



## Schlussbericht

Verbund: 05K2019 - Nanoscopy

Zuwendungsempfänger:	Hochschule Koblenz
Projektleitung:	Prof. Dr. Thomas Wilhein
E-Mail:	wilhein@rheinahrcampus.de
Förderkennzeichen:	05K19ULA
Förderzeitraum:	01.07.2019 - 31.12.2022
Zuwendung:	397.555,73 €
Projektträger:	Projektträger DESY
Zusätzlicher Kontakt:	haidl@hs-koblenz.de
Zusätzlicher Name:	Andreas Haidl

Genutzte Großgeräte:	Labor	Gerät	Experiment
	DESY	PETRA III	
	HZB	BESSY II	
Diplomarbeiten:	0		
Dissertationen:	0		
Habilitationen:	0		
Referierte Publikationen:	0		
Andere Veröffentlichungen:	14		
Patente:	0		
Bachelorarbeiten:	2		
Masterarbeiten:	3		
Staatsexamen:	0		

Dieser Bericht wurde beim Projektträger über einen individuellen Online-Zugang vom Projektleiter eingereicht und am 01.08.2023 18:24 für eine Veröffentlichung freigegeben.

# Schlussbericht

Zuwendungsempfänger:	Hochschule Koblenz
Projektleitung:	Prof. Dr. Thomas Wilhein
Verbund:	05K2019
Thema:	<b>Nanoscopy: Analytische Nanoskopie mit weichen Röntgenstrahlen. Teilprojekt 2</b>

## Zusammenfassung

Das zentrale Ziel dieses Projekts war die Weiterentwicklung unseres multifunktionalen AnImaX (Analytical Imaging with X-rays) Röntgenmikroskops als flexible, nutzerfreundliche Plattform für analytische Bildgebung mit weicher Röntgenstrahlung auf der Nanometer-Skala. Als transportables, an verschiedenen Strahlrohren adaptierbares Röntgenmikroskop, verfügt es über die Möglichkeit der Bildakquisition im Vollfeld- und Scanning-Modus. Insbesondere die Detektion der Fluoreszenzstrahlung im Scanning-Modus ermöglicht die Bildgebung von Elementverteilungen und von lokalen chemischen Spezies. In einer vorhergehenden Machbarkeitsstudie an dem P04-Strahlrohr von PETRA III konnten Elementverteilungsbilder im Scanning-Modus mit einer räumlichen Auflösung von unter 100 Nanometern und einer Aufnahmezeit pro Pixel von unter 10 Millisekunden an biomedizinischen Proben erreicht werden. Das Verbundprojekt Nanoscopy wurde gemeinsam von den ProjektpartnerInnen der Arbeitsgruppe von Birgit Kanngießer, Technische Universität Berlin (TUB) und der Arbeitsgruppe von Thomas Wilhein, Hochschule Koblenz (HSK) durchgeführt. Für die Weiterentwicklung zu einer nutzerfreundlichen Plattform mussten Maßnahmen zur Realisierung einer Messstrategie für einen hohen Probendurchsatz entwickelt und implementiert werden. Dies beinhaltete ein nutzerfreundliches Interface für die Aufnahme, Verwaltung und Auswertung von Daten und die Optimierung der Probenpräparation mittels Vormessungen mit einem Labor-Röntgenmikroskop. Zudem sollten dedizierte Auswerteprozeduren weiterentwickelt werden, die eine schnelle, zuverlässige Elementquantifizierung ermöglichen.

Die instrumentelle Weiterentwicklung war durchgängig mit spezifischen Anwendungen verknüpft. Dazu wurden im Berichtszeitraum insgesamt 5 Messkampagnen mit dem Röntgenmikroskop an dem P04-Strahlrohr von PETRA III durchgeführt. Die untersuchten Anwendungen aus den Bereichen der medizinischen Forschung, den Geowissenschaften und den Umweltwissenschaften wurden zusammen mit externen KooperationspartnerInnen geplant und durchgeführt. Zu den externen PartnerInnen zählen die Arbeitsgruppe von Marcus Makowski und von Antje Ludwig, beide Mitglieder im Sonderforschungsbereich 1340 „Matrix in Vision“, Karin Eusterhues, Friedrich-Schiller-Universität Jena und Jürgen Thieme, Brookhaven National Laboratory.

Leider wurde das Vorhaben durch die Auswirkungen der Corona-Pandemie seit Beginn des Jahres 2020 bis zum Ende des Vorhabens stark eingeschränkt und begrenzt. Konkret zu nennen sind Planungsunsicherheiten und massive Einschränkungen für den Messbetrieb am Synchrotron, für die Arbeiten in den Laboren und den dazu erforderlichen Reisetätigkeiten zwischen den Standorten der Pro-

jektpartnerInnen. Im weiteren Verlauf der Pandemie haben sich zusätzlich Lieferschwierigkeiten ergeben, da wichtige Komponenten nicht wie geplant beschafft werden konnten. Dies hat dazu geführt, dass nicht alle Projektziele erreicht werden konnten.

In den durchgeführten Messzeiten konnte gezeigt werden, dass die implementierte online Datenauswertung der Röntgenfluoreszenzspektren während der Messungen und die Ko-Lokalisierung mit, im Vorfeld der Messzeiten durchgeführten Untersuchungen mittels anderer Messmethoden, die Effizienz der Messungen, gerade im Bereich der Abrasterung von Proben für Absorptionsspektroskopie (NEXAFS), substantiell erhöht hat. Der entwickelte Messablauf erwies sich als sehr stabil und ermöglichte einen hohen Probendurchsatz. Aufgrund der Beschränkungen konzentrierten sich weitere Arbeiten auf die Weiterentwicklung der Auswerte-Software. Besonders zu nennen ist hier die Erweiterung der Auswertung von Röntgenfluoreszenzspektren zur Identifizierung und Beseitigung von Streueffekten. Es wurde gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Röntgenspektrometrie der Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) ein Konzept für geeignete Referenzmaterialien von verschiedenen nanoskaligen Objekten und unterschiedlicher Massenbelegung erarbeitet und umgesetzt. In der Projektlaufzeit konnten keine tomographischen Datensätze aufgenommen werden. Auch bestand keine Möglichkeit Referenzproben zu untersuchen, um die Effekte des großen Detektionsraumwinkels des Fluoreszenzdetektors zu charakterisieren und die erarbeiteten Modelle zu verifizieren.

Da in dem Projekt gezeigt werden konnte, dass die Weiterentwicklungen zu einer zuverlässigen, stabilen Röntgenmikroskopieplattform mit hohem Probendurchsatz geführt haben, werden die offenen Punkte gegenwärtig bereits bearbeitet.

# Bericht

## 1 Aufgabenstellung und Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Mit der bestehenden, multifunktionalen Endstation AnImaX, welche Absorptions- und Phasenkontrast und Röntgenfluoreszenzmikroskopie auf der Nanometerskala im weichen Röntgenbereich ermöglicht, wurde eine bisher unerreichte räumliche Auflösung im Fluoreszenzmodus und ebenso kürzeste Messzeiten bei Scans an dem P04 Strahlrohr von PETRA III erreicht. Diese ersten Machbarkeitsstudien zeigten bereits das große Potential des Aufbaus für biomedizinische Forschung auf der zellularen Ebene.

Um tatsächlich Forschungsfragen in den Lebenswissenschaften bearbeiten zu können, sollte die Endstation zu einer nutzerfreundlichen Plattform weiterentwickelt werden, die es ermöglicht eine größere Menge an Proben untersuchen zu können. Neben der Kombination von höchstauflösender Absorptions- und Röntgenfluoreszenznanoskopie im gleichen Aufbau am Synchrotron, sollte die Kombination von Labor-Röntgenmikroskopie und Synchrotron-Nanoskopie neue Untersuchungen von biomedizinischen Fragestellungen erlauben. Die zu entwickelnde Fluoreszenztomographie zusammen mit einer chemischen Speziation über Absorptionsspektroskopie vervollständigen die methodischen Möglichkeiten. Zur Realisierung von zuverlässigen, effizienten Messreihen sollte eine dedizierte Quantifizierungsroutine für Elementverteilungen entwickelt werden. Als erste Anwendungen sollten Untersuchungen von intravenös injizierten Nanopartikeln, die in der medizinischen Bildgebung als Sonden eingesetzt werden, im Verhältnis zu Zell- und Gewebebestandteilen durchgeführt werden. In der vorhergehenden Förderperiode wurden bereits experimentelle Voraussetzungen in Form einer Tomographiestage mit Kryo-Probenumgebung für eine Fluoreszenztomographie realisiert. In Bezug auf eine quantitative Bildanalyse ist eine Software vorhanden, die die unterschiedlichen Absorptionseffekte der Fluoreszenzstrahlung in der Probe für die Detektion unter großem Raumwinkel berechnet. Mit dieser Software können für bekannte Probengeometrien Röntgenspektren simuliert werden.

Die ProjektpartnerInnen der Hochschule Koblenz (HSK) und der TU Berlin (TUB) waren gemeinsam verantwortlich für die Realisierung der einzelnen Arbeitspakete. Dabei waren die Schwerpunkte der einzelnen Arbeitspakete einem der Projektpartner hauptverantwortlich zugeordnet. Entsprechend der sich ergänzenden Expertisen der Projektpartner lagen die Arbeitspakete zur Hardware-Entwicklung inklusive zugehöriger Programmierung hauptsächlich in der Verantwortlichkeit der Hochschule Koblenz; die der Datenaufnahme und Datenevaluation in der Verantwortlichkeit der TU Berlin. Diese Aufgabenteilung betrifft auch die Entwicklung der nutzerfreundlichen Plattform, der Implementation eines effizienten Arbeitsablaufs zwischen den bildgebenden Methoden und der Integration der Tomographie im Absorptions- und Fluoreszenzmodus.

Die allgemeinen Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens waren leider stark geprägt durch die massiven Beschränkungen aufgrund der Corona-Pandemie. Die wechselnden Einschränkungen und fehlende Planungssicherheit, vor allem bei Reisetätigkeit, waren im Berichtszeitraum ein Hemmnis für effektives Arbeiten sowohl am Synchrotron als auch im Labor. Hinzu kam eine massive Einschränkung der Tätigkeiten durch die Hochwasserkatastrophe im Ahrtal im Sommer 2021, von welcher der Projektmitarbeiter der Hochschule Koblenz direkt betroffen war und durch den großen Hackerangriff auf die TU Berlin im Frühjahr 2021, von dem alle Projektmitarbeitenden der TU Berlin betroffen waren.

## 2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Weltweit sind Synchrotron-Strahlungsquellen mit Aufbauten zur Röntgenmikroskopie ausgestattet. Ihre Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten unterscheiden sich entsprechend ihrer Anregungsenergie.

gien, ihres Erfassungsmodus (Vollfeld oder Abrasterung), ihres Kontrast-Modus (Absorption, Phasenkontrast), Probenumgebung (Vakuum, Kryo-Fixierung) und der Möglichkeit dreidimensionale Datensätze aufzunehmen. Da unsere AnlmaX-Endstation für den weichen Röntgenbereich geschaffen wurde, finden sich vergleichbare Aufbauten an den Synchrotron-Strahlungsquellen ALS, BESSY II, SLS, CLS, ELETTRA, Soleil, Diamond, Alba, NSRL, SSRF, PF, UVSOR, PLS, NSRRC, und SSRL. Full-Field Transmissions-Röntgenmikroskopie (FF-TXM) ermöglicht hochauflösende Röntgenbilder (routinemäßig unter 50 nm) in wenigen Sekunden und kann bei der ALS, BESSY II, Diamond und NSRL gefunden werden. Alle Aufbauten stellen die notwendige Probenumgebung für Kryo-Tomographie von Strahlungsempfindlichen Proben zur Verfügung. Ein Lichtmikroskop zur visuellen Kontrolle der Probe ist bei BESSY II, Alba und Diamond implementiert.

Experimente im Modus des Scannens (STXM) werden bei ALS, CLS, ELETTRA, Diamond, BESSY II, MAX IV, SLS, Soleil, UVSOR, PLS, PF, SSRF und SSRL angeboten. Das einzige Synchrotron mit einem flexiblen Wechsel zwischen dem FF- und STXM-Modus ist das TwinMic bei ELETTRA. STXM mit integrierter Tomographiestage existieren bei den Synchrotronen ALS, CLS, UVSOR, SSRF und PLS und mit Kryoumgebung bei ALS, Diamond, BESSY II und Soleil. Die höchsten räumlichen Auflösungen von 10 nm und kleiner wurden bei der ALS und der SLS realisiert. Typische, für Anwendungen zur Verfügung stehende Auflösungen liegen zwischen 30 nm und 50 nm. In diesem Bereich befindet sich auch die Auflösung des AnlmaX-Röntgenmikroskops. Die Möglichkeit das AnlmaX-Röntgenmikroskop zu transportieren und flexibel an Strahlrohre von unterschiedlichen Synchrotron-Strahlungsquellen im weichen bis „tender“ Energiebereich anzuschließen ist von Projektbeginn bis heute weltweit einzigartig.

Das AnlmaX-Röntgenmikroskop ist so konzipiert, dass es sowohl über einen Full-Field- (FF) als auch einen Scanning-Modus (STXM, Scanning Transmission X-ray Microscope) verfügt. Im FF-Modus wird ein relativ großer Bereich der Probe (mehrere 10 µm) homogen mit Röntgenstrahlung ausgeleuchtet und die transmittierte Strahlung auf einen orts aufgelösten Detektor abgebildet. Die räumliche Auflösung des Systems ist somit durch die Geometrie, die abbildende Optik und die Pixelgröße des Detektors limitiert. Beim STXM-Modus wird die Strahlung auf einen sehr kleinen Punkt fokussiert und die Probe durch den Fokus abgerastert. Der Strahldurchmesser im Fokus und die Schrittweite beim Rastervorgang der Probe definieren damit direkt die räumliche Auflösung. Der FF-Modus weist durch die direkte Abbildung deutlich kürzere Messzeiten auf als der STXM-Modus und ist daher besonders für schnelle Übersichtsmessungen geeignet. Der STXM-Modus bietet aber zudem die Option, über einen implementierten Fluoreszenzdetektor in Rückstreugeometrie die von der Probe emittierte charakteristische Röntgenstrahlung zu detektieren. Somit ist die Elementverteilung, auch von Spurenelementen, in Form von Bildern von orts aufgelösten zweidimensionalen Elementverteilungen zugänglich. Eine simultane Erzeugung von Transmissions- und Fluoreszenzbildern ermöglicht es Aussagen über die Elementverteilung mit physiologischen Eigenschaften (Absorptionskontrast, Phasenkontrast) zu korrelieren, was die korrekte Interpretation von Struktur-Eigenschaft-Beziehungen erleichtert. Für die Röntgenfluoreszenzmessungen (RFA) ist ein 4-Kanal Fluoreszenzdetektor mit großem Raumwinkel, der für die Bildgebung der Elementverteilung ausschlaggebend ist, implementiert. Zur Minimierung von Strahlenschäden, besonders bei Anwendungen im biomedizinischen Bereich, ist eine Kryoumgebung zur Kühlung der zu untersuchenden Proben mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in die Messkammer implementiert. Das individuelle Design der Kryo-Probenumgebung hat keine Einschränkung auf die oben beschriebene Flexibilität der Messungen (FF/STXM-Modus, Fluoreszenz) und erlaubt zusätzlich die Rotation der Probe, um auch die, während der Aufnahme tomografischer Datensätze, erhöhte Strahlenbelastung der Probe abzumildern. Zur Steigerung der Effizienz von Messzeiten an Synchrotron-Einrichtungen kann die Eignung präparierter Proben durch Vormessungen mittels eines Labor-Röntgenmikroskops an der TUB überprüft werden.

Erste biomedizinische und umweltbezogene Anwendungen wurden bereits erfolgreich durchgeführt. Sie zeigten das Potential des AnlmaX-Röntgenmikroskops für Untersuchungen in der Biomedizin und der Umweltanalytik mit einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich und einer zeitlichen Auflösung im

Millisekundenbereich. Die Kombination der Full-Field (FF)- und Scanning-(STXM) Modi und die Möglichkeit der chemischen Speziation mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie im Fluoreszenzmodus zeigten neue Möglichkeiten für Untersuchungen von Struktur-Eigenschaften-Beziehungen auf. Allerdings verwiesen diese ersten Untersuchungen auch auf die Notwendigkeit einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen, um schlüssige Ergebnisse zu erzielen.

### **3 Planung und Ablauf des Vorhabens sowie Kooperation mit Dritten**

Zur Realisierung des Vorhabens wurden Zwischenziele der verschiedenen Arbeitsgebiete definiert. Generell sind diese Ziele bestimmt von den Anforderungen der Anwendungen in der biomedizinischen Forschung und der Umweltforschung. Zu den Arbeitsgebieten zählt die Entwicklung eines effizienten Arbeitsablaufs für die Evaluierung der Daten im FF-Modus (Transmission) und für die Evaluierung der Röntgenfluoreszenz-Bildgebung im Scanning-Modus. Dies beinhaltet auch die Optimierung der Datenaufnahme und Datenverarbeitung. Ein weiteres Arbeitsgebiet ist die Implementierung und Optimierung von Tomographie im FF- und STXM-Modus und deren Kombination mit Tomographie am Labor-Röntgenmikroskop. Das dritte Arbeitsgebiet ist die Entwicklung einer verlässlichen Quantifizierung der Röntgenfluoreszenzdaten unter Berücksichtigung der Effekte des großen Detektor-Raumwinkels. Hierbei sind Absorptionseffekte bei der Röntgenfluoreszenz-Tomographie besonders zu berücksichtigen.

Das Vorhaben war geprägt durch die Auswirkungen der Corona-Pandemie seit Beginn des Jahres 2020 bis zum Ende des Vorhabens. Konkret zu nennen sind Planungsunsicherheiten und Einschränkungen für den Messbetrieb am Synchrotron, Arbeiten in den Laboren und den dazu erforderlichen Reisetätigkeiten zwischen den Standorten der ProjektpartnerInnen. Durch die auferlegten Maßnahmen zu Kontaktbeschränkungen waren nur 4 TeilnehmerInnen bei den Messzeiten möglich, wobei sich jeweils 2 Personen gleichzeitig am Arbeitsplatz aufhalten durften. Daher wurde bei der Vorbereitung der Experimente der Fokus darauf gelegt den 24-h-Messbetrieb auch mit einer reduzierten Personenzahl möglichst effizient zu nutzen. Zudem war der Projektmitarbeiter der Hochschule Koblenz im Sommer 2021 durch die Hochwasserkatastrophe im Ahrtal stark betroffen und für mehrere Monate in der Tätigkeit eingeschränkt. Hinzu kam die Kündigung des Projektmitarbeiters der TU Berlin zum Ende des Jahres 2021. Im letzten Quartal des Jahres 2021 musste daher substanzielle Zeit für eine Übergabe an den neuen Mitarbeiter aufgebracht werden.

In der Förderperiode wurden, trotz aller Beschränkungen, mit der geförderten Plattform für analytische Röntgenmikroskopie anwendungsbezogene Messkampagnen zusammen mit externen KooperationspartnerInnen durchgeführt (vgl. Abschnitt 5). Die Vorbereitungen einer Messzeit am Synchrotron teilt sich zum einen in die Planung zur Messstrategie auf, der Probenpräparation und die Vorbereitung des Experiments (Tests aller Komponenten, Transport, Aufbau). Die Messungen wurden zu gleichen Teilen von der HSK und der TUB in enger Zusammenarbeit mit den KooperationspartnerInnen der jeweiligen Anwendung übernommen. Die Aufarbeitung der Daten wurde von beiden Partnern entsprechend der vorhandenen Kompetenzen übernommen. Transmissionsdaten wurden von der HSK ausgewertet, Datensätze des Fluoreszenzdetektors von der TUB. In der Nachbereitung einer Messzeit erfolgte eine mehrmonatige Diskussion der Messdaten mit den externen Kooperationspartnern.

Im zweiten Halbjahr 2019 konnten, als einziger Projektzeitraum, die geplanten Meilensteine überwiegend entsprechend dem Projektplan umgesetzt werden. In zwei Messzeiten am P04-Strahlrohr von PETRA III konnte bereits eine Erhöhung der Effizienz der Messungen, gerade im Bereich der Abrasterung von Proben für Absorptionsspektroskopie (NEXAFS), erreicht werden. Die implementierte online Datenauswertung der Röntgenfluoreszenzspektren während der Messungen und die Kolokalisierung mit, im Vorfeld der Messzeiten durchgeführten Untersuchungen mittels anderer Messmethoden, war hierfür substanziell. Die durchgeführten Messungen beinhalteten medizinische und umweltwissenschaftliche Fragestellungen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Marcus Makowski, Charité

Universitätsmedizin Berlin (SFB 1340), wurden Untersuchungen zum Strahlzeitantrag „*STXM-based Investigation of Gadolinium Distribution in the damaged Endothelium of murine aortic aneurysms for non-invasive evaluation of rupture risk*“ durchgeführt. Ebenfalls bearbeitet wurden mit den PartnerInnen Karin Eusterhues, Friedrich-Schiller-Universität Jena und Jürgen Thieme, Brookhaven National Laboratory Untersuchungen zu dem Thema „*Spectromicroscopy at the C and O Absorption Edges to Unravel Formation of Mineral-Organic Associations in Soil*“.

Im Jahr 2020 mussten die beiden bewilligten Strahlzeiten am P04-Strahlrohr von PETRA III aufgrund der strikten Corona-Beschränkungen entfallen. Damit standen auch keine neuen Datensätze zur Verfügung, um die Quantifizierungsansätze für Röntgenfluoreszenzdetektoren mit großem Raumwinkel weiterzuentwickeln. Ebenso trugen die starken Zugangsbeschränkungen zu den eigenen Laboren dazu bei, dass geplante praktische Arbeiten kaum durchgeführt werden konnten. Daher konzentrierten sich die Arbeiten auf die Weiterentwicklung der Auswerte-Software. Besonders zu nennen ist hier die Erweiterung der Auswertung von Röntgenfluoreszenzspektren zur Identifizierung und Beseitigung von Streueffekten.

Um die wissenschaftlichen Ziele des Projekts „Nanoscopy“ zu erreichen, wurde daher der Schwerpunkt der Arbeiten im Jahr 2021 auf die effektive Nutzung der verfügbaren Arbeitszeit am Synchrotron ausgelegt. Dazu zählte neben der Weiterentwicklung der dem Projektantrag zugrundeliegenden Plattform für analytische Röntgenmikroskopie im Rahmen der vorgesehenen Zwischenziele, auch die gründliche Vorbereitung der Messkampagnen. Die bereits für das Jahr 2020 geplanten Messkampagnen am P04 Strahlrohr bei PETRA III konnten im ersten Halbjahr 2021 nachgeholt werden:

1. „*Investigation of the fate of Gadolinium in Macrophages using X-ray Fluorescence Nanoscopy*“, Kooperation mit dem SFB 1340 und der Arbeitsgruppe von A. Ludwig. Für vorbereitende Messungen an den Proben systemen wurde das an der Arbeitsgruppe Kanngießler, zur Verfügung stehende LTXM (laboratory transmission X-ray microscope) eingesetzt.
2. „*Spectromicroscopy at the C and O Absorption Edges to Unravel Formation of Mineral-Organic Associations in Soil*“ in Kooperation mit Jürgen Thieme, Brookhaven National Laboratory und Karin Eusterhues, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Für beide Messkampagnen wurde der volle Energiebereich des Strahlrohrs P04 genutzt. Der geplante effiziente Messablauf ermöglichte Messungen bei unterschiedlichen Anregungsenergien am gleichen Probenort. Im zweiten Halbjahr 2021 war eine weitere Messzeit geplant, die durch einen Defekt am Röntgenfluoreszenzdetektor verschoben werden musste. Bei Tests im Labor stellte sich heraus, dass die vier SDD-Elemente komplett ausgetauscht werden müssen. Der Hersteller des Detektors, Bruker Nano GmbH, zeigte sich bereit, die Elemente unentgeltlich auszutauschen und zum Anfang des Jahres 2022 wieder zur Verfügung zu stellen. Die geplanten Untersuchungen von Referenzmaterialien zur Weiterentwicklung der Quantifizierung der Röntgenfluoreszenzspektren mussten daher verschoben werden. Es wurde gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Röntgenspektrometrie der PTB ein Konzept für geeignete Referenzmaterialien von verschiedenen nanoskaligen Objekten und verschiedener Massenbelegung erarbeitet und umgesetzt. Zudem wurden die schnelle grafische Aufarbeitung und Präsentation der Messdaten während laufender Messungen weiterentwickelt. Im ersten Halbjahr 2022 konnte die für Dezember 2021 geplante Messzeit nachgeholt werden. Thema war „*Carbon and sulfur spectromicroscopy to corroborate chemical heterogeneity of free and mineral-bound microbial organic matter*“. Es konnte eine Vielzahl von Proben aus der Kooperation mit Karin Eusterhues von der Universität Jena gemessen werden. Wie sich bei den Messungen herausstellte wurde für das neue Detektormodul nicht das gleiche Schutzfenster eingebaut, wie beim alten Detektor. Es wurde bei der Reparatur versehentlich ein Mylar-Fenster mit rund 2.5 µm Dicke bereitgestellt. Die dadurch hervorgerufene Absorption der zu Fluoreszenzstrahlung hat speziell die Detektierbarkeit sehr leichter Elemente (z.B. Kohlenstoff) im Vergleich zum Vorgängermodell (vor Auftreten des Defektes) verschlechtert. Trotz dieser Einschränkung erwies sich der entwickelte Messablauf als sehr stabil und ermöglichte einen hohen Probendurchsatz.

Zudem konnte im Nachgang der Strahlzeit ein verbessertes Datenauswerteverfahren entwickelt werden, um zuverlässiger die Fluoreszenzsignale der einzelnen Elemente in den Röntgenfluoreszenzspektren zu isolieren.

#### 4 Verwendung der Zuwendung (wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises, z. B. Investitionen, Personalmittel)

Die Verwendung der Zuwendung an die Hochschule Koblenz ist, nach Positionen aufgeschlüsselt, in Tabelle 1 aufgelistet. Allgemeine Sachausgaben wurden für Verbrauchsmaterialien (Schrauben, Dichtungen, Chemikalien zur Probenpräparation und zum Säubern von Vakuumkomponenten, etc.), Vakuumkomponenten (Flansche, Vakuumdurchführungen, etc.) und Zubehör zur Arbeit mit Flüssigstickstoff und Gasen. Hinzu kamen eine Elektrobauteile, Photodiode und Halterungen zur vibrationsreduzierten Befestigung der Detektoren.

Dienstreisen beinhalteten hauptsächlich Reisen nach Hamburg zu den diversen Strahlzeiten an PETRA III, aber auch auf nationale und internationale Konferenzen sowie Dienstreisen nach Berlin für Besprechungen und gemeinsame Laborarbeiten, um die gemeinsame Arbeit am Synchrotron vorzubereiten.

Mit den Personalkosten wurden die bewilligte Personalstelle und studentische Hilfskräfte finanziert. Der Projektmitarbeiter der HSK hat die Koordination der Arbeitsabläufe mit der TUB koordiniert und mit der Unterstützung durch studentische Hilfskräfte die Arbeitspakete des Projektplans bearbeitet. Die Vorbereitung und Durchführung der Messkampagnen an PETRA III wurden mit einem zusätzlichen eigenfinanzierten Mitarbeiter der HSK unterstützt.

Die Investitionsmittel wurden entsprechend dem Projektplan verausgabt. Es wurden speziell für das Instrument benötigte Röntgenoptiken entworfen und beschafft, sowie eine Elektronik zur Datenerfassung/Masterclock in das Gesamtsystem integriert. Eine SPS Steuerung zur Überwachung des Vakuumsystems wurde beschafft um Beschädigungen durch Benutzerfehler z.B. beim Probenwechsel zu vermeiden. Dazu wurde auch die in der Geräteliste aufgeführte Kamera für den sichtbaren Spektralbereich beschafft. Sie dient dazu, dem Benutzer einen Blick in das Vakuumsystem zu ermöglichen, um damit den Justageprozess zu vereinfachen und Fehlbedienungen zu vermeiden.

**Tabelle 1:** Verwendung der Zuwendung an die Hochschule Koblenz

<b>Position:</b>	<b>Ausgabe in €</b>
Allgemeine Sachmittel	22,378,27 €
Dienstreisen	9.284,25 €
Investitionskosten	71.462,81 €
Personalkosten	203.391,07 €

#### 5 Erzielte Ergebnisse mit Gegenüberstellung der vereinbarten Ziele

Die im Projektplan vorgesehenen Abläufe der ineinandergreifenden Arbeitspakete und die daraus resultierenden Ergebnisse wurden durch die Corona-Pandemie gravierend gestört. Der entstandene Rückstand konnte nur teilweise aufgearbeitet werden, da neben weiterlaufenden Corona-Beschränkungen die Flutkatastrophe im Ahrtal die gemeinsame Arbeit teilweise zum Erliegen gebracht hat. Trotz dieser widrigen Umstände und weiteren Rückschläge konnten zentrale Arbeitsziele bearbeitet und erreicht werden.

Anwendungsorientierte Hardware-Entwicklung (HSK+TUB)



Zur besseren Vernetzung von Instrument und Lichtquelle, wurde eine Schnittstelle zum Strahlrohr P04 bei PETRA III, DESY implementiert und in der Projektlaufzeit standardmäßig bei Messkampagnen eingesetzt. Die Schnittstelle dient der Kommunikation mit dem Strahlrohr und erlaubt es Parameter sowohl zu setzen als auch abzufragen. Auch kann über die Schnittstelle der in das Strahlrohr integrierte Shutter genutzt werden, um strahlungssensitive Proben zwischen den einzelnen Messreihen vor unnötiger Strahlenexposition zu schützen. Zur Synchronisation der Detektoren und Baugruppen des Röntgenmikroskops wurde das Triggersystem überarbeitet und auf eine Masterclock umgestellt. Durch schlechte Verfügbarkeit der benötigten Komponenten konnte das Triggersystem in der finalen Version noch nicht am Synchrotron zum Einsatz gebracht werden. Ebenfalls wurde ein transportables Mikroskop auf Basis einer Machine-Vision Kamera zur Unterstützung bei der Probenpräparation und -dokumentation während der Messzeiten aufgebaut. Das System wird auch zur Überprüfung der Röntgenoptiken auf den Justagehaltern genutzt. Ergänzend kann die Kamera auch als Zweitnutzung von außen an das Vakuumsystem angebaut werden und für den Blick auf das Instrument genutzt werden. Aufgrund langer Lieferzeiten und der schlechten Verfügbarkeit von SPS-Komponenten, konnte das Vakuum Interlock-System erst teilweise in Betrieb genommen werden. Das Interlocksystem für das Transfersystem der Kryo-Probenumgebung ist vollständig; die verbleibenden Ventile, Schieber und Messpunkte wurden weitestgehend vorbereitet für den Anschluss an eine zentrale SPS-Steuerung.

#### Optimierung des Daten- und Erfassungsmanagements (HSK+TUB)

Für eine einheitliche Langzeitspeicherung sowohl der Mess- als auch der Metadaten wurde die Implementation einer zentralen Datenstruktur auf Basis von HDF5 und NeXus für die Betriebsarten STXM, NEXAFS und FF realisiert. Dazu werden die Daten der im System vorhandenen Detektoren durch eine neu geschaffene zentrale Instanz gesammelt, gebündelt und kohärent in einer komprimierten HDF5 Datei abgelegt. Durch das NeXus Markup können die Daten von externen Anwendungen eingelesen und verarbeitet werden. Die Implementation erfolgte unter der besonderen Berücksichtigung des, von NeXus bereitgestellten Validierungsverfahren. Es wurde damit die Interoperabilität und Kompatibilität zu NeXus Implementationen sichergestellt, damit auch externe Softwarepakete zusammen mit den im Projektkontext gewonnenen Messdaten verwendet werden können. Ebenfalls wurde eine grafische Schnittstelle implementiert, und damit das Starten der Messungen und die Verwaltung der Messabläufe vereinfacht.

#### Workflow Auswertung Transmissionsdaten (HSK)

Die Messdaten können für alle im Instrument vorhandenen Transmissionsdetektoren im NeXus Format abgelegt werden. Es konnte sowohl eine Live-Vorschau der Messdaten im laufenden Betrieb für die Betriebsarten STXM und NEXAFS realisiert werden als auch eine automatisierte Vorauswertung der Daten nach Abschluss der Datenerfassung. Diese Vorauswertungen stehen jeweils zusätzlich zu den im NeXus Format gesicherten Messdaten zur Verfügung.

#### Tomographie im FF- und STXM-Modus (HSK)

Das Arbeitspaket der 3D-Bildgebung (Transmissions- und Scanning Tomographie) weist im Vergleich zu anderen Arbeitspaketen den größten Rückstand bei der Bearbeitung der Arbeitspakete auf. Experimente am Synchrotron konnten in keinem der beiden Tomographieverfahren durchgeführt werden. Bei der Weiterentwicklung der Instrumentierung wurden in der Projektlaufzeit die Anforderungen der Tomographiemodi bei den Abläufen der Datenerfassung und der Synchronisation der Detektoren mit der Tomographiestage berücksichtigt. Implementiert und im Labor getestet wurde das auf einer Masterclock aufbauende Triggersystem für die Tomographieanwendung. Eine Schnittstelle zur Speicherung der tomographischen Messdaten im NeXus Datenformat wurde vorbereitet. Die im Projektumfang vorgesehenen Röntgenoptiken konnten abschließend definiert und beschafft werden.

#### Kombination von Labor- und synchrotronbasierten Röntgenmikroskopietechniken (TUB)

Die verschiedenen Probensysteme, die im Projektkontext für Messzeiten am Synchrotron genutzt wurden, sind auch am Labor-Röntgenmikroskop (LTXM) der Technischen Universität Berlin vermessen worden. Das LTXM wurde dabei sowohl für die Vorbereitung der Strahlzeiten als auch zur Charakterisierung der Proben genutzt. Bei der Entwicklung der Probensysteme konnten am LTXM die Eignung der Präparationstechniken für den Einsatz am Synchrotron untersucht werden. Ergänzend wurde das LTXM ebenfalls eingesetzt, um im Vorfeld von Messungen an PETRA III die Proben in Bezug auf wichtige Probenbereiche zu charakterisieren. Aufgrund der Arbeiten in der Projektlaufzeit ist nun der Probentransfer zwischen Labor- und Synchrotron-Instrumentierung möglich.

#### Workflow Auswertung Röntgen-Fluoreszenzdatensätze (TUB)

Um den Arbeitsablauf während der Messungen am Synchrotron zu verbessern, wurde eine erweiterte online-Vorschau der Messdaten des Fluoreszenzdetektors für die Messmodi XRF-STXM und NEXAFS realisiert. Auf Basis der Region-of-Interest Methode, werden vordefinierte Teile des Spektrums zur Laufzeit aufsummiert und als Elementverteilung-Maps dem Nutzer während der laufenden Datenerfassung zur Verfügung gestellt. Die Ausgaben der online-Auswertung werden zusätzlich zu den Rohdaten des Detektors gespeichert und stehen nach der Datenerfassung zusätzlich zu den im NeXus-Format abgelegten Daten zur Verfügung. Ergänzend zum NeXus-Format wurde eine Schnittstelle implementiert, um die selbst entwickelten Auswertungsroutinen auf die Fluoreszenzdatensätze anwenden zu können.

#### XRF-Quantifizierung bei großen Raumwinkeln (TUB)

Im Arbeitspaket XRF-Quantifizierung konnten im Berichtszeitraum hauptsächlich nur vorbereitende Arbeiten seitens der TU Berlin durchgeführt werden. Da aufgrund der Corona-Einschränkungen und des defekten Fluoreszenzdetektors wenig Messzeit am Synchrotron in der Projektlaufzeit zur Verfügung stand, musste die ursprünglich geplante Vorgehensweise (Vermessung verschiedener Nanopartikel-basierter Referenzmaterialien) angepasst werden. Dazu wurde gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Röntgenspektrometrie der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) ein Probensystem mit verschiedenen, nanoskaligen Objekten, verschiedenen Anordnungen und verschiedenen Massenbelegungen aus Al und Ge konzipiert und über die PTB beschafft. Seitens der PTB wurden die Massenbelegungen auf dieser Probe mittels ihrer referenzfreien Röntgenspektrometrie vorcharakterisiert, so dass dieser Probentyp einerseits als Transferprobe zur Charakterisierung/Validierung gerätespezifischer Eigenschaften (Raumwinkel der Detektion, Detektoreffizienz) für das AnlmaX-System verwendet werden und auch zur Validierung bestehender und zu entwickelnder Quantifizierungsansätze für das AnlmaX-System genutzt werden kann. Es ist daher geplant, dieses Probensystem im Rahmen der nächsten Stahlzeit an PETRA III mit dem AnlmaX-System zu vermessen, um die Elementquantifizierung weiter voranzubringen.

#### Absorptionseffekte bei großen Detektionsraumwinkeln in der XRF-Tomographie (TUB)

In der Projektlaufzeit konnten keine tomographischen Datensätze aufgenommen werden. Auch bestand keine Möglichkeit Referenzproben zu untersuchen, um die Effekte des großen Detektionsraumwinkels des Fluoreszenzdetektors zu charakterisieren und Modelle zu verifizieren.

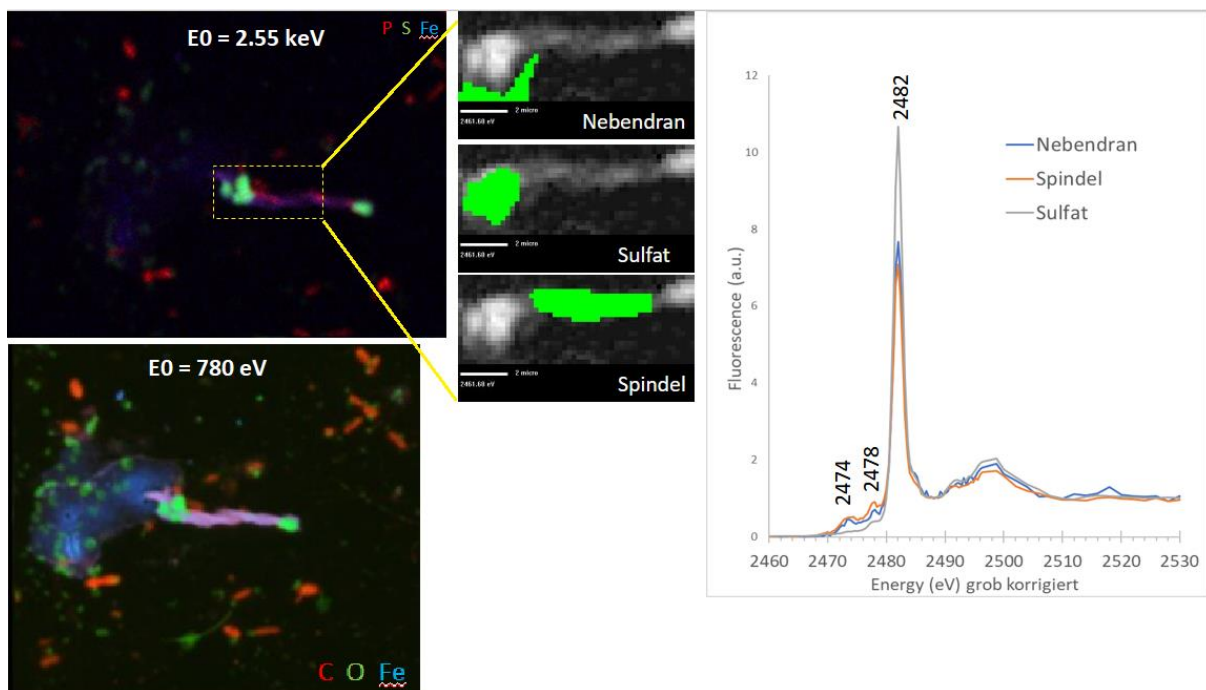
Neben den im Projektantrag genannten Zielen für die Weiterentwicklung der Instrumentierung und Methodik, stand eine starke Anwendungsorientierung für die Instrumentierung im Fokus. In der Projektlaufzeit konnten trotz der Einschränkungen durch die Corona-Pandemie zusammen mit externen KooperationspartnerInnen 5 Messzeiten mit der in diesem Antrag geförderten Plattform für analytische Röntgenmikroskopie an dem Strahlrohr P04 bei PETRA III durchgeführt werden.

Im Folgenden sollen exemplarisch einige Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dargestellt werden:

In der letzten Messzeit während dieser Förderphase konnte am P04 Strahlrohr eine Vielzahl von Proben im Rahmen der Kooperation mit Karin Eusterhues von der Universität Jena gemessen werden. Hierbei

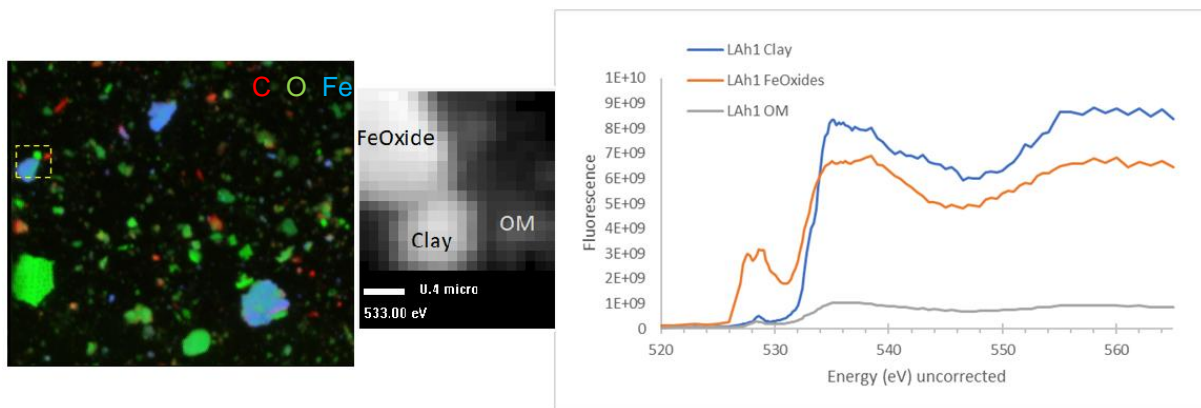
sollten Mineralablagerungen und Zusammensetzungen in verschiedenen Sedimenten untersucht werden. Die durchgeführten Experimente lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen: Hochauflösende Übersichtsscans, bei denen Bereiche auf den Proben abgerastert werden und an jedem Punkt die Röntgenfluoreszenzemission der Probe erfasst wird und NEXAFS-Messungen, für die die Röntgenfluoreszenzemission der Probe für jede Energie in einem vorher festgelegten Probenbereich aufgezeichnet wird.

In Abbildung 1 ist das Ergebnis eines solchen Übersichtsscans an einer Probe mit Sediment aus einem Gewässer gezeigt. Ein und derselbe Bereich auf der Probe wurde jeweils mit zwei verschiedenen Anregungsenergien abgerastert, um möglichst optimal verschiedene Elemente auf der Probe anzuregen. Im oberen linken Teil der Abbildung (Anregungsenergie 2.55 keV) ist die laterale Verteilung von P, S und Fe dargestellt während im unteren linken Teil (Anregungsenergie 780 eV) C, O und Fe dargestellt sind. In einem interessanten Bereich innerhalb dieses Übersichtsscans (markiert im oberen linken Teil) wurde dann ein hochauflösender NEXAFS-Scan an der K-Kante von Schwefel durchgeführt, um die verschiedenen chemischen Spezies von Schwefel lokal zu untersuchen. Da praktisch in jedem Pixel ein NEXAFS-Datensatz vorliegt (rechter Teil der Abbildung), kann durch eine Klassifizierung jeder Pixel einer Spezies zugeordnet werden (Mittlerer Teil der Abbildung 1).



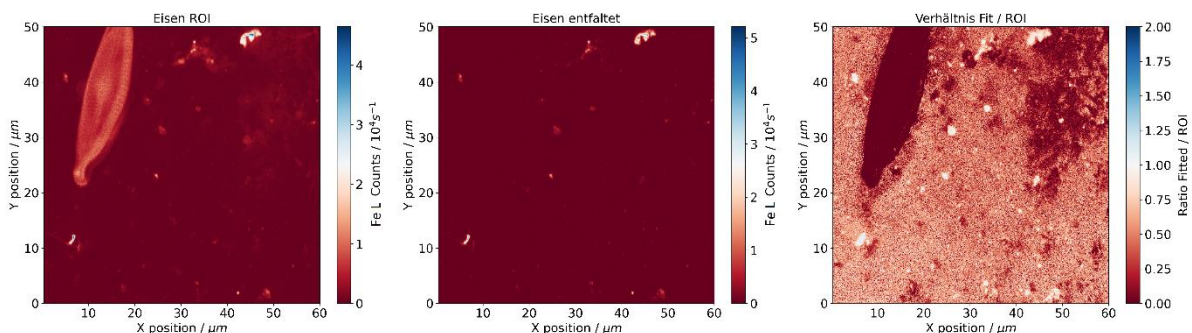
**Abbildung 1:** Zusammenfassung zu einem Teil der Messergebnisse der letzten Strahlzeit auf einer Sedimentprobe. Im linken Teil sind Fluoreszenzverteilungen dargestellt, welche bei zwei verschiedenen Anregungsenergien aufgenommen wurden (2550 eV und 780 eV). In beiden Bildern sind die Signale der gekennzeichneten interessanten Elemente per Farbcodierung überlagert, um deren Verteilung sichtbar zu machen. Außerdem wurde im gelb markierten Bereich eine Schwefel-K NEXAFS-Messung durchgeführt, um verschiedene Schwefelspezies in den Elementverteilungsmaps sichtbar zu machen (mittleres Bild).

In Abbildung 2 sind ähnliche Ergebnisse für eine Gesteinsprobe dargestellt. Auch hier wurden Übersichtsscans zur Bestimmung der Elementverteilung durchgeführt und dann in einem interessanten Bereich eine hoch ortsauflösende NEXAFS-Messung. Bei dieser Probe war allerdings die Sauerstoff K-Kante von Interesse. Im linken Teil der Abbildung ist wieder die Elementverteilung, im mittleren die Verteilung der verschiedenen Sauerstoff-Spezies und im rechten Teil die unterschiedlichen NEXAFS-Verläufe dargestellt.



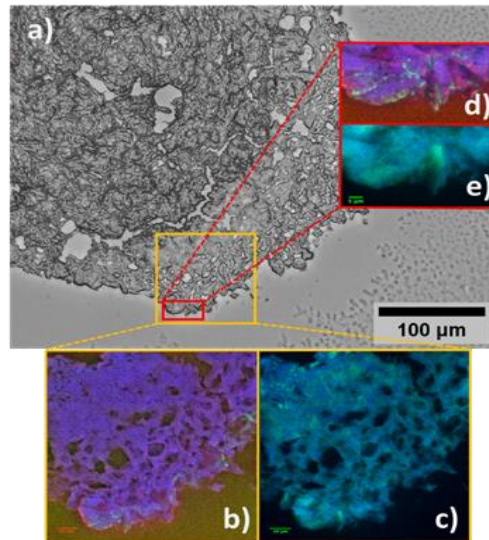
**Abbildung 2:** Zusammenfassung zu einem Teil der Messergebnisse der letzten Strahlzeit auf einer Gesteinsprobe. Im linken Teil ist eine Fluoreszenzverteilung dargestellt, welche bei einer Anregungsenergie von 780 eV aufgenommen wurde. Es sind die Signale der gekennzeichneten interessanten Elemente per Farbcodierung überlagert, um deren Verteilung sichtbar zu machen. Außerdem wurde im gelb markierten Bereich eine Sauerstoff-K NEXAFS-Messung durchgeführt, um verschiedene Spezies in den Verteilungsmaps sichtbar zu machen (mittleres Bild).

Im Nachgang der Strahlzeit wurde außerdem ein verbessertes Datenauswerteverfahren entwickelt, um zuverlässiger die Fluoreszenzsignale der einzelnen Elemente in den Röntgenfluoreszenzspektren zu isolieren. Bisher wurde in den meisten Fällen lediglich eine „region of interest“ (ROI) Evaluation durchgeführt, bei der alle spektralen Anteile innerhalb eines interessanten Bereiches im Spektrum aufsummiert werden. Dadurch können je nach spektraler Zusammensetzung auch relevante Signalanteile anderer Elemente mit aufsummiert werden und somit verfälschte Elementverteilungen extrahiert werden. Um das zu verbessern, wurden Teile der aufgenommenen Daten spektral entfaltet, d.h. die aufgenommenen Spektren in jedem Pixel wurden unter Nutzung von Detektorantwortfunktionen und relevanter Untergrundanteile nachgebildet. Dadurch können die Signale der einzelnen Elemente deutlich stabiler von anderen Anteilen separiert werden. Allerdings ist bei dieser Methode der Auswerteaufwand deutlich höher. In Abbildung 3 ist ein Vergleich zwischen ROI-Auswertung für Fe-L Fluoreszenz und einer Entfaltung gezeigt. Man erkennt deutlich, dass die in der ROI-Auswertung sichtbare Diatomee nach einer Entfaltung verschwindet und somit kein Eisen enthält. Ursache dafür ist, dass in diesen Pixeln ein sehr intensives Sauerstoff-Signal vorliegt, welches einen recht hohen Untergrund im Bereich des Eisens erzeugt.



**Abbildung 3:** Vergleich zwischen der lateralen Verteilung von Eisen auf einer Kieselalgenprobe bei Extraktion der Fe-L Fluoreszenzstrahlung per ROI (region of interest) bzw. durch eine spektrale Entfaltung.

Die Bindung von Kontrastmitteln auf Gadoliniumbasis in Zellen mit unterschiedlicher Glykosaminoglykan-Zusammensetzung wurde ebenfalls mit Hilfe des Scanning-Modus des Instruments untersucht. Die Untersuchungen erfolgten im Mai 2021 in Kooperation mit A. Ludwig (SFB 1340). Zur Bestimmung des Verbleibs von Gd-basierten Markern (direkte Gd-Behandlung, Dotarem, Magnevist und Kontrollgruppe)



**Abbildung 4:** Beispiel für die Messungen mit Gadolinium (Gd) behandelten Zellen bei unterschiedlichen Photonenenergien (a) VIS Mikroskop Übersicht über die Probe (b)(c) STXM-Übersichtsscans, 350 nm Schrittweite (d)(e) Detaillierte XRF-Untersuchung relevanter Teilbereiche, Schrittweite 150 nm; Farbcodes: (b)(d) 1280 eV Gd Na O (c)(e) 2550 eV P S.

wurden XRF-Messreihen durchgeführt. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für die durchgeführten Untersuchungen. Für optimale Fluoreszenzanregungsbedingungen zur Erhöhung der Messempfindlichkeit der relevanten Elemente, wurde jeder Bereich der Probe zweimal mit unterschiedlichen Photonenenergien (1280 eV und 2550 eV) gescannt.

## 6 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Projektzeitraum ergaben sich keine grundlegenden fachlichen Gründe von den im Projektantrag dargelegten Zwischenzielen abzuweichen. Jedoch stellten die mit der Corona-Pandemie einhergehenden Beschränkungen substantielle Behinderungen für die Arbeiten aller ProjektpartnerInnen dar. Die Einschränkungen bei der Arbeit in den Laborräumen der TUB und der HSK und die Aussetzung/Verschiebung der geplanten Messzeiten am Synchrotron haben dazu geführt, dass nicht alle Projektziele vollständig bearbeitet werden konnten.

Dennoch konnte die dem Antrag zugrundeliegende Plattform für analytische Röntgenmikroskopie signifikant im Rahmen des Projektantrags weiterentwickelt werden. Positiv hervorzuheben ist, dass durch die Pandemie bedingte, reduzierte Teilnehmerzahl während der Messkampagnen, die Nutzfreundlichkeit des Instruments mit Priorität verbessert wurde, um die in der Pandemiezeit zur Verfügung stehende Messzeit effizient nutzen zu können.

Neben der Möglichkeit nun Untersuchungen im Photonenenergiebereich von 250 eV bis 3000 eV durchzuführen, haben auch die erweiterten online-Auswertungen im XRF-STXM Modus und der ko-lokalisierten Erfassung von Nahkanten-Absorptionsspektren (NEXAFS) das Instrument erheblich aufgewertet. Darauf verweisen sowohl die Rückmeldungen der externen KooperationspartnerInnen, als auch die Tatsache, dass in der Projektlaufzeit mehr Anfragen nach seiner Nutzung bestanden, als Messzeiten geplant und durchgeführt werden konnten. Ohne die finanzielle Zuwendung vom BMBF wären diese Entwicklungen nicht möglich gewesen, da sie einen hohen personellen Einsatz erfordern.

## **7 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Das AnlmaX-Röntgenmikroskop hat in der STXM-Betriebsart mit der Kombination aus einem 4-Kanal Fluoreszenzdetektor in Rückstreugeometrie mit hohem Detektionsraumwinkel und der Brillanz des Strahlrohrs P04 bei PETRA III den Vorteil kurzer Integrationszeiten von bis zu 1 ms pro Pixel und damit die Möglichkeit einen hohen Probendurchsatz im Rahmen einer Messzeit zu gewährleisten. Ergänzt durch die Kryo-Probenumgebung ist das Röntgenmikroskop zudem ein interessantes Werkzeug für die Untersuchung von strahlungssensitiven Probensystemen.

Durch die in der Förderperiode designten und beschafften Röntgenoptiken ist der Einsatz noch vielseitiger und anpassbarer geworden. Durch das erweiterte Portfolio an Röntgenoptiken kann das Röntgenmikroskop in einem Energiebereich zwischen 250 eV und 3000 eV noch flexibler und anwendungsorientierter eingesetzt werden. Von externen Projektpartnern wird für Ihre Forschungsfragen die Möglichkeit geschätzt, nahtlos Untersuchungen (STXM-XRF, NEXAFS) bei unterschiedlichen Photonenenergien durchzuführen. Dazu können bis zu 4 verschiedene Röntgenoptiken im Vakuumsystem des Instruments verbaut werden und zum Einsatz gebracht werden. Damit können für eine Vielzahl an Anwendungen die besten experimentellen Randbedingungen hergestellt werden in Bezug auf Auflösung, Photonenzahl, Dauer der Messungen und Probendurchsatz.

Noch während der Datenerfassung kann durch die online-Auswertung der anfallenden Datenströme im Dialog mit externen ProjektpartnerInnen eine optimale Nutzung der Arbeitszeit am Synchrotron gewährleistet werden. Es können schnell die interessanten Bereiche auf der Probe identifiziert und detailliert mit höchster örtlicher Auflösung untersucht werden, oder ggf. auch geplante Scans vorzeitig abgebrochen werden, um Messzeit anderen Probenpositionen zuzuweisen. Von der Möglichkeit die Vorauswertungen der Messdaten noch während der laufenden Messzeit über eine Cloudinfrastruktur zu teilen, wurde und wird auch zukünftig Gebrauch gemacht.

Durch die bereits hergestellten, dedizierten Referenzproben und die fest geplante, absolute Kalibrierung des Röntgenfluoreszenzdetektors wird sich die Möglichkeit ergeben, zuverlässige Element-Quantifizierungen auf der Nanometer-Skala durchzuführen. Dadurch wird der Nutzerkreis für das Instrument erweitert und für weitere Forschungsaufgaben interessant.

## **8 Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Nach den vorliegenden Informationen sind keine neuen, für die Durchführung des Vorhabens relevanten Erkenntnisse von dritter Seite veröffentlicht worden. Wie bereits dargestellt, wird an Synchrotronstrahlungsquellen weltweit eine Vielzahl an Röntgenmikroskopen betrieben. Die Professionalität beim Einsatz der Systeme ist insgesamt als sehr hoch zu bewerten und es wird eine Vielzahl an Techniken im gesamten Röntgenspektralbereich angewendet. Es finden laufend weiterhin Neukonstruktionen von Lichtquellen und Instrumenten statt. Ein Beispiel dazu für ein Instrument in einem vergleichbaren Spektralbereich ist das SoftiMAX Strahlrohr an MAX IV, Lund, Schweden, welche in einem Photonenenergiebereich zwischen 275 eV und 2500 eV Röntgenmikroskopie betreibt (STXM, NEXAFS und Ptychografie).

Allerdings wird entsprechend den Veröffentlichungen bisher weder eine validierte, quantitative Elementbestimmung auf der Nanometer-Skala durchgeführt, noch durch eine Kombination mit Labor-Röntgenmikroskopie eine optimierte Probenvorbereitung.

Zudem handelt es sich bei den Instrumenten um ortsfeste Installationen an Synchrotronstrahlungsquellen. Hier nimmt Nanoscopy eine Sonderrolle ein, da es sich um ein transportables System handelt, welches nicht an eine feste Synchrotronstrahlungsquelle gebunden ist und daher flexibel eingesetzt



werden kann. Als Röntgenmikroskop „on demand“ kann das Instrument davon profitieren an verschiedenen Lichtquellen verwendet zu werden.

## 9 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

### 9.1 Referierte Publikationen (z. B. in Fachzeitschriften oder -büchern und referierte Konferenzproceedings)

Zu den in 9.2 erwähnten zwei Konferenzbeiträgen von Jürgen Thieme (2021) und von Karin Eusterhues (2022) ist noch eine Veröffentlichung in Vorbereitung. Weiterhin ist eine Veröffentlichung geplant, um das Instrument mit seinen aktuellen Fähigkeiten der Fachwelt vorzustellen.

### 9.2 Andere Veröffentlichungen (z. B. Konferenzbeiträge wie Vorträge und Poster, unreferierte Proceedings, Conference Notes)

Posterpräsentation A. Haidl, „Scanning Transmission X-ray Microscopy with Fluorescence Detection at P04“, Workshop Soft X-ray Science at PETRA, DESY, Hamburg, 09/2019

Vortrag L. Lühl, „Soft X-Ray Fluorescence Nanoscopy with the AnImaX endstation for biomedical and environmental applications“, 10th Workshop on X-ray Nano-Imaging of Biological and Chemical Systems at PETRA III, DESY, Hamburg, 01/2020

Posterpräsentation A. Haidl, „A Portable Endstation for Analytical X-ray Microscopy“, DESY Photon Science Users' Meeting, Hamburg, 01/2020

Vortrag K. Eusterhues, „Imaging organo-mineral associations of creek sediments“, 22nd EGU General Assembly Conference, online, 05/2020

Vortrag und Proceeding J. Thieme, „Natural Mineral-Organic Associations Studied by XRF and P-Edge XANES“, Goldschmidt 2020, Virtual, doi:10.46427/gold2020.2588, 06/2020

Vortrag und proceeding J. Thieme, „XRF and P K-edge XANES on natural mineral-organic associations“, Goldschmidt 2021, Virtual, doi:10.7185/gold2021.7246, 07/2021

Posterpräsentation A. Haidl, „Analytical X-ray Microscopy in the Soft and Tender Spectral Range with the AnImaX endstation“, 14<sup>th</sup> International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation, online, 03/2022

Posterpräsentation A. Haidl, „Analytical X-ray Nanoscopy of natural mineral-organic associations with the AnImaX endstation“, 15<sup>th</sup> International Conference on X-ray Microscopy, online, 06/2022

Vortrag B. Kanngießer, „X-Ray Nanoscopy for Investigations in Life Science“, European Conference on X-ray Spectrometry 2022, Brügge 06/2022

Vortrag A. Haidl, „XRF-Nanoscopy of Sediment combined with C/P K-edge NEXAFS in Fluorescence Mode“, European Conference on X-ray Spectrometry 2022, Brügge, 06/2022

Posterpräsentation A. Haidl, „Synchrotron based analytical X-ray nanoscopy of biomedical samples with the AnImaX endstation“, European Conference on X-ray Spectrometry 2022, Brügge, 06/2022

Vortrag K. Eusterhues, „Imaging distribution and speciation of P across natural Fe oxides, clay minerals, microorganisms, and diatoms by Nano-XRF and Nano-NEXAFS“, Goldschmidt 2022, Hawaii/online, doi: 10.46427/gold2022.12367, 07/2022

Vortrag A. Haidl, „Analytical X-ray Nanoscopy in the Soft and Tender Spectral Range with the AnImaX endstation“, DESY Science Seminar, online, 08/2022

Vortrag K. Eusterhues, „XRF und P-NEXAFS Spektromikroskopie an mineral-organischen Assoziationen aus Fe-reichen Bachsedimenten“, Jahrestagung der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft 09/2022

### 9.3 Abschlussarbeiten (Bachelor, Master, Diplom, Staatsexamen, Promotion, Habilitation)

Die Einschränkungen bei der Labornutzung durch die Corona-Pandemie spiegeln sich auch in der akademischen Ausbildung wider. Die Partizipation von studentischen Hilfskräften und die Anfertigung von Abschlussarbeiten im Projektumfeld gestalteten sich sehr schwierig. Trotz dieser Einschränkungen konnte im ersten Halbjahr 2020 eine Masterarbeit im Projektkontext abgeschlossen werden. Die im Jahr 2022 begonnene Bachelorarbeit hat sich aufgrund zu großer Beschränkungen verzögert.

Masterarbeit J. Heym, „Analytical X-Ray Fluorescence Nanoscopy of Human Endothelial Cells“, Technische Universität Berlin, 04/2020

Bachelorarbeit M. Sevenich, „Aufbau eines Laser-Scanning-Mikroskops zur Integration in ein synchrotronbasiertes Röntgenmikroskop“, Hochschule Koblenz, 10/2020

Masterarbeit N. Entz, „Entwicklung und Implementation einer Datenstruktur für multimodale Daten eines Raster-Röntgenmikroskops auf Basis von HDF5 / NeXus“, Hochschule Koblenz, 01/2022

Masterarbeit S. Hufschmidt, „Microcontroller-based evaluation and optimization of an optical shutter for applications in x-ray microscopy“, Hochschule Koblenz 11/2022

Bachelorarbeit M. Cave, „Analytical Imaging of environmental samples on the Nanometer-Scale“, Technische Universität Berlin (voraussichtlich Q2/2023)



## Kurzbericht

- öffentlich -

Zuwendungsempfänger: Hochschule Koblenz

Projektleitung: Prof. Dr. Thomas Wilhein

Verbund: 05K2019

Thema: Nanoscopy: Analytische Nanoskopie mit weichen Röntgenstrahlen.  
Teilprojekt 2

### 1. Ziel und Inhalt des Projektes

Das Ziel dieses Projekts umfasst die Weiterentwicklung eines Röntgenmikroskops für die multimodale Röntgenbildgebung mit weicher Röntgenstrahlung als flexible, benutzerfreundliche Plattform zur effizienten Untersuchung medizinischer, biologischer oder geologischer Proben. Als transportables, an verschiedenen Strahlrohren adaptierbares Röntgenmikroskop, verfügt es über die Möglichkeit der Bildakquisition im Vollfeld- und Scanning-Modus. Insbesondere die Detektion der Fluoreszenzstrahlung im Scanning-Modus ermöglicht die Bildgebung von Elementverteilungen und von lokalen chemischen Spezies. In einer vorhergehenden Machbarkeitsstudie an dem P04-Strahlrohr von PETRA III konnten Elementverteilungsbilder im Scanning-Modus mit einer räumlichen Auflösung von deutlich unter 100 Nanometern und einer Aufnahmezeit pro Pixel von unter 10 Millisekunden an biomedizinischen Proben erreicht werden.

Mit der benutzerfreundlichen Plattform für analytische Röntgenmikroskopie auf der Nanometer-Skala soll der Routineeinsatz von Röntgenmikroskopietechniken für die verschiedensten wissenschaftlichen Fragestellungen, mit einem besonderen Fokus auf die biomedizinische Forschung, etabliert werden. Ein wesentlicher Punkt dabei war die Ermöglichung eines hohen Probendurchsatzes, welche die Entwicklung einer adäquaten Messstrategie und Probenpräparation erforderte. Zudem sollte die enge Einbindung von Forschenden aus der Medizin, der Biologie und den Umweltwissenschaften in den gesamten Messprozess ermöglicht werden.

Die instrumentelle Weiterentwicklung sollte daher ein benutzerfreundliches Interface für die Aufnahme, Verwaltung und Auswertung von Daten und die Optimierung geeigneter Probenpräparationstechniken mittels Vormessungen mit einem Labor-Röntgenmikroskop beinhalten. Zudem sollten dedizierte Auswerteprozeduren weiterentwickelt werden, die eine schnelle, zuverlässige Elementquantifizierung ermöglichen. Als besondere Herausforderung sollte dies auch für eine 3D-Bildgebung mittels Fluoreszenztomographie umgesetzt werden.

### 2. Ablauf und Ergebnisse des Vorhabens

Das Verbundprojekt „Nanoscopy“ wurde gemeinsam von den ProjektpartnerInnen der Arbeitsgruppe von Birgit Kanngießer, Technische Universität Berlin und der Arbeitsgruppe von Thomas Wilhein, Hochschule Koblenz durchgeführt.

Das Vorhaben war leider durch die Auswirkungen der Corona-Pandemie stark begrenzt. Lediglich im ersten Projekthalbjahr konnte entsprechend den Verlaufsplänen gearbeitet werden. Konkret zu nennen sind Planungsunsicherheiten und massive Einschränkungen für

den Messbetrieb am Synchrotron, für die Arbeiten in den Laboren und für die dazu erforderlichen Reisetätigkeiten zwischen den Standorten der ProjektpartnerInnen. Im weiteren Verlauf der Pandemie haben sich zusätzlich Lieferschwierigkeiten ergeben, da wichtige Komponenten nicht wie geplant beschafft werden konnten.

Trotzdem konnten die Projektziele in Bezug auf Benutzerfreundlichkeit (Grafische Benutzeroberfläche, Interlocksystem, Masterclocksystem zur Datenerfassung, Live-Auswertung der Datenströme) und Datenmanagement (Live-Vorschau, kohärente Datenspeicherung, Workflowverbesserungen für Datenauswertung Transmissions- und Fluoreszenzdaten) erreicht werden. Durch die starken Beschränkungen bei der Planung und Durchführung der Messzeiten am Synchrotron, konnten jedoch keine Messungen zur 3D-Bildgebung mittels Röntgenfluoreszenztomographie durchgeführt werden. Die Entwicklung der dazu erforderlichen Systeme und Komponenten wurde jedoch weiterverfolgt. Insgesamt konnten im Projektzeitraum 5 Messkampagnen mit dem Röntgenmikroskop an dem P04-Strahlrohr von PETRA III durchgeführt werden. Der Verbleib von Gadolinium in unterschiedlichen Bereichen im Körper (Transportgefäße, Gehirn, Leber, Testzellen) konnte sowohl mit Marcus Makowski als auch mit Antje Ludwig, Sonderforschungsbereich 1340, Charité Berlin, untersucht werden. Mit Antje Ludwig wurden zusätzlich die Entzündungsprozesse von Endothelzellen untersucht. Die Assoziation organischer Moleküle mit mineralischen Oberflächen zur Stabilisierung organischer Stoffe im Boden gegen biologische Degradation wurde in Kooperation mit Karin Eusterhues von der Friedrich-Schiller-Universität Jena und Jürgen Thieme vom Brookhaven National Laboratory weiter untersucht. Die Ergebnisse dieser Messkampagnen wurden im Berichtszeitraum auf nationalen und internationalen Konferenzen vorgetragen.

### **3. Konkreter Nutzen sowie Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse**

Die im Laufe des Projekts realisierten Erweiterungen des Röntgenmikroskops zu einer benutzerfreundlichen Plattform ermöglicht nun einen routinemäßigen Einsatz für Forschungsfragen aus den Lebens- und den Umweltwissenschaften.

Die innovative Kombination von Messungen im Labor mit denen an Synchrotronquellen ermöglicht einen hohen Probendurchsatz, der für die Forschung in den Lebenswissenschaften notwendig ist. Es ist ein weiteres Modell für die effiziente kombinierte Nutzung von Strahlzeit am Synchrotron mit anderen laborbasierten Röntgenmethoden. Die Adaption des NeXus-Datenformats im Rahmen des Projekts und das damit einhergehende Forschungsdatenmanagement verbessert den Austausch der Messdaten mit externen KooperationspartnerInnen nachhaltig und ermöglicht Open-Data Veröffentlichungen mit einer niedrigen Einstiegsschwelle beim Zugriff sowohl auf die multimodalen Bilddaten als auch auf Röntgenfluoreszenzspektren.

Die Bandbreite zukünftiger Anwendungen ist groß. Schließlich wird mit dem Betrieb des Instruments an dem P04-Strahlrohr von PETRA III die derzeit höchste räumliche Auflösung in Kombination mit schnellen On-the-fly-Scans für Röntgenfluoreszenzmikroskope im Bereich zwischen 260 eV und 3000 eV erreicht. Hauptanwendungsgebiete sind im Bereich der Lebens- und Umweltwissenschaften zu finden, aber auch materialwissenschaftliche Fragestellungen lassen sich mit der Methode beantworten. So besteht bereits ein großes Interesse an materialwissenschaftlichen Untersuchungen im Bereich der Mikroelektronik. Im Gebiet der aktuellen Weiterentwicklung von Energieträgern kann Röntgenmikroskopie mit Anregung im Tender-Energiebereich zum Beispiel zu Fragestellungen zur lokalen Verteilung von Schwefel in Batterien und deren Einfluss auf den Lebenszyklus beitragen.