Построение изображения в микроскопе, определение увеличения микроскопа

Электронный микроскоп

Электронный микроскоп — прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию вместо светового потока пучка электронов. Разрешающая способность электронного микроскопа в 1000÷10000 раз превосходит разрешение светового микроскопа и для лучших современных приборов может составлять несколько ангстрем (10^{-7} м).

- Появление электронного микроскопа стало возможным после ряда физических открытий конца XIX — начала XX века. Это открытие в 1897 году электрона (Дж.Томсон) и экспериментальное обнаружение в 1926 году волновых свойств электрона (К.Дэвиссон, Л.Гермер), подтверждающее выдвинутую в 1924 году де Бройлем гипотезу о корпускулярно-волновом дуализме всех видов материи. В 1926 году немецкий физик Х.Буш создал магнитную линзу, позволяющую фокусировать электронные лучи, что послужило предпосылкой для создания в 1930-х годах первого электронного микроскопа.
- В 1931 году Р.Руденберг получил патент на просвечивающий электронный микроскоп, а в 1932 году М.Кнолль и Э.Руска построили первый прототип современного прибора. Эта работа Э.Руски в 1986 году была отмечена Нобелевской премией по физике, которую присудили ему и изобретателям сканирующего зондового микроскопа Герду Карлу Биннигу и Генриху Рореру.
- В 1938 Руска и Б. фон Боррис построили прототип промышленного просвечивающего электронного микроскопа для фирмы «Сименс-Хальске» в Германии; этот прибор в конце концов позволил достичь разрешения 100 нм. Несколькими годами позднее А.Пребус и Дж.Хиллер построили первый ОПЭМ высокого разрешения в Торонтском университете (Канада).
- В конце 1930-х — начале 1940-х годов появились первые растровые электронные микроскопы (РЭМ), формирующие изображение объекта при последовательном перемещении электронного зонда малого сечения по объекту. Массовое применение этих приборов в научных исследованиях началось в 1960-ых годах, когда они достигли значительного технического совершенства.
- РЭМ в его нынешней форме был изобретен в 1952 Чарльзом Отли. Правда, предварительные варианты такого устройства были построены Кноллем в Германии в 1930-х годах и Зворыкиным с сотрудниками в корпорации RCA в 1940-х годах, но лишь прибор Отли смог послужить основой для ряда технических усовершенствований, завершившихся внедрением в производство промышленного варианта РЭМ в середине 1960-х годов.

Просвечивающий электронный микроскоп

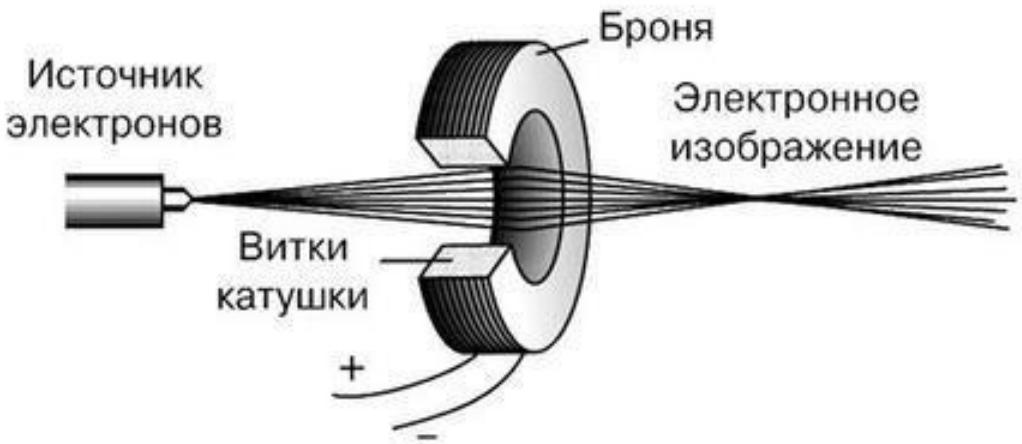
- Просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ) — это установка, в которой изображение *от ультратонкого объекта* (толщиной порядка 0,1 мкм) формируется в результате взаимодействия пучка электронов с веществом образца с последующим увеличением магнитными линзами (объектив) и регистрацией на флуоресцентном экране.

- Просвечивающий электронный микроскоп во многом подобен световому микроскопу, но только для освещения образцов в нем используется не свет, а пучок электронов. В нем имеются электронный прожектор, ряд конденсорных линз, объективная линза и проекционная система, которая соответствует окуляру, но проецирует действительное изображение на люминесцентный экран или фотографическую пластинку.

- Источником электронов обычно служит нагреваемый катод из вольфрама или гексаборида лантана. Катод электрически изолирован от остальной части прибора, и электроны ускоряются сильным электрическим полем. Для создания такого поля катод поддерживают под потенциалом порядка - 100 000 В относительно других электродов, фокусирующих электроны в узкий пучок. Эта часть прибора называется электронным прожектором.

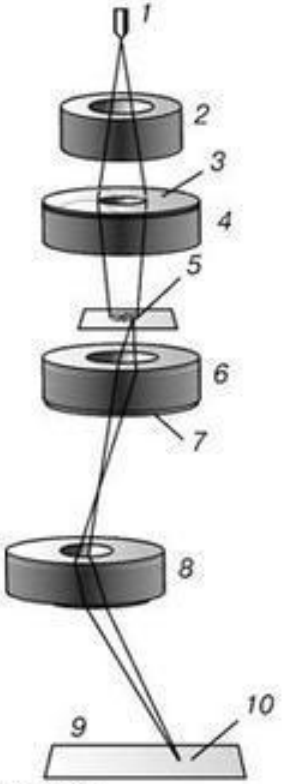
- Поскольку электроны сильно рассеиваются веществом, в колонне микроскопа, где движутся электроны, должен быть вакуум. Здесь поддерживается давление, не превышающее *одной миллиардной атмосферного*.

- Электронное изображение формируется электрическими и магнитными полями примерно так же, как световое – оптическими линзами. Принцип действия магнитной линзы поясняется следующей схемой.



Витки провода, по которым проходит ток, фокусируют пучок электронов так же, как стеклянная линза фокусирует световой пучок.

- Магнитное поле, создаваемое витками катушки, по которой проходит ток, действует как собирающая линза, фокусное расстояние которой можно изменять, изменяя ток.



ОБЫЧНЫЙ ПРОСВЕЧИВАЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП (ОПЭМ). 1 – источник электронов; 2 – ускоряющая система; 3 – диафрагма; 4 –конденсорная линза; 5 – образец; 6 – объективная линза; 7 – диафрагма; 8 – проекционная линза; 9 – экран или пленка; 10 – увеличенное изображение.

- Электроны ускоряются, а затем фокусируются магнитными линзами. Увеличенное изображение, создаваемое электронами, которые проходят через диафрагму объектива, преобразуется люминесцентным экраном в видимое или регистрируется на фотопластинке.

- Ряд конденсорных линз (показана лишь последняя) фокусирует электронный пучок на образце. Обычно первая из них создает неувеличенное изображение источника электронов, а последняя контролирует размер освещаемого участка на образце. Диафрагмой последней конденсорной линзы определяется ширина пучка в плоскости объекта.

- *Образец* помещается в магнитном поле объектной линзы с большой оптической силой – самой важной линзы ОПЭМ, которой определяется предельное возможное разрешение прибора. Аберрации объективной линзы ограничиваются ее диафрагмой так же, как это происходит в фотоаппарате или световом микроскопе. Объектная линза дает увеличенное изображение объекта (обычно с увеличением порядка 100); дополнительное увеличение, вносимое промежуточными и проекционной линзами, лежит в пределах величин от несколько меньшей 10 до несколько большей 1000.

- Таким образом, увеличение, которое можно получить в современных ОПЭМ, составляет от менее 1000 до ~1 000 000. (При увеличении в миллион раз грейпфрут вырастает до размеров Земли).

- Исследуемый объект обычно помещают на очень мелкую сетку, вкладываемую в специальный держатель. Держатель можно механическим или электрическим способом плавно перемещать вверх-вниз и вправо-влево.

- Окончательное увеличенное электронное изображение преобразуется в видимое посредством люминесцентного экрана, который светится под действием электронной бомбардировки. Это изображение, обычно слабоконтрастное, как правило, рассматривают через бинокулярный световой микроскоп. При той же яркости такой микроскоп с увеличением 10 может создавать на сетчатке глаза изображение, в 10 раз более крупное, чем при наблюдении невооруженным глазом. Иногда для повышения яркости слабого изображения применяется люминофорный экран с электронно-оптическим преобразователем. В этом случае окончательное изображение может быть выведено на обычный телевизионный экран. Фотопластинка обычно позволяет получить более четкое изображение, чем наблюдаемое простым глазом или записанное на видеоленте, так как фотоматериалы, вообще говоря, более эффективно регистрируют электроны.

- *Разрешение*. Электронные пучки имеют свойства, аналогичные свойствам световых пучков. В частности, каждый электрон характеризуется определенной длиной волны. Разрешающая способность ЭМ определяется эффективной длиной волны электронов. Длина волны зависит от скорости электронов, а следовательно, от ускоряющего напряжения; чем больше ускоряющее напряжение, тем больше скорость электронов и тем меньше длина волны, а значит, выше разрешение. Столь значительное преимуществ о ЭМ в разрешающей способности объясняется тем, что длина волны электронов намного меньше длины волны света. Но поскольку электронные линзы не так хорошо фокусируют, как оптические (числовая апертура хорошей электронной линзы составляет всего лишь 0,09, тогда как для хорошего оптического объектива эта величина достигает 0,95), разрешение ЭМ равно 50–100 длинам волн электронов.

- Даже со столь слабыми линзами в электронном микроскопе можно получить предел разрешения ~0,17 нм, что позволяет различать отдельные атомы в кристаллах. Для достижения разрешения такого порядка необходима очень тщательная настройка прибора; в частности, требуются высокостабильные источники питания, а сам прибор (который может быть высотой ~2,5 м и иметь массу в несколько тонн) и его дополнительное оборудование требуют монтажа, исключающего вибрацию.

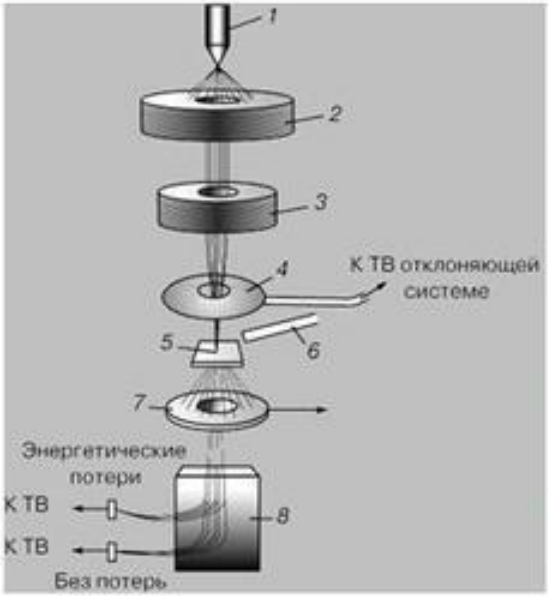
Растровая электронная микроскопия

- Растровый электронный микроскоп (РЭМ, англ. Scanning Electron Microscope, SEM) — прибор, основанный на принципе взаимодействия электронного пучка с веществом, предназначенный для получения изображения поверхности объекта с высоким пространственным разрешением (несколько нанометров), а также о составе, строении и некоторых других свойствах приповерхностных слоёв.

- ***Пространственное разрешение*** сканирующего электронного микроскопа зависит от поперечного размера электронного пучка, который, в свою очередь зависит от электронно-оптической системы, фокусирующей пучок.

В настоящее время современные модели РЭМ выпускаются рядом фирм мира, среди которых можно назвать:

- Carl Zeiss NTS GmbH — Германия
- FEI Company — США (слилась с Philips Electron Optics)
- FOCUS GmbH — Германия
- Hitachi — Япония
- JEOL — Япония (Japan Electron Optics Laboratory)
- Tescan — Чехия



1 – источник электронов; 2 – ускоряющая система; 3 – магнитная линза; 4 – отклоняющие катушки; 5 – образец; 6 – детектор отраженных электронов; 7 – кольцевой детектор; 8 – анализатор

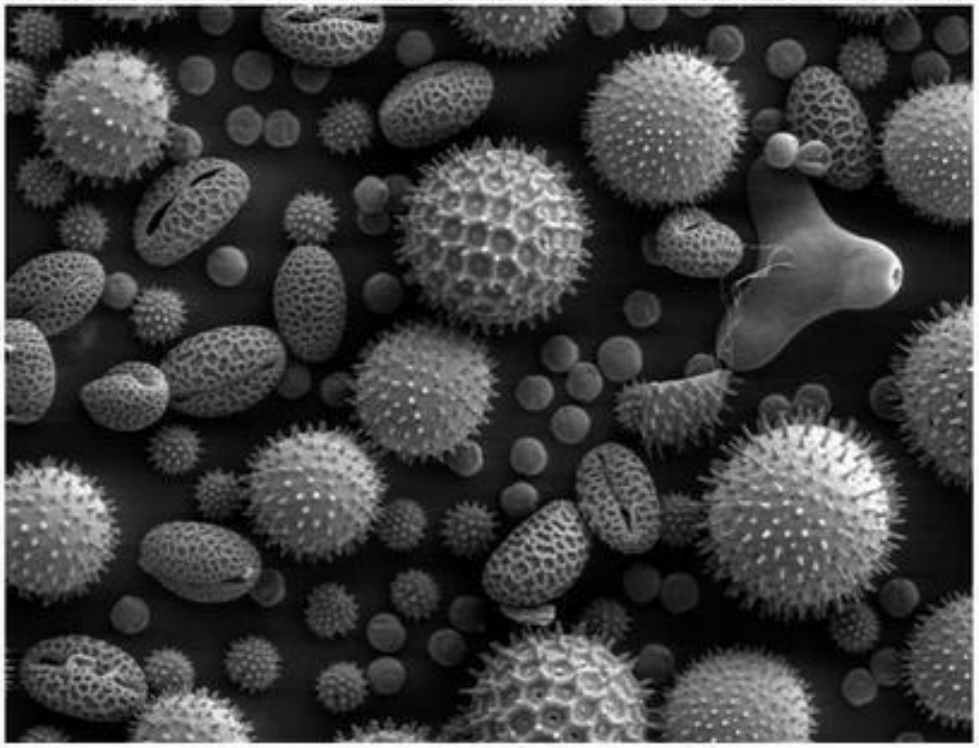
- В РЭМ применяются электронные линзы для фокусировки электронного пучка (электронного зонда) в пятно очень малых размеров. Можно отрегулировать РЭМ так, чтобы диаметр пятна в нем не превышал 0,2 нм, но, как правило, он составляет единицы или десятки нанометров.
- Это пятно непрерывно обегает некоторый участок образца аналогично лучу, обегающему экран телевизионной трубки. Электрический сигнал, возникающий при бомбардировке объекта электронами пучка, используется для формирования изображения на экране телевизионного кинескопа или электронно-лучевой трубки (ЭЛТ), развертка которой синхронизирована с системой отклонения электронного пучка (рис.).
- Увеличение в данном случае понимается как отношение размера изображения на экране к размеру области, обегаемой пучком на образце. Это увеличение составляет от 10 до 10 млн.
- Электронные линзы (обычно сферические магнитные) и отклоняющие катушки образуют систему, называемую *электронной колонной*.

Однако РЭМ-метод характеризуется рядом ограничений и недостатков, которые особенно сильно проявляются в субмикронном и нанометровом диапазонах измерений:

- недостаточно высокое пространственное разрешение;
- сложность получения трехмерных изображений поверхности, обусловленная в первую очередь тем, что высота рельефа в РЭМ определяется по эффективности упругого и неупругого рассеяния электронов и зависит от глубины проникновения первичных электронов в поверхностный слой;
- необходимость нанесения дополнительного токосъемного слоя на плохопроводящие поверхности для предотвращения эффектов, связанных с накоплением заряда;
- проведение измерений только в условиях вакуума;
- возможность повреждения изучаемой поверхности высокоэнергетичным сфокусированным пучком электронов.

Из-за очень узкого электронного луча РЭМ обладают очень большой глубиной резкости (0.6-0.8 мм), что на два порядка выше, чем у оптического микроскопа и позволяет получать четкие микрофотографии с характерным трехмерным эффектом для объектов со сложным рельефом.

Это свойство РЭМ крайне полезно для понимания поверхностной структуры образца.



Микрофотография пыльцы демонстрирует возможности РЭМ.

Сканирующие зондовые микроскопы

- Сканирующие зондовые микроскопы (СЗМ, англ. SPM — Scanning Probe Microscope) — класс микроскопов для измерения характеристик объекта с помощью различных типов зондов. Процесс построения изображения основан на сканировании поверхности зондом.

- В общем случае СЗМ позволяют получить трёхмерное изображение поверхности (топографию) с высоким разрешением.

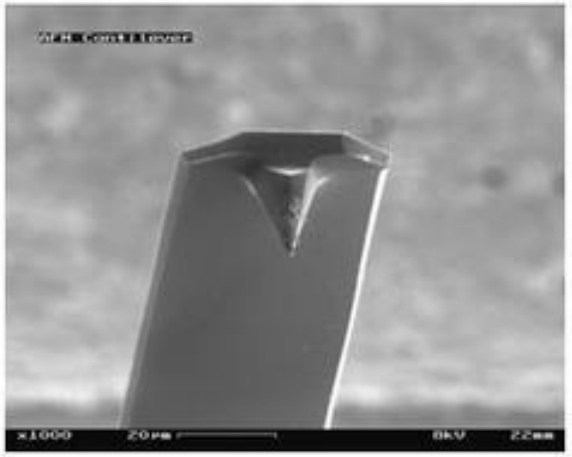
Основные типы сканирующих зондовых микроскопов:

- *Сканирующий туннельный микроскоп* (СТМ, англ. STM — scanning tunneling microscope) или растровый тунельный микроскоп (РТМ) - для получения изображения используется туннельный ток между зондом и образцом, что позволяет получить информацию о топографии и электрических свойствах образца.
- *Сканирующий атомно-силовой микроскоп* (АСМ) - регистрирует различные силы между зондом и образцом. Позволяет получить топографию поверхности и её механические свойства.
- *Сканирующий ближнепольный оптический микроскоп* (СБОМ) - для получения изображения используется эффект ближнего поля.

Отличительной СЗМ особенностью является наличие:

- зонда,
- системы перемещения зонда относительно образца по 2-м (X-Y) или 3-м (X-Y-Z) координатам,
- регистрирующей системы.

Работа сканирующего зондового микроскопа основана на взаимодействии поверхности образца с зондом (*кантилевер* - англ. балка, игла или оптический зонд). Кантилеверы разделяются на жёсткие и мягкие, - по длине балки, а характеризуется это резонансной частотой колебаний кантилевера. Процесс сканирования микрозондом поверхности может происходить как в атмосфере или заранее заданном газе, так и в вакууме, и даже сквозь плёнку жидкости.



Кантилевер в сканирующем электронном микроскопе (увеличение 1000X) координатам,

- При малом расстоянии между поверхностью и образцом действие сил взаимодействия (отталкивания, притяжения,и других сил) и проявление различных эффектов (например, туннелирование электронов) можно зафиксировать с помощью современных средств регистрации.

- Для регистрации используют различные типы сенсоров, чувствительность которых позволяет зафиксировать малые по величине возмущения.

- Регистрирующая система фиксирует значение функции, зависящей от расстояния зонд-образец.

- Для получения полноценного растрового изображения используют различные устройства развертки по осям X и Y (например, пьезотрубки, плоскопараллельные сканеры). Сканирование поверхности может происходить двумя способами, - сканирование кантилевером и сканировение подложкой. Если в первом случае движения вдоль исследуемой поверхности совершает кантилевер, то во втором относительно неподвижного кантилевера движется сама подложка.

- Для сохранения режима сканирования, - кантилевер должен находиться вблизи поверхности, - в зависимости от режима, - будь то режим постоянной силы, или постоянной высоты, существует система, которая могла бы сохранять такой режим во время процесса сканирования. Для этого в электронную схему микроскопа входит специальная система *обратной связи*, которая связана с системой отклонения кантилевера от первоначального положения.

- Основные технические сложности при создании сканирующего зондового микроскопа:
  - Конец зонда должен иметь размеры сопоставимые с исследуемыми объектами.
  - Обеспечение механической (в том числе тепловой и вибрационной) стабильности на уровне лучше 0,1 ангстрема.
  - Детекторы должны надежно фиксировать малые по величине возмущения регистрируемого параметра.
  - Создание прецизионной системы развёртки.
  - Обеспечение плавного сближения зонда с поверхностью.

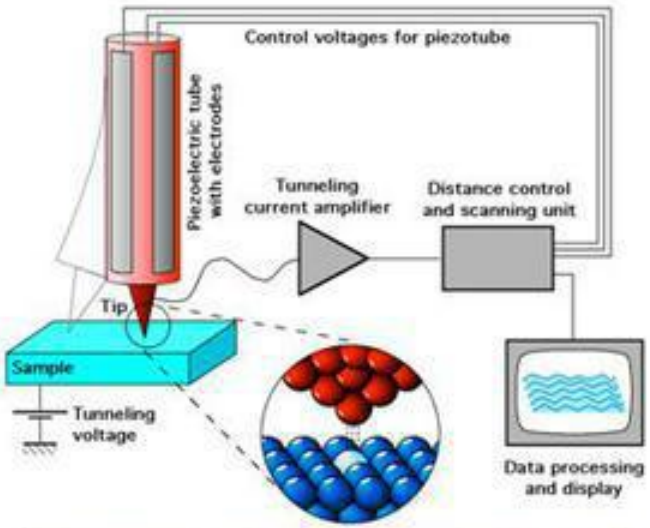
Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ, англ. STM — scanning tunneling microscope) или растровый тунельный микроскоп (РТМ)

- Сканирующий тунельный микроскоп в современном виде изобретен (принципы этого класса приборов были заложены ранее другими исследователями) Гердом Карлом Биннигом и Генрихом Рорером в 1981 году. За это изобретение они были удостоены Нобелевской премии по физике за 1986 год, которая была разделена между ними и изобретателем просвечивающего электронного микроскопа Э. Руска.

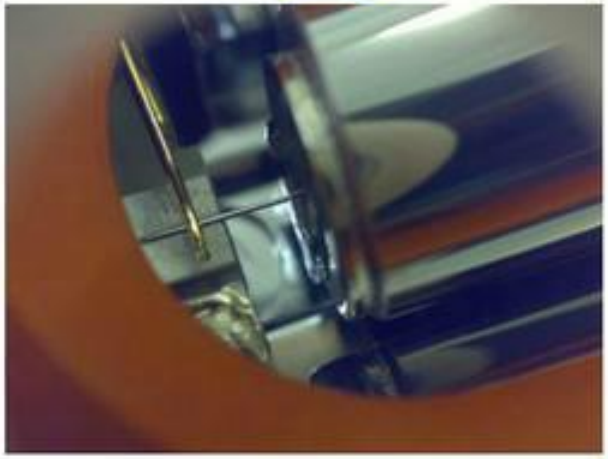
- В СТМ острая металлическая игла подводится к образцу на расстояние нескольких ангстрем. При подаче на иглу относительно образца небольшого потенциала возникает туннельный ток. Величина этого тока экспоненциально зависит от расстояния образец-игла. Типичные значения 1—1000 пА при расстояниях около 1 А.

- В этом микроскопе используется металлическое острие малого диаметра, являющееся источником электронов. В зазоре между острием и поверхностью образца создается электрическое поле. Число электронов, вытягиваемых полем из острия в единицу времени (ток туннелирования), зависит от расстояния между острием и поверхностью образца (на практике это расстояние меньше 1 нм). При перемещении острия вдоль поверхности ток модулируется. Это позволяет получить изображение, связанное с рельефом поверхности образца. Если острие заканчивается одиночным атомом, то можно сформировать изображение поверхности, проходя атом за атомом.

- РТМ может работать только при условии, что расстояние от острия до поверхности постоянно, а острие можно перемещать с точностью до атомных размеров.



Высокое разрешение СТМ вдоль нормали к поверхности (~0,01 нм) и в горизонтальном направлении (~0,1 нм), которое реализуется как в вакууме, так и с диэлектрическими средами в туннельном промежутке, открывает широкие перспективы повышения точности измерений линейных размеров в нанометровом диапазоне.



Платиново - иридиумная игла сканирующего туннельного микроскопа крупным планом.

Сканирующий атомно-силовой микроскоп (АСМ)

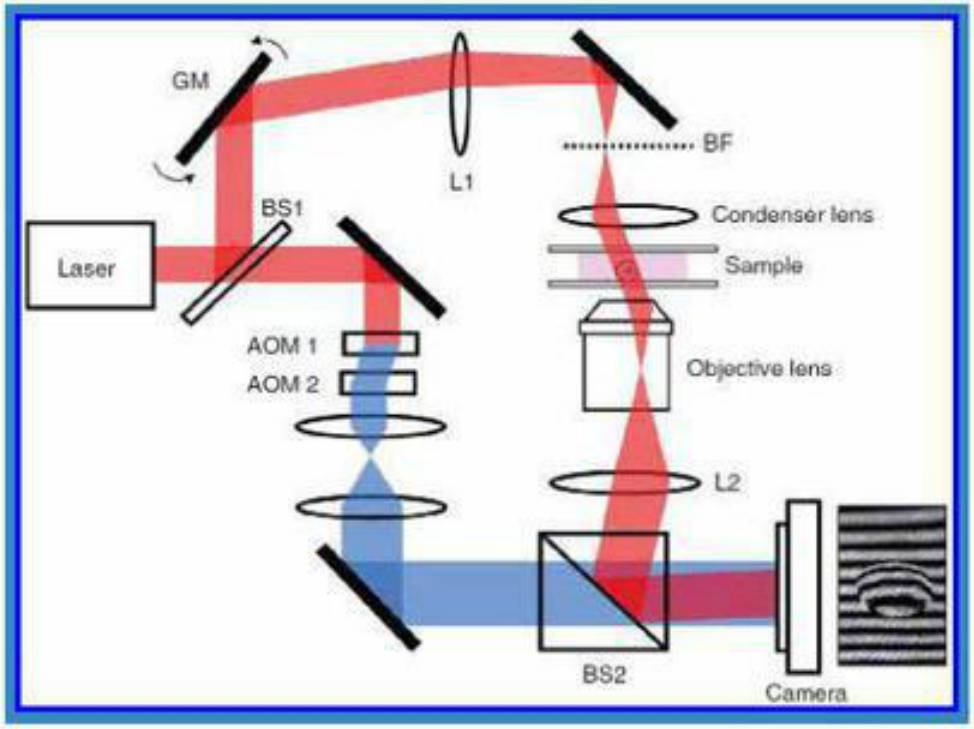
- Атомно-силовая микроскопия поверхности (АСМ), предложенная в 1986 г., основана на эффекте силового взаимодействия между близко расположенными твердыми телами.
- В отличие от СТМ метод АСМ пригоден для проведения измерений как на проводящих, так и на непроводящих поверхностях не только в вакууме, но и на воздухе и в жидкой среде.
- Важнейшим элементом АСМ является микрозонд (кантилевер), на конце которого располагается диэлектрическое острие с радиусом кривизны R, к которому с помощью трехкоординатного манипулятора подводится поверхность исследуемого образца на расстояние $d \approx 0{,}1 \div 10$ нм. Острие кантилевера обычно закрепляют на пружине, изготовленной в виде кронштейна с малой механической жесткостью. В результате межатомного (межмолекулярного) взаимодействия между образцом и острием кантилевера кронштейн отклоняется.

- Разрешение АСМ вдоль нормали к поверхности сравнимо с соответствующим разрешением СТМ, а разрешение в горизонтальном направлении (продольное разрешение) зависит от расстояния d и радиуса кривизны острия R. Числовой расчет показывает, что при R=0,5 нм и d=0,4 нм продольное разрешение составляет ~1 нм.

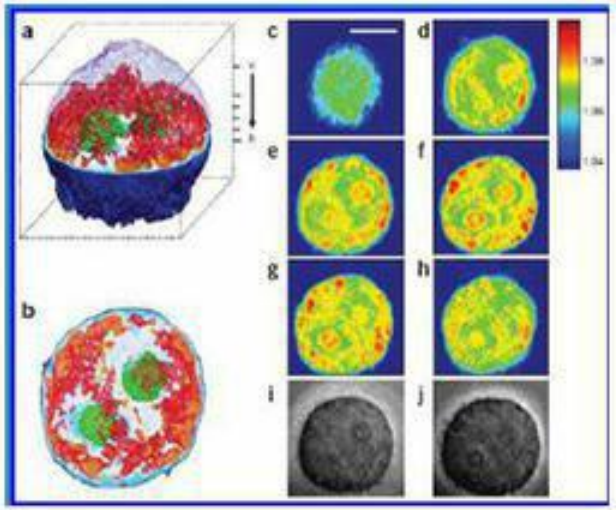
- Необходимо подчеркнуть, что зондом АСМ является острие иглы, которое позволяет снимать информацию о профиле элемента рельефа поверхности, имеющего нанометровые размеры, но высота (глубина) такого элемента не должна превышать 100 нм, а соседний элемент должен быть расположен не ближе, чем на расстоянии 100 нм. При выполнении некоторых специфических для АСМ условий возможно восстановление профиля элемента без потери информации. Однако эти условия практически невозможно осуществить в эксперименте.

Вид	Пространственное разрешение (x,y)	Разрешение по z-координате	Размер поля	Увеличение
Оптическая микроскопия	200 нм	-	0,4 -0,2 мм	1.5-1000x
Конфокальный микроскоп	200 нм	1 нм		
Интерферометрия в белом свете	200 нм	0,1 нм	0.05 до 8.24	1.5-100x
Голографическая микроскопия	200 нм	0,1 нм	0.05 до 8.24	1.5-100x
Просвечивающий электронный микроскоп	0,2 нм	-		до 1 000 000
Растровый электронный микроскоп (РЭМ)	0,4 нм	0,1 нм	0,1-500 мкм по z - ~1-10 мм	до 10 000 000x
Сканирующие зондовые микроскопы	0,1 нм	0,05 нм	~150 x 150 мкм по z - < 25 мкм	

Голографическая микроскопия



Томографический интерференционный микроскоп MIT



Клетка Hela
Масштаб 10 мкм