

## ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ СКЕНИРАЈУЋЕ ЕЛЕКТРОНСКЕ МИКРОСКОПИЈЕ И ПРИМЕНЉИВОСТ ЕСЕМ МЕТОДЕ

Кристина Филиповић<sup>1</sup> Сања Стојановић<sup>2</sup> Светлана Ристић<sup>3</sup> Даница Димитријевић<sup>4</sup> Душан Пауновић<sup>5</sup>

**Резиме:** Електронска микроскопија представља изузетну методу којом се помоћу уског снопа електрона добија увид у микроструктуру посматраног узорка. Овај рад описује принципе функционисања, инструментацију и примену скенирајуће електронске микроскопије (SEM). Специфично је дат увид у примену ЕСЕМ (енгл. Environmental Scanning Microscopy) методе која представља скенирајућу електронску микроскопију у области заштите животне средине. Она се показала као изузетно успешна метода у погледу анализе и праћења динамичких појава као што су корозија, дејство растварача, капиларне силе, кристализација соли, топљење и многе друге. Својом јединственошћу, методе скенирајуће електронске микроскопије отварају нова истраживачка поља у различитим областима примене.

**Кључне речи:** SEM, ESEM, електронска микроскопија, животна средина

## BASIC PRINCIPLES OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND APPLICABILITY OF ESEM METHOD

**Abstract:** Electron microscopy is an exceptional method by which a narrow beam of electrons provides insight into the microstructure of the observed sample. This paper describes the principles of operation, instrumentation and application of scanning electron microscopy (SEM). Specific insight is given into the application of ESEM (Environmental Scanning Microscopy) method, which is scanning electron microscopy in the field of environmental protection. It has proven to be an extremely successful method in terms of analysis and monitoring of dynamic phenomena such as corrosion, solvent action, capillary forces, salt crystallization, melting and many others. With their uniqueness, scanning electron microscopy methods open up new research fields in various fields of application.

**Key words:** SEM, ESEM, electron microscopy, environment

### 1. УВОД

Инструменталне методе се баве детекцијом и мерењем карактеристичног сигнала који ће послужити за квалитативну и квантитативну анализу узорка. Карактеристични сигнал зависи од интеракције молекула или атома са електромагнетним зрачењем, физичко-хемијских особина, односа масе и наелектрисања и термичких карактеристика. Инструменталне методе се деле на оптичке, електрохемијске и сепарационе. Оптичке методе су засноване на интеракцији електромагнетног зрачења и молекула или атома узорка.

Данас је познато неколико врста микроскопа: светлосни, фазноконтрастни, флуоросцентни, микроскоп са тамним видним пољем и електронски микроскоп. Моћ увећавања предмета ових микроскопа је неупоредиво већа у односу на првобитне микроскопе. Креће се од неколико стотина пута (светлосни микроскоп) па до више десетина хиљада пута (електронски микроскоп).

Електронска микроскопија је релативно млада метода, а њен развој довео је до открића нових истраживачких подручја у разним гранама.

<sup>1</sup> асистент, Универзитет „Унион-Никола Тесла“ Београд, Факултет примењених наука, Ниш, kristina.filipovic@fpm.rs

<sup>2</sup> асистент, Универзитет „Унион-Никола Тесла“ Београд, Факултет примењених наука, Ниш, sanja.stojanovic@fpm.rs

<sup>3</sup> ван. проф., Универзитет „Унион-Никола Тесла“ Београд, Факултет примењених наука, Ниш, svetlana.ristic@fpm.rs

<sup>4</sup> доцент, Универзитет „Унион-Никола Тесла“ Београд, Факултет примењених наука, Ниш, danica.dimitrijevic@fpm.rs

<sup>5</sup> доцент, Универзитет „Унион-Никола Тесла“ Београд, Факултет примењених наука, Ниш, dusan.paunovic@fpm.rs

## 2. СКЕНИРАЈУЋА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА

### 2.1. Основни принципи електронске микроскопије

Принцип електронског микроскопа је исти као и принцип рада светлосног микроскопа, али уместо употребе видљиве светлости користи електроне као извор. Међутим, резолуција оптичког микроскопа је ограничен својом таласном дужином у поређењу са убрзаним електронима који имају веома кратке таласне дужине. То је оно што омогућава да се виде веома мале карактеристике. У електронским микроскопима, електрони имају веома малу таласну дужину. Ова таласна дужина може се мењати према примењеном високом напону.

### 2.2. Подела електронске микроскопије

Основне врсте електронских микроскопа су:

- ФЕ-СЕМ (енгл. Field Emission Scanning Electron Microscope)
- АФМ (енгл. Atomic-force Microscope)
- СТМ (енгл. Scanning-tunneling Microscope)
- ТЕМ (енгл. Transmission Electron Microscopy)
- СЕМ (енгл. Scanning Electron Microscopy)

#### 2.2.1. ФЕ-СЕМ (Field Emission Scanning Electron Microscope)

Field Emission Scanning Electron Microscope или скенирајући електронски микроскоп са емисијом поља је изузетно осетљив уређај који се примењује за скенирање површина материјала до нанометарских размера. Уместо класичне катоде, ФЕ-СЕМ емитује електроне помоћу јаких поља. Скенирајући електронски микроскоп са емисијом поља се примењује у истраживањима органских наноструктурних и других материјала, анализи величине и распореда честица и хомогености материјала механичких оштећења и контаминације материјала, биомедицини, геологији и археологији [1].

#### 2.2.2. АФМ (Atomic-force Microscope)

Микроскоп атомских сила или АФМ примењује се за добијање топографске слике узорка. Овај микроскоп има могућност мерења интеракција атомских сила између врха сонде микроскопа и узорка. Сензор се састоји од полуге са шилком и опруге. Овом методом се могу мерити интермолекуларне и интрамолекуларне силе, адхезионе силе као и еластичност и тврдоћа узорка. Примењује се за испитивање макромолекула, полимера, течних кристала, колоида и ћелија и ћелијских органела. АФМ метода је недеструктивна и примењива у различитим условима [2], [3].

#### 2.2.3. СТМ (Scanning Tunneling Microscope)

Скенирајући тунелски микроскоп је врста модерног микроскопа који се примењује ради добијања атомске резолуције површине метала. Он функционише по принципу тунелирања електрона са површине узорка према сонди микроскопа. Основни делови скенирајућег тунелског микроскопа су пизоелектрична цев, електроде и сонда.

#### 2.2.4. ТЕМ (Transmission Electron Microscopy)

Трансмисиона електронска микроскопија је техника електронске микроскопије код које се електронски снап пропушта кроз ултра танки узорак. Слика која се формира услед интеракције електрона при проласку кроз узорак, увећава се и фокусира у уређају за добијање слике, као што је флуоресцентни екран, слој фотографског филма или се детектује помоћу сензора, као што су CCD камере. Трансмисиони електронски микроскоп се користи за анализу електрон-пропусних узорака, па зато дебљина узорака ретко може бити већа од 1  $\mu\text{m}$ . По грађи је сличан

## КОНФЕРЕНЦИЈЕ СА МЕЂУНАРОДНИМ УЧЕШЋЕМ

38. Конференција одржавалаца Србије и 1. Конференција напредне технологије у функцији развоја привреде, Врњачка Бања, 01.06. – 03.06. 2022. године

оптичком микроскопу, али ради у условима високог вакуума како честице ваздуха не би пореметиле путању електрона. Трансмисиони електронски микроскоп се састоји од електронског топа као извора снопа електрона исте брзине, кондензатора, електронског сочива које фокусира сноп електрона на објекат, носача објекта који омогућава постављање објекта у жељени положај и оријентацију према електронском снопу и од објектива, међусочива и пројектора, система електронских сочива која преносе коначну слику објекта на фотографску плочу или филм.

### 2.3. Скенирајући електронски микроскоп

#### 2.3.1. Историјат откића СЕМа

Ограничење светлосног микроскопа у решавању финих детаља органских ћелија обезбедило је подстицај за развој електронског микроскопа почетком двадесетог века [4]. Зачетак електронске микроскопије тридесетих и четрдесетих година 20. века представљао је велики напредак у проучавању микроструктуре, састава и својстава материјала. Јака интеракција електрона са супстанцом производи широк спектар корисних сигнала који откривају све детаље супстанце на микроскопском и наноскопском нивоу [5].

Први електронски микроскоп је био трансмисиони електронски микроскоп који је развио немачки научник Макс Кнол у Немачкој 1931. Макс Кнол је увео концепт скенирајућег електронског микроскопа. Немачки физичар Манфред вон Арденне је објаснио принципе технике и интеркције зрак-узорак и направио први скенирајући електронски микроскоп 1937. године. То је био уређај сличан светлосном микроскопу осим што је сноп електрона, уместо видљиве светлости, пролазио кроз тело узорка при чему се формирала слика на флуоресцентном екрану. Примена електрона као медијума за сликање омогућила је резолуцију од 10 нанометара која је далеко боља у поређењу са резолуцијом од 200 нанометара која се постиже светлосним микроскопом. Накнадна побољшања у погледу убрзавања напона, технологије сочива, вакуумских система, електронских топова и целокупног дизајна микроскопа у наредних неколико деценија омогућила су атомску резолуцију. Нобелову награду за рад у електронској оптици и за дизајнирање првог електронског микроскопа из физике добио је Ернст Руска 1986. године [4].

#### 2.3.2. Компоненте скенирајућег електронског микроскопа

Основне компоненте СЕМа су електронска колона, комора за узорак и компјутерски систем управљања. Ове компоненте користе се за обављање различитих функција микроскопије и микрохемијске анализе. СЕМ инструментација може укључивати секундарне и повратно расејане електронске детекторе, енергетски дисперзне рендгенске спектрометре (ЕДС), детекторе ниског вакуума, детекторе дифракције повратно расејаних електрона (ЕБСД) и тако даље. Неки од ових инструмената можда нису неопходни за основна снимања, али играју важну улогу у захтевнијој примени микроскопије. Квалитет добијених слика у великој мери зависи од улазних параметара који су одређени од стране оператера, а ово захтева проучавање СЕМа и његових различитих компоненти и начина на који се може користити за производњу висококвалитетних слика и поузданих аналитичких података.

#### 2.3.3. Микрохемијска анализа у СЕМу

Микрохемијска анализа се врши коришћењем EDS детектора или WDS спектрометара смештених у СЕМ колону. Они су уграђени у СЕМ тако да не утичу на способност снимања инструмента. Овом методом се може одредити микрохемијски састав особина величине неколико микрона са високим степеном осетљивости. На овај начин се може вршити квалитативна, али и квантитативна анализа. Микрохемијска анализа је ефикасна и недеструктивна и тако игра важну улогу у потврди квалитета материјала [4].

## 2.4. Припрема и начин рада СЕМа

### 2.4.1. Припрема узорка

Електрони су негативно наелектрисане честице које погађају узорак великом брзином. Електрони који први погоде узорак га наелектришу. Узорак постаје позитивно или негативно наелектрисан, зависно од врсте материјала. Истоимена наелектрисања се одбијају па се према томе негативно наелектрисан узорак и снап електрона одбијају. Течности нису добар одабир узорка за снимање СЕМом. Оне се у вакууму распршују по зидовима микроскопа и на тај начин га контаминирају. Комора СЕМа испуњена је вакуумом како се електрони не би сударали са честицама ваздуха и тако га распршили по целој комори [3].

Узорци се секу специјалним уређајем (енгл. ultramicrotome) са дијамантским сечивом. Добију се узорци дебљине од 90 нанометара. Биолошки узорци се хемијски фиксирају глутаралдехидом или формалдехидом, дехидрирају етанолом који се уклања у критичној тачки угљендиоксида, затим се фиксирају за носач. Користи се графен, наноматеријал који се може добити у моноатомском слоју. Узорци могу да се фиксирају и утапањем у Аралдит или акрилат и секу на потребну дебљину. За истањивање узорка се користи и ion beam milling или спатеровање јонима аргона. Узорци се могу препарирати и брзим замрзавањем (енг. criofixation).

### 2.4.2. Начин рада

Извор електрона скенирајућег електронског микроскопа је волфрамова нит која када се загреје емитује електроне, који под утицајем високог напона убразавају према аноди микроскопа у електронском топу. Напон који се користи у СЕМу износи око 30 000 V. Једном када електрони изађу из електронског топа, пролазе кроз електромагнетна сочива. Убрзани електрони наилазе на магнетно поље које на њих делује Лоренцовом силом тако што им мења путању и усмерава их у једну тачку. Након што електрони прођу кроз сочива, наилазе на завојницу кроз који тече електрична струја. Мењајући јачину електричне струје у завојници, око ње се ствара магнетно поље које помера и усмерава снап електрона на посматраном узорку.

Постоји више различитих сигнала које чине коначну слику узорка. Различити сигнали долазе из различитог извора снопа електрона. Један од сигнала долази до примарног снопа електрона који пада на узорак па се одбија о његово атомско језгро. Такви електрони се називају повратно расејани електрони. Секундарни електрони настају међусобним деловањем примарног снопа електрона и узорка. Наведено међуделовање узрокује избијање електрона из спољашњег електронског омотача атома узорка. Такве електроне уочава детектор секундарног снопа електрона, а детектори даље шаље податке рачунару који их обрађује [6].

### 2.4.3. Резолуција СЕМ-а

Просторна резолуција СЕМа зависи од величине електронског снопа, који зависи од таласне дужине електрона и електронског оптичког система, који производи скенирајући снап. Резолуција је такође ограничена величином интерагујуће запремине, односно степеном интеракције материјала са електронским снопом. И величина спота и величина интерагујуће запремине су велики у поређењу са растојањем између атома, тако да резолуција СЕМа није довољно висока да би се добила слика појединачних атома, као што је то могуће при краћим таласним дужинама (већим енергијама) код трансмисионог електронског микроскопа (ТЕМ). СЕМ има своје посебне предности, као што је могућност да слика релативно велику површину узорка и волуминозне материјале (не само танке филмове или фолије). Он поседује и разноврсност аналитичких режима који су на располагању за мерење састава и особина узорка. У зависности од инструмента, резолуција може бити у опсегу од 20 до 1 нанометара. До 2009. године највећа резолуција коју је имао СЕМ, за високо енергетске снопове при енергији снопа од 30 Kv, износила је 0,4 нанометара. Таква резолуција добијена је на уређају Hitachi S-5500. За ниско

## КОНФЕРЕНЦИЈЕ СА МЕЂУНАРОДНИМ УЧЕШЋЕМ

38. Конференција одржавалаца Србије и 1. Конференција напредне технологије у функцији развоја привреде, Врњачка Бања, 01.06. – 03.06. 2022. године

енергетске снопове, најбоља резолуција до 2009. године постигнута је са Magelan XHR системом FEI Company и износила је 0,9 нанометара при енергији снопа од 1 Kv [7].

### 2.5. ЕСЕМ (Environmental Scanning Microscopy)

Средином осамдесетих година развијен је еколошки СЕМ или ЕСЕМ (енг. environmental scanning microscopy). Његова примарна предност лежи у томе што дозвољава варирање окружење узорка кроз опсег притисака, температура и састава атмосфере. ЕСЕМ задржава све предности перформанси конвенционалног СЕМа, али уклања ограничење високог вакуума примењеног на узорцима. Мокри, уљани, онечишћени, непроводни узорци могу се испитати у њиховом природном стању без модификација или припрема. ЕСЕМ нуди снимање високе резолуције секундарним електронима у гасовитом окружењу било ког састава, при притисцима од 50 Тора и температури од 1500°C [8].

Кроз целу колону где молекули гаса могу да расеју електроне и униште сноп, присутан је високи вакуум. Међутим, уместо коришћења једног отвора за контролу притиска, као код конвенционалног СЕМа, ЕСЕМ, да би раздвојио комору узорка од колоне, користи вишеструке отворе за контролу притиска. ЕСЕМ користи одговарајући секундарни детектор (енг. environmental secondary detector - ESD), који функционише у невакуумској средини, за разлику од Everhart-Tonli (енг. Everhart-Thornley (ET)) детектора коришћеног код СЕМа. Примењујући позитиван потенцијал од неколико хиљада волти на детектор, СЕ убрзавају у пољу детектора и сударају се са молекулима гаса. Резултујућа јонизација ствара додатне електроне, појачавајући оригиналан сигнал СЕ и позитивних јона. Детектор сакупља сигнале СЕ и пропушта их директно до електронског појачивача. Код непроводних узорака позитивни јони, настали у процесу јонизације гаса, привучени су ка површини узорка и добро спречавају наелектрисавање [9].

Значајне предности ЕСЕМ технике су следеће:

- Гасна јонизација у комори за узорак елиминира наелектрисавање, које је уобичајено присутно код непроводних узорака, тако да није потребно да се узорци напарвају проводним слојем, чиме се уједно спречава и могуће оштећење узорака у току припреме
- Онечишћења и контаминације не уништавају инструмент и не утичу деградирајуће на квалитет слике
- Секундарни детектор који се примењује у заштити животне средине (енгл. Environmental secondary electron detector - ESD) није осетљив на топлоту и може се извршити снимање и на 1500°C, а није остетљив ни на светлост од топлотоно усијаних узорака, катодолуминисценцију и флуоросценцију, тако да овакви ефекти не ометају квалитет слике. Са помоћним светлосним микроскопом ЕСЕМ може да обезбеди истовремене оптичке и електронске слике.
- Осетљива структура често се не може одржати током припреме узорака потребне за конвенционални СЕМ, док ЕСЕМ елиминира потребу за проводљивим премазима и већини других припрема узорака.
- Мокре узорке је неопходно просушити пре снимања ЕСЕМом. Ово је посебно важно за узорке који морају остати хидратисани да би задржали своју структуру. ЕСЕМ може да обезбеди окружење засићене водене паре, одржавајући узорке потпуно хидратисаним на неодређено време.
- ЕСЕМ на већем напону убрзања може да користи и сигнал од X-зрака изолованих узорака.
- ЕСЕМ омогућава посматрање узорка у процесима обраде, као што су истезање, сабијање, деформација, адхезија, загревање, хлађење, смрзавање, топљење, хидратација, дехидратација и сублимација [8].

### 3. ЗАКЉУЧАК

Скенирајући електронски микроскоп је инструмент за проучавање микрорелефа и морфологије објекта. Скенирање површине се остварује прелажењем уског снопа примарних

## КОНФЕРЕНЦИЈЕ СА МЕЂУНАРОДНИМ УЧЕШЋЕМ

38. Конференција одржавалаца Србије и 1. Конференције напредне технологије у функцији развоја привреде, Врњачка Бања, 01.06. – 03.06. 2022. године

електрона преко површине узорка. У свакој тачки узорка у интеракцији примарног електрона и атома узорка долази до стварања сигнала који се детектује.

Примена овог микроскопа је у истраживању микроорганизама, крвних зрнаца, биолошких структура, влакана, легура и полимера. SEM је нашао велику примену у геологији (састав гл, фосили), биологији, медицини, хемији, код испитивања материјала, форезничких испитивања, па чак и у археологији. Могућности примене електронске микроскопије су неограничене и свакодневно смо сведоци готово експлозивног развоја микроскопије у многим гранама истраживања.

ESEM се може најбоље разумети као микроскопска експериментална комора у којој окружење узорка може бити компонента експерименталног система. Интеракције између узорка и његовог окружења представљају још један нови аспект потенцијалних примена ове методе, као и студије које са баве хидратацијом узорака, раста кристала у гасовитој средини и праћења процеса корозије.

## 4. ЛИТЕРАТУРА-

- [1] <http://www.metris-research.com/index.php?id=53>
- [2] Тонејц, А.: <http://www.phy.pmf.unizg.hr/~atonejc/3-3%20Povrsinske%20metode.pdf> 01.05.2022.
- [3] Coffey, T.: <https://www.youtube.com/watch?v=1oGOWpiVvw8&t=307s> 01.05.2022.
- [4] Ul-Hamid, A.: *A Beginners guide to scanning electron microscopy*, Springer Nature Switzerland, 2018.
- [5] Спасић, П.: *Пола века електронске микроскопије у Србији*, Српско друштво за микроскопију, Академија медицинских наука, 2005.
- [6] [http://virtual.itg.uiuc.edu/training/EM\\_tutorial](http://virtual.itg.uiuc.edu/training/EM_tutorial) Beckman Institute for Advanced Science and Technology, University of Illinois at UrbanaChampaign, 2020.
- [7] Јокановић, В.: *Електронска микроскопија, Инструменталне методе, кључ за разумевање нанотехнологије и наномедицине*, Инжењерска академија Србије и Институт за нуклеарне науке Винча, Београд, Србија, 2014.
- [8] *Environmental scanning electron microscopy, An Introduction to ESEM*, Philips Electron Optics Eindhoven, The Netherlands, 1996.
- [9] Павловић, В.; Пуђа, П.; Трпковић, Г.; Миочиновић, Ј.: Примена техника електронске микроскопије у проучавању сирева, Прех. инд. 1-2, 2009, стр. 78 - 86.