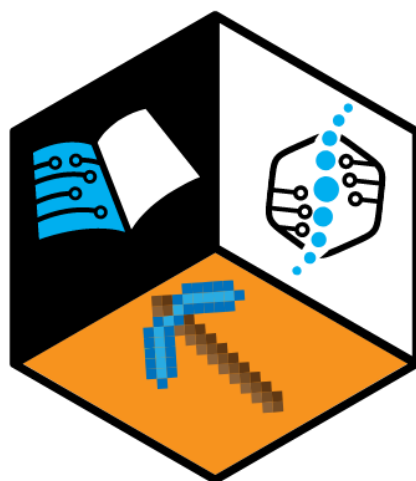


NANOWARE Program nauczania

MODUŁ 4: JAK WIDZIMY NANOCZĄSTKI?

DOSTAWCA: R1/T1.1



NANOWARE

31.10.2022

Pamukkale University

Opracowany przez: PAU

Numer projektu: 2021-2-PL01-KA220-SCH-000051200



Co-funded by
the European Union

The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Spis treści

1. Wprowadzenie do modułu	3
2. Jak widzimy nanocząstki?.....	4
2.1 Granice widzenia ludzkiego oka	4
2.2 Mikroskop.....	5
2.3 Co możemy zobaczyć za pomocą mikroskopu optycznego/światłnego?	6
2.3.1 Dalsze przetwarzanie w mikroskopii optycznej.....	8
2.4 Jak możemy zobaczyć atomy? Mikroskop elektronowy	9
2.4.1 Techniki mikroskopii elektronowej.....	11
2.4.2 Mikroskopia sondy	11
3. Przegląd mikroskopów	14
4. Referencje	15

1. Wprowadzenie do modułu

Po krótkim opisie ograniczeń widzenia ludzkiego oka, w tym module wprowadzane są różne typy i zasady działania mikroskopów. Szczegółowo wyjaśnione są metody wizualizacji i analizy nanocząstek. Moduł kończy się przeglądem typów mikroskopów i obszarów ich zastosowania.

Opis

W tym module studenci poznają metody wizualizacji i analizy nanocząstek, ich opis i zasady działania.

Cele modułu

Celem tego modułu jest podniesienie świadomości na temat:

- granice widzenia ludzkiego oka,
- celu stosowania mikroskopu świetlnego oraz innych metod wizualizacji takich jak SEM, TEM, AFM, STM,
- różnic pomiędzy wszystkimi metodami mikroskopowymi.

Cele kształcenia.

Studenci będą potrafili:

- wyjaśnić granice widzenia ludzkiego oka,
- opisać cel użycia mikroskopu świetlnego i zasady jego działania
- opisać, dlaczego nie możemy wizualizować atomów za pomocą mikroskopu świetlnego,
- wyjaśnić metody wizualizacji, które możemy zastosować do wizualizacji atomów i nanocząstek.

Efekty kształcenia

Po pomyślnym zakończeniu tego modułu studenci nauczą się:

- granic widzenia ludzkiego oka,
- celu stosowania mikroskopów, ich rodzajów i zasad działania,
- metody wizualizacji, które możemy wykorzystać do wizualizacji atomów i nanocząstek.

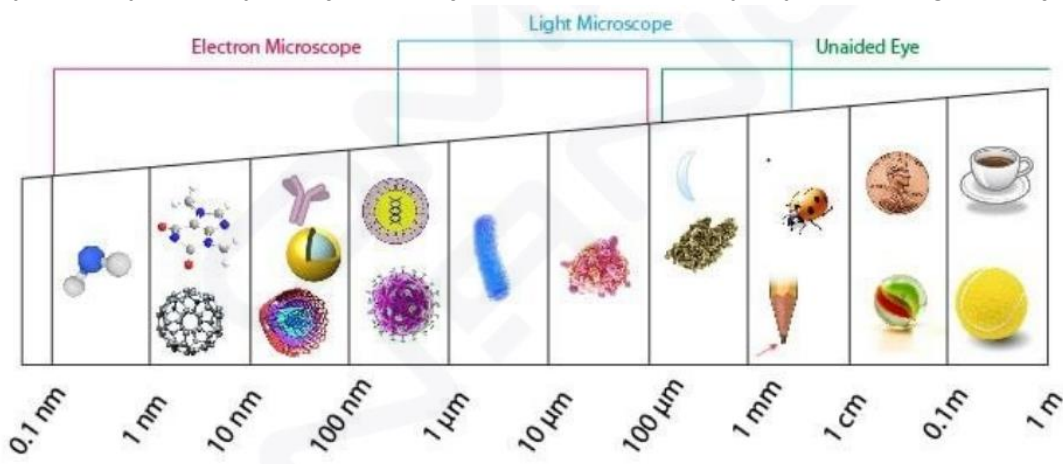
Przewidywany czas

Realizacja modułu będzie trwała 1,5 godziny. W grę wchodzi 30-minutowa część wykładowa oraz 1-godzinna sesja laboratoryjna.

2. Jak widzimy nanocząstki?

2.1 Granice widzenia ludzkiego oka

Oko ludzkie nie widzi obiektów mniejszych niż 40 μm (mikrometrów). ($1 \mu\text{m} = 0,000001 \text{ m} = 10^{-6} \text{ m}$)
Aby zobaczyć obiekty mniejsze od tej wielkości powinniśmy używać różnego rodzaju mikroskopów.



Rysunek 1. Zakres wizualizacji oka ludzkiego, mikroskopu optycznego/światłowego i mikroskopu elektronowego.

Organizmy eukariotyczne i bakterie mierzy się w mikrometrach, wirusy w nanometrach, a atomy i cząsteczki w skali angstromów.

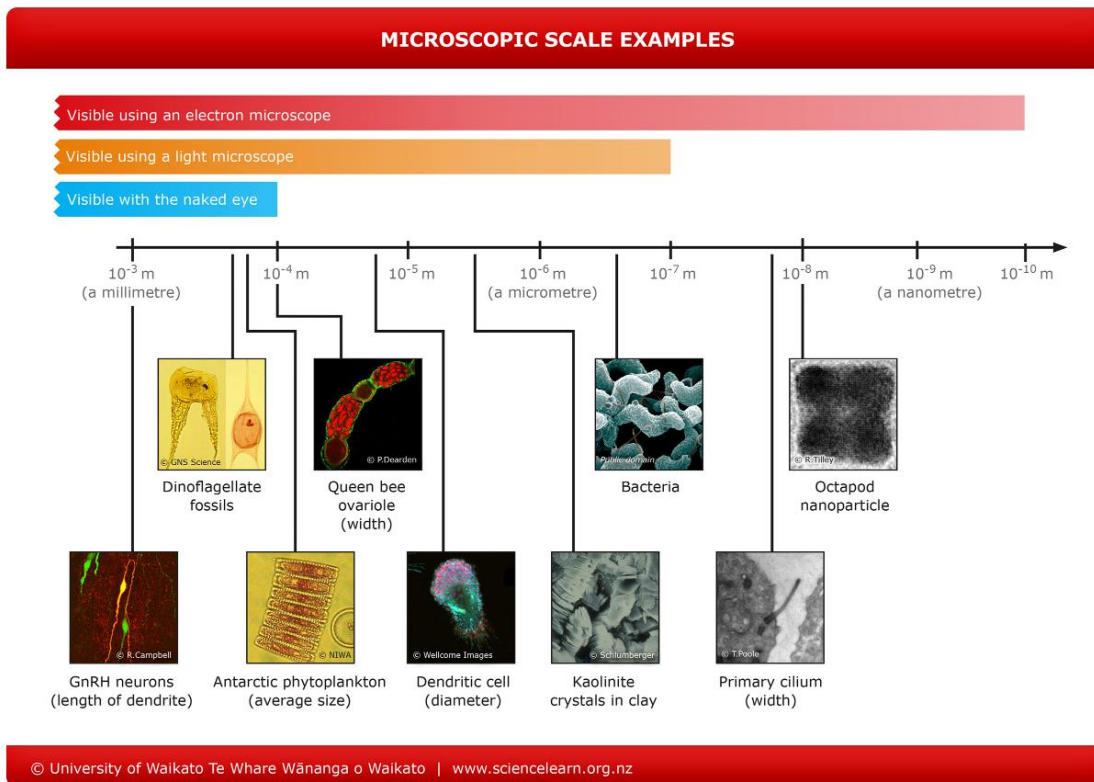
1 mm = 1000 μm (mikrometr)

1 μm = 1000 nm (nanometr)

1 nm = 1000 Å (angstrom)



Mikroskopy to przyrządy optyczne, dzięki którym możemy badać żywe lub pozbawione życia obiekty, które są zbyt małe, aby zobaczyć je gołym okiem. Przybliżają one małe obiekty do granic wzroku, czyniąc je widocznymi gołym okiem. Żywe i pozbawione życia obiekty, które można zobaczyć za pomocą mikroskopów świetlnych i elektronowych, przedstawiono na rysunku poniżej:



Rysunek 3. Przykłady skali mikroskopowej (<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/497-the-microscopic-scale>)

2.3 Co możemy zobaczyć za pomocą mikroskopu optycznego/światłowego?

Mikroskop optyczny, czyli mikroskop świetlny, wykorzystuje światło widzialne z systemem soczewek do powiększania małych obiektów. Mikroskop świetlny pozwala na powiększenie obiektów poprzez zastosowanie różnych soczewek i ułożenie tych soczewek. Jest to przyrząd często wykorzystywany w badaniach biologicznych. Mikroskopy świetlne opierają się na wiązkach światła o długości fali widzialnej wysyłanych ze źródła światła, przechodzących przez badaną próbkę i postrzeganiu obrazu powiększonego przez soczewki oraz przez obserwatora w zależności od różnic kontrastu, gęstości i grubości.

Za pomocą mikroskopu optycznego możemy oglądać obiekty o rozmiarach sięgających 1 mikrona. (Dla porównania, średnica ludzkiego włosa wynosi około 100 mikronów). Inne obiekty, które możemy zobaczyć za pomocą mikroskopu świetlnego to części kwiatów, owady, dżdżownice i ludzka skóra. Mikroskop świetlny jest idealny do obrazowania okazów biologicznych, ponieważ rozdzielczość mikroskopu świetlnego (zdolność mikroskopu do rozróżniania szczegółów) mieści się w zakresie rozmiarów komórek.

O jakości obrazu uzyskanego w mikroskopie świetlnym i innych typach mikroskopów decydują dwie cechy. Pierwszą z tych cech jest współczynnik powiększenia (magnification). Współczynnik powiększenia informuje o tym, ile razy większy jest uzyskany obraz od oryginalnych rozmiarów obiektu. Drugą właściwością jest rozdzielczość. Rozdzielczość wskazuje, w jakim stopniu w powiększonym obrazie zachowane są takie warunki, jak odległość i różnica gęstości struktur obserwowanego obiektu, czyli jak wyraźny jest obraz. W mikroskopach rozdzielczość i powiększenie zapewnia światło i obiektywy mikroskopowe. Soczewki pozwalają nam ukierunkować światło używane do różnych celów.

W obrazach mikroskopowych długość fali (λ) światła mikroskopowego i apertura numeryczna (NA), która wyraża moc zbierania światła przez obiektyw, to dwa czynniki, które wpływają na rozdzielczość. Istnieje liniowa proporcjonalność między aperturą numeryczną a rozdzielczością. Obiektyw o dużej wartości apertury numerycznej ma również wysoką rozdzielczość. Współczynnik załamania światła (n) jest wyrażeniem liczbowym, które określa ilość światła przepuszczanego/rozpraszanego bez załamania. Współczynnik załamania światła to stosunek światła emitowanego do światła załamanego. Wartość n , która oznacza współczynnik załamania światła, wyraża zdolność zbierania światła przez zastosowaną soczewkę. Innymi słowy, im wyższa wartość n , tym większa zdolność gromadzenia światła przez zastosowaną soczewkę.



[File:2019 - Editable Doc](#)

Rysunek 4. Części mikroskopu

Aby obraz był widoczny za pomocą mikroskopu, wymagany jest wysoki poziom kontrastu. Możliwe jest dostosowanie kontrastu poprzez zmianę natężenia światła i kąta, pod jakim światło przechodzi przez soczewki. Kąt padania światła z soczewki oświetlającej (kondensora) jest regulowany przez pierścienie fazowe w mikroskopie zwane diafragmą. Inną metodą stosowaną do regulacji kontrastu są filtry, które można umieścić przed źródłem oświetlenia. Możliwe jest wzmocnienie kontrastu poprzez zabarwienie badanej próbki różnymi środkami chemicznymi.

W klasach istnieją dwa rodzaje mikroskopów świetlnych. Jednym z nich jest stereomikroskop, służący do oglądania powierzchni obiektów, a drugim mikroskop złożony, służący do badania cienkiego przekroju. Jedną z zalet mikroskopów świetlnych (a stereomikroskopów w szczególności) jest to, że obiekty można oglądać przy niewielkim lub żadnym wcześniejszym przygotowaniu.

Istnieje potrzeba zwiększenia widoczności próbek biologicznych w mikroskopie świetlnym (zwłaszcza w mikroskopach złożonych). W tym celu do barwienia próbek stosuje się niektóre materiały barwiące, ponieważ często brakuje im kontrastu, co utrudnia rozróżnienie wszystkich ich części.

Jako barwnik często stosuje się jod do barwienia komórek roślinnych. Jod barwi skrobię zgromadzoną w komórkach na niebiesko, a pozostałe struktury na blady brąz, co pozwala na oddzielenie ich od siebie kolorystycznie. Inne najczęściej stosowane barwniki to hematoksylina i eozyna. W przypadku stosowania mikroskopii fluorescencyjnej, barwniki fluorescencyjne są używane do podświetlenia określonych części komórki lub tkanki. (<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/501-light-microscopes>).

Konfokalna laserowa skanująca mikroskopia fluorescencyjna (confocal) pozwala na oglądanie grubej próbki biologicznej pod mikroskopem bez konieczności pobierania przekrojów. Ta cecha umożliwia monitorowanie procesów w próbkach biologicznych, takich jak ruch mitochondriów wokół komórek i wejście systemu nośników leków przez błonę komórkową.

Konfokalna mikroskopia może być wykorzystywana do badania organelli komórek, tkanek lub określonych składników, takich jak białka. Badany składnik jest naświetlany substancją fluorescencyjną i staje się jaśniejszy o różnych kolorach na obrazie prowadzącym do jego najłatwiejszego zbadania.

Gdy chcemy zobaczyć minerały w skale, używamy mikroskopu ze światłem spolaryzowanym. W ten sposób różne minerały pojawiają się jako różne kolory w świetle spolaryzowanym (fale świetlne drgające tylko w jednym kierunku). Kiedy oglądamy minerały za pomocą mikroskopu w świetle spolaryzowanym, pozwala nam to na zbadanie ich kształtu, rozmiaru i orientacji.

2.3.1 Dalsze przetwarzanie w mikroskopii optycznej

W tym rozdziale omówimy, jak mikroskopy optyczne są wykorzystywane w analizie nanocząstek. Jak wspomnieliśmy w poprzedniej części, bezpośrednią obserwację nanocząstek można osiągnąć z wysoką rozdzielczością tylko w przypadku zastosowania mikroskopów elektronowych. Jednak ze względu na wady mikroskopów elektronowych, takie jak konieczność stosowania środowiska próżniowego, potrzeba ekspertów oraz czas i koszt pomiaru, wysiłki zmierzające do opracowania analiz nanocząstek za pomocą mikroskopów optycznych stają się coraz ważniejsze. Po pierwsze, samo użycie mikroskopów optycznych nie jest wystarczające do obserwacji nanocząstek. Maksymalne możliwe powiększenie to tylko 1000x, a najlepsza możliwa rozdzielczość to 200 nm przy użyciu

mikroskopów optycznych. Jednak rozwój technologii i nowe badania w tej dziedzinie pokazały, że urządzenia te mogą być wykorzystywane w niektórych analizach nanocząstek w wyniku połączenia ich z określonymi instrumentami. W szczególności obrazy cyfrowe uzyskane w wyniku połączenia kamer CCD (Charge-Coupled Device) z mikroskopami optycznymi umożliwiły ujawnienie wielu właściwości nanocząstek poprzez ich przetwarzanie za pomocą programów komputerowych. Zastosowanie mikroskopów optycznych w analizie nanomateriałów ze względu na ich zalety, takie jak łatwość użycia, niewymaganie środowiska próżniowego, koszt, dostępność i szybkość pomiaru, spowodowało wzrost liczby badań w tej dziedzinie. Niektóre z metod wykonywanych za pomocą mikroskopów optycznych to fototermiczna mikroskopia optyczna, skaningowa mikroskopia optyczna bliskiego pola (s-SNOM), mikroskopia ramanowska, mikroskopia rezonansu plazmonów powierzchniowych, mikroskopia ciemnego pola oraz mikroskopia fluorescencyjna.

2.4 Jak możemy zobaczyć atomy? Mikroskop elektronowy

Nowoczesny mikroskop świetlny może osiągnąć powiększenie do 2000 razy. Takie powiększenie jest wystarczające, aby zobaczyć wnętrze komórek roślinnych i zwierzęcych, ale nie wystarcza do zobaczenia wielu obiektów w nanoskali ze względu na długość fali światła. Obiekty w nanoskali są tak małe, że światło skierowane na nie nie może w nie trafić, co powoduje, że nie odbija się ono od nich i nie możemy ich zobaczyć.

Mikroskopy elektronowe pozwalają nam na szczegółowe oglądanie obiektów, ponieważ mogą osiągnąć znacznie większe powiększenie niż mikroskop świetlny. Niektóre mikroskopy elektronowe umożliwiają oglądanie obiektów tak małych jak molekuły lub nawet atomy. W przeciwieństwie do mikroskopu świetlnego, mikroskopy elektronowe muszą przejść przez etap przygotowania próbki przed bezpośrednim oglądaniem żywych istot.

Za pomocą mikroskopu elektronowego możemy zobaczyć obiekty tak małe jak atom (około jednej dziesięciomilionowej części milimetra lub 10^{-10} m). Wielkość atomu to ułamek nanometra (średnica atomu = 10^{-10} m, 1 nanometr (nm) = 10^{-9} m, zatem wielkość atomu = 0,1 nm). Innymi przykładami obiektów, które możemy zobaczyć za pomocą mikroskopu elektronowego są wirusy i cząsteczki.

Dwaj niemieccy naukowcy, Ernst Ruska i Max Knoll opracowali w 1931 roku metodę, która zapewniała lepszą rozdzielczość niż światło widzialne. W tej metodzie zamiast światła przez badaną próbkę przechodzą elektrony i uzyskuje się obraz. Dzięki tej metodzie ujawnił się pierwszy przykład mikroskopu elektronowego. Wiązki elektronów kieruje się na próbkę i każe się w nią uderzyć. Elektrony uderzające w próbkę są rozpraszane i wykorzystywane do obrazowania obiektu, w który uderzyły. W mikroskopie elektronowym obraz ten może być powiększony 500,00 razy. Podczas gdy mikroskop elektronowy pozwala nam szczegółowo zobaczyć wnętrze komórki, transmisyjny mikroskop elektronowy pozwala nam zobaczyć nanocząsteczki i atomy. W latach 1940-1950, dzięki pracom wykonanym przez Alberta Claude'a, Keitha Parera i George'a Palade'a, mikroskop elektronowy stał się również dziedziną wykorzystywaną w biologii.

W mikroskopie elektronowym zamiast światła jako źródło oświetlenia wykorzystywane są elektrony. Mikroskop elektronowy zapewnia lepszą rozdzielczość niż mikroskop świetlny, ponieważ długość fali elektronów wynosi około 0,04 nm. Długość fali elektronów jest około 10000 razy mniejsza niż długość

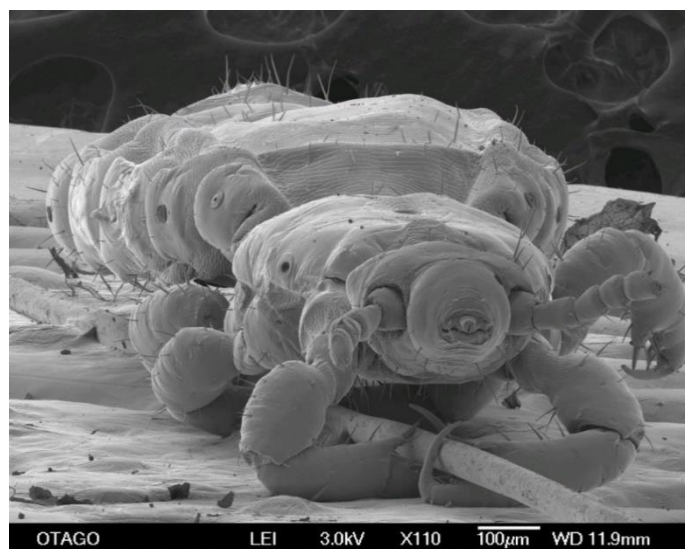
fali światła widzialnego. Ponieważ długość fali elektronów jest krótsza niż długość fali światła widzialnego, powiększenie i rozdzielczość zapewniane przez mikroskop elektronowy są wyższe niż w przypadku standardowych mikroskopów świetlnych.

W mikroskopie elektronowym elektrony są uwalniane przez działło elektronowe. Soczewki kondensacyjne przekształcają następnie wiązkę elektronów w pojedynczą, cieką wiązkę. W ten sposób elektrony są dostarczane w celu skupienia się na jednym punkcie. Wokół próbki znajdują się dodatnio naładowane układy, dzięki którym elektrony mogą podróżować w dół rzeki i być skierowane na próbkę. Zastosowanie mikroskopu elektronowego i przygotowanie próbek do przetwarzania obrazu jest bardziej złożone w porównaniu ze standardowymi mikroskopami. Próbka, która ma być użyta w mikroskopie elektronowym musi być w znacznie cieńszych przekrojach niż w mikroskopie świetlnym. Przepuszczając elektrony bezpośrednio przez tę próbkę, można tworzyć obrazy na podstawie stopnia zaczernienia na powierzchni fluorescencyjnej lub elektrony uderzają w powierzchnię próbki i są odchylane pod różnymi kątami i z różną szybkością w zależności od głębokości i gęstości badanej próbki. Elektrony błędzące są wykrywane przez detektory, w wyniku czego powstaje cyfrowy obraz próbki.

Istnieje wiele rodzajów mikroskopów elektronowych:

Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) był pierwszym mikroskopem elektronowym, który powstał w technologii mikroskopii elektronowej. Działa on na zasadzie wykrywania elektronów, które uderzają w cienki plaster próbki i przechodzą na drugą stronę. TEM jest podobny do złożonej mikroskopii świetlnej, pozwalając nam na oglądanie ciekiego przekroju próbki z bardzo wysoką rozdzielczością. Ta funkcjonalność zapewnia jeszcze bardziej szczegółowe badanie wielu małych obiektów.

Tomografia elektronowa to inny rodzaj TEM, który pozwala nam zobaczyć trójwymiarowy obraz komórki lub tkanki. Widzenie obiektów i ich części w trzech wymiarach pomaga nam zrozumieć relacje między nimi. Również tomografia elektronowa może dać dwuwymiarowe obrazy o wyższej rozdzielczości niż konwencjonalna TEM.



Rysunek 5. Wiesz oglądana za pomocą SEM (www.sciencelearn.org.nz/resources/502-types-of-electron-microscope)

Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) najpierw skanuje powierzchnię próbki wiązką elektronów skierowaną na obiekt, a następnie wykorzystuje elektrony odbite od powierzchni próbki do uzyskania trójwymiarowego i wysokorozdzielczego obrazu. Czasami, aby zobaczyć obiekty (owady takie jak wszy, pchły itp.), do uzyskania ich trójwymiarowych obrazów mogą wystarczyć niskie wartości powiększenia.

CryoSEM jest specjalną formą SEM, która pozwala nam zobaczyć i zbadać obiekty, które naturalnie zawierają wodę (rośliny, żywność, itp.). W przeciwieństwie do przygotowania próbki w konwencjonalnej SEM, próbki są zamrażane w ciekłym azocie przed badaniem w CryoSEM. Wielu badaczy woli pracować z CryoSEM, ponieważ jest on zbliżony do kształtu próbki przed jej przygotowaniem.

Dyfrakcja wsteczna elektronów (EBSD) jest stosowana do szczegółowego badania struktury minerałów w kamieniach i skałach. Detektory EBSD pracują jako część SEM. Wiązka elektronów jest kierowana na obiekt taki jak kamień/skała, elektrony uderzające w obiekt są rozpraszane, a urządzenie wykrywa te elektrony. Wzór rozpraszania daje tutaj ważne informacje o strukturze i kształcie kryształu minerału.

2.4.1 Techniki mikroskopii elektronowej

Na ogół technika bezpośredniego obrazowania nanocząstek wykonywana jest metodami mikroskopii elektronowej. Podstawowe zasady działania mikroskopów elektronowych zostały opisane w poprzednim rozdziale. Należy tu wspomnieć o dwóch różnych technikach mikroskopii elektronowej. Są to skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz tranzycyjna mikroskopia elektronowa (TEM). SEM jest metodą uzyskiwania obrazu poprzez odbicie od powierzchni materiału wiązki elektronów wysyłanych na badany materiał. W tej metodzie można uzyskać informacje o właściwościach powierzchniowych materiału. TEM to technika wykonywania obrazów poprzez przepuszczanie przez materiał wiązki wysyłanych elektronów.

Obie metody mają wady i zalety względem siebie. Ponadto, różne właściwości fizyczne nanomateriałów można stwierdzić za pomocą obu metod mikroskopii elektronowej poprzez rozpraszanie elektronów lub promieni (rentgenowskich), które powstają w wyniku oddziaływania elektronów z atomami materiału.

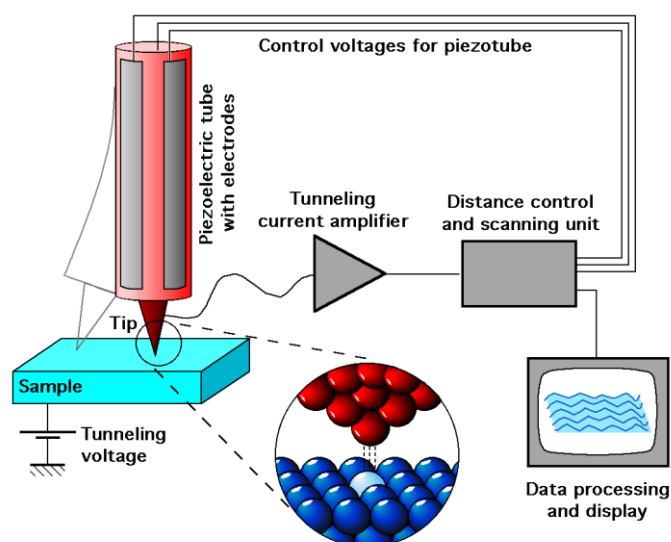
W SEM energia elektronów, które mają być wysłane na powierzchnię nanomateriału wynosi od 200 eV do 100 keV. W TEM wartość ta musi być większa, aby elektrony mogły przejść przez materiał. Wartość ta waha się od około 100 keV do 500 keV. W procesach obrazowania, które mają być wykonywane za pomocą SEM, materiał musi być przewodzący, aby elektrony były zorientowane. Jeśli materiał nie jest przewodzący, to jego powierzchnia powinna być pokryta materiałem przewodzącym (złoto, węgiel) o grubości kilku nanometrów. Jest to wada tej techniki zarówno pod względem trudności etapu przygotowania pomiaru i długiego czasu, jak i kosztów. Z drugiej strony TEM może być stosowany bezpośrednio na materiałach zarówno przewodzących, jak i izolujących. Jednak, aby wysyłane elektrony mogły przejść przez materiał, musi on być bardzo cienki lub musi być przygotowany o grubości kilku nm przy użyciu specjalnych technik. Jest to jedna z wad tej metody. W obu metodach można uzyskać z nanomateriałów informacje zarówno o ich obrazowaniu, jak i różnych właściwościach fizycznych.

2.4.2 Mikroskopia sondy

Mikroskopy sondowe należą do pośrednich metod obrazowania. W metodach tych za pomocą sondy można uzyskać informacje zarówno o obrazowaniu, jak i o właściwościach fizycznych materiału.

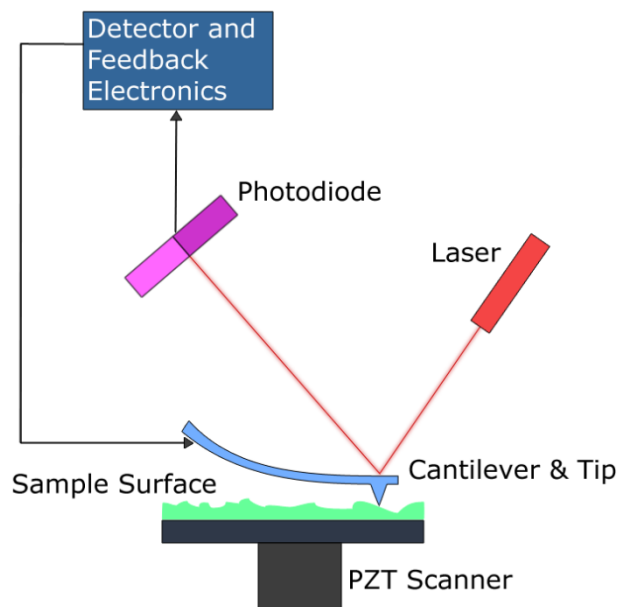
Najczęściej stosowanymi mikroskopami sondowymi są skaningowe mikroskopy tunelowe (STM) oraz mikroskopy sił atomowych (AFM).

STM zostały po raz pierwszy wynalezione w 1981 roku przez G.Binniga i H.Rohrera. W metodzie tej, za pomocą materiału piezoelektrycznego, pomiędzy ostrą końcówką a powierzchnią zachodzi przejście prądowe i uzyskuje się informacje o atomach skanowanej powierzchni. Metoda ta działa tylko na powierzchniach przewodzących. Generalnie jako kolce piezoelektryczne stosuje się wolfram, platynowo-iryd i nanorurki węglowe. Dzięki STM uzyskuje się informacje o stanie elektronowym regionu w materiałach próbek, można zmierzyć chropowatość powierzchni, a także uzyskać trójwymiarowe obrazy powierzchni metali. O ile jednak ustawienie mikroskopu powinno znajdować się w środowisku próżniowym, to pomiary wykonywane są w niskich temperaturach. (Rysunek 6).



Rysunek 6. Struktura skaningowej mikroskopii tunelowej
(https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Scanning_tunneling_microscope)

AFM jest metodą stosunkowo łatwiejszą i bardziej użyteczną niż metoda STM. W metodzie tej wysokorozdzielcze, trójwymiarowe obrazowanie powierzchni przewodzącej lub izolującej uzyskuje się za pomocą końcówki igły zaostrejzonej do wymiarów atomowych. Obrazowanie odbywa się poprzez badanie oddziaływania końcówki igły z powierzchnią. W tej metodzie ruch igły działa na zasadzie odbicia lasera, padającego na powierzchnię igły, do fotodiody (rysunek 7).

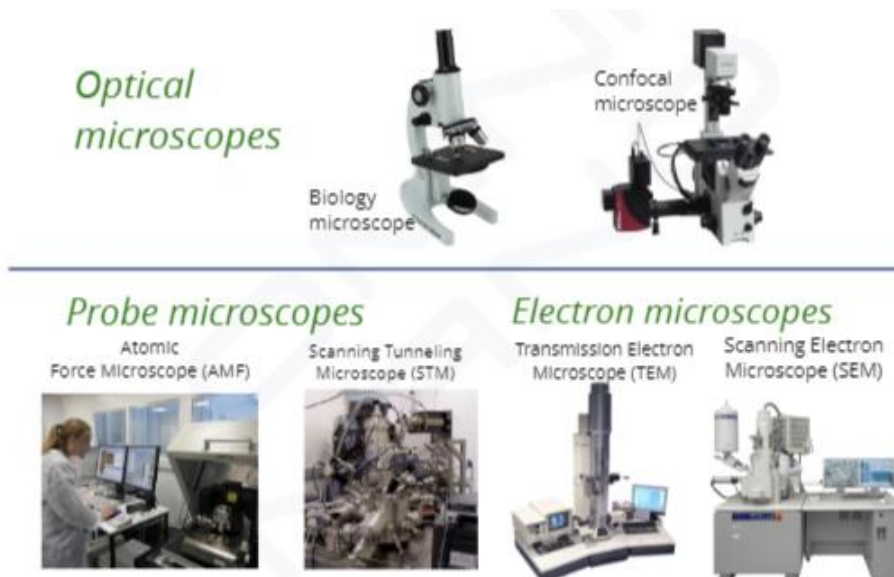


Rysunek 7. Struktura mikroskopu sił atomowych

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1a/Atomic_force_microscope_block_diagram.png)

3. Przegląd mikroskopów

Rodzaje mikroskopów, które są skategoryzowane według tego działu, można zobaczyć w obrębie poniższego rysunku:



Rysunek 8. Rodzaje mikroskopów

4. Referencje

1. <https://evrimagaci.org/mikroskoplarin-genel-ozellikleri-hangi-mikroskop-cesitleri-hangi-deneylerde-kullanilir-9830>
2. https://acikders.tuba.gov.tr/pluginfile.php/11110/mod_resource/content/0/konu12.pdf
3. <https://study.com/academy/lesson/how-to-use-a-microscope-lesson-for-kids.html>
4. <https://omninano.org/nanotechnology-stem-curriculum/>