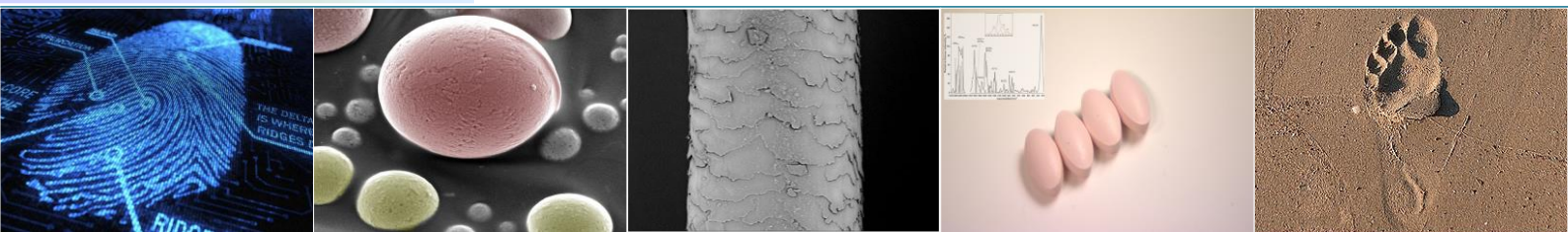


## Ćwiczenie 8

# Analiza materiału dowodowego przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)



## I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z zasadą działania skaningowego mikroskopu elektronowego.

### Pytanie organu procesowego:

- A. Czy badane włosy mogą należeć do tej samej osoby?
- B. Które narzędzia zostawiły ślady na powierzchni metalowego stolika:



Nóż do szkła



Nóż kuchenny



Diamentowy nóż do szkła

## II. Wstęp teoretyczny

Etymologicznie słowo mikroskop pochodzi z języka greckiego „*mikros*”- mały i „*skopeo*”- patrzę, obserwuję. Mikroskopię możemy podzielić na: optyczną, elektronową, jonową i ultradźwiękową. Jeżeli za kryterium podziału przyjmujemy metodę obrazowania to wyróżniamy mikroskopię: holograficzną, skaningową i transmisyjną. Mikroskopia jest dziedziną dynamicznie rozwijającą się. Ciągłe powstają nowe rozwiązania techniczne, ulepszone są dostępne oprogramowania, dlatego temat mikroskopii jest bardzo szeroki i ciekawy.

Początkowo podstawowym ograniczeniem jakości uzyskiwanych obrazów w mikroskopach optycznych były wady soczewek. Gdy ten problem zminimalizowano, napotkano na kolejną barierę. Zjawisko dyfrakcji powoduje, że zobaczyć można tylko obiekty o rozmiarach większych lub porównywalnych z długością stosowanej fali. Dlatego też mikroskopy optyczne pracujące w zakresie światła widzialnego osiągają maksymalne powiększenia rzędu 1500 razy. Dalsze zwiększanie zdolności rozdzielczej okazało się możliwe

poprzez zastąpienie światła strumieniem elektronów, z którymi jest związana fala o wyraźnie mniejszej długości.<sup>1</sup>

Ogólna idea budowy mikroskopu elektronowego jest oparta na mikroskopie optycznym. Zamiast żarówki mamy działło elektronowe. Wiązka elektronów jest wysyłana przez katodę na zasadzie termoemisji lub emisji polowej. Warunkiem koniecznym pracy mikroskopu elektronowego jest wysoka próżnia, która jest wytwarzana przez odpowiednie pompy. Wstępnie uformowana wiązka elektronów zostaje rozpędzona w obszarze pomiędzy katodą i anodą. Zwiększenie napięcia pozwala na zwiększenie pędu elektronów, i zmniejszenie długości fali. Przykładowo, gdy napięcie przyspieszające  $U = 300$  kV, wtedy długość fali elektronów  $\lambda = 0.00197$  nm, prędkość elektronów w kolumnie mikroskopu  $v = 0.776 \cdot c$ .

Soczewki w mikroskopie elektronowym są elektromagnetyczne, a obraz powstaje na ekranie fluorescencyjnym, kliszy lub matrycy CCD. W przypadku mikroskopu SEM stosuje się detektory półprzewodnikowe lub detektor Everharta-Thornleya.

W mikroskopie skaningowym wiązką elektronów skanuje powierzchnię przewodzącej próbki linia po linii, zaś transmisyjny bada elektrony, które przeszły przez specjalnie przygotowaną bardzo cienką próbkę.

---

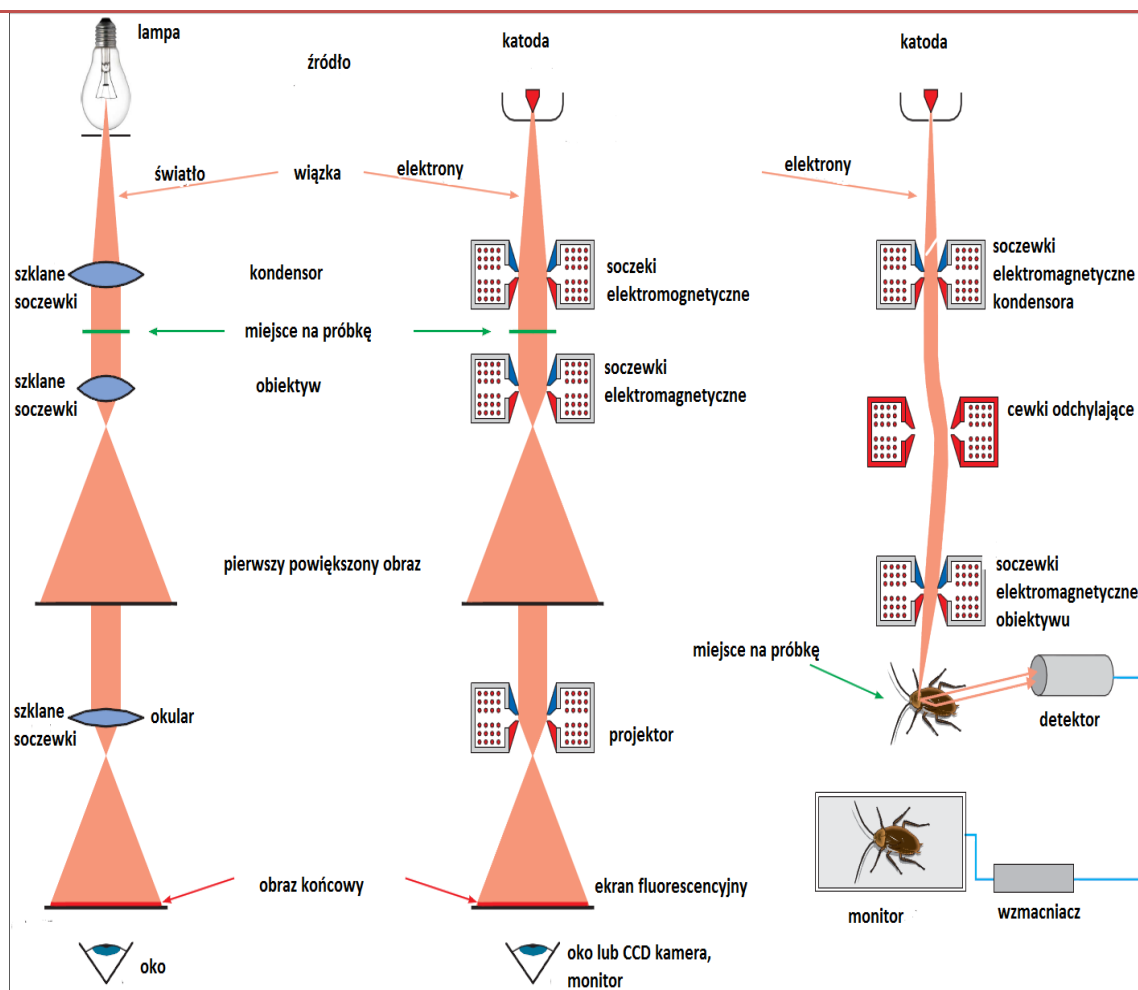
<sup>1</sup> \*Elektrony mają podwójny charakter: korpuskularno-falowy. Długość fali elektronów zależy od prędkości, jaką uzyskają przyspieszone w polu elektrostatycznym między katodą a anodą w mikroskopie elektronowym:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv}$$

gdzie:  $\lambda$ - długość fali,  $h$ - stała Plancka,  $p$  = pęd elektronu,  $v$ - prędkość elektronu,  $m$ - masa elektronu.

Po wprowadzeniu poprawki relatywistycznej, istotnej przy dużych prędkościach oraz zależności pędu od napięcia przyspieszającego  $U$ :  $p = \sqrt{2meU}$ , otrzymamy równanie:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU(1 + \frac{eU}{2mc^2})}}, \text{ gdzie: } c - \text{prędkość światła.}$$



Mikroskop optyczny

TEM

SEM

W wyniku oddziaływania wiązki elektronów z materiałem próbki:

- część przechodzi przez próbkę prostoliniowo (**elektrony pierwotnie nierozproszone**);
- część przechodzi przez próbkę zmieniając swój tor (**elektrony pierwotnie rozproszone**);
- część odbija się od próbki (**elektrony pierwotnie wstecznie rozproszone**);
- z powłok elektronowych próbki wybijane są elektrony i biegają w kierunku przeciwnym niż wiązka pierwotna (**elektrony wtórne**);
- atomy zostają pozbawione elektronu, a przeskokowi elektronu z poziomu o wyższej energii na wolne miejsce na powłoce wewnętrznej towarzyszy **emisja charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego**.

Wykorzystano to w następujący sposób:

- elektrony pierwotnie rozproszone i nierozproszone - mikroskopia transmisyjna;
- **elektrony wstecznie rozproszone i wtórne – mikroskopia skaningowa;**
- promieniowanie rentgenowskie - mikroanalizator rentgenowski.

Długość fali elektronów jest ok 100 000 razy mniejsza niż długość fali światła i dzięki temu jest możliwe osiągnięcie w mikroskopie elektronowym zdolności rozdzielczej 0.3 nm, a w przypadku transmisyjnej mikroskopii wysokorozdzielczej około 0.1 nm. Badania materiałów przy użyciu mikroskopów elektronowych cieszą się coraz większą popularnością ze względu na ich zdecydowanie większe możliwości badawcze w porównaniu z mikroskopami świetlnymi. Dodatkową zaletą mikroskopów elektronowych jest możliwość połączenia badań topografii powierzchni próbki z analizą fazową i krystalograficzną.

Skaningowy mikroskop elektronowy umożliwia obserwację próbek litych, bez konieczności pracochłonnego przygotowania cienkich folii lub replik jak w przypadku mikroskopu transmisyjnego. Jesteśmy w stanie obserwować nie tylko warstwę wierzchnią próbki, ale również uzyskiwać informacje o budowie materiału.

Zdolność odbijania elektronów przez atomy pierwiastków zależy w dużym stopniu od liczby atomowej  $Z$  i rośnie z jej wzrostem co stanowi źródło o chemicznym zróżnicowaniu próbek. Ziarna ciemniejsze na obrazie uzyskanym w SEM zawierają pierwiastki lżejsze, jaśniejsze o większej liczbie  $Z$ .

Ze względu na małą energię tylko elektrony wtórne emitowane blisko powierzchni mają szansę opuścić próbkę i dotrzeć do detektora. Dzięki temu są wrażliwe na topografię próbki. Wiele opuści próbkę a reszta pozostanie w zagłębieniach dzięki czemu powstanie kontrast topograficzny.

Próbki analizowane na skaningowym mikroskopie elektronowym muszą przewodzić prąd elektryczny i mieć w miarę trwałą powierzchnię. Z próbek należy usunąć zanieczyszczenia powierzchniowe poprzez przedmuchiwanie powierzchni gazem obojętnym lub kąpiel w płuczce ultradźwiękowej. Próbki słabo przewodzące, ale odporne na warunki wysokiej próżni po naniesieniu na krążki/taśmy/przylepce węglowe do stolika mikroskopowego poddawane są napyleniu warstwą przewodzącą.

Próbki słabo przewodzące i dodatkowo uwodnione (np.: preparaty biologiczne) obrazuje się albo bez żadnej preparatyki w warunkach regulowanej próżni, albo poddaje procesowi utrwalenia, odwodnienia i suszenia.

SEM znalazło zastosowanie w:

- inżynierii materiałowej:
  - badanie i analizowanie powierzchni materiałów;
  - analiza składu materiałów;
  - analizowanie orientacji krystalograficznych;
  - określanie własności magnetycznych i elektrycznych materiałów;
  - kontrola jakości materiałów;
- biologii i medycynie:
  - określanie struktur;
  - charakterystyka defektów;
- technice śledczej.

### III. Literatura

1. Barbacki – „*Mikroskopia elektronowa*”, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, 2007.
2. J.A.Litwin, M. Gajda, „*Podstawy technik mikroskopowych*”, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2011.
3. Sołtyszewski, P. Polak – „*Badania kryminalistyczne*”, Wyd. UMW. Olsztyn, 2007.
4. J. Zięba-Palus (red.) „*Mikroślady i ich znaczenie*”, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 2015.
5. J. Wójcikiewicz (red.); „*Ekspertyza Sądowa*”. Zagadnienia Wybrane; Wolters Kluwer, Warszawa 2007.

### IV. Zagadnienia do opracowania

1. Dualizm korpuskularno – falowy cząstek.
2. Oddziaływanie wiązki elektronów z materią.

3. Zdolność rozdzielcza mikroskopów.
4. Budowa elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM).
5. Zasada działania elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM).
6. Powstawanie obrazu i jego kontrastu w skaningowym mikroskopie elektronowym.
7. Zastosowania elektronowego mikroskopu skaningowego.
8. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie elektronowym.

#### V. Zestaw przyrządów.

1. Skaningowy mikroskop elektronowy TM – 1000 wraz z układem pomp próżniowych.
2. Komputer.
3. Próbki

#### VI. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z instrukcją działania skaningowego mikroskopu elektronowego dostępną w dodatku.
2. Wykonaj zdjęcia próbek wybranych przez prowadzących zajęcia:
  - badanie grubości włosa;
  - badania stopów metali;
  - badania śladów pozostawionych przez narzędzia do cięcia szkła.
3. Przeanalizuj otrzymane wyniki zgodnie z sugestiami prowadzącego.
4. Sprawozdanie ma mieć charakter przykładowej opinii biegłego tzn.: zawierać takie elementy jak:
  - imię, nazwisko, stopień i tytuł naukowy, specjalność i stanowisko zawodowe biegłego;
  - imiona i nazwiska oraz pozostałe dane innych osób, które uczestniczyły w przeprowadzeniu ekspertyzy, ze wskazaniem czynności dokonanych przez każdą z nich, w przypadku opinii instytucji - także pełną nazwę i siedzibę instytucji;
  - czas przeprowadzonych badań oraz datę wydania opinii;
  - szczegółowy opis nadesłanego materiału dowodowego, porównawczego (sposób zabezpieczenia podczas transportu, opis opakowania, jego cechy ogólne i indywidualne) i cytowane pytania organu procesowego;
  - informację o zastosowanych technikach i metodach;
  - sprawozdanie z przeprowadzonych badań i obserwacji;
  - interpretację wyników i wnioski;
  - podpisy wszystkich biegłych, którzy uczestniczyli w wydaniu opinii.

Opinia powinna być napisana zrozumiałym językiem, a wnioski powinny być bardzo czytelne, zwłaszcza dla organów procesowych (dla prokuratury i sądziego).



Zdjęcie 1. Przykładowy materiał dowodowy do badań przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego:  
ślady narzędzi, włosy zwierzęce i ludzkie.



## Dodatek

### Instrukcja obsługi skaningowego mikroskopu elektronowego.

#### I. Przygotowanie mikroskopu do pomiarów.

1. Włączyć mikroskop głównym włącznikiem (1 na Zdjęciu 2).
2. Odczekać około 3 minuty aż migocząca czerwona dioda (AIR) (4 na Zdjęciu 2) zgaśnie a zaświeci się w sposób ciągły zielona dioda (READY). W tym czasie w komorze pomiarowej mikroskopu zostaje osiągnięta próżnia.



Zdjęcie 1. Widok frontu mikroskopu TM-1000: 1 – włącznik główny; 2 – front komory preparatowej; 3 – przycisk trybu pracy układu próżniowego; 4 – diody sygnalizujące stan próżni w komorze mikroskopu.

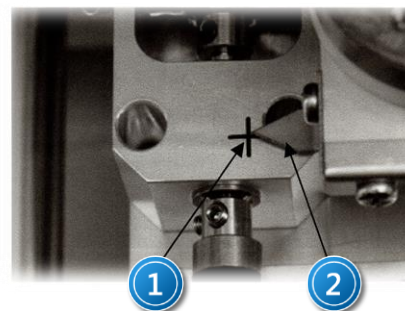
3. Wcisnąć przycisk Exchange (3 na Zdjęciu 2). Ponownie odczekać 3 minuty aż do zapalenia się czerwonej diodki (AIR) – będzie to jednoznaczne z zapowietrzeniem komory pomiarowej i możliwością jej otwarcia.
4. Ubrać rękawice ochronne.
5. Przygotować próbkę pomiarową.
6. Umieścić próbkę na specjalnym stoliku i sprawdzić czy długość śruby mocującej stolik do podłoża jest odpowiednia. W tym celu skorzystać z uchwyty z ruchomym ramieniem (Zdjęcie 3) – odstęp pomiędzy powierzchnią próbki a ramieniem ma wynosić około 1 mm.
7. Wysunąć **powoli** komorę pomiarową wkładając palce w zagłębienie w górnej części frontu komory.



Zdjęcie 3. Próbnik wysokości stolika z preparatem.



Zdjęcie 4. Montaż stolika w komorze mikroskopu.



Zdjęcie 5. Regulacja położenia startowego próbki: 1 – centrum; 2 – znacznik stolika.

8. Stolik z próbką umieścić w komorze pomiarowej zgodnie ze *Zdjęciem 4* (wkładając go **prostopadle** w przewidziany otwór).
9. Za pomocą pokręteł na ścianie frontowej komory pomiarowej (2 na *Zdjęciu 2*) ustawić przesuwany mechanizm stolika z próbką tak, aby jego znacznik znajdował się w środku znaku „+” (zgodnie ze *Zdjęciem 5*).
10. Zamknąć **powoli** komorę pomiarową.
11. Dociskając lekko front komory pomiarowej, wcisnąć drugą ręką przycisk „EXCHANGE” powodując, tym samym, ponowne wytworzenie próżni w komorze pomiarowej. Zwolnić ucisk frontu komory dopiero wtedy, gdy zapali się żółta diodka „LOW”.
12. Odczekać do zapalenia się zielonej diodki (READY) oznaczającej osiągnięcie żądanej próżni. Mikroskop jest gotowy do pomiarów. Dalsze kroki wykonywać zgodnie z opisem pracy z oprogramowaniem mikroskopu zamieszczonym w *Dodatku C*.

## II. Wymiana próbek.

1. Po zapisaniu obrazu (według procedur z *Dodatku C*) należy zmniejszyć ustawione powiększenie mikroskopu do x 100 a następnie kliknąć przycisk „Stop” (*Zdjęcie 6 w Dodatku C*) w górnym lewym rogu okna operacyjnego monitora. Ten przycisk może czasami wyświetlać napis nie „Stop” a „Start” – w zależności od tego, czy wiązka elektronów jest jeszcze włączona czy wyłączona - tak się dzieje, gdy jej czas zogniskowania na próbce był dłuższy niż kilka minut - program czyni to automatycznie, aby uniknąć uszkodzenia próbki.
2. Wcisnąć przycisk EXCHANGE (3 na *Zdjęciu 2*). Po około 3 minutach i po zapaleniu się w sposób ciągły czerwonej diodki (AIR) komora pomiarowa ulegnie zapowietrzeniu.
3. Ubrać rękawice ochronne.
4. Otworzyć **powoli** komorę pomiarową i wyjąć stolik z próbką.
5. Wymienić próbkę po czym odtworzyć procedury z punktów I. 5. – I.12. w *Dodatku B*.

## III. Wyłączanie mikroskopu.

1. Po zapisaniu obrazu (według procedur z *Dodatku BC*) należy zmniejszyć ustawione powiększenie mikroskopu do x 100 a następnie kliknąć przycisk „Stop” (*Zdjęcie 6 w Dodatku C*) w górnym lewym rogu okna operacyjnego monitora. Ten przycisk może czasami wyświetlać napis nie „Stop” a „Start” – w zależności od tego, czy wiązka elektronów jest jeszcze włączona

czy wyłączona - tak się dzieje, gdy jej czas zogniskowania na próbce był dłuższy niż kilka minut - program czyni to automatycznie, aby uniknąć uszkodzenia próbki.

Napis „Start” na przycisku oznacza, że wiązka elektronów została wyłączona i można kontynuować procedury wyłączania mikroskopu.

2. Wcisnąć przycisk EXCHANGE (3 na Zdjęciu 2).  
Po około 3 minutach i po zapaleniu się w sposób ciągły czerwonej diodki (AIR) komora pomiarowa ulegnie zapowietrzeniu.
3. Ubrać rękawice ochronne.
4. Otworzyć **powoli** komorę pomiarową i wyjąć stolik z próbką.
5. Zamknąć komorę.  
Lekko dociskając front komory ponownie wcisnąć EXCHANGE.  
Zwolnić ucisk dopiero wtedy, gdy zapali się żółta diodka (LOW).
6. Odczekać do zapalenia się w sposób ciągły zielonej diodki (READY) oznaczającej osiągnięcie próżni w mikroskopie – będzie to trwało około 3 minuty.
7. Kliknąć przycisk zamknięcia w prawym górnym rogu okna operacyjnego monitora.  
Pojawi się okno dialogowe – potwierdzić zamknięcie aplikacji klikając „OK”.
7. Wyłączyć mikroskop głównym wyłącznikiem (1 na Zdjęciu 1).

#### IV. Obserwacja obrazu.



- 1 – tryb pracy do podglądu obrazu;
- 2 – tryb pracy do zapisu obrazu;
- 3 – ograniczanie obszaru obserwacji;
- 4 – zatrzymanie obrazu;
- 5 – szybki zapis obrazu;
- 6 – zapis obrazu;
- 7 – regulacja powiększenia;
- 8 – regulacja jasności i kontrastu;
- 9 – regulacja ostrości;
- 10 – obrót stolika z próbką.

Zdjęcie 6. Widok ekranu monitora wraz z opisem przycisków funkcyjnych.

1. Włączyć komputer. Uruchomić aplikację TM – 1000.
2. Kliknąć „Start” w lewym górnym rogu okna operacyjnego. Aktywacja „Auto Start Mode” spowoduje włączenie wiązki elektronowej.

3. Ustawić powiększenie mikroskopu na x 100. Automatyczne funkcje „Auto Brightness and Contrast” i „Auto Focus” zapewniają pojawienie się obrazu próbki na monitorze. Wygląd okna operacyjnego pokazany jest na *Zdjęciu 6*.
4. Wybierz interesujący obszar próbki zmieniając jej położenie pokrętkami 2 na *Zdjęciu 2*. Obserwację obrazu ułatwia w tym przypadku dobór małego powiększenia i modu „Fast”.
5. Korzystając z przycisków automatycznych funkcji „Auto Brightness and Contrast” oraz „Auto Focus” (*Zdjęcie 6*) uzyskać wyraźny obraz badanej powierzchni.

Jeśli funkcja „Auto Focus” nie daje zadowalającego efektu można wyostrzyć obraz ręcznie. Należy wtedy skorzystać z modu „Reduced Area”. Poniższe procedury zapewnią polepszenie ostrości obrazu:

- a) posługując się przyciskiem „Focus” należy klikać + bądź -, aby zmienić ostrość obrazu lub trzymać ten przycisk w sposób ciągły w celu szybkiej i płynnej zmiany ostrości;
  - b) można zaznaczyć kursorem myszki wybrany fragment obrazu a następnie przeciągając myszką wielokrotnie po tym obrazie w lewo bądź w prawo, przy wciśniętym lewym przycisku myszki, uzyskać polepszenie ostrości obrazu.
6. Uzyskać możliwie dokładną informację o topografii i składzie materiałowym badanych próbek wykorzystując, opisane poniżej, funkcje obróbki obrazu w oprogramowaniu mikroskopu zaczynając od przejścia w tryb pracy „Slow” (2 na *Zdjęciu 6*) powodującego zmniejszenie szybkości skanowania powierzchni próbki przez wiązkę elektronów. Jest to optymalny trybu pracy w przypadku potrzeby analizy obrazu.

W zakładce „View” wybrać opcję „Image Mode”.

Zapisać kolejne obrazy korzystając ze wszystkich czterech funkcji (narzędzi do obróbki obrazów) w opcji „Image Mode” :

- **Normal** – związana z zapisem obrazu przy standardowym (fabrycznym) ustawieniu detektora BSE w mikroskopie TM – 1000 na maksimum zliczeń;
- **Shadow 1 i Shadow 2** - związane z rejestracją obrazu przy innych pozycjach detektora BSE niż w trybie **Normal** (z prawej i lewej strony poprzedniej pozycji);
- **Topo** – funkcja obróbki obrazów uzyskanych za pomocą wszystkich trzech powyższych funkcji dająca w efekcie końcowym obraz topografii powierzchni badanej próbki.

## V. Zapis obrazu.

1. Po uzyskaniu wyraźnego obrazu badanej powierzchni kliknąć „File” → „Image” → „Save” (lub „Quick Save”) w celu jego zapisu. Potrwa to około 40 sekund. Rozmiar zapisanego obrazu to: 1280 x 960 pikseli.



### Wskazówka

Przy kliknięciu „Quick Save” zostanie zapisany chwilowo obserwowany obraz. Jego rozmiar wyniesie: 640 x 480 pikseli.

2. Po zapisie obrazu pojawi się okno zapisu wyników.  
Zastosować konieczne procedury wpisując nazwę i miejsce zapisu danych na dysku i potwierdzić je ponownym kliknięciem „Save’.
3. Dokonując wymiany próbki wykonać procedury opisane w punktach II.1. – II.4. w *Dodatku*.
4. Przy konieczności zakończenia pracy z mikroskopem i jego wyłączenia wykonać procedury opisane kolejno w punktach 1. – 7. części III w *Dodatku*.