



DLF

**DYDAKTYCZNE
LABORATORIUM
FIZYCZNE**

Ćwiczenie G8

Analiza próbek przy zastosowaniu mikroskopii optycznej i elektronowej



I. Zagadnienia do opracowania.

1. Budowa i zasada działania mikroskopu optycznego.
2. Zdolność rozdzielcza mikroskopu optycznego.
3. Dualizm korpuskularno – falowy cząstek.
4. Oddziaływanie wiązki elektronów z materią
5. Budowa i zasada działania elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM).
6. Powstawanie obrazu i jego kontrastu w skaningowym mikroskopie elektronowym.
9. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie optycznym i elektronowym.

II. Aparatura

1. Mikroskop optyczny NIKON SMZ745T
2. Skaningowy mikroskop elektronowy TM – 1000

III. Zadania doświadczalne

1. Zapoznać się z zasadą działania mikroskopu optycznego i elektronowego zgodnie z instrukcjami znajdującymi się w Dydaktycznym Laboratorium Fizyki.
2. Wykonać zdjęcia próbek wybranych przez prowadzących zajęcia.
3. Przeanalizować otrzymane wyniki zgodnie z sugestiami prowadzącego.

IV. Literatura.

1. E. U. Kurczyńska, D. Borowska-Wykręt, „Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej”, PWN, 2007.
2. J.A. Litwin, M. Gajda, „Podstawy technik mikroskopowych”, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2011.
3. A. Barbacki – „Mikroskopia elektronowa”, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, 2007.
4. W. Dziadur, J. Mikuła, „Mikroskopia elektronowa skaningowa”, tom 2, Kraków 2016.
5. M. Pluta, „Mikroskopia optyczna”, PWN, Warszawa, 1980



UWAGA!

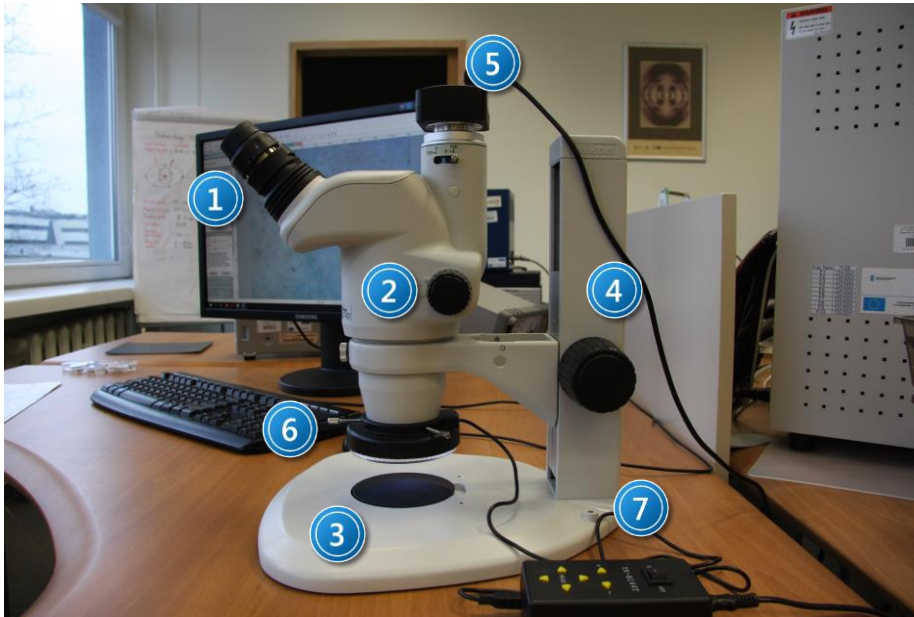
Samodzielne włączanie i wyłączenie mikroskopu elektronowego oraz samodzielna wymiana próbek bez wcześniejszej instrukcji prowadzącego jest zabroniona

Dodatek

Instrukcja obsługi stanowiska mikroskopu stereoskopowego.

Dane techniczne mikroskopu stereoskopowego Nikon SMZ 745T:

- port kamery i łącznik z optyką o powiększeniu 0,55x



Zdjęcie 3. Mikroskop stereoskopowy **Nikon SMZ 745T**: 1 – okular; 2 – śruba wyboru powiększenia obiektywu; 3 – miejsce na badaną próbkę; 4- śruba mikrometryczna; 5 – kamera CCD z portem o powiększeniu $x0,55$ oraz przełącznik ścieżki optycznej; 6 - oświetlacz; 7 – układ kontrolny oświetlacza.

- przełącznik ścieżki optycznej między okulem a aparatem
- zakres powiększeń obiektywu 0,67x do 5x
- stały obiektyw 1x z obiektywami nasadkowymi 2x o dużych odległościach roboczych
- okular o powiększeniu 20x z regulacją dioptryjną i muszlami optycznymi
- dystans pracy 115 mm –zapewnia wygodę przygotowania i manipulacji próbki.

✓ **Przed rozpoczęciem pracy należy ustawić właściwy rozstaw źrenic.**

✓ **Ustawianie ogniskowania:**

- ustawić pokrętko powiększenia na najniższą wartość
- rozpocząć ogniskowanie obrazu na preparacie
- ustawić pokrętko powiększenia na najwyższą wartość

- ✓ Powiększenie – można odczytać na pokrętle po prawej stronie.

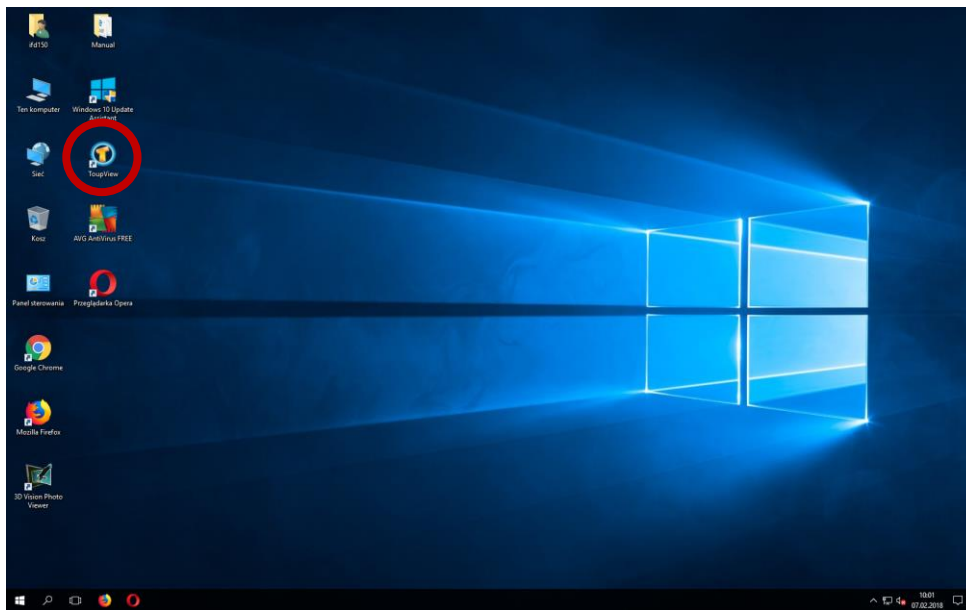


Wskazówka

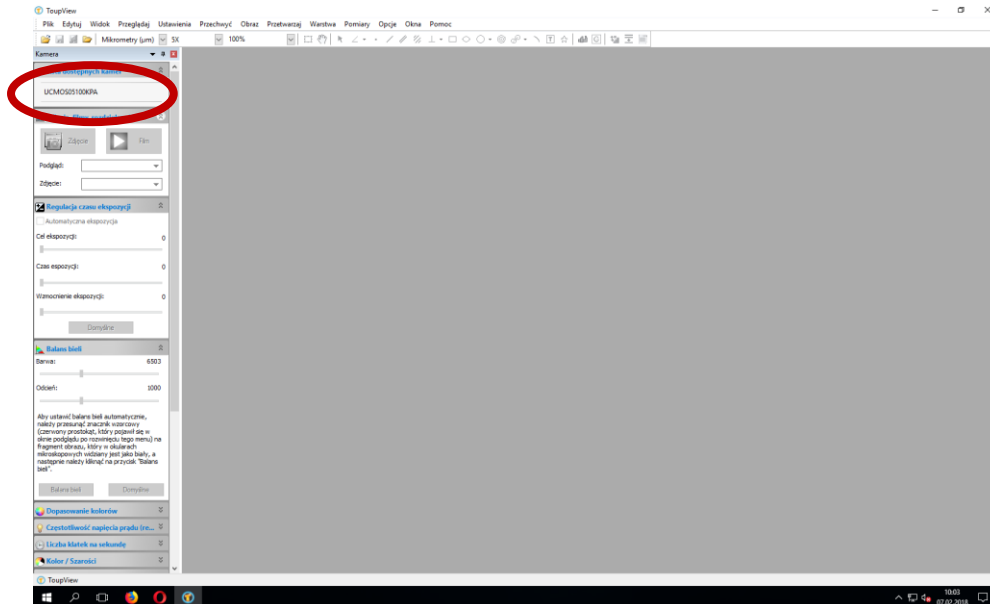
Po wyregulowaniu ostrości, pozostaje ona stała, pomimo zmiany ogniskowej. Zakładając, że ustawienie dioptrii w okularach jest prawidłowe dla oczu użytkownika.

Instrukcja obsługi programu ToupView

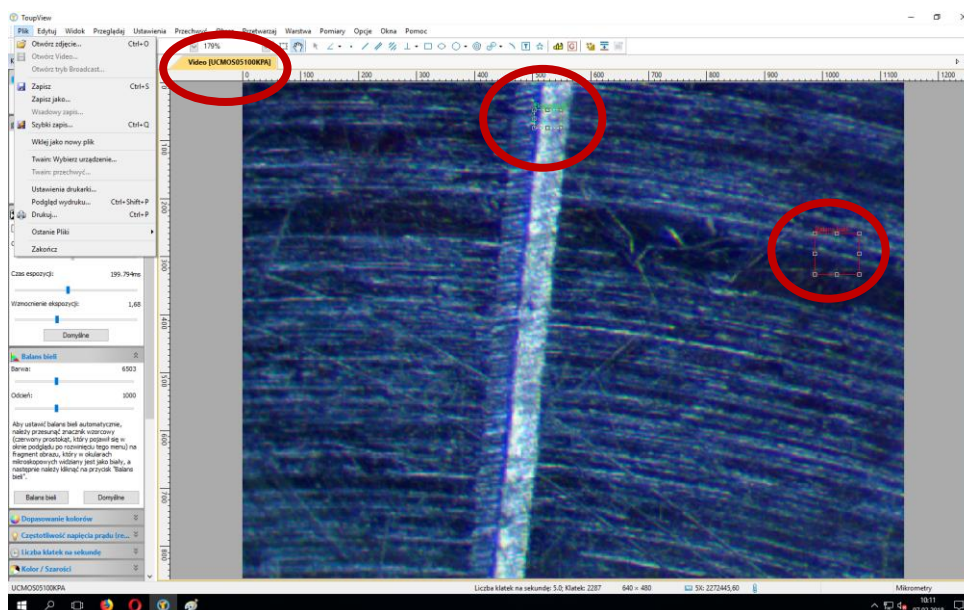
1. Włączyć komputer.
2. Uruchomić aplikację **ToupView**.



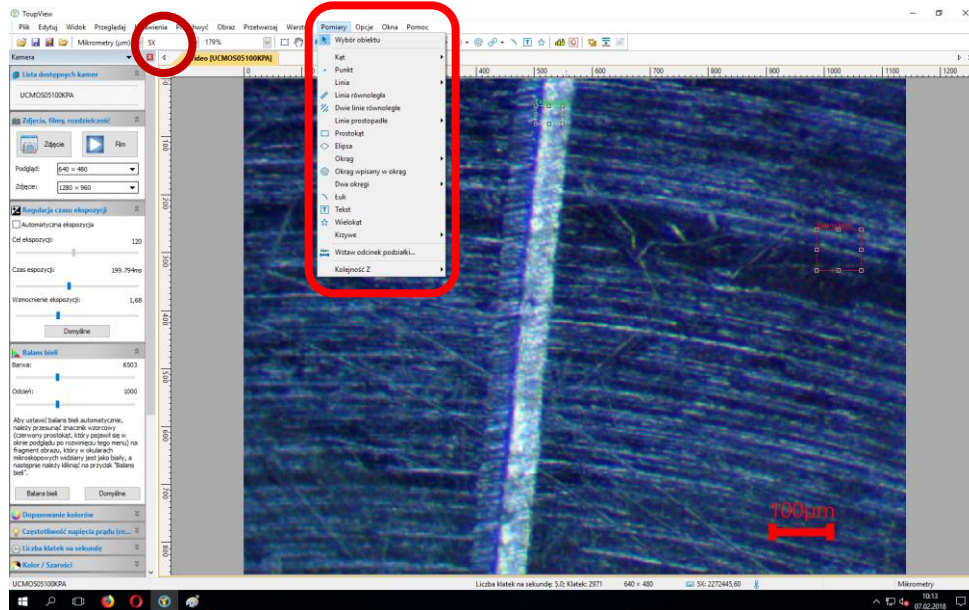
- Po pojawieniu się okna programu ToupView z zakładki „Lista dostępnych kamer” (po lewej stronie ekranu) wybrać podaną kamerę.



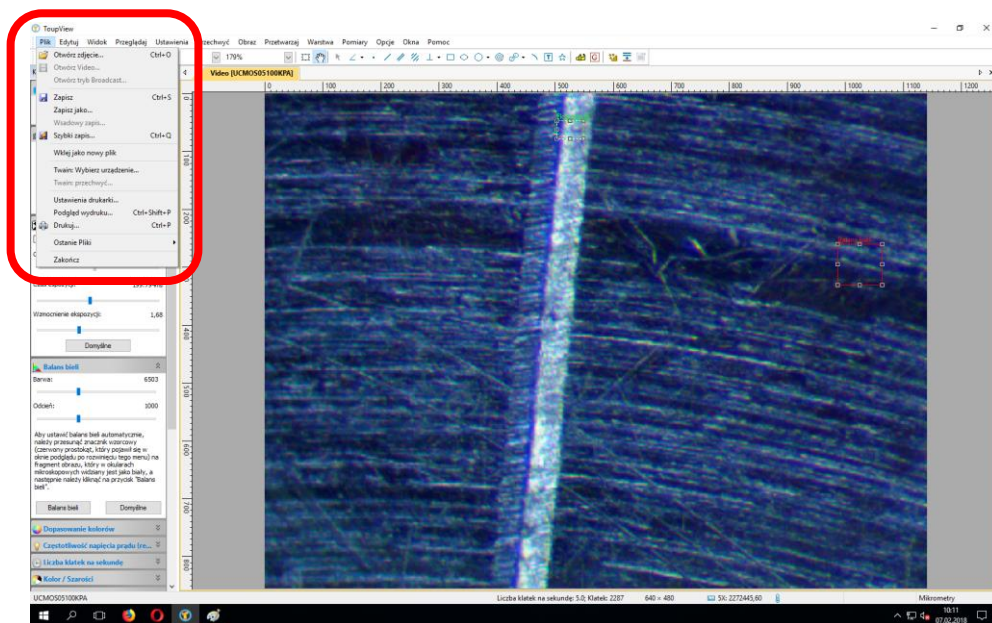
- Na ekranie monitora ukaze się podgląd z kamery **Video**. W oknie **Video** pojawią się obszary kontrolne **Ekspozycja** oraz **Balans bieli**.



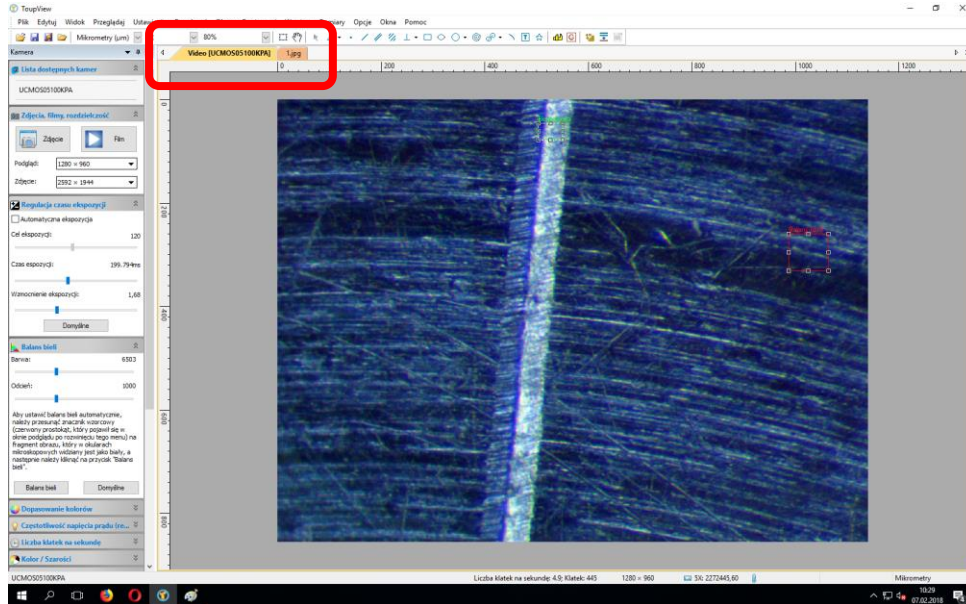
- W czasie obserwacji próbek można korzystać z dostępnych funkcji w zakładce **Pomiary**. Należy jednak wybrać odpowiednie powiększenie, które będzie zgodne z wartością powiększenia wybraną za pomocą śruby powiększenia obiektywu mikroskopu.



6. Po odpowiednim ustawieniu i doborze parametrów oświetlenia próbki dokonać zapisu obrazu. W tym celu należy przejść do zakładki **Plik** oraz **Zapisz jako...**



- Zapisać obraz wpisując jego nazwę i rozszerzenie (do wyboru JPG, BMP, TIFF). Pojawi się kolejne okno z nazwą zapisanego pliku. W celu dalszej obserwacji badanej próbki należy ponownie wybrać pole **Video**.



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.
3. Wcisnąć przycisk Exchange (3 na *Zdjęciu 2*). Ponownie odczekać 3 minuty aż do zapalenia się



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

czerwonej diodki (AIR) – będzie to jednoznaczne z zapowietrzeniem komory pomiarowej i możliwością jej otwarcia.

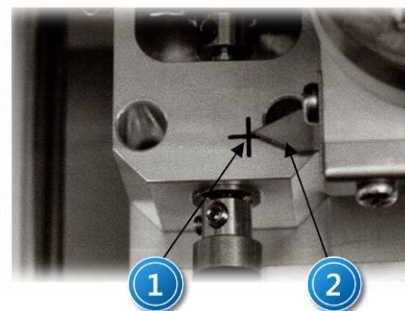
4. Ubrać rękawice ochronne.
5. Przygotować próbkę pomiarową.
6. Umieścić próbkę na specjalnym stoliku i sprawdzić czy długość śruby mocującej stolik do podłoża jest odpowiednia. W tym celu skorzystać z uchwyty z ruchomym ramieniem (*Zdjęcie 3*) – odstęp pomiędzy powierzchnią próbki a ramieniem ma wynosić 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*.

II. Wyłączenie 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).

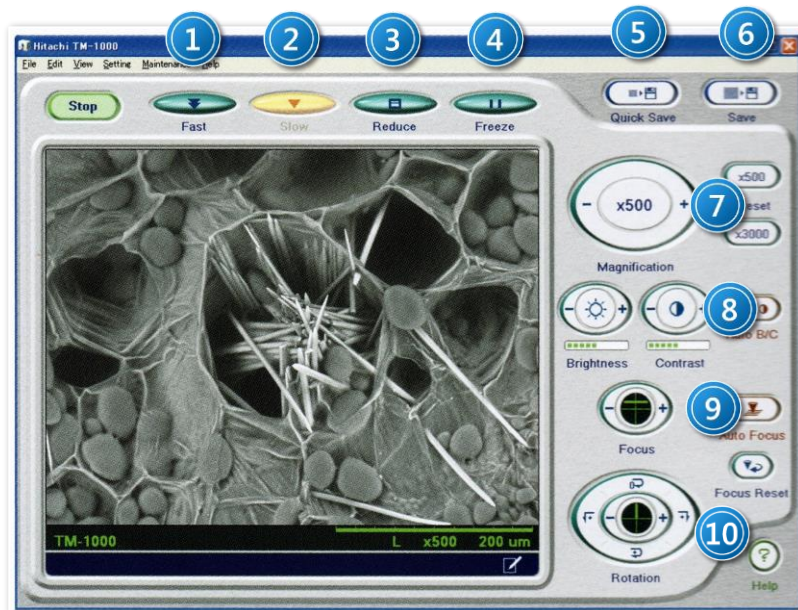
Odczekać do zapalenia się w sposób ciągły zielonej diodki (READY) oznaczającej osiągnięcie próżni w mikroskopie – będzie to trwało około 3 minuty.

6. 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*).

III. 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.

IV. 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*.