



Max-Planck-Institut für Metallforschung
Stuttgart

Structural and mechanical investigations of biological materials using a Focussed Ion Beam microscope

Steffen Orso

Dissertation
an der
Universität Stuttgart

Bericht Nr. 180
Dezember 2005

Structural and mechanical investigations of biological materials
using a Focussed Ion Beam microscope

Von der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Dipl.-Ing. Steffen Orso
aus Reutlingen

Hauptberichter:	Prof. Dr. phil. Eduard Arzt
Mitberichter:	Prof. Dr. rer. nat. Alexander Wanner
Tag der mündlichen Prüfung:	10.11.2005

Institut für Metallkunde der Universität Stuttgart und
Max-Planck-Institut für Metallforschung Stuttgart

Stuttgart, Dezember 2005



Danksagung:

Die vorliegende Doktorarbeit wurde zwischen Juni 2002 und September 2005 am Max-Planck-Institut für Metallforschung in Stuttgart angefertigt.

Herrn Prof. Dr. E. Arzt gilt mein besonderer Dank, für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren, für die Übernahme des Hauptberichts, für das Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Wanner danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Zeit, die er sich als Mitberichter für mich genommen hat.

Frau Dr. Ulrike Wegst möchte ich herzlich danken für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die Sie mir stets bei der Betreuung meiner Arbeit entgegen gebracht hat.

Dank schulde ich auch Dr. Christoph Eberl, der mit mir den Grundstein zu einem wichtigen Teil dieser Arbeit gelegt hat.

Herrn Dr. Stefan Kleindiek und Herrn Klaus Schock von der Firma Kleindiek Nanotechnik möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Kraftmesseinheit auf der Basis ihres Mikromanipulators danken.

Dr. Thomas Scheibel und Daniel Huemmerich von der Technischen Universität München möchte ich für die Proben der künstlichen und natürlichen Spinnenseide und die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Robin Seidel danke ich für die Proben und Lichtmikroskopbilder der Filiform Sensoren, sowie für die nette Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Birgit Heiland, Natascha Sauer, K.-H. Berckhemer und H. Eckstein für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft, für die Diskussionen und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Kommilitonen Petra Sonnweber-Ribic, Patric Gruber und Holger Pfaff.

Meiner Familie möchte ich herzlich danken.

Table of contents

1. Application of a Focussed Ion Beam (FIB) system to biological samples	13
1.1 Introduction: The Focussed Ion Beam (FIB) system.....	13
1.2 Literature review: FIB investigations on biological materials.....	14
1.3 Microscopy and milling of biological materials.....	18
1.3.1 Sample condition.....	18
1.3.2 Imaging.....	18
1.3.3 Milling.....	19
1.4 Structural investigations using the FIB.....	20
1.4.1 The hairy attachment system in insects.....	20
1.4.2 Mechanoreceptors in insects.....	23
1.5 Milling process and sputter rate.....	27
1.5.1 Milling process.....	27
1.5.2 Sputter rates.....	31
1.6 Influence of the Ga ⁺ -ion beam on the sample material.....	35
1.6.1 Redeposition	35
1.6.2 Ga ⁺ -ion implantation.....	36
1.6.3 Temperature rise due to the ion beam bombardment.....	37
1.6.4 Change in the mechanical properties.....	40
1.7 Discussion.....	42
1.8 Conclusions.....	52
1.9 References.....	54
2. Development of a novel <i>in situ</i> device for a Focussed Ion Beam system and a Scanning Electron Microscope	59
2.1 Literature review.....	59
2.2 Development of a device for <i>in situ</i> mechanical testing.....	64
2.3 Sample preparation.....	66
2.3.1 Beam bending samples.....	66
2.3.2 Tensile test samples.....	69
2.4 <i>In situ</i> beam bending.....	72
2.5 <i>In situ</i> tensile testing.....	75
2.6 Force and strain analysis.....	76
2.7 Measurement of the cross-sectional area.....	77

2.8 Discussion.....	79
2.9 Conclusions.....	84
2.10 References.....	85
3. Mechanical testing of biological materials.....	87
3.1 Introduction.....	87
3.2 Beam bending.....	87
3.2.1 Calibration demonstrated on Kapton [®]	88
3.2.2 Test on a hair from a horse tail.....	90
3.2.3 Properties of spruce (<i>Picea</i> sp.) wood cell wall.....	92
3.3 Tensile testing.....	95
3.3.1 A single seta of the beetle <i>Gastrophysa viridula</i>	95
3.3.2 Natural (<i>Araneus diadematus</i>) and artificial spider silk.....	99
3.3.3 Mechanoreceptor properties:	
A filiform airflow sensor on crickets (<i>Acheta domesticus</i>).....	109
3.4 Discussion.....	115
3.4.1 Bending tests.....	115
3.4.2 Tensile tests.....	119
3.5 Conclusions.....	126
3.6 References.....	127
4. Summary.....	131
5. Deutsche Zusammenfassung.....	135
6. Appendix.....	145
6.1 Stopping range of 30 keV Ga ⁺ -ions.....	145
6.2 Load-deflection curves of the beam bending experiments.....	148
6.2.1 Kapton [®]	148
6.2.2 Hair from a horse tail.....	150
6.2.3 Spruce wood cell wall material.....	152
6.3 Error calculations.....	154
6.3.1 Beam bending.....	154
6.3.2 Tensile testing.....	155
6.4 AutoIt macros.....	157

List of Abbreviations

AFM	Atomic Force Microscope
d	Ion Beam Spot Size [μm]
δ	Deflection [μm]
E	Young's Modulus [Pa]
EDX	Energy Dispersive X-ray Analysis
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
F	Load [μN]
FIB	Focused Ion Beam Microscope
GAD	Gas Assisted Deposition
GAE	Gas Assisted Etching
h	Height [μm]
I	Ion Beam Current [A]
I_M	Second Moment of Area
J	Ion Beam Current Density [$\text{A}/\mu\text{m}^2$]
κ	Thermal Conductivity [W/mK]
l	Length [μm]
LMIS	Liquid Metal Ion Source
MEMS	Micro-Electro-Mechanical Systems
MFA	Micro-Fibril Angle
ρ	Radius of the Affected Volume
r	Radius [μm]
SEM	Scanning Electron Microscope
3-D	Three-dimensional
T	Temperature
T_g	Glass Transition Temperature
ΔT	Change in Temperature [K]
TEM	Transmission Electron Microscope
V	Ion Acceleration Voltage [V]
VP	Variable Pressure
w	Width [μm]

Steffen Orso

**Structural and mechanical investigations of biological materials using
a Focussed Ion Beam microscope**

Institute of Physical Metallurgy, University of Stuttgart and
Max-Planck-Institute for Metals Research Stuttgart, 2005
172 pages, 83 figures and 28 tables

Abstract

Biological materials have been evolved over millions of years of evolution to fulfil the requirements posed by the organism and environment. A closer inspection of these materials reveals that they are composites with a highly hierarchical structure. A detailed understanding of the behaviour and function of these materials is possible only if the structure and the mechanical properties down to the smallest level of the hierarchy are known. This requires specimens of very small scale to be analysed.

This thesis describes the development and application of a novel technique for the quantitative investigation of both the three-dimensional structure and the mechanical properties of biological materials. This technique allows the micromechanical testing in bending and tension of samples of a few tens of micrometers in length and a few micrometers or less in diameter. It uses a Focussed Ion Beam system (FIB) as an *in situ* laboratory for structural investigations, sample preparation and sample fixation. Mechanical tests are carried out *in situ* in a FIB and a scanning electron microscope (SEM). Advantages of this method are that samples from larger objects can be prepared site-specifically using the FIB, and that testing in tension is possible without end effects due to gripping, since the samples are affixed by metal ‘tapes’ deposited using the FIB. Forces are measured with a piezoresistive Atomic Force Microscope (AFM) tip attached to a micromanipulator for high precision positioning. The displacement is determined from micrographs taken during the test.

The mechanical properties of three different polymeric and biological materials and structures were measured in bending *in situ* inside an SEM: polyimide (Kapton[®]), horse hair (keratin) and spruce wood cell wall material (cellulose-fibre composite). Four different biological materials were tested in tension *in situ* in a FIB: a single element (seta) of the hairy attachment system of a beetle *Gastrophysa viridula*, wind-receptor hairs from the filiform

sensor of crickets (*Acheta domesticus*) (both chitin-fibre composites), natural spider silk from the garden cross spider (*Araneus diadematus*) and artificial spider silk (protein fibres).

Some of the biological samples could be tested for the first time using the newly designed testing method. They showed exceptional high mechanical properties when compared to technical materials.

Steffen Orso

Strukturelle und mechanische Untersuchungen von biologischen Materialien unter Verwendung eines Focussed Ion Beam Mikroskops

Institut für Metallkunde, Universität Stuttgart und
Max-Planck-Institut für Metallforschung Stuttgart, 2005
172 Seiten, 83 Abbildungen und 28 Tabellen

Kurzzusammenfassung

Biologische Materialien haben sich im Laufe der Evolution über Jahrtausende hinweg dahingehend entwickelt, dass sie den Anforderungen, die durch den Organismus und die Umwelt an sie gestellt werden, genügen. Bei einer genaueren Betrachtung offenbart sich ihr Aufbau als der eines Verbundwerkstoffes mit einer hierarchischen Struktur. Um die Prinzipien der Optimierung biologischer Werkstoffe bis in die kleinste Hierarchieebene zu verstehen, ist es notwendig, sehr kleine Proben untersuchen zu können.

Die vorliegende Doktorarbeit beschreibt die Entwicklung und Anwendung einer neuen Methode zur quantitativen Untersuchung der dreidimensionalen Struktur und der mechanischen Eigenschaften von biologischen Werkstoffen. Diese neue Methode ermöglicht mikromechanische Untersuchungen in Biegung und Zug von Proben mit einer Länge von einigen zig μm und einer Breite von wenigen μm . Die entwickelte Methode verwendet ein Focused Ion Beam (FIB) System als ein *in situ* Labor für strukturelle Untersuchungen und Probenpräparation. Mechanische Versuche wurden *in situ* in einem FIB und einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass Proben zielgenau aus größeren Proben herauspräpariert werden können und dass es bei den Zugversuchen zu keinen Einspanneffekten durch ein Festklemmen der Proben kommt. Die Proben für die Zugversuche werden durch „Metallklebestreifen“, die mit dem FIB erzeugt werden, befestigt. Kräfte werden mit einer piezoresistiven Kraftmessspitze gemessen, die an einem nm-genau positionierbaren Mikromanipulator befestigt ist. Die Auslenkung und Dehnung der Probe wird anhand von Bildern bestimmt, die während der Versuche aufgenommen werden.

Die mechanischen Eigenschaften von drei polymeren und biologischen Werkstoffen und Strukturen wurden in Biegung *in situ* in einem Rasterelektronenmikroskop bestimmt:

Polyimid (Kapton[®]), Pferdehaar (Keratin) und eine Fichtenholzzellwand (Zellulosefaser Verbundwerkstoff). Es wurden ferner vier weitere Werkstoffe und Strukturen *in situ* unter Zugbelastung in einem FIB getestet: ein Haar (Seta) der bürstenartigen Haftstruktur an den Füßen des Ampferblattkäfers (*Gastrophysa viridula*), Windrezeptorhaare der Filiform Sensoren von Heimchen (*Acheta domesticus*) (beide sind Chitinfaser Verbundwerkstoffe), natürliche Spinnenseide der Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus*) und künstlich hergestellte Spinnenseide (Proteinfasern).

Einige der gemessenen Proben konnten mit der neu entwickelten Testmethode zum ersten Mal überhaupt gemessen werden. Sie zeigten dabei auch im Vergleich mit technischen Materialien exzellente mechanische Eigenschaften.

