der Isotopenverhältnisse

Proben-art	Gemes-sen ^{151}Eu	Gemes-sen ^{153}Eu	Verhältnis ^{151}Eu	Verhältnis ^{153}Eu	Unsicher-heit ^{151}Eu	Unsicher-heit ^{153}Eu	Überein-stimmung
Blatt Kontrolle	0,05	0,06	0,468	0,532	0,266	0,288	Ja
Blatt 5mmol	4,25	4,73	0,473	0,527	0,007	0,008	Ja
Blatt 10mmol	3,74	4,09	0,478	0,522	0,009	0,009	Ja
Wurzel 5mmol	2,72	3,00	0,475	0,525	0,012	0,013	Ja
Wurzel 10mmol	2,40	2,67	0,473	0,527	0,013	0,014	Ja
Wurzel Kontrolle	0,03	0,04	0,472	0,528	0,312	0,338	Ja
Wurzel Kontrolle	0,34	0,37	0,479	0,521	0,080	0,086	Ja
Wurzel 5mmol	2,42	2,69	0,474	0,526	0,013	0,014	Ja
Blatt 5mmol	4,70	5,13	0,478	0,522	0,007	0,007	Ja

Für weitere Berechnungen wurden nur die mit Europium getracerten Proben betrachtet, nicht die Kontrollen. Aus den Ergebnissen (Tab. 9) lässt sich für diese ein mittleres Isotopenverhältnis von (47,5±1,0) % ^{151}Eu zu (52,4±1,1) % ^{153}Eu berechnen. Für alle Proben gilt, dass sie im Rahmen der Messunsicherheiten mit dem Literaturwert übereinstimmen.

6.3 Ergebnisse Laserablation

Bei der Laserablation-ICP-MS wurden zum einen die beiden Europiumisotope ^{151}Eu und ^{153}Eu als auch das Phosphorisotop ^{31}P gemessen. Da Phosphor das einzige Makroelement der Pflanze ist, welches mit der LA-ICP-MS gemessen werden kann, wurde es mitbestimmt, um einen Vergleichswert für das Europium-Signal zu bekommen, der möglicherweise Rückschlüsse auf das Verhalten des Europiums in der Pflanze gibt. Durch dieses ortsaufgelöste Verfahren konnten Ionenkarten des Wurzelquerschnitts der Erbse erstellt werden (Abb. 31b-d).

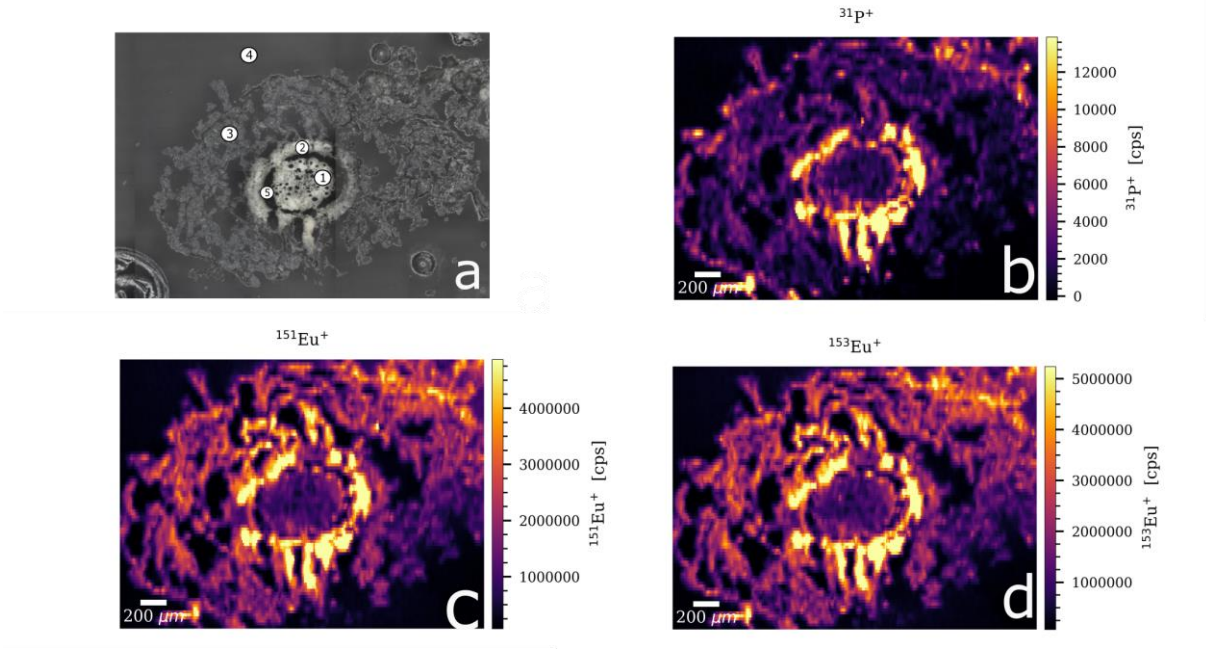

Abbildung 31: **Ergebnisse der Laserablation** (a) Mikroskopie-Bild ① Zentralzylinder ② Endodermis ③ Wurzelrinde ④ Kryo-Kleber ⑤ Löcher durch das Auftauen (b) Phosphor-Signal (c) & (d) Europium-Signale, deutlich erkennbar ist die Häufung am Übergang Wurzelrinde und Zentralzylinder

Die untersuchte Probe war circa 2mm x 3mm groß und stammte aus dem oberen Teil der Wurzel, kurz vor dem Übergang zum Stiel. Im Kamerabild (Abb. 31a) sind deutlich die unterschiedlichen Strukturen zu erkennen. Wesentlich dabei ist der Unterschied zwischen dem Zentralzylinder mit den Leitungsbahnen in der Mitte (hell, ①), der Endodermis (heller Ring um den Zentralzylinder, ②) und dem Gewebe der Wurzelrinde (hellgrau, ③). Deutlich sichtbar sind wieder die Löcher (schwarz, ⑤) durch das Auftauen und Trocknen und der Kryo-Kleber (dunkelgrau, ④) um die Wurzel herum. In den Ionenbildern werden die Unterschiede zwischen Wurzelzellen und Kleber beziehungsweise Löchern noch deutlicher, da letztere weder Phosphor noch Europium enthalten und deshalb schwarz erscheinen. Die Wurzel weist Stellen mit einer erhöhten Phosphor-Konzentration auf, diese befinden sich am Rand der Wurzel, also der Rhizodermis und besonders stark an der Endodermis. Dort befindet sich ebenfalls ein Großteil des aufgenommenen Europiums (Abb. 31c, d). Wie schon in Kapitel 2 erläutert, bildet die Endodermis eine Schutzmembran um den Zentralzylinder und verhindert die unkontrollierte Ionenaufnahme. Verfolgt man nun den Weg des Europiums aus der Nährlösung in die Pflanze, so ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, nach dem das Europium im Apoplasten aufgenommen wurde. Zum einen kann es direkt über

Kanalproteine durch das Plasmalemma in die Zelle aufgenommen werden. Wird es dort von der Pflanze als Schwermetall identifiziert, so wird es im Phytochelatin-Komplex gebunden und in der Vakuole gespeichert. Dieser Weg lässt sich in den Ionenbildern (Abb. 31c, d) an den geringen Europium-Konzentrationen in der Wurzelrinde erkennen. Da es keine speziellen Europium-Kanäle zur spezifischen Aufnahme des Europiums in die Pflanze gibt, gelangt es nur in geringen Mengen als Fremdionen in die Zellen der Wurzelrinde. Zum anderen kann das Europium durch apoplastische Verbindungen zwischen den Zellen weiter ins Innere der Wurzel transportiert werden. In diesem Fall bildet dann die Endodermis eine unüberwindbare Schranke, wodurch sich das Europium hier besonders stark akkumuliert. Dem Ionenbild zur Folge ist dieser Weg der wahrscheinlichste, denn das Ionensignal ist in der Endodermis mindestens fünfmal höher als in der Wurzelrinde. Der Grund dafür ist, dass dieser Weg höchst unselektiv ist, sodass einzig der Diffusionsgradient für die Aufnahme und Weiterleitung verantwortlich ist.

6.4 SIMS-Messung

Für die Messungen an der SIMS wurden die Proben auf drei verschiedene Arten vorbereitet. Zu Beginn wurde die in Epoxidharz eingebettete Bohne untersucht. Dabei wurde zwar Europium in der Pflanze nachgewiesen, allerdings konnten aufgrund der zerstörten Struktur (Abb.: 23) keine genaueren Aussagen über Aufnahme- und Transportweg getroffen werden. Zudem gab es aufgrund der starken Topographie der Probe Schwierigkeiten, die Organik-Peaks von den Europium-Peaks zu unterscheiden.

In Folge dessen wurde das bereits beschriebene Kryo-Mikrotom angeschafft, um ebenere Schnitte herstellen zu können und um die Struktur der Wurzel besser zu erhalten. Diese Methode ist sehr erfolgversprechend, wie es anhand der Mikroskopie-Bilder erkennbar ist (u.a. Abb.: 31). Die Struktur der Wurzel bleibt erhalten und die unterschiedlichen Gewebe sind eindeutig identifizierbar. Durch die glatte Oberfläche der Schnitte sind die Peaks im Spektrum wesentlich schmaler als bei der Epoxidharzmethode. Dadurch ließ sich das Europium-Signal leichter als solches identifizieren.

Am Ende wurde noch ein Schnitt des Kryo-Mikrotoms auf einem Aluminiumblock aufgebracht und am Backmount befestigt. Die Verwendung des Backmounts an Stelle der Kryo-Stage stellt eine Vereinfachung des Messvorgangs dar und sollte deshalb kurz getestet werden. Auch bei dieser Methode wurde Europium in der Pflanze gefunden.

Die folgenden zwei Kapitel behandeln die Analyse und Interpretation der Spektren und der Ionenbilder.

6.4.1 Analyse der Spektren

Bei der Analyse der Spektren werden die relevanten Peaks (zum Beispiel: H^+, Na^+, Ca^+, P^+, Eu^+, EuO^+, $EuOH^+$) ausgewählt und neben ihrer Fläche werden auch Auflösung, Untergrund und das m/z-Verhältnis des Peakmaximums bestimmt. Bei den untersuchten Proben befinden sich auf fast jedem m/z-Verhältnis Einzel- oder Doppelpeaks. Um bei den Dopppelpeaks auf den m/z-Verhältnissen von Europium, Europiumoxid und Europiumhydroxid eindeutig zwischen diesen Ionen und den Peaks der Organik unterscheiden zu können, wurden verschiedene Methoden angewendet. Zum einen stellt die Messsoftware eine Suchfunktion für Ionen zu Verfügung, die das exakte m/z-Verhältnis des jeweiligen Ions im Massenspektrum anzeigt. Dieses theoretische m/z-Verhältnis wird dann mit dem Wert des Peakmaximums verglichen. Zum anderen werden in den Ionenbildern die Herkunft eindeutiger Organik-Peaks wie CH^+, CH_2^+, CH_3^+ mit der Herkunft der Ionen der Doppelpeaks verglichen. Im Optimalfall kommt genau einer dieser zwei Peaks von denselben Stellen wie CH^+, CH_2^+, CH_3^+, und der andere Peak von anderen Stellen in der Probe, was daraufhin deutet, dass es sich bei ihm um eine Europiumspezies handelt. Die Massenauflösung der Peaks des Spektrums lässt sich durch die Nutzung der GCIB verbessern. Diese ebnet die Oberfläche der Probe, was zu geringeren Flugzeitunterschieden gleicher Ionen führt und damit zu schmaleren Peaks. Allerdings ist es trotz GCIB nicht möglich, die Unebenheiten der Harzprobe ausreichend zu reduzieren.

Um ausschließen zu können, dass die Doppelpeaks von der gleichen Ionenspezies aber unterschiedlichen Höhen stammen, wurde der Doppelpeak des Wasserstoffs im Ionenbild betrachtet (Abb. 32). Da beide Peaks gleichmäßig von der gesamten Probe kommen, und der Abstand der Peakmaxima mit 0,02 sehr gering ist, kann diese als eben angenommen werden. Die kleinen Unebenheiten, die für den zweiten Peak verantwortlich sind, können mit der GCIB beseitigt werden. Werden weitere Doppelpeaks nicht durch die GCIB zu Einzelpeaks reduziert, so kommen diese Doppelpeaks von verschiedenen Ionenspezies und nicht von verschiedenen Höhen.

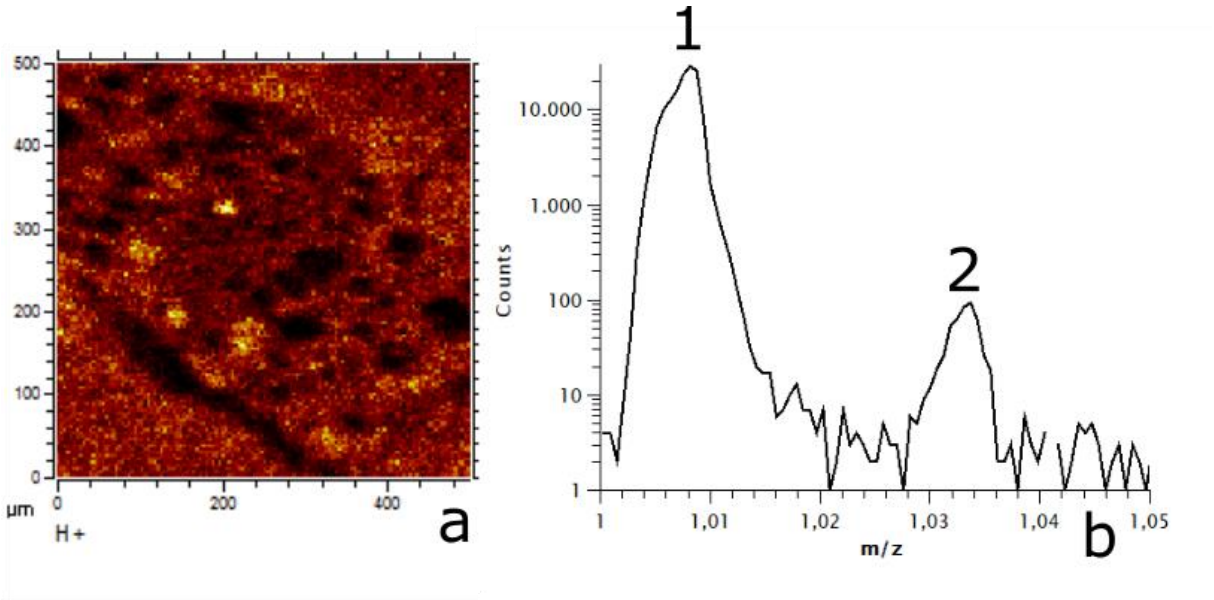

Abbildung 32: **Wasserstoff auf der Kryo-Probe** (a) Ionenbild von Peak 1 (b) Doppelpeak des Wasserstoffs, Ionen beider Peaks stammen von der gesamten Oberfläche. Zudem beträgt der Abstand der Peaks 0,02. Die Probe kann als eben angenommen werden, Doppelpeaks auf einer Masse resultieren aus verschiedenen Ionenspezies, nicht aus unterschiedlichen Höhen

Mit dieser Information aus dem Ionenbild des Wasserstoffs kann nun das Messspektrum ausgewertet werden. Abbildung 33 zeigt Ausschnitte des gesamten Spektrums. Interessant sind die m/z-Bereiche des Europiums (a), des Europiumoxids und des Europiumhydroxids (b), und des Europiumsulfids beziehungsweise des Europiumdioxids (c), letztere lassen sich aufgrund der fast identischen m/z-Verhältnisse nicht voneinander unterscheiden. Anhand des Spektrums (a) ist es nicht möglich, Europium eindeutig zu identifizieren. Es befinden sich zwar Doppelpeaks auf den m/z = 151 und 153, aber der ^{151}Eu-Peak ist deutlich höher als der ^{153}Eu-Peak. Das muss aber nicht bedeuten, dass in diesem Messausschnitt kein Europium vorhanden ist, der ^{151}Eu-Peak kann von anderen organischen Ionenspezies, wie Lignin überlagert worden sein. Deshalb wurde im zweiten Schritt das Spektrum der m/z-Verhältnisse 167 und 169 für Europiumoxid und 168 und 170 für Europiumhydroxid betrachtet (b). Zunächst die Betrachtung des Europiumoxids: Auf den m/z = 167 und m/z = 169 befinden sich jeweils zwei Peaks. Ein kleinerer schmaler Peak ist einem deutlich höheren und breiteren Peak vorgelagert. Der Abstand der Peakmaxima beträgt circa 0,2 und ist eine Größenordnung größer als der Abstand der Maxima der Wasserstoffpeaks (Abb. 32). Die Peaks stammen daher von unterschiedlichen Ionenspezies. Die exakten m/z-Verhältnisse von ^{151}EuO und ^{153}EuO liegen in der Nähe der kleineren Peaks. Demnach kommen die

Europiumoxidionen kurz vor der Organik im Detektor an. Wird nur die Peakfläche und Höhe betrachtet, so ergibt dieses Ergebnis ebenfalls Sinn, da in der Pflanze selbstverständlich deutlich mehr Organikverbindungen vorhanden sind als Europium. Analoges gilt für die Peaks ^{151}EuOH und ^{153}EuOH. Auch hier ist der Organik-Peak deutlich größer als der Europiumhydroxidpeak. Dieser Ausschnitt aus dem Spektrum eignet sich sehr gut für weitere Untersuchungen zur Verifikation des Europiums, da die Peaks ungefähr die gleiche Größe haben und sich deutlich vom Organik-Peak abheben. Eine weitere mögliche Europiumspezies ist Europiumsulfid (EuS). Wenn das Europium im Phytochelatin-Komplex gebunden wird, so bindet es sich an die Sulfid-Gruppe des Komplexes. Das Spektrum (c) zeigt den m/z-Bereich von 185 (^{151}EuS) bis 187 (^{153}EuS), ungünstiger weise liegen auch die Europiumdioxide auf diesen m/z-Verhältnissen und zusammen mit dem Organik-Untergrund ist es unmöglich, genauere Aussagen über das Vorhandensein von Europiumsulfid zu treffen.

Grundsätzlich gilt für die Analyse der Spektren, dass sich Europiumoxid und –hydroxid am besten mit der SIMS identifizieren lassen. Für einige Messungen kann auch die Analyse des reinen Europiumions verwendet werden, sämtliche Europiumverbindungen mit höherem m/z-Verhältnis lassen sich hingegen nicht mehr eindeutig zuordnen, da die Peaks kleiner werden und mit dem Untergrund verschmelzen.

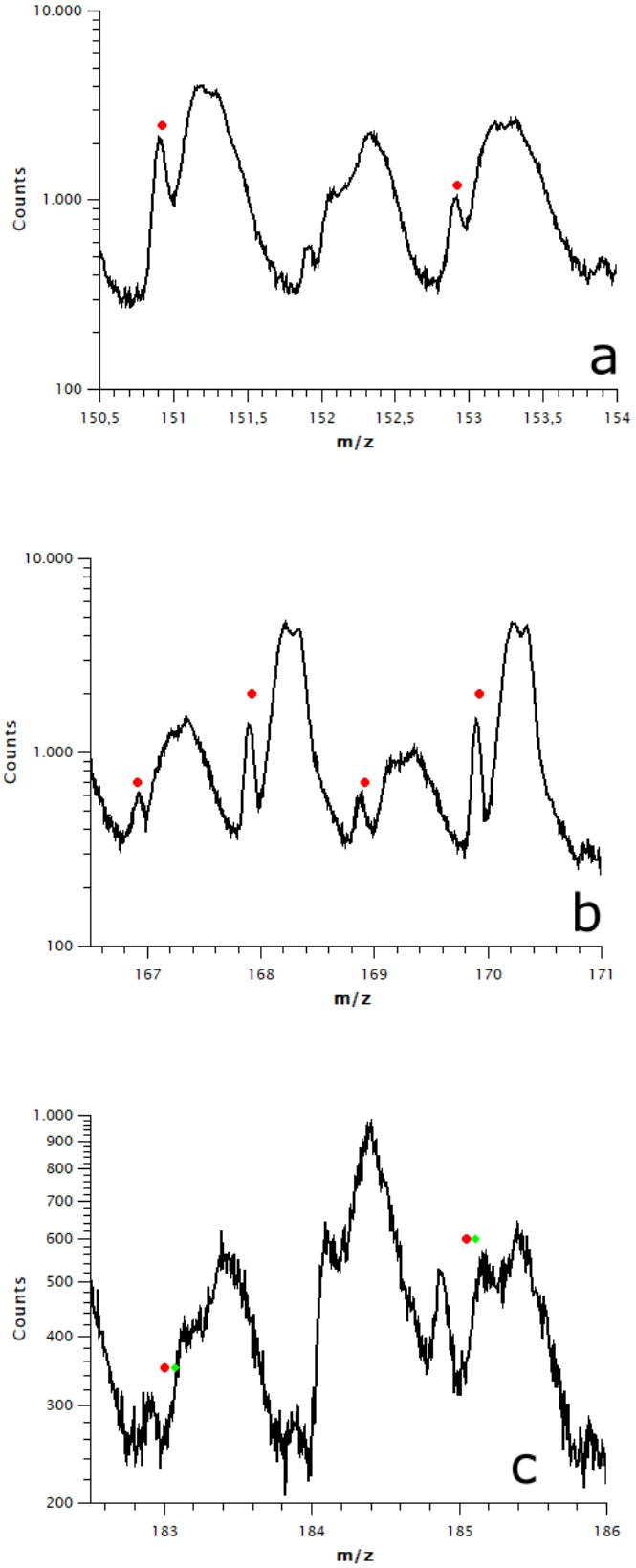

Abbildung 33: **Spektren einer Messung** rote Punkte zeigen das exakte m/z an (a) m/z = 151 bis 153 für Eu^+ (150,919; 152,921) (b) m/z = 167 bis 170 für EuO^+ (166,914; 168,916) und $EuOH^+$ (167,922; 169,923) (c) m/z = 183 bis 185 grüne Punkte für EuS^+ (183,0706; 185,1136) und rote Punkte für EuO_2^+ (183,0036; 185,0466)

Wie schon angedeutet, eignet sich ein Spektrum wie in Abbildung 33b für genauere Analysen. Das Spektrum kann an einer bestimmten Stelle erneut ausgewertet werden. In Abbildung 34 wurde dem ursprünglichem Spektrum (rot) ein weiteres überlagert (schwarz). Dieses schwarze Spektrum gehört zu derselben Messung und wurde an der Stelle (Region of Interest, kurz ROI) ausgewertet, an der das Signal des Europiumhydroxids maximal ist. Dazu wird das Ionenbild des Europiumhydroxids im ROI Editor geöffnet und Grenzen für die minimale und maximale Intensität gesetzt. Pixel, die in diesem Intensitätsbereich liegen, gehören dann zur ROI. Das Massenspektrum und die Ionenbilder wurden in dieser ROI erneut berechnet. Die Europiumhydroxid-Peaks 1 und 2 veränderten sich dabei kaum, während der nachfolgende Organik-Peak stark unterdrückt wurde. Das war auch zu erwarten, da das Organik-Signal und die Europiumhydroxid-Signale von unterschiedlichen Positionen in der Wurzel stammen und die ROI nur die europiumreichen Pixel beinhaltet. Aus demselben Grund wurden auch die Europiumoxid-Peaks (3 und 4) im roten Spektrum (vgl. Abb. 33b) im schwarzen Spektrum hervorgehoben. Dadurch lassen sich diese Peaks bezüglich Peakfläche, Untergrund und Auflösung genauer analysieren. Dazu wurde das Spektrum aus der Messsoftware exportiert und mittels QTI-Plot der Untergrund bestimmt (Abb. 35 und Tab. 10). Aus den, um den Untergrund korrigierten, Peakflächen des schwarzen und des roten Graphen konnte dann das Verhältnis der Europiumisotope berechnet werden.

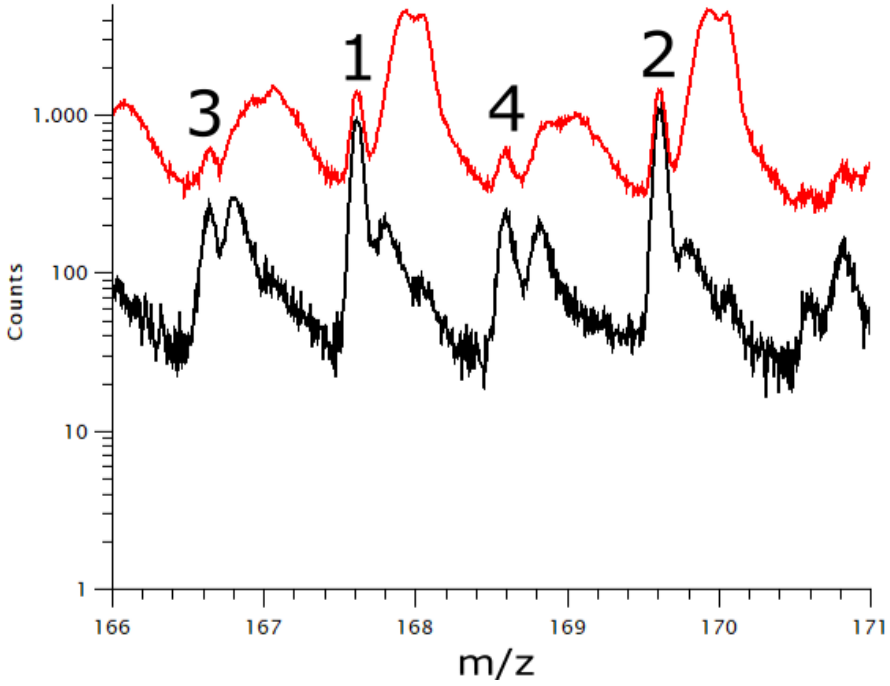

Abbildung 34: **Spektrum des EuOH und EuO**, in rot: Spektrum vom gesamten Bild, in schwarz: Spektrum ROI, der Organik-Untergrund ist geringer als bei rot, während Peak 1 & 2 unverändert bleiben

Stimmt dieses berechnete Verhältnis mit dem Massenverhältnis des Europiums aus der Literatur überein, so handelt es sich bei den betrachteten Peaks höchstwahrscheinlich um Europiumspezies.

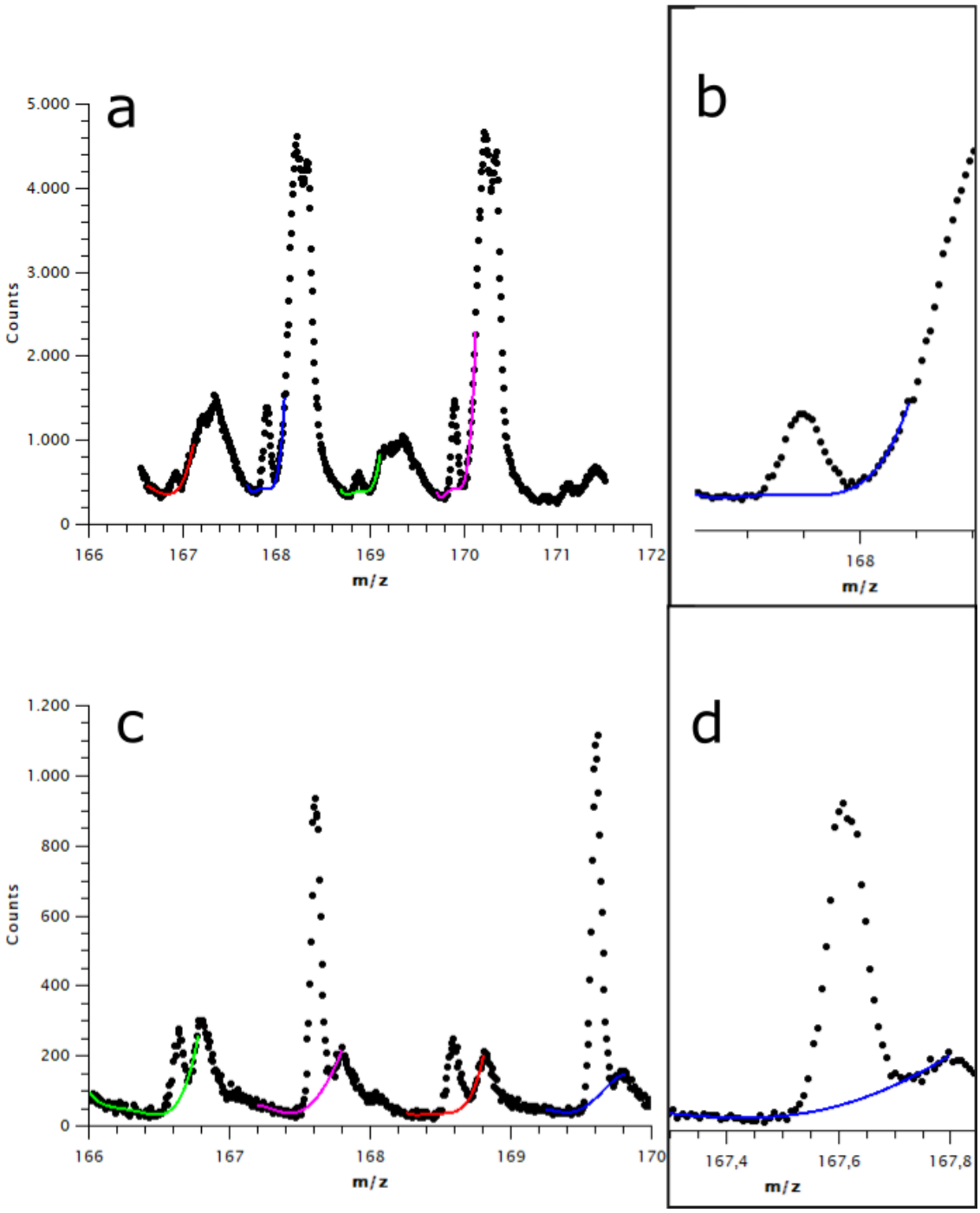

Abbildung 35**: Bestimmung des Untergrunds der Signalpeaks durch eine quartische Regression**. In (a) das gesamte Spektrum der Auswertung des gesamten Bildes mit den vier verschiedenen Regressionen. (b) zeigt eine Vergrößerung für den ^{151}EuOH-Peak. In (c) ist das gesamte Spektrum für die ROI gezeigt und in (d) die Vergrößerung des ^{151}EuOH-Peaks.

Die Bestimmung des Untergrunds erfolgt für jeden Signalpeak durch QTI-Plot. Dafür wurden die Datenpunkte vor und hinter dem Signalpeak verwendet. An diese Punkte fand eine polynominale Anpassung vierten Grades statt. Diese passt sich optimal der Peakform des Organik-Peaks an und liefert dadurch das beste Bestimmtheitsmaß R^2 = 0,965. Die Fläche unter der quartischen Regression im Bereich des Signalpeaks stellt

den Untergrund dar. Dieses Verfahren wurde für die EuO- und EuOH-Peaks der ROI und des gesamten Bildes angewendet. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Counts der Signalpeaks und des Untergrunds für die ROI und das gesamte Bild

	ROI		**Gesamtes Bild**	
	Counts		Counts	
	Signal ($n_{p,i}$)	Untergrund ($n_{0,i}$)	Signal ($n_{p,i}$)	Untergrund ($n_{0,i}$)
^{151}EuOH	11343	2806	20127	10126
^{153}EuOH	13143	3834	20058	9091
^{151}EuO	3915	1793	12191	9935
^{153}EuO	3916	1640	11576	8922

Aus der um den Untergrund korrigierten Peakfläche wurde das Verhältnis der Europiumisotope bestimmt und die zugehörigen Messunsicherheiten berechnet. (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008) Beides ist in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11: Berechnung des Europium-Verhältnisses der Signalpeaks des gesamten Bildes und der ROI

		n_i	**$u(n_i)$**	**p_i**	**$u(p_i)$**	**Ergebnis**
Gesamtes Bild	^{151}EuOH	10001	174	47,7%	0,006	(47,7±0,6)%
	^{153}EuOH	10967	171	52,3%	0,006	(52,3±0,6)%
	^{151}EuO	2256	149	45,9%	0,021	(45,9±2,1)%
	^{153}EuO	2654	143	54,1%	0,021	(54,1±2,1)%
ROI	^{151}EuOH	8537	119	47,8%	0,005	(47,8±0,5)%
	^{153}EuOH	9309	130	52,2%	0,005	(52,2±0,5)%
	^{151}EuO	2122	76	48,2%	0,012	(48,2±1,2)%
	^{153}EuO	2276	75	51,8%	0,012	(51,8±1,2)%

Mit der Peakfläche $n_{p,i}$, dem Untergrund $n_{0,i}$ und der Nettopeakfläche n_i.

Die Messunsicherheiten der Peakflächen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$u(n_i) = \sqrt{n_{p,i} + n_{0,i}} \tag{21}$$

Das Verhältnis der Europiumisotope ergibt sich aus:

$$p_i = \frac{n_i}{n_{151} + n_{153}} \tag{22}$$

Mittels

$$u(p_i)^2 = \sum_{k=1}^{2} \left(\frac{\partial}{\partial n_k} p_i\right)^2 * u(n_k)^2 \tag{23}$$

wurde die Genauigkeit des bestimmten Verhältnisses berechnet. Die genaue Rechnung wurde exemplarisch für ^{151}Eu dargestellt, für ^{153}Eu erfolgt die Berechnung analog.

$$u(p_{151}) = \sqrt{\left(\frac{\partial}{\partial n_{151}} \frac{n_{151}}{n_{151}+n_{153}}\right)^2 * u(n_{151})^2 + \left(\frac{\partial}{\partial n_{153}} \frac{n_{151}}{n_{151}+n_{153}}\right)^2 * u(n_{153})^2} \tag{24}$$

$$u(p_{151}) = \sqrt{\left(\frac{n_{151}+n_{153}-n_{151}}{(n_{151}+n_{153})^2}\right)^2 * u(n_{151})^2 + \left(\frac{-n_{151}}{(n_{151}+n_{153})^2}\right)^2 * u(n_{153})^2} \tag{25}$$

Das natürliche Isotopenverhältnis von ^{151}Eu und ^{153}Eu beträgt laut Literatur 47,8 % zu 52,2 %. Die errechneten Isotopenverhältnisse aus Tabelle 11 stimmen demnach im Rahmen der Messunsicherheiten sehr gut mit dem Literaturverhältnis überein.

Beim Vergleich des Spektrums der mit Europium getracerten Erbsenwurzel mit einer ungetracerten Karotte als Kontrollpflanze sind Unterschiede und Gemeinsamkeiten erkennbar (Abb. 36). In Abbildung 36a ist der Massenbereich des Europiums dargestellt. Der rote Graph zeigt das Spektrum der Erbse (dasselbe wie in Abb. 33a) und der schwarze Graph das Spektrum der Karotte. Während sich im Spektrum der Erbse Doppelpeaks auf den m/z-Verhältnissen 151 und 153 befinden, ist im Spektrum der Kontrolle nur auf dem 153 ein Doppelpeak. Dieser Doppelpeak erstreckt sich über denselben m/z-Bereich wie der Organik-Peak des Erbsenspektrums. Der Einzelpeak bei m/z = 151 liegt ebenfalls im selben Bereich, wie der Organik-Peak der Erbse. Die im Vorfeld als mögliche Europium-Peaks bezeichneten kleineren Peaks davor, haben keine Entsprechung im Kontrollspektrum. Ein ähnliches Verhalten ist im Bereich des Europiumoxids beziehungweise –hydroxids erkennbar (Abb. 36b). Die Doppelpeaks der Kontrollpflanze liegen im Bereich der Organik-Peaks der Erbse und die Peaks der möglichen Europiumspezies finden sich nicht im Spektrum der Kontrolle wieder. Das sind weitere Indizien dafür, dass es sich bei den in Abbildung 35 markierten Peaks um Europiumoxid und –hydroxid handeln könnte.

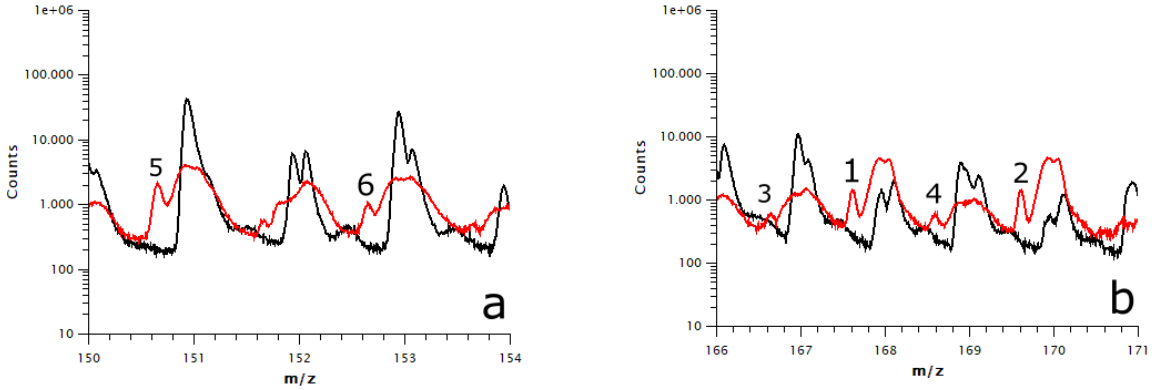

Abbildung 36: **Vergleich der Spektren** einer Kontrollpflanze (Karotte, schwarz) und einer mit Europium getracerten Erbse (rot) für unterschiedliche m/z-Bereiche (a) Für Europium (Peak 5 & 6); Auffällig ist der Einzelpeak der Kontrolle bei 151, der dem Organik-Peak der getracerten Erbse entspricht. (b) für Europiumoxid (Peak 3 & 4) und –hydroxid (Peak 1 & 2); Doppelpeaks der Kontrolle liegen im selben m/z-Bereich wie die Organik der mit Europium getracerten Erbse.

6.4.2 Analyse der Ionenbilder

Die Ionenbilder können für beliebige Peaks erstellt werden. Sie zeigen die Intensitätsunterschiede im Ionensignal pro Pixel an und geben Aufschluss über die Ionenverteilung in der Wurzel. Die verschiedenen Ionensignale können zum Vergleich in einem Rot-grün-blau-Overlay (RGB-Overlay) überlagert werden. Zudem können Additions- und Subtraktionsbilder erstellt werden, die für die Europium-Signale verwendet wurden, da zu erwarten war, dass ^{151}Eu und ^{153}Eu von demselben Ort kommen, während der Organik-Peak auf m/z = 152 von einem homogen über die Wurzel verteilten Signal stammt. Des Weiteren ist es möglich, die Spektren und Ionenbilder aus den Rohdaten erneut herzustellen. Es kann die gesamte Messregion ausgewertet werden oder nur bestimmte Ausschnitte, die ROIs. Dazu wird ein Ionensignal (z.B. ^{151}EuOH) ausgewählt und die Pixel mit maximalem Signal ausgewertet. Mit all diesen Techniken wurde gearbeitet, um die folgenden Ionenbilder zu analysieren. Anschließend wurden Vergleiche zwischen den unterschiedlich vorbereiteten Proben gezogen.

Zunächst soll der Einfluss der Floodgun auf das Ionensignal gezeigt werden. Die Floodgun kompensiert lokale Aufladungen bei nichtleitenden Proben, wie den Wurzeln. In Abbildung 37 wurde die auf Aluminium aufgebrachte Wurzel mit und ohne Verwendung der Floodgun untersucht. In (a) und (c) ist jeweils das Ionensignal des m/z = 150,89, welche dem ^{151}Eu entsprechen könnte und in (b) und (d) das gesamte Ionensignal der Probe gezeigt. Der Einfluss der Floodgun ist gut in den unterschiedlichen Helligkeiten der Ionenbilder zu erkennen. Während in (b) größtenteils der Untergrund der Probe gemessen wurde, ist in (d) das Ionensignal der Wurzel maximal. Dazu wurde das Surface Potential auf -35 V eingestellt, um genau diesen Effekt zu erzielen. Für das ^{151}Eu-Signal bedeutet das, dass die Ionen der gesamten Wurzel analysiert werden (c) und nicht wie in (a) nur ein kleiner Ausschnitt der Wurzel. Anhand der Spannung des Surface Potentials können unterschiedliche Bereiche im Messfenster untersucht werden. Insbesondere bei den Unebenheiten der Harzproben konnten dadurch die richtigen Bereiche gemessen werden, indem das Ionensignal des Harzes verringert und das der Wurzel erhöht wurde. Bei den Harzproben wurde ein Surface Potential von circa -70 bis -100 V verwendet, bei den Kryo-Proben war die Varianz deutlich größer von +100 V bis -140 V und bei der Probe auf dem Aluminiumblock betrug es zwischen -30 V und -40 V.

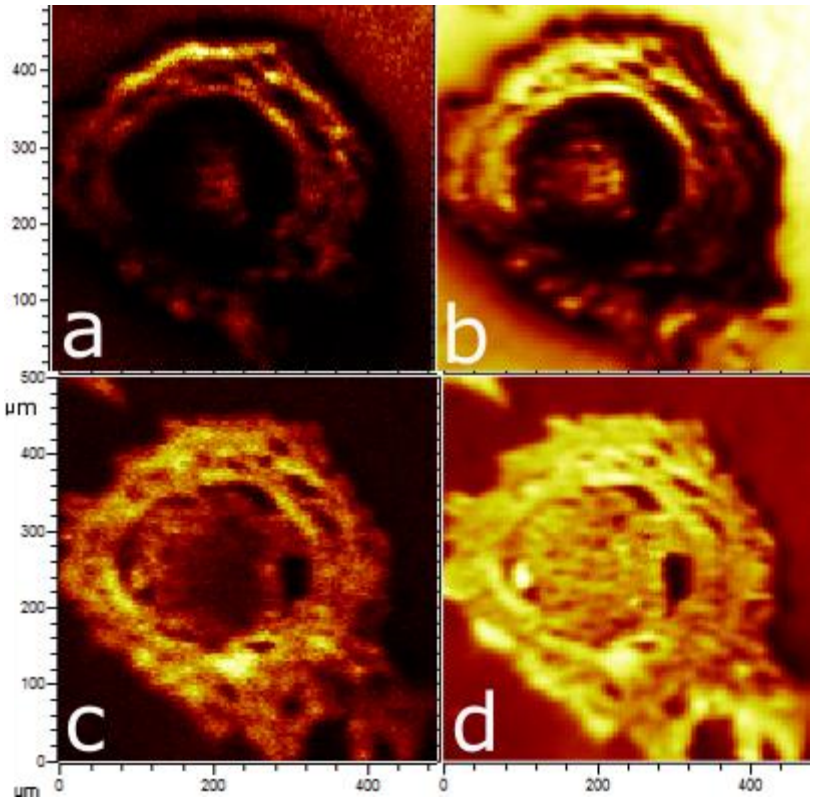

Abbildung 37: **Unterschiede im Ionensignal durch die Verwendung der Floodgun** (a) Ionenbild des m/z = 150,89 ohne Floodgun und (b) Ionensignal total ebenfalls ohne Floodgun (c) Ionenbild des m/z = 150,89 mit Floodgun und Surface Potenial -35 V und (d) Ionensignal total ebenfalls mit Floodgun und Surface Potential -35 V

Nun folgt der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Probenvorbereitungen.

Abbildung 38 zeigt die mit 10 mmol Europium getracerte Erbse, die mit dem Kryo-Mikrotom geschnitten und auf einem Aluminiumblock aufgebracht und getrocknet wurde. Dieser Schnitt besitzt eine Größe von 0,5 x 0,5 mm und wurde mit dem Backmount analysiert. Bild (a) zeigt das Ionensignal des m/z = 150,89, welches als ^{151}Eu identifiziert wurde. Das Mikroskopie-Bild von der SIMS ist in b zu sehen, während c das Mikroskopie-Bild des Mikroskops ist. Trotz der unterschiedlichen lateralen Auflösung und den Rissen durch das Auftauen und Trocknen der drei Bilder ist in jedem die Struktur der Wurzel gut zu erkennen. Damit lassen sich unterschiedliche Signalintensitäten einer Ionenspezies in bestimmten Gewebearten der Wurzel lokalisieren. So befindet sich ^{151}Eu am Rand der Wurzel, genauer in der Wurzelrinde und nicht im Zentralzylinder.

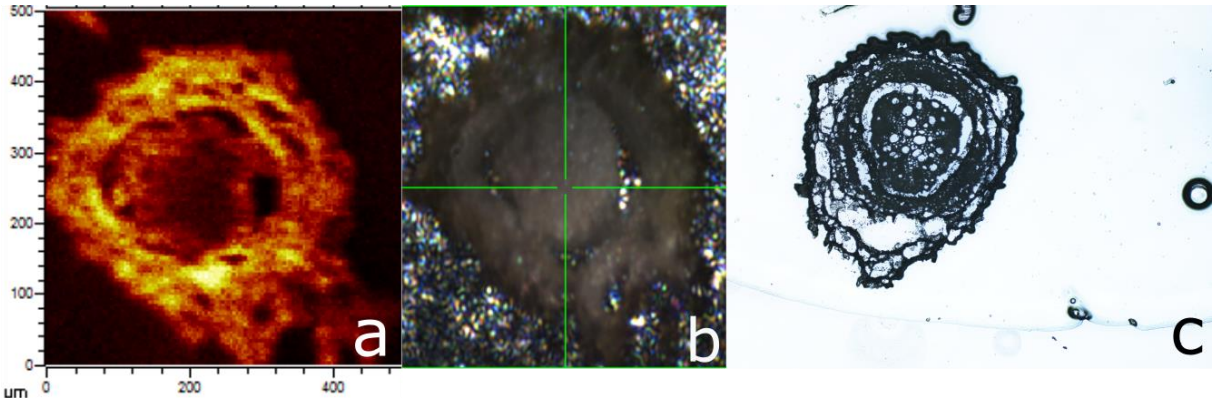

Abbildung 38: **Erbsenwurzel getracert mit 10 mmol Europium** getrocknet auf Alu. (a) Ionenbild m/z = 150,89 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild

Im direkten Vergleich zu Abbildung 38 steht Abbildung 39. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Proben ist, dass die Erbsenwurzel in Abbildung 39 nicht aufgetaut und mit der Kryo-Stage analysiert wurde. Deshalb ist diese Probe nicht beschädigt und die Strukturen des Zentralzylinders gut erhalten. Die Erbsenwurzel war circa 2 x 3 mm groß und der gemessene Ausschnitt zeigt den Zentralzylinder mit einem Teil der Endodermis. In a ist das Ionensignal der Organik auf m/z = 153 abgebildet. Die Leitungsbahnen des Xylems sind als schwarze Punkte zu erkennen. Diese zeigen sich auch im Mikroskopie-Bild der SIMS, während sie beim Mikroskop heller als die Zellen sind.

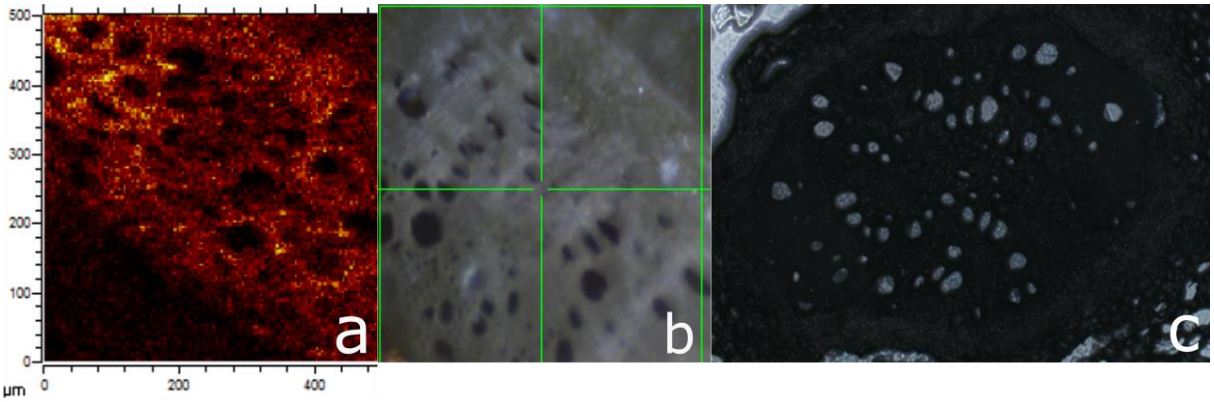

Abbildung 39: **Erbsenwurzel getracert mit 10 mmol Europium** gefroren auf Kryo-Stage (a) Ionenbild Organik m/z = 153 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild

Ein deutlicher Unterschied ist zwischen den beiden Erbsenwurzeln und der Bohnenwurzel zu sehen. Das liegt aber nicht an den unterschiedlichen Pflanzen, sondern an der unterschiedlichen Einbettungs- und Schneidemethode. Die Bohne wurde in Epoxidharz eingebettet und mit dem Skalpell geschnitten. Durch die Austrocknung der Wurzel im Harz und die Rauigkeit der Oberfläche ist bei dieser Probe keine Struktur erkennbar (Abb. 40b und c). Nur der Übergang zwischen Harz und Wurzel ist klar zu erkennen, und genau an diesem Übergang wurde Europium detektiert (Abb. 40a). Das Ionenbild a ist ein RGB-Overlay aus Kohlenstoff (rot), Methyl-Ionen (blau) und der Summe der Europium-Signale (grün). Das Ionensignal des Europiums stammt genau aus der Übergangszone Harz-Wurzel, die Pflanze scheint das Europium demnach in der

Wurzelrinde oder Rhizodermis zu speichern. Auf Grund des starken Strukturverlustes können keine genaueren Zuordnungen erfolgen.

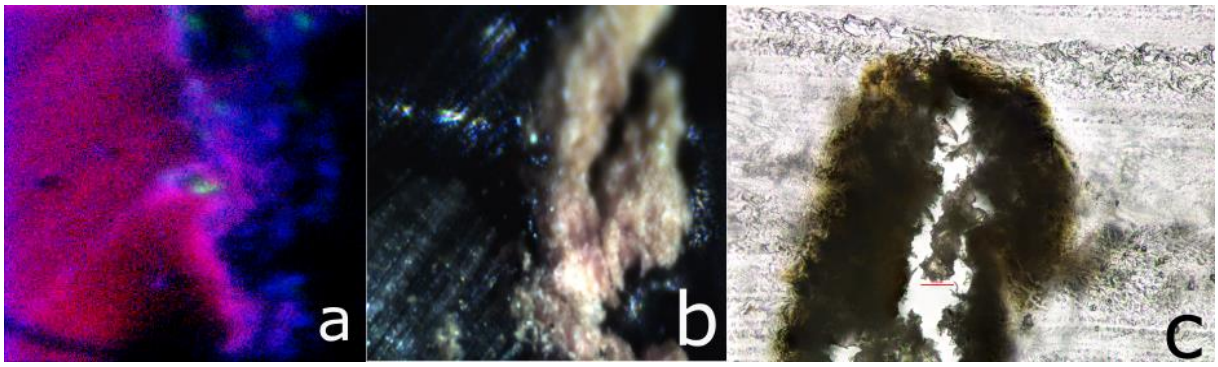

Abbildung 40: **Bohnenwurzel getracert mit 5 mmol Europium** eingegossen in Epoxidharz (a) Ionenbild Overlay: rot Kohlenstoff-Signal stellt Harz dar; blau Methyl-Signal stellt Wurzel dar; grün Europium-Signal m/z = 151 & m/z = 153 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild, Overlay aus mehreren Bildern, damit ein scharfes Bild entsteht, roter Messbalken entspricht 40µm

Der Vergleich der drei verschiedenen Probenvorbereitungen zeigt auch in den Ionenbildern deutliche Unterschiede. Besonders die Epoxidharzeinbettung liefert durch den Strukturverlust der Wurzel keine genauen Informationen über die Lokalität des Europiums in der Pflanze. Im Gegensatz dazu kann das Europium bei der Kryo-Methode bestimmten Regionen und Geweben in der Wurzel zugeordnet werden. Da die Probe auf der Kryo-Stage weniger Risse aufweist als die getrocknete Probe auf dem Aluminiumblock, ist diese zu bevorzugen, obwohl beide Proben gute Ergebnisse bezüglich der räumlichen Verteilung des Europiums liefern.

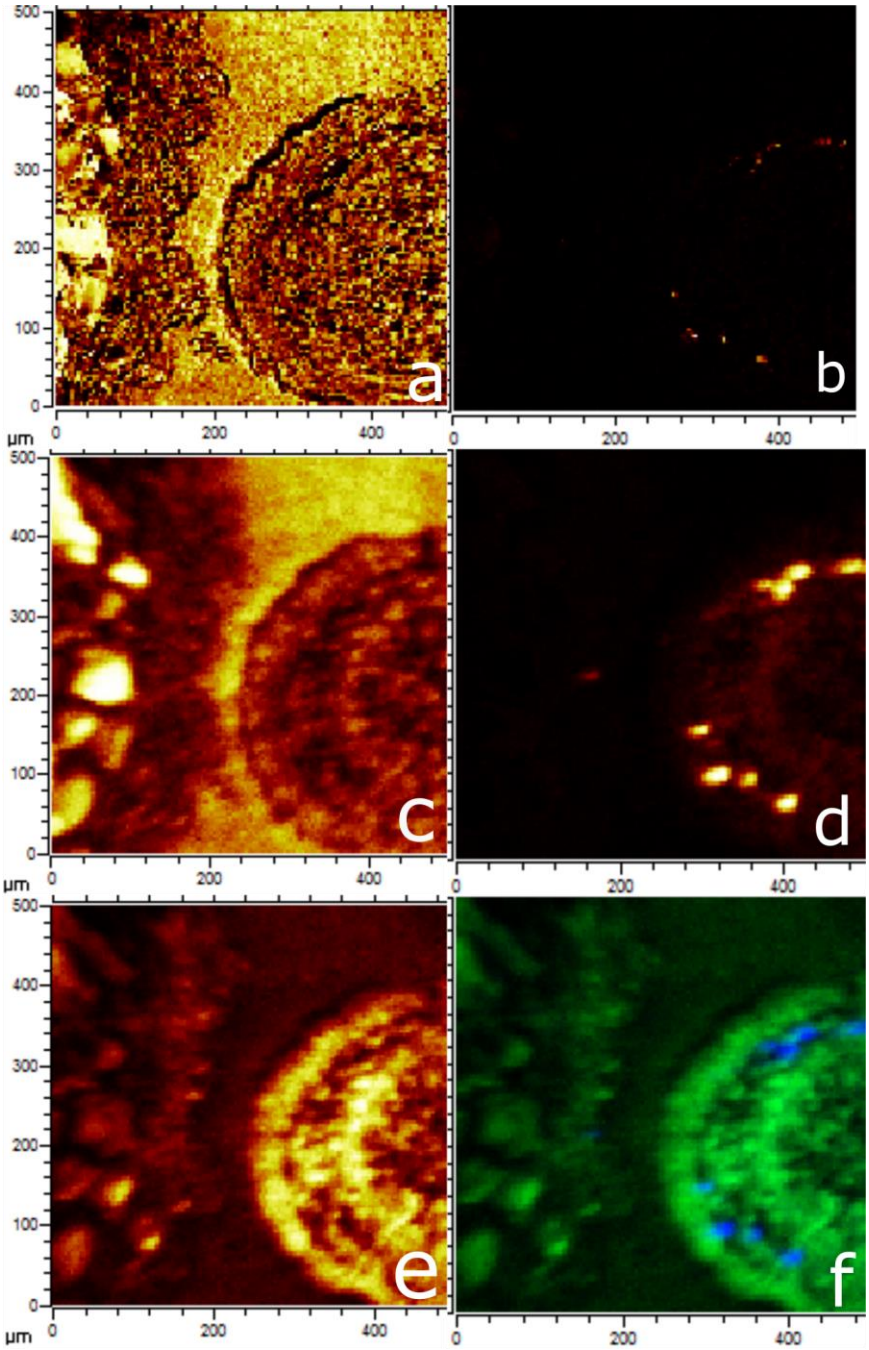

Abbildung 41: **Ionenbilder Erbsenwurzel** getracert mit 10mmol Europium (a) FI-Bild von Kalium mit guter lateraler Auflösung, aber schlechter Massenauflösung (b) & (d) Calcium-Signal Hotspots an den Leitungsbahnen: oben im FI-Modus darunter im Spectrometry-Modus, man erkennt die unterschiedliche Bildschärfe und Ionenanzahl (c) Ionenbild von Natrium (e) Summe der Signale 151+ 153- 152,Europium-Signal könnte von Organik (Lignin m/z = 151) überlagert sein (f) Overlay aus (d) & (e) in blau die Calcium-Hotspots in der Mitte der Wurzel

In Abbildung 41 sind die Ionenbilder verschiedener Elemente gezeigt. In (b) und (d) ist das Calcium-Signal einmal im FI-Modus (b) und einmal im Spectrometry-Modus (d) gezeigt. Der direkte Vergleich dieser unterschiedlichen Modi zeigt deutlich die verbesserte laterale Auflösung des FI-Bildes gegenüber des Spectrometry-Bildes. Dieser Unterschied ist auch in den in (a) und (c) dargestelltem Kalium- beziehungsweise das Natrium-Signal zu erkennen. Diese beiden Elemente eignen sich durch ihre nahezu homogene Verteilung über die Wurzel zur Erstellung einer Grundrisskarte. Diese Karte eignet sich dann optimal für Vergleiche mit anderen Ionen, welche nur als Hotspots

auftreten. Diese können dann einer Position im Inneren der Wurzel zugeordnet werden. In f ist ein solcher RGB-Overlay aus dem Additionsbild e des Europiums und des Calcium-Signals in d dargestellt. Mit Hilfe des Grundrisses kann der Ursprung des Calcium-Signals in der Wurzelrinde lokalisiert werden. Das Additionsbild (e) wurde aus der Summe der ^{151}Eu- und ^{153}Eu-Signale und der Differenz zum Organik-Peak auf m/z= 152 gebildet. Durch die Subtraktion der Organik sollte der Untergrund minimiert werden. Das Europium ist nahezu über die gesamte Wurzel verteilt, weist aber Häufungen in der Rhizodermis und der Endodermis auf. Im Zentralzylinder in der Mitte der Wurzel ist es hingegen kaum bis gar nicht vorhanden.

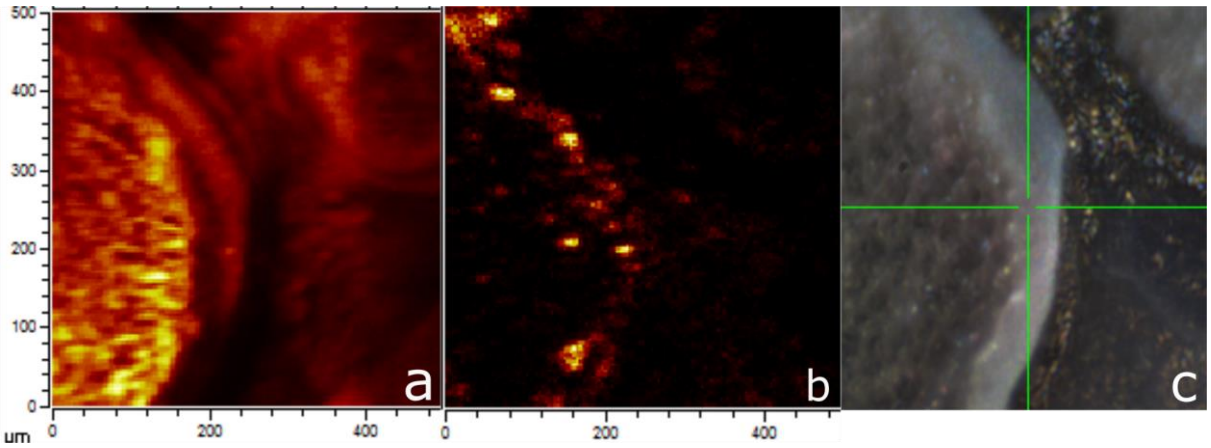

Abbildung 42: (a) Ionenbild total, deutlicher Unterschied im Signal zwischen Wurzel und Kryo-Kleber (b) Phosphorsignal Hotspots am Rand der Wurzel (c) Bild Kamera SIMS

Calcium ist nicht das einzige Element, das in der Wurzel in Hotspots vorkommt. Für Phosphor lässt sich ein ähnliches Verhalten erkennen (Abb. 42b). Die Hotspots des Phosphors liegen in der Rhizodermis, wo es auch schon mit der LA-ICP-MS (Kapitel 5.3) nachgewiesen wurde. Das Ionenbild aller Ionen in Abbildung 42a zeigt deutliche Intensitätsunterschiede zwischen Wurzel (gelb, mehr Signal) und Kryo-Kleber (rot-schwarz, weniger Signal). Ursprünglich wurde für das Europium ein ähnliches Verhalten wie das des Calciums und des Phosphors angenommen. Das Bilden von intensiven Hotspots konnte aber nicht beobachtet werden, stattdessen ist eine ringförmig homogene Verteilung sowohl mit der LA-ICP-MS als auch mit der SIMS festzustellen. Dies zeigt sich besonders klar in Abbildung 43d und 43e. In dieser Abbildung sind zum Strukturvergleich die Mikroskopie-Bilder von SIMS (b) und vom Mikroskop (c) sowie das totale Ionenbild (a) der Erbsenwurzel auf Aluminium gezeigt. Das Phosphor-Signal (f) ist in der Rhizodermis maximal und tritt wieder in Hotspots auf. Das Europium-Signal stammt aus derselben Region, ist aber deutlich stärker, was zu der Aufweitung der Hotspots führt und damit zu einer ringförmig homogenen Struktur, die die Rhizodermis und die Wurzelrinde abbildet. Der Grund dafür ist, wie schon in Kapitel 5.3 erläutert, dass das Europium in den Vakuolen der Wurzelrinde gespeichert wird. Dass es keine größere Akkumulation an der Endodermis gibt, liegt vermutlich daran, dass die Wurzel der LA-ICP-MS die Hauptwurzel der Erbse und damit wesentlich dicker war, als diese Erbsenwurzel, die eine von vielen kleinen Seitenwurzeln und damit deutlich dünner war.

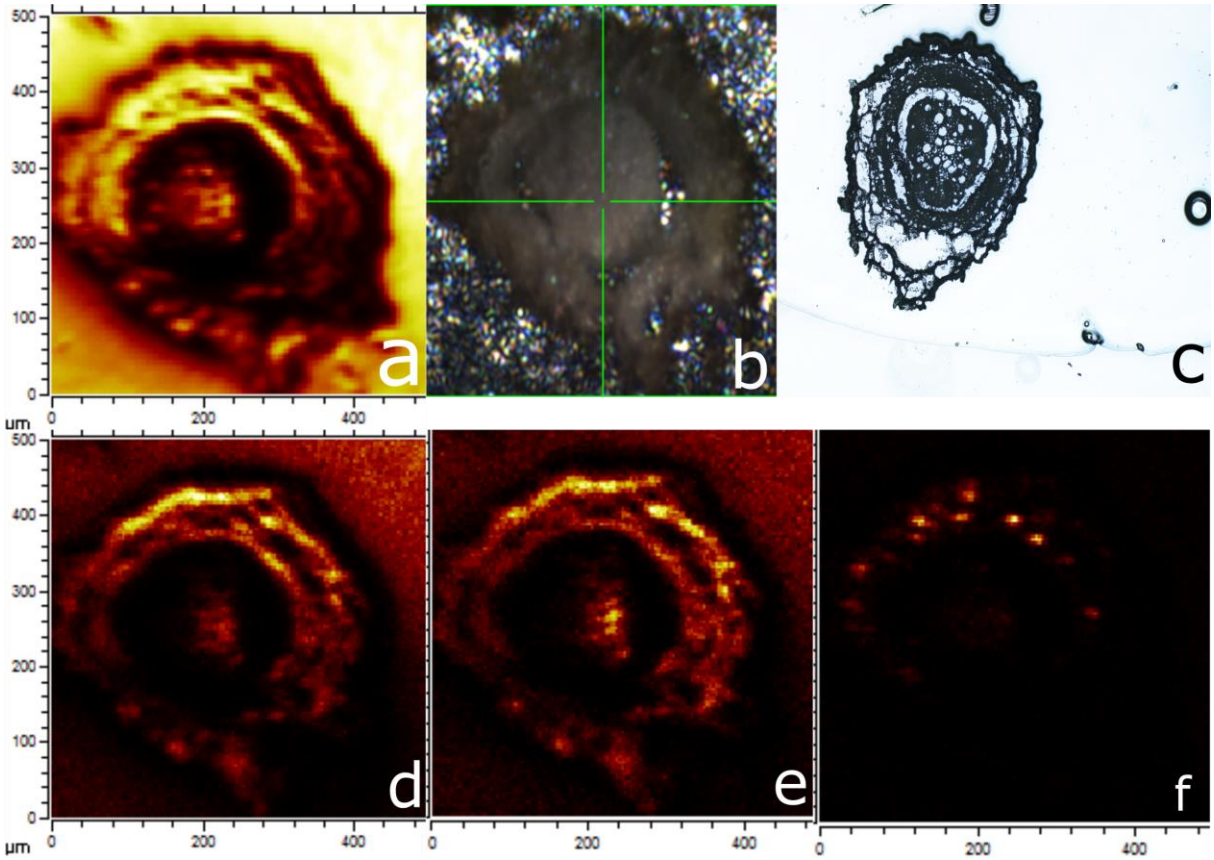

Abbildung 43: (a) Ionenbild total (b) Bild Kamera SIMS (c) Mikroskopie-Bild (d) Ionenbild m/z = 150,89, könnte ^{151}Eu sein, aber auch Organik (e) Ionenbild m/z = 152,89, könnte ^{153}Eu sein, aber auch Organik (f) Phosphor- Hotspots

Außerdem ist der Stoffaustausch bei der dicken Wurzel viel stärker als bei den kleineren Wurzeln und auch die Menge, die akkumuliert werden kann, ist dort viel größer, da mehr Gewebe vorhanden ist. Was zu einer besseren Sichtbarkeit des Ionensignals führt.

Dass das Europium keine Hotspots bildet, kann auch an der (zu) hohen Tracer-Konzentration liegen. Die Pflanze wird mit Europium überflutet und das Resultat ist eine Schwermetallvergiftung, da zu viel Europium in überlebenswichtige Bereiche eindringt.

7. Diskussion

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Versuchsergebnisse vorgestellt. In diesem Kapitel sollen nun die wichtigsten Erkenntnisse hervorgehoben und mit anderen Arbeiten verglichen und diskutiert werden. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Methode der Schnittherstellung und Einbettung und der zweite Teil mit den Messergebnissen der ICP-MS, LA-ICP-MS und SIMS.

7.1 Diskussion der Schnittherstellung

Für die Herstellung der Schnitte wurden Techniken und Materialien für die Einbettung von Pflanzen aus den Veröffentlichungen von Gruber und Lang bezüglich der Einbettung in PEG und den Veröffentlichungen von Finck und Luft bezüglich der Verwendung von Epoxidharzen in der Elektronenmikroskopie für erste Experimente übernommen (Gruber, 1989), (Lang, 2013), (Finck, 1960), (Luft, 1961). Dabei ließ sich feststellen, dass sich das Epoxidharz mit dem Mischungsverhältnis von Araldite : DDSA von 1:0,5 am besten für die SIMS-Messungen eignet. Das Einbettungsprotokoll war kurz und das Harz bettete die Probe fest ein. Zudem war es in diesem Mischungsverhältnis sowohl von Hand als auch mit dem Mikrotom schneidbar. Die entstandenen Schnitte waren für das Auge glatt und eben, aber unter dem Mikroskop fielen viele Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche auf (Abb. 23). Diese Topographie der Probe führte bei den Messungen an der SIMS zu verbreiteten Peaks und schwer interpretierbaren Ergebnissen. Aus anderen Publikationen, wie Saatz et al. (Saatz, 2016) ging hervor, dass die Verwendung eines Kryo-Mikrotoms für die Herstellung sehr dünner und ebener Schnitte sehr gut geeignet für Messungen mit der SIMS ist. Deshalb wurde für weitere Experimente ein Kryo-Mikrotom angeschafft und die Kryo-Stage der SIMS verwendet. Mit diesen beiden Werkzeugen war es zum einen möglich, sehr dünne und glatte Schnitte herzustellen (Abb. 28c) und zum anderen, diese im gefrorenen Zustand zu messen (Abb. 19). In einer Versuchsreihe wurde die optimale Schnitttemperatur für unterschiedliche Schnittdicken bestimmt. Die Schnittdicke wurde so gewählt, dass zum einen die Wurzelzellen ganz blieben und zum anderen so, dass die Wurzelzellen und unterschiedliche Gewebearten gut zu unterscheiden waren. Das beschränkte den Schnittdickenbereich auf 10 bis 50 µm, wobei ersteres schon zu dünn und letzteres schon zu dick war. Am Ende wurden die Schnitte für die SIMS-Messungen 20 µm dick geschnitten, diese Schnittdicke zeigt gut die unterschiedlichen Zellen und Gewebe und besitzt zudem genügend Material zur Analyse. Die ermittelte optimale Schneidetemperatur beträgt -15 °C, da der Schnitt bei dieser Temperatur nicht gestaucht wird oder sich aufrollt (vgl. Abb. 24).

7.2 Diskussion der Messergebnisse

In diesem Kapitel werden die Messergebnisse der ICP-MS, der LA-ICP-MS und der SIMS interpretiert und in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

7.2.1 ICP-MS

Bei der Analyse der Erbsen mit der ICP-MS wurde ein Konzentrationsunterschied des Europiums zwischen Wurzel und Blatt festgestellt. Dieses Verhalten ist schon aus vorherigen Pflanzenexperimenten am IRS bekannt. So wurde von Julia Stadler bei einem Experiment mit Roggen (Secale Cereale L.) und einer Europium-Konzentration in der Tracerlösung von 10mmol mit der ICP-MS eine Konzentration von 106 mg/g in der Wurzel und 46,7 mg/g im Blatt nachgewiesen (Stadler, 2017). Die Erbsen in dieser Arbeit wurden ebenfalls mit 10 mmol/L Europium getracert. Die Europium-Konzentration in den Erbsen betrug 86,3 mg/g in der Wurzel und 31,6 mg/g im Blatt. Damit stimmt die Größenordnung der Konzentrationen dieser Arbeit mit denen von Julia Stadler überein. Die Abweichungen resultieren aus den unterschiedlichen Pflanzenspezies und daraus, dass jede Pflanze aufgrund ihrer Physiologie eine individuelle Menge an Europium aufnimmt.

Aus den berechneten Europium-Konzentrationen der verschiedenen Erbsenteile Wurzel und Blatt in Tabelle 8 lassen sich mehrere Erkenntnisse ableiten. Angefangen mit dem Vergleich zwischen Wurzel und Blatt mit derselben Tracer-Konzentration lässt sich feststellen, dass sich in der Wurzel mehr als doppelt so viel Europium akkumuliert wie in den Blättern der Erbse. Das deutet darauf hin, dass das Europium von der Pflanze als Schwermetall identifiziert und durch den Phytochelatin-Komplex immobilisiert wird. Die Einlagerung in die Vakuolen der Wurzelzellen vermindert den Transport in die Blätter und verhindert so eine Vergiftung der Pflanze. Beim Vergleich der beiden Tracer-Konzentrationen 5 mmol/L und 10 mmol/L in der Wurzel fällt auf, dass die Konzentration sich nicht verdoppelt, sondern nur um circa 27% steigt. In den Blättern nimmt die Konzentration sogar nur um 6% zu. Grund dafür könnte eine Sättigung des Plasmalemmas sein. Um das genauer zu untersuchen müssten noch weitere Experimente mit geringeren Tracer-Konzentrationen durchgeführt werden. Da in dieser Arbeit der Fokus auf der SIMS lag, und die ICP-MS-Messung nur zur Kontrolle diente, wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt. Das Plasmalemma ist die Lipiddoppelschicht mit den verschiedenen Transportproteinen, sammeln sich hier viele Ionen an, so wird deren Aufnahme gehemmt. Das gilt sowohl für Kalium und Calcium als auch für Europium, zudem beeinflussen sich diese Ionen gegenseitig (D. Cataldo, 1983). Diese lokale Aufsättigung im Inneren der Pflanze wirkt dem Diffusionsgradienten entgegen und die Europium-Aufnahme befindet sich im Gleichgewicht mit der Europium-Abgabe im Apoplasten. Resultat ist eine gleichbleibende Europium-Konzentration in der Pflanze trotz Erhöhung der Tracer-Konzentration.
Für die weiteren Versuche bedeutet das, dass eine Europium-Konzentration von 5 mmol/L als Tracer-Lösung vollkommen ausreichend ist und dass die Betrachtung von Wurzelquerschnitten statt Blattquerschnitten durchaus sinnvoll ist.

Aus den Berechnungen der Verhältnisse von ^{151}Eu zu ^{153}Eu in den getracerten Proben in Tabelle 9 lässt sich ein mittleres Isotopenverhältnis von (47,5±1,0) % ^{151}Eu zu (52,4±1,1) % ^{153}Eu bestimmen. Der Literaturwert für dieses Verhältnis liegt bei 47,8 % ^{151}Eu zu 52,2 % ^{153}Eu. Die Messergebnisse stimmen im Rahmen der Messunsicherheiten mit dem Literaturwert überein.

Die Nachweisgrenze für ^{151}Eu beträgt 0,0455 und für ^{153}Eu 0,0492. Alle Proben liegen oberhalb dieser Nachweisgrenze.

7.2.2 LA-ICP-MS

Durch das ortsauflösende Verfahren der LA-ICP-MS war es möglich das elementare Europium bestimmten Regionen in der Wurzel zuzuordnen. Die Ergebnisse der Messung mit der LA-ICP-MS bilden damit die Schnittstelle zwischen den Ergebnissen der elementspezifischen ICP-MS und der ortsauflösenden SIMS. Deshalb eignet sie sich hervorragend für eine erste Untersuchung der Pflanzenprobe, um das Europium in der Pflanze zu lokalisieren. Da es noch keine Möglichkeit gibt, die mit der LA-ICP-MS gemessenen Zählraten zu kalibrieren, war die Messung mit der ICP-MS notwendig, um die Europium-Konzentration in der Pflanze zu bestimmen.

Der Overlay aus dem Mikroskopie-Bild der Wurzel und dem Ionensignal des ^{153}Eu erlaubt eine genaue Zuordnung des Signals an bestimmte Gewebearten der Wurzel (Abb. 44). So befindet sich das meiste Europium im Zellgewebe der Endodermis. Wie schon in Kapitel 2 beschrieben, bildet die Endodermis eine Grenzschicht für Fremdionen, die diese nicht durchdringen können und sich deshalb dort anlagern. Dadurch können die Europiumionen nicht in den Zentralzylinder gelangen und das Ionensignal ist dort am geringsten. Eine geringe Europium-Konzentration ist zudem in der Wurzelrinde zu finden. Sie resultiert aus der Aufnahme des Europiums in den Symplasten, die darauffolgende Immobilisierung durch Phytochelatin-Komplexe und die Einlagerung in die Vakuolen der Wurzelrindenzellen.

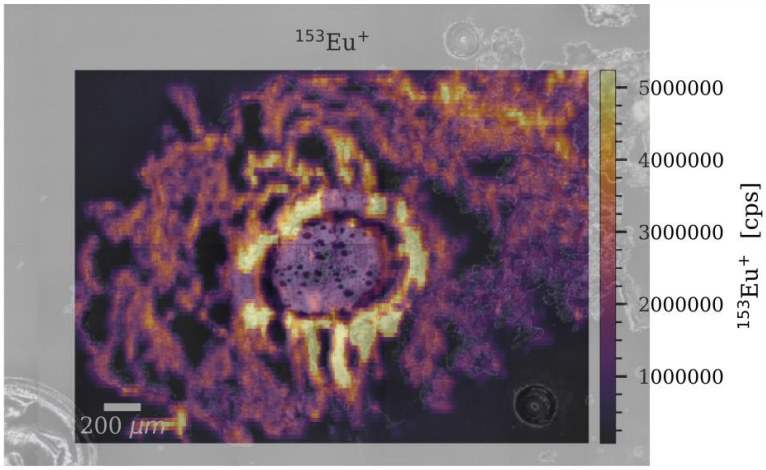

Abbildung 44: **Overlay Mikroskopie-Bild und ^{153}Eu-Signal der mit 10 mmol/L Europium getracerten Erbsenwurzel**

Mit der LA-ICP-MS konnte eine Karte der größten Europium-Vorkommen in der Wurzel erstellt werden. Diese Karte erleichtert bei folgenden SIMS-Messungen die Suche nach nicht-elementarem Europium. Geringe Europium-Signale werden vom Untergrund der

SIMS-Messung überlagert und können nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Mit der Karte konnten die Bereiche der maximalen Europium-Konzentration genauer mit der SIMS analysiert werden.

7.2.3 SIMS

Bei der Untersuchung der Pflanzenproben mittels SIMS gab es unterschiedliche Probenvorbereitungen und damit auch unterschiedliche Versuchsprotokolle. So wurde die in Epoxidharz eingebettete Probe auf dem Backmount montiert und analysiert. Das hat den Vorteil, dass die Justage der SIMS-Ionen direkt vor der Messung durchgeführt werden können und eventuelle Korrekturen direkt umgesetzt werden können. Zudem ist der Wechsel zwischen den beiden Modi Spectrometry und FI einfacher. Bei den gefrorenen Proben wurde die Kryo-Stage als Probenträger verwendet. Auf diesem Träger befinden sich keine Kalibrier- und Einstellungsmöglichkeiten, deshalb musste die SIMS vor jeder Messung auf der Kryo-Stage mit dem Backmount eingestellt werden. Das stellt zwar kein großes Problem dar, allerdings können dann während der Messung die Einstellungen der SIMS nicht kontrolliert und angepasst werden. Inwieweit das nötig ist, ist schwer abzuschätzen, da aber der exakte Abstand zwischen Probe und LMIG beziehungsweise Analysator eingestellt werden muss und sich dieser durchaus bei den verschiedenen Probenträgern unterscheidet, sind daraus resultierende Ungenauigkeiten zu erwarten. Aus diesem Grund wurde am Schluss der experimentellen Arbeiten ein Schnitt aufgetaut und auf dem Backmount analysiert. Auch in anderen vergleichbaren Arbeiten, wie der von Saatz (Saatz, 2016) und Saito (Saito, 2006), wurden die Proben präpariert, getrocknet und dann bei Raumtemperatur gemessen. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung der Kryo-Stage ist, dass nur eine Probe auf den Probenträger aufgebracht werden kann und die Kryo-Stage beim Wechsel der Probe komplett aufgetaut und getrocknet sein muss. Dies beschränkt die Anzahl der am Tag analysierbaren Proben auf maximal zwei. Dabei ist es gerade zu Beginn der Experimente wichtig, möglichst viele verschiedene Proben zu untersuchen, um herauszufinden, wo sich das Europium befindet. Um eine ausreichende Anzahl an Wurzeln zu untersuchen, wurden mehrere Wurzeln auf einmal eingegossen. Das ist aber nur bei den sehr dünnen Proben möglich, vergrößert sich der Wurzeldurchmesser auf über 3 mm, so kann nur eine Probe pro Tag analysiert werden. Ein weiteres mitunter nicht unerhebliches Problem stellt die Bildung einer Eisschicht auf der Pflanzenprobe dar. Befindet sich die tiefgekühlte Probe in warmer Raumluft, so kondensiert Wasser aus der Luft an der Probenoberfläche. Beim Transfer vom Kontrollbereich bis zum Laserlabor und anschließend in die Loadlock der SIMS befindet sich die Probe zwangsläufig in Raumluft, diese Transferzeiten sind deshalb so kurz wie möglich gehalten worden. Zudem wurde die Kryo-Stage in einer isolierten und mit Argon gefüllten Box transportiert und die Loadlock mit Stickstoff gespült. Trotzdem bildete sich eine zum Teil nicht sichtbare Eisschicht, die sich zum Teil im Vakuum der Messkammer löste und das Vakuum verschlechterte und zum anderen mit der GCIB abgetragen werden musste.

In Abbildung 45 sind die Ionenbilder einer Messung dargestellt. Die untersuchte Probe stellt ein Stück Wurzel am Übergang zum Stiel dar und ist insgesamt circa 2 mm x 3 mm groß. In der Mitte des Ionenbildes (a) des Wasserstoffs befindet sich der Zentralzylinder mit den Leitungsbahnen (schwarze Flecken). Am Rand unten links ist ein Ausschnitt aus der Endodermis zu sehen (c) und (d). Doch wie sind diese Ionenbilder zu interpretieren? Das Wasserstoff-Signal aus (a) kommt gleichmäßig von der gesamten Probe. Das zeigt, dass die Oberfläche der Probe eben ist. Sollten auf einem m/z-Verhältnis mehrere Peaks liegen, so deuten diese auf unterschiedliche Ionenspezies und nicht auf unterschiedliche Höhen hin. In (b) und (d) ist ein solcher Doppelpeak in Bilder der Einzelpeaks geteilt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Peaks aus unterschiedlichen Regionen der Wurzel kommen. In (b) ist dabei das als Organik identifizierte Signal gezeigt und in (d) das als ^{153}EuOH identifizierte. Dieses Signal deckt sich mit dem Signal des ^{151}EuOH. Anhand der Vorkenntnisse aus der LA-ICP-MS war dieses Ergebnis zu erwarten. Bei dem Europium-Signal aus der LA-ICP-MS (Abb. 44) befand sich das Maximum an der Endodermis und das Minimum im Zentralzylinder. Das zeigt noch einmal, wie wichtig eine vorangehende Analyse ist, um das Messergebnis der SIMS zu verifizieren.

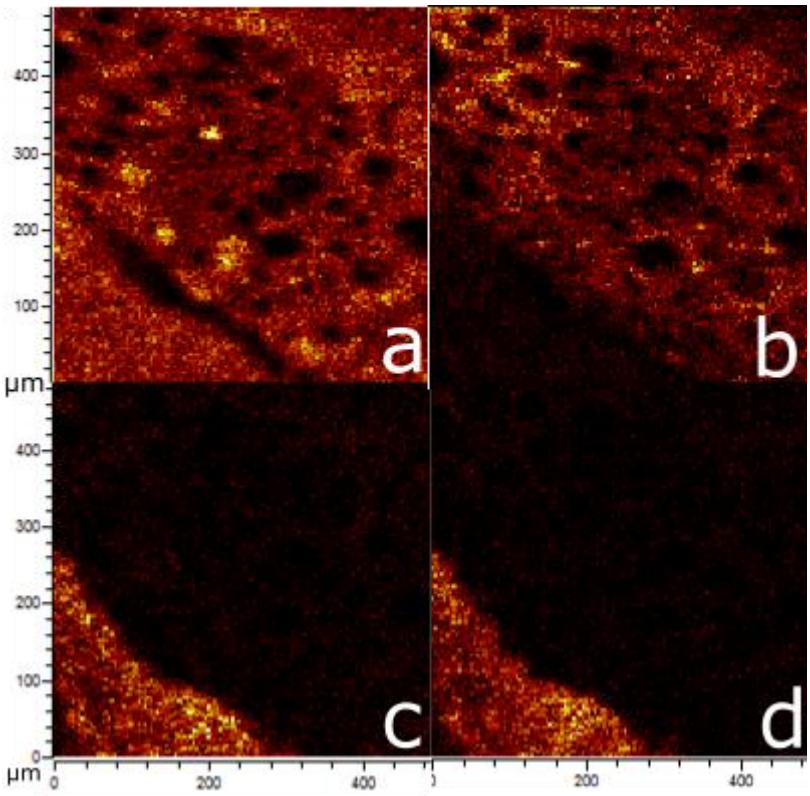

Abbildung 45: **Messung von Europiumhydroxid** (a) Wasserstoff-Signal, (b) Organik-Signal, (c) ^{151}EuOH und (d) ^{153}EuOH

Eine weitere Möglichkeit zur Verifizierung des Europium-Signals der SIMS ist die Berechnung des Isotopenverhältnisses aus den Peakflächen. Dazu werden Peaks auf den m/z = 151 und m/z = 153 (reine Europiumionen), auf den m/z = 167 und m/z = 169 (Europiumoxid) und auf den m/z = 168 und m/z = 170 (Europiumhydroxid) ausgewählt. Anhand des Ionenbildes (Abb. 45) und der Gestalt des Peaks (Abb. 34) wird dabei zuerst ausgewählt, bei welchem der Doppelpeaks es sich am wahrscheinlichsten um die Europiumspezies handelt. In der Praxis hat sich gezeigt, dass der Europium-Peak stets

vor dem Organik-Peak liegt. Die Peakflächen der Europium-Peaks wurden bestimmt und ihr Untergrund durch eine quartische Regression berechnet. Aus den korrigierten Peakflächen derselben Europiumspezies kann dann das Verhältnis der beiden Isotope berechnet werden (Tab. 11). Dabei hat sich gezeigt, dass die berechneten Isotopenverhältnisse im Rahmen der Messunsicherheiten sehr gut mit dem Literaturverhältnis übereinstimmen.

Im Folgenden soll noch einmal genauer auf die Analyse der verschiedenen Europiumspezies eingegangen werden. Auffällig ist, dass das Signal des Europiumhydroxids deutlich stärker und eindeutiger ist, als dass des elementar ionisierten Europiums. Bezüglich der Eindeutigkeit, also dem Vorkommen klar getrennter Doppelpeaks bei m/z = 151 und m/z = 153 im richtigen Massenverhältnis (mehr ^{153}Eu als ^{151}Eu), lässt sich feststellen, dass genau auf dem m/z = 151 ein weiteres Molekülfragment liegt, dass in der Pflanze reichlich vorhanden ist: Lignin (Saito, 2006). Da in dieser Arbeit Wurzeln untersucht wurden, die für ihre Stabilität viel Lignin in ihren Zellwänden verbaut haben, führt dieser Lignin-Peak zu einer Überlappung mit dem ^{151}Eu-Signal. Das erklärt die Beobachtung, dass der 151-Peak deutlich größer ist als der 153-Peak. Aber auch auf dem m/z = 167 (^{151}EuO) befindet sich ein Lignin-Peak, der auch dort zu Überlappungen führt. Da dieser Peak aber nicht so prominent vorkommt wie der 151-Peak, ist der Effekt auf das Isotopenverhältnis des Europiums nicht so stark. Durch den erhöhten Untergrund bei größeren m/z-Verhältnissen (Abb. 33c) ist auch die Bestimmung aus den Europiumdioxidionen oder Europiumsulfidionen nicht möglich. Am besten eignet sich der Europiumhydroxid-Peak für die Bestimmung des Isotopenverhältnisses und damit des Nachweises von Europium in der Pflanze. Zum einen liegt auf den m/z-Verhältnissen 168 und 170 kein bestimmtes Organikmolekül der Pflanze und zum anderen sind die Europiumhydroxid-Signale deutlich stärker, als die Signale anderer Europiumspezies.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Proben (Epoxidharz, tiefgefroren, getrocknet) gab es zum Teil erhebliche Unterschiede. Die Ergebnisse einer tiefgefrorenen Probe auf der Kryo-Stage wurden schon ausführlich behandelt, weshalb hier nur die anderen beiden Probenarten analysiert werden sollen. Bei der Epoxidharzprobe gab es schon beim Herstellen der Schnitte Schwierigkeiten, eine sehr ebene Oberfläche zu erreichen. Diese Rauigkeit der Probe wirkte sich stark auf die Messergebnissse aus. Aufgrund der unterschiedlichen Höhen, von denen die Ionen abgesputtert wurden, kamen gleiche Ionenspezies zu unterschiedlichen Zeiten im Detektor an und verursachten verbreiterte Peaks im Spektrum. In diesen breiten Peaks konnte das Europium-Signal nur schwer identifiziert werden. Nach Verwendung der GCIB und längerer Messzeit war es dann aber doch möglich, Europium am Übergang der Wurzel zum Harz zu detektieren (Abb. 40a). Durch die Zerstörung der Struktur der Wurzel beim Eingießen in das Harz können keine genaueren Aussagen über die Aufnahme oder die Einlagerung getroffen werden. Prinzipiell wäre es sogar möglich, dass das Europium außen an der Wurzel haftete und gar nicht aufgenommen wurde. Auch die Berechnung des Isotopenverhältnisses lieferte ein stark vom Literaturwert abweichendes Ergebnis von 40 % ^{151}Eu zu 60 % ^{153}Eu. Die Abweichungen resultieren ebenfalls aus den verbreiterten

Peaks. Grundsätzlich eignet sich dieses Verfahren zur Identifikation des Europiums, aber nicht zur ortsaufgelösten Analyse. Bei der getrockneten Probe, die auf einem Aluminiumblock aufgebracht wurde um mit dem Backmount analysiert zu werden, wurde ebenfalls Europium nachgewiesen. Trotz der zum Teil schweren Beschädigung der Struktur durch das Auftauen können die Europium-Signale bestimmten Wurzelgeweben zugeordnet werden. Auch das berechnete Verhältnis von 49,5 % ^{151}Eu zu 50,5 % ^{153}Eu liegt nahe am Literaturwert. Da diese Methode nur einen Test darstellte, wurde nur eine Messung gemacht. Grundsätzlich würde dieses Verfahren, wenn die Probe beim Auftauen nicht zerreißt, eine größere Anzahl an Messungen an verschiedenen Proben erlauben, da auf dem Backmount mehr Probenplätze vorhanden sind und die Proben einfacher ausgetauscht werden können.

Abschließend ist festzuhalten, dass mit allen drei Methoden Europium in der Wurzel nachgewiesen werden konnte. Da die Analyse mit der SIMS durchgeführt wurde, um eine ortsaufgelöste Europiumverteilung in den Wurzelschnitten zu erhalten, ist die Einbettung in Epoxidharz nicht zielführend. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Einfrieren der Probe und der Verwendung der Kryo-Stage erzielt. Anhand von Spektren und Ionenbildern konnte das Europium genau lokalisiert und das Isotopenverhältnis bestimmt werden. Das Auftauen der Probe mit anschließender Verwendung des Backmounts könnte der nächste Schritt sein, um einen größeren Probenumfang mit der SIMS zu messen. Dafür müsste die Gefriertechnik aber noch weiterentwickelt werden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Methode zur Analyse von Pflanzenproben mit der SIMS zu entwickeln. Da es noch keine Erfahrungswerte auf diesem Gebiet im Institut gab, wurden die ersten Versuche nur mit dem stabilen Europium durchgeführt. Eine Durchführung der Experimente mit Americium war am Ende leider nicht mehr möglich, da die Methode dafür noch nicht ausreichend optimiert werden konnte. Zu Beginn schien die Einbettung der Pflanze in Epoxidharz am erfolgversprechendsten. Die Materialien waren am Institut vorhanden und das Einbettungsprotokoll kurz und leicht umzusetzen. Nach einigen Experimenten bezüglich der Festigkeit des Blocks wurde ein optimales Verhältnis zwischen Harz und Härter von 1:0,5 gefunden und die Pflanzenproben in diese Mischung eingebettet. Das Herstellen der Schnitte per Hand oder mit dem Mikrotom produzierte auf den ersten Blick dünne und glatte Schnitte. Unter dem Mikroskop fielen dann die ersten Unebenheiten der Oberfläche sowie ein Strukturverlust der Wurzel auf. Bei den SIMS-Messungen war zu beobachten, dass die Unebenheiten der Probenoberfläche zu stark für ein so empfindliches Messgerät waren. Das zeigte sich in den Doppelpeaks im Massenspektrum, die von derselben Ionenspezies, aber von verschiedenen Höhen stammen. Aufgrund der Pflanzenorganik war auf jedem m/z-Verhältnis mindestens ein Peak. Dadurch war es schwer, das Europium-Signal vom Organik-Untergrund zu unterscheiden. Anhand des Ionenbildes wurde Europium in der Harzprobe gefunden. Die Zerstörung der Struktur der Probe durch das Einbetten führte dazu, dass der Ursprung des Europiums nicht einem bestimmten Bereich im Inneren der Wurzel zugeordnet werden konnte. Deshalb wurde dieses Verfahren aufgegeben und stattdessen ein Kryo-Mikrotom angeschafft.

Bei der sogenannten Kryo-Einbettung wird die Probe in einem speziellen Kryo-Kleber eingebettet und im Kryo-Mikrotom eingefroren. Anschließend kann sie direkt geschnitten werden. Dazu ist es möglich, Schneidetemperatur und Schnittdicke variabel einzustellen. Je nach Schnittdicke und Gewebeart (Wurzel, Blatt, etc.) entscheidet die Temperatur der Probe über den Erfolg beim Schneiden. Es wurden einige Schnittdicken und Schneidetemperaturen untersucht, bis das beste Ergebnis bei einer Dicke von 20 µm und einer Temperatur von -15 °C erreicht wurde. Mit diesen Parametern wurden die Schnitte für die SIMS-Messungen hergestellt. Bei der Messung wurde als Objekthalter die Kryo-Stage verwendet, damit die Probe nicht auftaute und dabei zerriss. Das Ergebnis war ein sehr glatter Schnitt mit wenig Topographie und vollständigem Erhalt der Wurzelstruktur. In den Spektren konnten die Peaks der Europiumspezies exakt zugeordnet und ausgewertet werden. Am prominentesten waren die Peaks des Europiumhydroxids. Mit einigen Softwaretools und dem Vorwissen aus der Laserablation konnte das Europium nicht nur denselben Wurzelstrukturen in den Ionenbildern zugeordnet, sondern auch das Isotopenverhältnis von ^{151}Eu zu ^{153}Eu bestimmt werden. Im Rahmen der Unsicherheiten stimmt das berechnete Verhältnis mit dem Verhältnis aus der Literatur überein.

Mit der LA-ICP-MS wurde das Europium in der Wurzelrinde, aber insbesondere in der Endodermis nachgewiesen. Daraus lässt sich schließen, dass das Europium zum größten Teil im Apoplasten verbleibt und in diesem bis an die Endodermis transportiert wird. Die Endodermis ist eine Schutzschicht, die den Zentralzylinder umgibt und Fremdionen aus

dem Apoplasten nicht hinein diffundieren lässt. Ein kleinerer Teil des Europiums gelangt vermutlich durch Ionenkanäle fälschlicherweise in den Symplasten. Dort wird es auf Grund seiner hohen Dichte als Schwermetall identifiziert und in Phytochelatin-Komplexen gebunden. Diese Komplexe werden in der Vakuole gespeichert. Das würde die geringe Europium-Konzentration in der Wurzelrinde erklären. Im Zentralzylinder findet sich aufgrund dessen kaum Europium.

Mit der LA-ICP-MS wäre es vermutlich auch möglich gewesen, das wesentlich geringer konzentrierte ^{243}Am zu messen, da dieses Verfahren nur die Elemente misst und sämtliche Verbindungen aufgebrochen werden. Bei der SIMS bleiben viele Verbindungen aber intakt und gerade bei den organischen Proben befindet sich dadurch viel Untergrund im Spektrum. Schon beim Europium war es mitunter schwierig die Doppelpeaks klar zu differenzieren. Obwohl Europium zwei stabile Isotope hat, deren Vergleich das Ergebnis verifiziert. Um diesen Vorteil auch bei der Messung von Americium zu erhalten, müsste eine Mischung aus zwei Isotopen (z.B. ^{241}Am und ^{243}Am) mit bekanntem Isotopenverhältnis hergestellt werden. Dennoch liegt Americium in einem m/z-Bereich mit erhöhtem Untergrund aus dem sich einzelne Peaks nur geringfügig hervortun, was die exakte Zuordnung erschwert. Abhilfe würde an dieser Stelle das Verfahren der Sekundärneutralteilchenmassenspektrometrie (SNMS) schaffen. Bei diesem Verfahren ionisieren Laser nur die neutralen Americiumatome, nicht jedoch die anderen Atome. Herausgelöste Sekundärionen werden unterdrückt. Damit verbessert sich die Massenauflösung um mehrere Größenordnungen. Aktuell am IRS durch Manuel Raiwa durchgeführte Experimente zeigen, dass dann Americium-Konzentrationen von $10^{-7}\frac{Bq}{\mu m^3}$ gemessen werden können. Auch für eine genauere Messung des Europiums würde sich die SNMS eignen. Dann könnte im FI-Modus das Europium noch genauer lokalisiert werden.

Die Messungen an der ICP-MS dienten in dieser Arbeit allein der Kontrolle der Europium-Aufnahme durch die Pflanze. Durch sie sollte sichergestellt werden, dass von den Pflanzen genügend Europium aufgenommen wurde, um mit der SIMS und LA-ICP-MS nachweisbar zu sein. Auch sollte bestätigt werden, dass in der Wurzel das meiste Europium akkumuliert ist und sich diese deshalb besonders gut für die SIMS-Messungen eignet. Bei der Messung stellte sich heraus, dass die Pflanze Europium aufgenommen hat und dass sich in der Wurzel fast dreimal so viel Europium wie in den Blättern befindet. Zudem kann mit den Ergebnissen der ICP-MS abgeschätzt werden, wie viel Europium in der Pflanze sein muss um mit der SIMS nachweisbar zu sein. Dazu wird die Tracer-Konzentration variiert und die Pflanzen sowohl mit ICP-MS als auch mit SIMS analysiert. Findet sich ab einer bestimmten Tracer-Konzentration kein Europium mehr mit der SIMS, so kann über die ICP-MS die Grenzkonzentration in der Pflanze bestimmt werden. Diese Arbeiten stehen aber noch aus. Grundsätzlich wurde in dieser Arbeit eine funktionierende Methode zur Analyse von Wurzelquerschnitten mit der ToF-SIMS entwickelt. Wie bei fast jeder Methode gibt es noch Kleinigkeiten, die verbessert werden könnten. So war die Probenanzahl durch die Verwendung der Kryo-Stage begrenzt. Wird die Gefriertechnik noch weiter verbessert, so sollte es möglich sein, die gefrorenen Schnitte aufzutauen, ohne dass die Strukturen zerstört werden. Aufgetaute Schnitte lassen sich in größerer Anzahl auf dem Backmount analysieren. Mehr Messungen an

verschiedenen Proben erlauben eine genauere Berechnung des Isotopenverhältnisses und sind daher erstrebenswert. Auch die Verwendung der SNMS zusätzlich zur SIMS verspricht eine genauere Identifikation und Lokalisation der untersuchten Elemente.

9.Literaturverzeichnis

Agilent Technologies. (2020). Agilent ICP-MS Laser Ablation. URL https://www.agilent.com/en/products/icp-ms/icp-ms-accessories/icp-ms-laser-ablation.

Alikhanov S.G. (1957). A new impulse technique for ion mass measurements . *Soviet Phys. JETP, 4*.

Becker J.S. (2007) *Inorganic Mass Spectrometry - Principles and Applications* (p.514). John Wiley & Sons, Chichester, England.

BMU, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit. (2015) Programm für eine verantwortungsvolle und sichere Entsorgung bestrahlter Brennelemente und radioaktiver Abfälle, Deutschland

Bosco, H. (2016) *Erarbeitung eines Anregungsschemas zum Strontiumnachweis mittels resonanter Laser-SNMS*, Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz, Deutschland

Choi, Y. H., Lim, K. M., Jun, I., Kim, B. H., Keum, D. K., & Kim, I. G. (2014). Soil-to-soybean transfer of 99Tc and its underground distribution in differently contaminated upland soils. *J. Environ. Radioact.*, *132*, 57-64.

Cataldo D. Wildung R. (1983). The role of Soil and Plant Metabolic Processes in controlling Trace Element Behavior and Bioavailability to Animals. *Sci. Total Environ., 28(1-3),159-168*.

Electron Microscopy Science. (2018). Technical Data Sheet Araldite 502 Kit.

Finck, H. (1960). Epoxy Resins in Electron Microscopy *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 7(1), 27.

Gross J.H. (2013). *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*, Heidelberg, Springer Spektrum.

Gruber, M. (1989). Einbettung von Pflanzenteilen in Polyethylenglykol. *Mikrokosmos 78 (4)*.

Hamann, L. (2017). *Untersuchung radioaktiver Partikel mittels Sekundärionen-Flugzeit-Massenspektrometrie*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz, Deutschland.

Henkel, K. (2020). Das Schneiden in der Mikroskopie. *Mikrobiologische Vereinigung München* URL http://www.klaus-henkel.de/cut-allgem.html.

Hölzer, A. (2018). *Simultane Quantifizierung von I-127- und I-129-Spezies in Umweltproben mittels IC-ICP-MS und AMS*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz, Deutschland.

JCGM, Joint Committee for Guides in Metrology. (2008). Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement, *BIPM*, Frankreich

Krug, H., Liebig, H.P., Stützel, H. (2002). *Gemüseproduktion*. Euger Ulmer GmbH & Co, Stuttgart.

Kück, U., Wolff, G. (2014). *Botanisches Grundpraktikum*. Springer Spektrum, Berlin.

Kuhn, H.-R. (2005). *Laser ablation ICP-MS: Fundamental investigations on aerosols generated by laser ablation at ambient pressure* Dissertation, ETH Zurich, Schweiz.

Lang, G. (2013). *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer, Wien, New York.

Livens, F. R., Horrill, A. D., & Singleton, D. L. (1994). The relationship between concentrations of plutonium and americium in soil interstitial waters and their uptake by plants. *Sci. Total Environ., 155(2),* 151-159.

Luft, J. H. (1961). Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods. *The Journal of biophysical and biochemical cytology, 9(2),* 409.

Mousny, J.M., & Myttenaere, C. (1981). Absorption of Technetium by Plants in relation to soil type, contamination level and time. *Plant Soil, 61(3),* 403-412.

Saatz, J. (2016). Location and speciation of gadolinium and yttrium in roots of zea mays by LA-ICP-MS and ToF-SIMS. *Environ. Pollut., 216,* 245-252.

Saito, K., Kato, T., Takamori, H., Kishimoto, T., Yamamoto, A., & Fukushima, K. (2006). A new analysis of the depolymerized fragments of lignin polymer in the plant cell walls using ToF-SIMS. *Appl. Surf. Sci., 252(19),* 6734-6737.

Schmöger, M. (2000). *Phytochelatine Komplexierung von Metallen und Metalloiden Untersuchungen zur Phytochelatin-Synthase*, Dissertation, TU München, Deutschland.

Stadler, J. (2017). *Auf dem Weg zur massenspektrometrischen Bildgebung von Pflanzenteilen: Erste Messungen mit einer Desorptions Elektrospray Ionisationsquelle (DESI) an einem Orbitrap-Massenspektrometer*, Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz, Deutschland.

Thermo Fisher Scientific (2012). Thermo Scientific Cryo-Star NX50 Kryostat.

Weiler, E. W., Nover, L. (2008). *Allgemeine und molekulare Botanik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Wenig, H. X., Hong, C. L., Yan, A.L., Pan, L.H., Qin, Y. C., Bao, L. T., & Xie, L.L. (2008). Mechanism of Iodine Uptake by Cabbage: Effects of Iodine Species and Where It is Stored. *Biol. Trace Elem. Res., 125(1),* 59.

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: **Querschnitt einer Karottenwurzel mit Zuordnung der Gewebe 1** Rhizodermis, **2** Wurzelrinde, **3** Endodermis, **4** Xylem, **5** Phloem, **6** Parenchym 5
Abbildung 2: **Längsschnitt durch die Wurzelspitze der jungen Karottenwurzel.** Gut erkennbar sind die einzelnen Zellen mit ihren Organellen. 6
Abbildung 3: **Nährstoffaufnahme durch die Wurzel** in (a) ist ein Ausschnitt aus der Rhizosphäre gezeigt, das Wurzelhaar liegt zwischen den drei Phasen des Bodengemischs, in braun die Bodenpartikel, in weiß die Bodenluft und in blau das Bodenwasser. (b) zeigt eine Vergrößerung des Wurzelhaars mit den Mechanismen der Mobilisierung und Ionenaufnahme (schwarze Zahlen): ① Ionenaustauschdesorption ② Diffusion in den Apoplasten ③ Aufnahme in den Symplasten. In (c) ist die Wurzelzelle schematisch dargestellt. 1 ist die Zellwand, 2 das Cytoplasma getrennt durch das Plasmalemma (rot) und 3 die Vakuole getrennt durch den Tonoplast (grün). 8
Abbildung 4: **Phytochelatin-Komplex** (PC, oben) und die Bindung von Cadmium an die Schwefelatome des PC (unten) (Schmöger, 2000) 9
Abbildung 5: links: **Mikrotom** EMS 5000; rechts: **Kryo-Mikrotom** NX50 11
Abbildung 6: **Laserablation mit ICP-MS gekoppelt** (Becker, 2007) 13
Abbildung 7: **Schematischer Aufbau der ToF-SIMS 5** Der Primärionenstrahl schlägt Sekundärteilchen aus der Oberfläche heraus, die ionisierten Teilchen werden in den Flugzeitmassenanalysator beschleunigt und separiert, bevor sie auf den Detektor treffen. 14
Abbildung 8: ToF-SIMS des IRS mit Beschriftung der einzelnen Komponenten 15
Abbildung 9: **Schematische Darstellung des Sputtervorgangs** (a) Primärionenpuls (Bi_3^+, blau) trifft auf die Probenoberfläche und schlägt Sekundärteilchen (Ionen, rot und Neutralteichen, grün) heraus, dabei wird die Oberfläche positiv aufgeladen. (b) Argoncluster der GCIB tragen Oberfläche ab, die Oberfläche bleibt positiv aufgeladen. (c) Elektronen der Floodgun neutralisieren die Oberfläche vor dem nächsten Primärionenpuls (d). 16
Abbildung 10: **Spektrum einer Pflanzenprobe**, es handelt sich um den Wurzelquerschnitt einer Erbse. Durch das organische Material befindet sich auf jedem m/z-Verhältnis ein Peak. 18
Abbildung 11: **Aufzucht der Erbsen in Hydrokultur** 20
Abbildung 12: **Variation des Verhältnisses von Araldite und DDSA**, analog zur Tabelle 24
Abbildung 13: **Blick in die Kühlkammer des Mikrotoms** unten links: Probe wird auf Kryobar gefroren, oben links: Proben warten auf weitere Benutzung, Mitte oben: Probe auf Probenhalter beim Schneiden 25
Abbildung 14: **Probenkopf mit Probe** 25
Abbildung 15: **Kalibriergerade ^{151}Eu** Standard 3 wird nach DIN32646 als Ausreißer identifiziert 26
Abbildung 16: **Kalibriergerade ^{151}Eu ohne Standard 3** nach DIN32646 kein Ausreißer mehr vorhanden 27

Abbildung 17: **Kalibriergerade ^{153}Eu** Standard 3 wird nach DIN32646 als Ausreißer identifiziert 27
Abbildung 18: **Kalibriergerade ^{153}Eu ohne Standard 3** nach DIN32646 kein Ausreißer mehr vorhanden 28
Abbildung 19**: Kryo-Stage beschriftet** 31
Abbildung 20: **Vakuumtest des Agars** links: Agar davor, rechts: Agar danach, Styroporähnlich, nicht geeignet für Messung in der SIMS 32
Abbildung 21: **Probe in PEG** eingebettet, die Ränder der Karotte sind kaum mit dem PEG verbunden 33
Abbildung 22: **Karotte in Epoxidharz** Verhältnis 1:1, Probe schwimmt auf dem Harz und kristalliert an der Oberfläche 34
Abbildung 23: **Bohne in Epoxidharz** Die Struktur der Wurzel ist nicht mehr zu erkennen 35
Abbildung 24: **Schnitte am Mikrotom** Unterschiedliche mechanische Eigenschaften abhängig von Temperatur und Schnittdicke **1)** Späne und Raspel (Temperatur zu hoch oder Schnitt zu dünn) **2)** Aufrollen und Umklappen des Schnittes (Temperatur zu niedrig) **3)** optimaler Schnitt, gut nutzbar **4)** Schnitt wird gestaucht (Temperatur zu hoch) 36
Abbildung 25 **Auftauen des Schnittes unterm Mikroskop** Oben: nach dem Schneiden, es sind kaum Löcher im Gewebe Unten: circa 2 Minuten später, Gewebe ist deutlich zerrissen 37
Abbildung 26**: Karottenwurzel** 10 µm, 10 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -15 °C (d) -16 °C; bestes Ergebnis (e) -18 °C (f) -20 °C (g) -25 °C (h) -30 °C 38
Abbildung 27: **Karottenwurzel** 14 µm, 5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -12 °C; bestes Ergebnis (d) -16 °C (e) -20 °C (f) -30 °C 40
Abbildung 28: **Erbsenwurzel** 20 µm, 5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -15 °C; bestes Ergebnis (d) -18 °C (e) -20 °C (f) -30 °C 42
Abbildung 29: **Erbsenwurzel** 50 µm, 5 X (a) -10 °C; bestes Ergebnis (b) -15 °C; bestes Ergebnis (c) -20 °C (d) -30 °C 44
Abbildung 30: **Karotten Fruchtkörper** 20 µm,5 X (a) -5 °C (b) -10 °C (c) -14 °C (d) -15 °C; bestes Ergebnis (e) -20 °C (f) -30 °C 46
Abbildung 31: **Ergebnisse der Laserablation** (a) Mikroskopie-Bild ① Zentralzylinder ② Endodermis ③ Wurzelrinde ④ Kryo-Kleber ⑤ Löcher durch das Auftauen (b) Phosphor-Signal (c) & (d) Europium-Signale, deutlich erkennbar ist die Häufung am Übergang Wurzelrinde und Zentralzylinder 51
Abbildung 32: **Wasserstoff auf der Kryo-Probe** (a) Ionenbild von Peak 1 (b) Doppelpeak des Wasserstoffs, Ionen beider Peaks stammen von der gesamten Oberfläche. Zudem beträgt der Abstand der Peaks 0,02. Die Probe kann als eben angenommen werden, Doppelpeaks auf einer Masse resultieren aus verschiedenen Ionenspezies, nicht aus unterschiedlichen Höhen 54
Abbildung 33: **Spektren einer Messung** rote Punkte zeigen das exakte m/z an (a) m/z = 151 bis 153 für Eu^+ (150,919; 152,921) (b) m/z = 167 bis 170 für EuO^+ (166,914; 168,916) und $EuOH^+$ (167,922; 169,923) (c) m/z = 183 bis 185 grüne Punkte für EuS^+ (183,0706; 185,1136) und rote Punkte für EuO_2^+ (183,0036; 185,0466) 56

Abbildung 34: **Spektrum des EuOH und EuO**, in rot: Spektrum vom gesamten Bild, in schwarz: Spektrum ROI, der Organik-Untergrund ist geringer als bei rot, während Peak 1 & 2 unverändert bleiben 57
Abbildung 35**: Bestimmung des Untergrunds der Signalpeaks durch eine quartische Regression**. In (a) das gesamte Spektrum der Auswertung des gesamten Bildes mit den vier verschiedenen Regressionen. (b) zeigt eine Vergrößerung für den ^{151}EuOH-Peak. In (c) ist das gesamte Spektrum für die ROI gezeigt und in (d) die Vergrößerung des ^{151}EuOH-Peaks. 58
Abbildung 36: **Vergleich der Spektren** einer Kontrollpflanze (Karotte, schwarz) und einer mit Europium getracerten Erbse (rot) für unterschiedliche m/z-Bereiche (a) Für Europium (Peak 5 & 6); Auffällig ist der Einzelpeak der Kontrolle bei 151, der dem Organik-Peak der getracerten Erbse entspricht. (b) für Europiumoxid (Peak 3 & 4) und –hydroxid (Peak 1 & 2); Doppelpeaks der Kontrolle liegen im selben m/z-Bereich wie die Organik der mit Europium getracerten Erbse. 61
Abbildung 37: **Unterschiede im Ionensignal durch die Verwendung der Floodgun** (a) Ionenbild des m/z = 150,89 ohne Floodgun und (b) Ionensignal total ebenfalls ohne Floodgun (c) Ionenbild des m/z = 150,89 mit Floodgun und Surface Potenial -35 V und (d) Ionensignal total ebenfalls mit Floodgun und Surface Potential -35 V 63
Abbildung 38: **Erbsenwurzel getracert mit 10 mmol Europium** getrocknet auf Alu. (a) Ionenbild m/z = 150,89 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild 64
Abbildung 39: **Erbsenwurzel getracert mit 10 mmol Europium** gefroren auf Kryo-Stage (a) Ionenbild Organik m/z = 153 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild 64
Abbildung 40: **Bohnenwurzel getracert mit 5 mmol Europium** eingegossen in Epoxidharz (a) Ionenbild Overlay: rot Kohlenstoff-Signal stellt Harz dar; blau Methyl-Signal stellt Wurzel dar; grün Europium-Signal m/z = 151 & m/z = 153 (b) Mikroskopie-Bild SIMS (c) Mikroskopie-Bild, Overlay aus mehreren Bildern, damit ein scharfes Bild entsteht, roter Messbalken entspricht 40µm 65
Abbildung 41: **Ionenbilder Erbsenwurzel** getracert mit 10mmol Europium (a) FI-Bild von Kalium mit guter lateraler Auflösung, aber schlechter Massenauflösung (b) & (d) Calcium-Signal Hotspots an den Leitungsbahnen: oben im FI-Modus darunter im Spectrometry-Modus, man erkennt die unterschiedliche Bildschärfe und Ionenanzahl (c) Ionenbild von Natrium (e) Summe der Signale 151+ 153- 152,Europium-Signal könnte von Organik (Lignin m/z = 151) überlagert sein (f) Overlay aus (d) & (e) in blau die Calcium-Hotspots in der Mitte der Wurzel 66
Abbildung 42: (a) Ionenbild total, deutlicher Unterschied im Signal zwischen Wurzel und Kryo-Kleber (b) Phosphorsignal Hotspots am Rand der Wurzel (c) Bild Kamera SIMS 67
Abbildung 43: (a) Ionenbild total (b) Bild Kamera SIMS (c) Mikroskopie-Bild (d) Ionenbild m/z = 150,89, könnte ^{151}Eu sein, aber auch Organik (e) Ionenbild m/z = 152,89, könnte ^{153}Eu sein, aber auch Organik (f) Phosphor- Hotspots 68
Abbildung 44: **Overlay Mikroskopie-Bild und ^{153}Eu-Signal der mit 10 mmol/L Europium getracerten Erbsenwurzel** 71

Abbildung 45: **Messung von Europiumhydroxid** (a) Wasserstoff-Signal, (b) Organik-Signal, (c) ^{151}EuOH und (d) ^{153}EuOH 73

Tabelle 1: Einbettprotokoll für PEG (Lang, 2013) 22
Tabelle 2: Variation der Verhältnisse von Araldite und DDSA 24
Tabelle 3: Schneideeigenschaften der Karottenwurzel bei 10 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen 39
Tabelle 4: Schneideeigenschaften der Karottenwurzel bei 14 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen 41
Tabelle 5: Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel bei 20 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen 43
Tabelle 6: Schneideeigenschaften der Erbsenwurzel bei 50 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen 45
Tabelle 7: Schneideeigenschaften der Karotte bei 20 µm Schnittdicke und unterschiedlichen Temperaturen 47
Tabelle 8: Europium-Konzentrationen der Erbsenteile, Massenanteil und Vertrauensbereich 49
Tabelle 9: Berechnung der Isotopenverhältnisse 50
Tabelle 10: Counts der Signalpeaks und des Untergrunds für die ROI und das gesamte Bild 59
Tabelle 11: Berechnung des Europium-Verhältnisses der Signalpeaks des gesamten Bildes und der ROI 59
Tabelle 12: Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze in ppb 86
Tabelle 13: Einwaage und Verdünnungsfaktor 86

11. Anhang

11.1 Zusammensetzung Hoagland

Für 1 Liter Flüssigkeit werden

- 100ml Macro (KNo_3, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- 0,6ml Eisen ($FESO_4 \cdot 7H_2O$, EDTA-Na_2
- 1ml Micro (H_3BO_3, $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, $H_2MoO_4 \cdot H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$)
- 50ml (High-Phosphate-Hoagland) oder 12,5ml $NH_4H_2PO_4$ (Low-Phosphate-Hoagland)

gemischt und mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Die High-Phosphate-Hoagland-Lösung wurde zur Pflanzenaufzucht verwendet, bei den Topfpflanzen zum Gießen und bei den Hydrokulturen als Nährmedium. Mit der Low-Phosphate-Hoagland-Lösung und dem Zusatz des Tracers wurden die Pflanzen getracert. Bei den Topfpflanzen wurde damit gegossen, die Hydrokultur-Pflanzen wurden in dieses Nährmedium umgesetzt.

11.2 Ablaufprotokoll Kryo-Stage

Um die Kryo-Stage in die SIMS einschleusen zu können, muss ein spezielles Protokoll verwendet werden (aus der ToF-SIMS-Hilfe: Using the instrument > Preparing/Cleaning samples > Heating/Cooling samples). Dazu wird zuerst die Loadlock belüftet, um die Kryo-Stage hineinzubringen. Um die Bildung einer Eisschicht beim Abkühlen zu reduzieren, wird anschließend die Loadlock mit Stickstoffgas gespült. Dabei wird das Ventil geöffnet und die Loadlock gleichzeitig für circa 60 Sekunden evakuiert. Dann erfolgt eine weitere Belüftung der Loadlock und die Schließung des Stickstoff-Ventils. Im Anschluss werden die Flüssig-Stickstoff-Behälter der Loadlock und der Main mit flüssigem Stickstoff befüllt. Der Füllstand muss regelmäßig kontrolliert werden und gegebenenfalls Stickstoff nachgefüllt werden. Danach wird der Loadlock-Behälter abgesenkt, so dass der Kühlfinger in Kontakt mit der Kryo-Stage kommt und die Kühlung beginnt. In der Software der ToF-SIMS wird die gewünschte Temperatur der Probe in Loadlock und Main eingestellt. Für die hier durchgeführten Experimente wurde eine Temperatur von -100°C eingestellt. Die Temperatur wird über den dünnen Draht an die Software übermittelt, deshalb ist es wichtig, dass dieser mit der Probe unter dem Metallrahmen festgespannt wird (Abb.: 18). Erst wenn der Probenhalter eine Temperatur von -80°C erreicht hat, wird mit der Evakuierung der Loadlock begonnen. Der Grund dafür ist, dass die Temperatur im Vakuum viel langsamer sinkt, als in der Stickstoffatmosphäre. Erreicht das Vakuum in der Loadlock einen Druck von weniger als $1{,}6 * 10^{-6} mBar$ kann die Kryo-Stage in die Main überführt werden. Dazu muss zuerst der Kontakt mit dem Kühlfinger unterbrochen werden, dann kann die Kryo-Stage in die Main eingeschleust werden. In der Software kann dann der richtige Probenhalter ausgewählt werden und die Stage in die richtige Position für die Messung gefahren werden. Dabei ist wichtig, dass an der Endposition der Kontakt zum Kühlfinger der Main hergestellt wird, damit die Probe nicht auftaut, Wasser ausgast und das Vakuum

verschlechtert. Bei Kontakt mit dem Kühlfinger darf die Stage nicht in X/Y-Richtung verfahren werden.

11.3 Analyse mit ICP-MS

Tabelle 12: Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze in ppb

^{151}Eu		^{153}Eu	
NWG	BG	NWG	BG
0,0455	0,1366	0,0492	0,1477

Nur die Kontrollen liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

Tabelle 13: Einwaage und Verdünnungsfaktor

Probenart	*Trockenmasse*	*Verdünnungsfaktor*
12.12.Blatt Kontrolle	0,49g	947362
12.12.Blatt 5mmol	0,49g	8217178
12.12.Blatt 10mmol	0,49g	9548549
12.12.Wurzel 5mmol	0,18g	9797027
12.12.Wurzel 10mmol	0,12g	9786811
12.12.Wurzel Kontrolle	0,26g	996560,7
2.12.Wurzel Kontrolle	0,24g	953644,9
2.12.Wurzel 5mmol	0,16g	10156891
2.12. Blatt 5mmol	0,39g	937988,9