

Министерство образования и науки Российской Федерации

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

Воронежский государственный архитектурно-строительный  
университет

Кафедра физики и химии

## **СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ**

*Методические указания  
к выполнению лабораторных работ по дисциплинам  
«Концепции современного естествознания»,  
«Физика и концепции современного естествознания»,  
«Современная аналитическая химия»  
для студентов всех специальностей и направлений*

Воронеж 2010

**УДК 620.22:537.533.35**  
**ББК 22.3 + 24ч7**

*Составители*  
*О.Б. Рудаков, С.М. Усачев,*  
*О.Б. Кукина, О.В. Черноусова*

**Сканирующая зондовая микроскопия** : метод. указания к выполнению лабораторных работ для студ. всех спец. и направлений/ Воронеж. гос. арх.-строит. ун-т; сост.: О.Б. Рудаков, С.М. Усачев, О.Б. Кукина, О.В. Черноусова – Воронеж, 2010. – 28 с.

Содержат краткие теоретические сведения по сканирующей зондовой микроскопии, лабораторные работы по исследованию твердых, жидких поверхностей и поверхностей биологических объектов .

Предназначены для студентов всех специальностей и направлений подготовки, изучающих циклы естественнонаучных дисциплин.

Ил. 16. Табл. 2. Библиогр.: 8 назв.

**УДК 620.22:537.533.35**  
**ББК 22.3 + 24я7**

*Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Воронежского архитектурно-строительного университета*

**Рецензент** - *В.Т. Перцев, д. т. н., профессор кафедры технологии  
строительных изделий и конструкций Воронежского  
государственного архитектурно-строительного  
университета*

## ВВЕДЕНИЕ

Достижения современной науки и техники во многом связаны с появлением в арсенале исследователей принципиально новых инструментов, в том числе сканирующего зондового микроскопа (СЗМ). Методы с использованием СЗМ позволяют не только визуализировать и диагностировать микро- и нанообъекты различной природы, но и манипулировать отдельными объектами и модифицировать их структуру с высоким пространственным разрешением. Именно благодаря СЗМ еще недавно казавшиеся фантастическими прямые эксперименты с отдельными молекулами стали вполне реальными не только для фундаментальных исследований, но и для прикладных разработок.

В основе сканирующей зондовой микроскопии лежит взаимодействие между твердотельным зондом, приближенным к исследуемому объекту на некоторое малое расстояние  $l$ , где  $l$  - характерная длина затухания взаимодействия «зонд-объект». Для получения изображения поверхности объекта используются системы механического сканирования зондом относительно образца (или образцом относительно зонда), причем система автоматического регулирования стабилизирует параметры контакта между зондом и объектом в процессе сканирования. Пространственное разрешение СЗМ определяется характерным размером контакта между зондом и образцом и может достигать атомных масштабов. Образно выражаясь, можно сказать, что если в оптическом или электронном микроскопах образец осматривается, то в СЗМ – «ощупывается и обстукивается».

Природа взаимодействия между зондом и объектом весьма разнообразна, что и определяет разнообразие типов СЗМ и методов измерений. В сканирующем туннельном микроскопе (СТМ) детектируется туннельный ток, протекающий между зондом и объектом. В атомно-силовых микроскопах (АСМ) детектируется локальная сила, действующая между зондом и объектом, причиной которой могут быть вандер-ваальсовское, электростатическое, магнитное взаимодействия, трение и т.п. Работа ближнепольных оптических микроскопов (БОМ) основана на использовании оптических фотонов. Существуют также емкостные (локальная емкость), акустические (звуковые колебания), электрохимические (токи локальных электрохимических реакций) и другие типы СЗМ.

Поскольку сканирующая зондовая микроскопия становится одним из основных инструментов нанотехнологии, которая, в свою очередь, является основной движущей силой развития исследования в XXI веке, очевидно, что ее использование является неотъемлемой частью учебного процесса. В настоящее время СЗМ используется в большом

многообразии дисциплин, как в фундаментальных научных исследованиях, так и прикладных высокотехнологичных разработках.

Данные методические указания содержат работы, посвященные изучению методов сканирующей зондовой микроскопии, включая спектроскопические измерения и процессы литографии, а также их применение для исследования и модифицирования микро- и наноструктур. Лабораторные работы проводятся на базе сканирующего зондового микроскопа NanoEducator, разработанного компанией ЗАО «НТ-МДТ» (г. Зеленоград, Россия). Приборы полностью управляются с помощью компьютера, имеют простой и наглядный интерфейс, анимационную поддержку, предполагают поэтапное освоение методик, в них отсутствуют сложные настройки и используются недорогие расходные материалы.

Методические указания предназначены для студентов и бакалавров всех специальностей, изучающих циклы математических, естественнонаучных и профессиональных дисциплин, а также магистрантов и аспирантов всех направлений подготовки.

## **ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ СО СКАНИРУЮЩИМ ЗОНДОВЫМ МИКРОСКОПОМ NANOEDUCATOR**

- Соблюдайте правила безопасности работы с электроприборами. Перед началом работы с прибором обеспечьте его заземление. Перед присоединением/отсоединением разъемов выключите прибор. Отсоединение или присоединение разъемов во время работы прибора может привести к повреждению электронной схемы и выходу прибора из строя.
- Не разбирайте самостоятельно никакие части прибора! Не подключайте к прибору дополнительные устройства.
- Оберегайте прибор от воздействия предельных температур, попадания жидкости.
- Оберегайте прибор от сильных механических воздействий. Помните, что толщина стенок сканера составляет всего 0,5 мм.
- При работе с устройством для травления игл соблюдайте правила безопасности работы с химическими реактивами.
- Будьте осторожны при работе с зондом! Соблюдайте правила безопасности работы с колющими предметами.

# Лабораторная работа № 1

## ЗНАКОМСТВО С ОСНОВАМИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

### *1.1. Цель работы*

1. Овладеть теоретическими знаниями о микроскопических методах исследования.
2. Освоить основы сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ).
3. Изучить принцип работы и конструкцию прибора NanoEducator и приобрести навыки работы на данном оборудовании.

### *1.2. Краткие теоретические сведения*

Традиционные методы исследования поверхности, такие как рентгеновская или ионная дифракция, дифракция медленных электронов, электронная оже-спектроскопия, позволяют получать усредненную по поверхности образца картину расположения атомов, но не дают возможности своими глазами увидеть атомную структуру. Все эти методы, работающие только в вакууме, позволяют детализировать объекты нанометрового масштаба, но при этом возможно повреждение образца пучком высокоэнергетических частиц. Кроме того, они не позволяют непосредственно получать информацию о высоте поверхностных деталей.

Частично эти проблемы удалось решить с помощью сканирующей туннельной микроскопии (СТМ). В начале 1980-х годов методом СТМ были получены первые экспериментальные изображения поверхности кремния с атомным разрешением. Однако новые, практически неограниченные возможности открылись с изобретением атомного силового микроскопа (АСМ), с помощью которого стало возможным изучать рельеф не только проводящих, но и диэлектрических материалов. С тех пор области применения сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) значительно расширились.

### *1.3. Принцип работы и конструкция СЗМ NanoEducator*

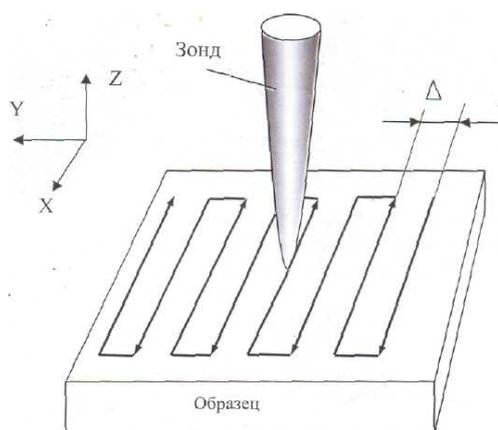
В основе работы СЗМ NanoEducator лежит использование зависимости величины взаимодействия между зондом и поверхностью исследуемого образца от величины расстояния зонд – образец. Взаимодействие может быть токовым (за счет туннельного тока) или силовым.

Оперируя туннельным током, протекающим при постоянном электрическом смещении между зондом и образцом, можно исследовать

довать только проводящие объекты, в то время как, используя силу взаимодействия зонд – поверхность, можно исследовать как проводящие, так и непроводящие (диэлектрические) образцы. Чем более выражена зависимость тока или силы от расстояния между зондом и образцом, тем выше пространственное разрешение СЗМ, причем характер этой зависимости определяется физико-химическими свойствами исследуемой поверхности. Пространственное разрешение определяется также радиусом закругления кончика зонда, уровнем механических вибраций и тепловых дрейфов конструкции, а также уровнем электронных шумов измерительной аппаратуры. Кончик зонда (вольфрамовой иглы) затачивается путем электрохимического травления и имеет радиус закругления вершины менее 100 нм.

В СЗМ NanoEducator зонд закрепляется неподвижно. Образец может перемещаться относительно зонда по трем пространственным координатам:  $X$ ,  $Y$  – в плоскости образца;  $Z$  – по вертикали перпендикулярно плоскости  $XY$ . При работе прибора образец движется в плоскости  $XY$  (рис. 1) построчно, таким образом, что кончик зонда постепенно проходит над всей заданной площадью образца с шагом  $\Delta$ . Этот процесс называется *сканированием*.

В процессе сканирования зонд может находиться над участками поверхности, имеющими различные физические свойства, в результате чего величина и характер взаимодействия зонд-образец будут изменяться. Кроме того, если на поверхности образца есть неровности, то при сканировании будет изменяться и расстояние  $\Delta Z$  между зондом и поверхностью, соответственно будет изменяться и величина локального взаимодействия.



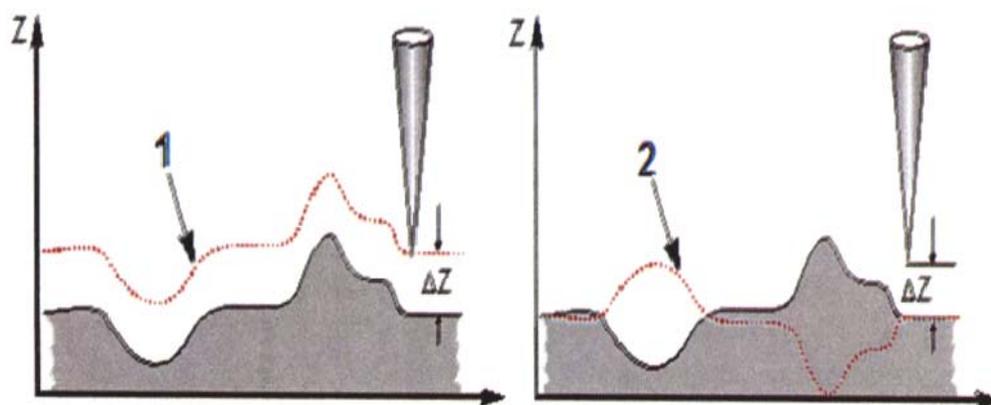
**Рис. 1.** Принцип сканирования поверхности образца

В процессе сканирования величина локального взаимодействия поддерживается постоянной с помощью системы автоматического слежения, которая, регистрируя сигнал взаимодействия (силу или ток), поддерживает его среднее значение на постоянном уровне. Это осуще-

ствляется за счет перемещения образца по вертикали (ось  $Z$ ) специальным движителем – сканером, таким образом, чтобы величина взаимодействия оставалась постоянной в процессе сканирования.

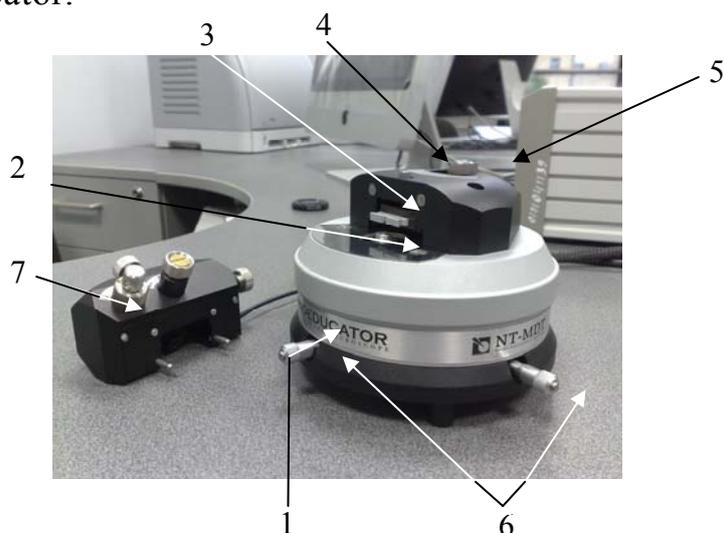
На рис. 2 показана траектория движения зонда относительно образца (кривая 1) и образца относительно зонда (кривая 2) при сохранении постоянной величины взаимодействия зонд - образец. Если зонд оказывается над ямкой или областью, где взаимодействие слабее, то образец приподнимается, в противном случае – образец опускается. Величина взаимодействия зонда с поверхностью в общем случае зависит как от величины зазора зонд - поверхность, так и от локальных характеристик поверхности, так что такое смещение образца системой автоматического слежения может происходить в результате одновременного влияния как изменений рельефа, так и физико-химических свойств поверхности образца. Поэтому требуется уделять особое внимание интерпретации информации, полученной в процессе сканирования СЗМ.

NanoEducator регистрирует перемещение образца по оси  $Z$  и по осям  $X$ ,  $Y$  (рис.1). При этом на экране компьютера синхронно с перемещением образца строится изображение, где изменение локальной яркости пропорционально измеренному перемещению образца по оси  $Z$  при сканировании. Такой метод работы СЗМ называют методом постоянного взаимодействия (постоянной силы или постоянного тока).



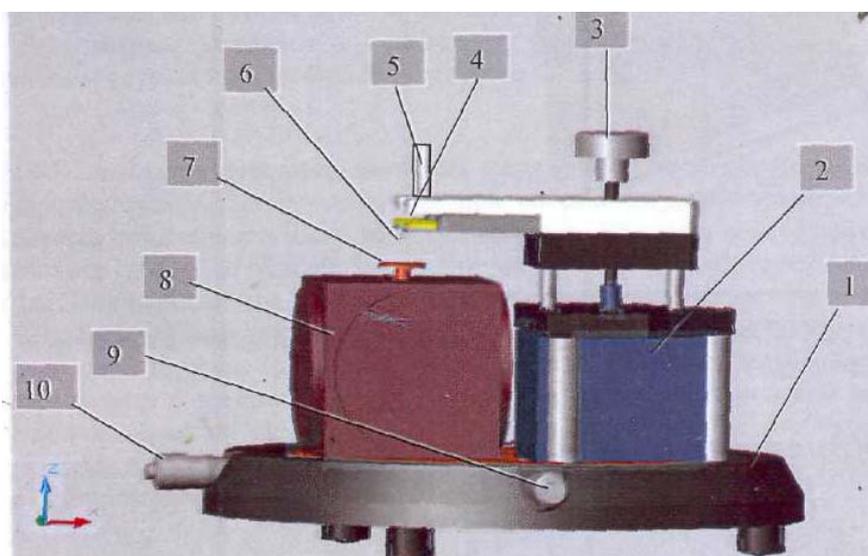
**Рис. 2.** Траектории относительного движения зонда и образца:  
*1 – траектория движения зонда при неподвижном образце;*  
*2 – траектория движения образца при неподвижном зонде*

На рис. 3 представлен внешний вид измерительной головки прибора NanoEducator.



**Рис. 3.** Внешний вид измерительной головки СЗМ NanoEducator: 1 – основание; 2 – держатель образца; 3 – датчик взаимодействия; 4 – винт фиксации датчика; 5 – винт ручного подвода; 6 – винты перемещения сканера с образцом; 7 – защитная крышка с видеокамерой

На рис. 4 приведена конструкция измерительной головки прибора.



**Рис. 4.** Конструкция СЗМ NanoEducator: 1 – основание; 2 – механизм подвода; 3 – винт ручного подвода; 4 – датчик взаимодействия; 5 – винт фиксации датчика; 6 – зонд; 7 – держатель образца; 8 – сканер; 9, 10 – винты перемещения сканера с образцом

На основании 1 установлен сканер 8 с держателем образца 7 и механизм подвода 2 на основе шагового двигателя. Подвод зонда 6, закрепленного на датчике взаимодействия 4, к образцу можно также осуществлять с помощью винта ручного подвода 3. Датчик взаимодействия закрепляется при помощи винта фиксации датчика 5. Предварительный выбор места исследования на образце осуществляется с помощью винтов перемещения сканера с образцом 9, 10.

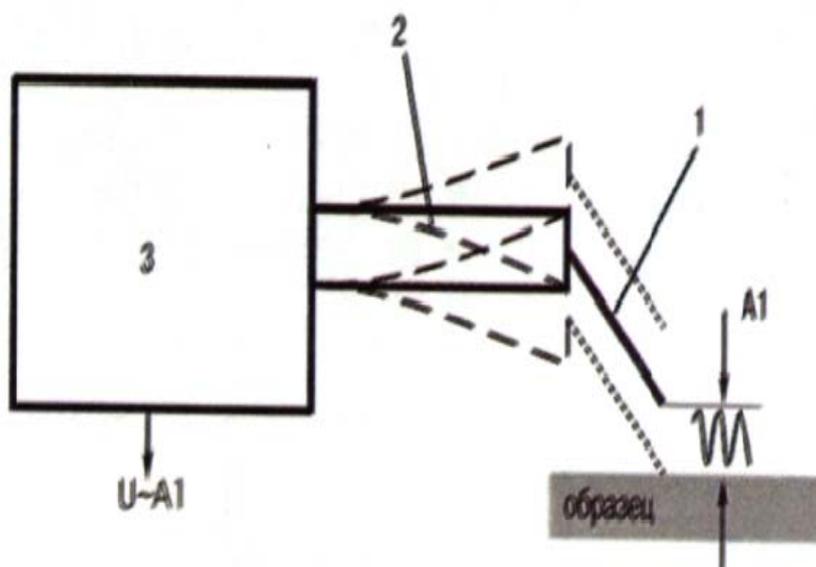
В общем виде NanoEducator состоит из измерительной головки с видеокамерой, электронного блока, соединительных кабелей и управляющего компьютера (рис. 5).



**Рис. 5.** Общий вид NanoEducator

Сигнал от датчика взаимодействия после преобразования в усилителе поступает в электронный блок. Управляющие сигналы от электронного блока поступают в измерительную головку. Управление электронным блоком осуществляется от компьютера.

В приборе NanoEducator применяется универсальный датчик силового взаимодействия и туннельного тока. Зондовый датчик силового взаимодействия состоит из игольчатого зонда из вольфрамовой проволоки 1, закрепленного на трубчатой пьезоэлектрической консоли 2, которая, в свою очередь, закреплена на неподвижном основании 3 (рис. 6). Поскольку консоль на английском языке называется *cantilever*, то в зондовой микроскопии для консоли, несущей зонд на свободном конце, установилось название «*кантилевер*». Одна часть пьезоэлектрического трубчатого кантилевера используется как пьезовибратор, а другая – как датчик механических колебаний.

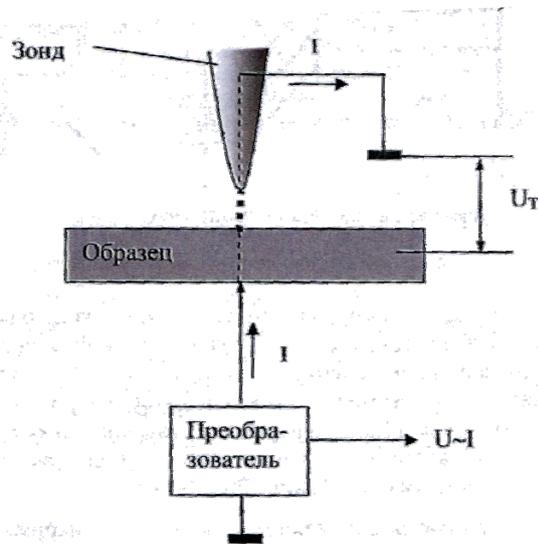


**Рис. 6.** Принцип регистрации силового взаимодействия

К пьезовибратору подводится переменное электрическое напряжение с частотой, равной резонансной частоте электромеханической системы кантилевер-зонд. Кантилевер колеблется вокруг равновесного положения. Амплитуда колебаний при этом максимальна. Как видно из рис. 5, в процессе колебаний зонд отклоняется от равновесного положения на величину  $A_1$ , равную амплитуде его вынужденных механических колебаний (она составляет доли микрона), при этом на второй части пьезоэлемента (датчике колебаний) возникает переменное электрическое напряжение, пропорциональное смещению зонда.

При приближении зонда к поверхности образца зонд начинает касаться образца в процессе колебаний. Степень взаимодействия зонда с поверхностью образца увеличивается, а амплитуда колебаний уменьшается на величину  $\Delta A$  (рис. 6).

Для регистрации туннельного тока необходимо приложить разность потенциалов между проводящим образцом и проводящим зондом (рис. 7).



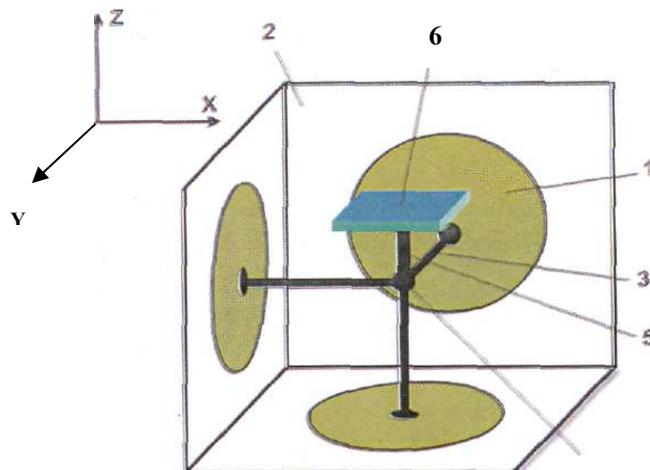
**Рис. 7.** Принцип регистрации туннельного тока

Преобразователь, изображенный на рис. 6, вырабатывает электрическое напряжение  $U_T$ , обуславливающее протекание туннельного тока  $I$  и выдает напряжение  $U$  пропорциональное этому току в электронный блок.

При использовании СЗМ NanoEducator в качестве СТМ, заземленная игла датчика силового взаимодействия служит зондом СТМ.

Сканер - это устройство, перемещающее образец по трем пространственным координатам:

$X, Y$  – для перемещения в плоскости образца;



$Z$  – для перемещения в перпендикулярном к плоскости образца направлении, под воздействием следящей системы (рис. 8).

**Рис. 8.** Конструкция сканера:

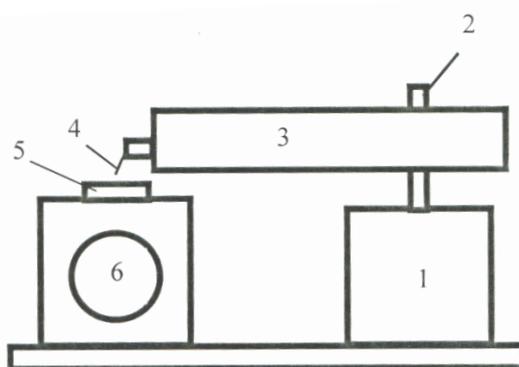
*1 – пьезоэлемент; 2 – корпус; 3 – толкатель; 4 – точка соединения толкателей; 5 – стойка; 6 – держатель образца*

Три пьезоэлемента 1 закреплены на гранях корпуса сканера 2, имеющего кубическую форму. Каждый пьезоэлемент может передвигать прикрепленный к нему толкатель 3 в одном из трех взаимно перпендикулярных направлений – X, Y или Z при приложении к нему электрического поля (напряжения). Как видно из рис. 8, все три толкателя соединены в одной точке 4. С некоторым приближением можно считать, что эта точка перемещается по трем координатам X, Y, Z. К этой же точке прикрепляется стойка 5 с держателем образца 6. Таким образом, образец перемещается по трем координатам под действием трех независимых источников напряжения.

В NanoEducator максимальное перемещение образца по осям X и Y составляет около 70 мкм, что и определяет максимальную площадь сканирования в горизонтальной плоскости. Диапазон перемещений сканера по оси Z составляет до 10 мкм, поэтому необходимо первоначально приблизить образец к зонду на это расстояние. Для этого предназначен механизм подвода, схема которого приведена на рис. 9.

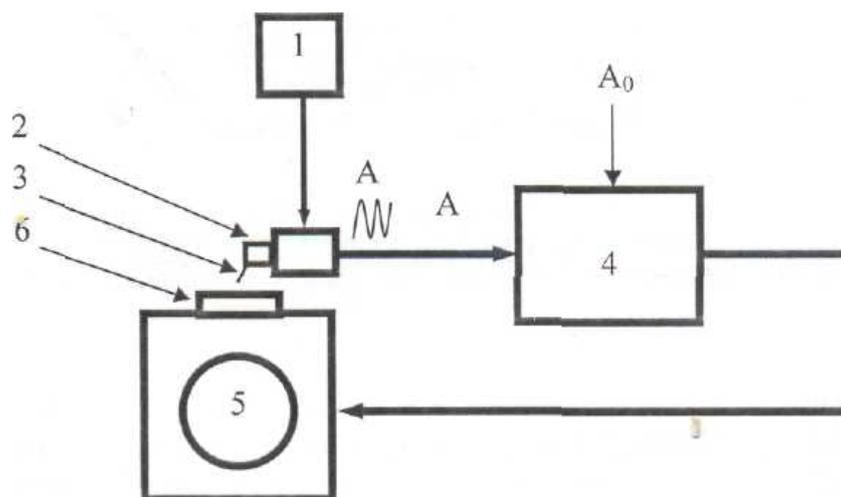
Шаговый двигатель 1 при подаче на него электрических импульсов вращает винт подачи 2 и перемещает планку 3 с зондом 4, приближая или отдаляя его от образца 5, установленного на сканере 6. Величина одного шага составляет около 2 мкм.

На рис. 10 изображена функциональная схема системы обратной связи, которая поддерживает постоянным среднее значение величины взаимодействия зонд - образец.



**Рис. 9.** Схема механизма подвода:

*1 – шаговый двигатель; 2 – винт перемещения; 3 – перемещающаяся планка; 4 – зонд; 5 – образец; 6 – сканер*



**Рис. 10.** Схема системы обратной связи:  
 1 – генератор напряжения; 2 – датчик; 3 – зонд;  
 4 – электронный блок управления; 5 – сканер; 6 – образец

При использовании СЗМ NanoEducator в конфигурации атомно-силового микроскопа (АСМ) постоянно включен генератор синусоидального напряжения 1. Этим напряжением раскачивается на своей резонансной частоте датчик силового взаимодействия 2 с закрепленным на нем зондом 3. Когда зонд взаимодействует с образцом, на выходе датчика 2 появляется сигнал  $A$ , изменение амплитуды которого пропорционально изменению величины силового взаимодействия.

Система обратной связи устроена таким образом, чтобы пользователь мог задавать желаемую величину взаимодействия  $A_0$  по командам от компьютера. Сигнал  $A$  усиливается и преобразуется в электронном блоке управления 4. В блоке управления производится сравнение величины сигнала  $A$  с заданной пользователем постоянной величиной  $A_0$  (рис. 9). Блок управления выдает управляющее напряжение на сканер 5. Под действием этого напряжения образец 6 перемещается вверх или вниз по оси  $Z$ , при этом изменяется величина взаимодействия зонд-образец и средняя амплитуда сигнала  $A$ . Движение образца сканером по оси  $Z$  происходит до тех пор, пока величина сигнала  $A$  не достигнет заданного значения  $A_0$ . В результате среднее значение взаимодействия поддерживается на постоянном уровне.

Аналогичным образом система обратной связи работает и в конфигурации туннельного микроскопа, с той разницей, что при отключенном генераторе между образцом и зондом прикладывается постоянное напряжение смещения, а входным сигналом для электронного блока 4 является сигнал от датчика туннельного тока.

В СЗМ NanoEducator перед началом работы зонд находится достаточно далеко от образца и взаимодействие зонд – образец отсутствует. Однако система обратной связи включена, и электронный блок управления выдает напряжение, заставляющее сканер поднять образец на максимально возможную высоту (около 10 мкм). Для работы прибора необходимо установить требуемую величину расстояния зонд – образец. Данную процедуру называют подводом зонда. Так как шаг механизма подвода значительно превосходит величину требуемого расстояния зонд – образец, то во избежание деформации зонда его подвод осуществляется при одновременной работе шагового двигателя и перемещением сканера по оси  $Z$  по следующему алгоритму:

- 1) система обратной связи отключается и сканер «втягивается», т.е. опускает образец в нижнее крайнее положение;
- 2) механизм подвода зонда производит один шаг и останавливается;
- 3) система обратной связи включается, и сканер плавно поднимает образец, одновременно производится анализ наличия взаимодействия зонд – образец;
- 4) если взаимодействие отсутствует, процесс повторяется с пункта 1;
- 5) если во время вытягивания сканера вверх появится ненулевой сигнал взаимодействия, система обратной связи остановит движение сканера вверх и зафиксирует величину взаимодействия на заданном уровне.

Диапазон перемещения образца сканером по оси  $Z$  превышает шаг механизма грубого подвода, поэтому силовое взаимодействие возникает не во время движения механизма, а при работе системы слежения в промежутках между шагами.

#### ***1.4. Техническая спецификация оборудования NanoEducator***

Условия эксплуатации:

- температура окружающей среды  $25 \pm 5$  °C;
- относительная влажность не более 60 %;
- атмосферное давления  $760 \pm 30$  мм. рт. ст.;
- электрическая сеть напряжением 220 В, частотой 50 Гц, заземление;
- рабочее помещение должно быть защищено от механических вибраций и акустических шумов;
- электрический блок должен быть защищен от воздействия прямых солнечных лучей.

В табл. 1 представлены основные параметры сканирующего зондового микроскопа NanoEducator.

Таблица 1

Основные параметры СЗМ NanoEducator

Параметры	Количественные характеристики
1	2
Режимы сканирования	АСМ, СТМ, литография
Область сканирования	70x70x10 мкм
Пространственное разрешение X-Y Z	~ 50 нм ~ 2 нм (зависит от радиуса кривизны зонда)
Нелинейность сканера	5 %
Минимальный шаг сканера	10 нм
Ток сканирования	100-200 нА
Радиус кривизны зонда	10-100 нм
Время сканирования	30-40 мин (зависит от площади сканирования)
Время выхода на рабочий режим (время настройки)	не более 10 мин
Размер исследуемого образца	12x12 мм
Высота образца	не более 5 мм

### ***1.5. Контрольные вопросы***

1. Опишите принцип работы СЗМ NanoEducator.
2. Опишите общую конструкцию прибора СЗМ NanoEducator.
3. Объясните конструкцию зондового датчика туннельного тока/силового взаимодействия прибора NanoEducator.
4. Дайте описание механизма подвода зонда к образцу.
5. Назовите основные параметры СЗМ NanoEducator.

## **Лабораторная работа № 2 ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ТВЕРДОГО ТЕЛА**

### ***2.1. Цель работы***

1. Получить СЗМ изображение поверхности объекта.
2. Освоить навыки обработки и представления экспериментальных результатов.

### ***2.2. Краткие теоретические сведения***

Одной из важнейших задач современного материаловедения является исследование поверхности твердых тел. Необходимость в этом

возникла, с одной стороны, в связи с переходом современной технологии на субмикронный уровень. Поверхностные свойства материала, а не объемные, стали играть определяющую роль при взаимодействии с другими материалами.

Поверхность и происходящие на ней явления представляют интерес и с точки зрения фундаментальных наук (химия, физика), поскольку атомная структура кристалла, то есть расположение и свойства его решеточных слоев вблизи поверхности совершенно иное, чем в объеме.

Для детального исследования поверхности твердых тел существует много разнообразных методов. Микроскопия как средство получения увеличенного изображения зародилась еще XV в., когда впервые были изготовлены простые увеличительные стекла для изучения насекомых. В конце XVII в. Антонио ван Левенгук изготовил оптический микроскоп, который позволял установить существование отдельных клеток, болезнетворных микробов и бактерий. Уже в XX веке были разработаны методы микроскопии с помощью электронных и ионных пучков.

Во всех описанных методах применяется следующий принцип: освещение исследуемого объекта потоком частиц и его последующее преобразование. В сканирующей зондовой микроскопии использован другой принцип – вместо зондирующих частиц в ней используется механический зонд, игла. Образно выражаясь, в оптическом или электронном микроскопах образец осматривается, в СЗМ – ощупывается.

Другим важным принципом, отраженным в названии метода СЗМ, является принцип сканирования, т.е. получение не усредненной информации об объекте исследования, а дискретное (от точки к точке, от линии к линии) перемещение зонда и считывание информации в каждой точке.

### ***2.3. Рабочее задание***

Получение изображения и обработка экспериментальных данных выполняется студентом или группой студентов на одном приборе под присмотром преподавателя. В качестве образцов для исследования могут использоваться тестовые образцы или любые другие по выбору преподавателя.

### ***2.4. Порядок выполнения работы***

Общий порядок выполнения работы состоит из следующих этапов:

1. Знакомство с основами сканирующей зондовой микроскопии и с конструкцией СЗМ NanoEducator (см. лабораторную работу №1).
2. Знакомство с программой управления прибором NanoEducator.

3. Получение первого изображения (установка зонда и образца, выбор места сканирования, подвод зонда, выбор параметров сканирования).

4. Обработка и анализ полученного изображения (способ представления результатов, количественные характеристики изображения).

5. Составление отчета о работе (сведения о методе СЗМ, описание используемого образца, анализ экспериментальных результатов и выводы по работе).

Управление прибором NanoEducator осуществляется автоматически с помощью компьютера при отсутствии сложных юстировок и настроек. Вручную производится только установка образца и первоначальный подвод зонда. Работа с прибором простота в обращении, позволяет использовать видеокамеру для визуального контроля состояния зонда и поверхности образца, удобный программный интерфейс в *Apple Mac* обеспечивает многофункциональность и возможность просмотра и обработки данных одновременно с процессом сканирования образца.

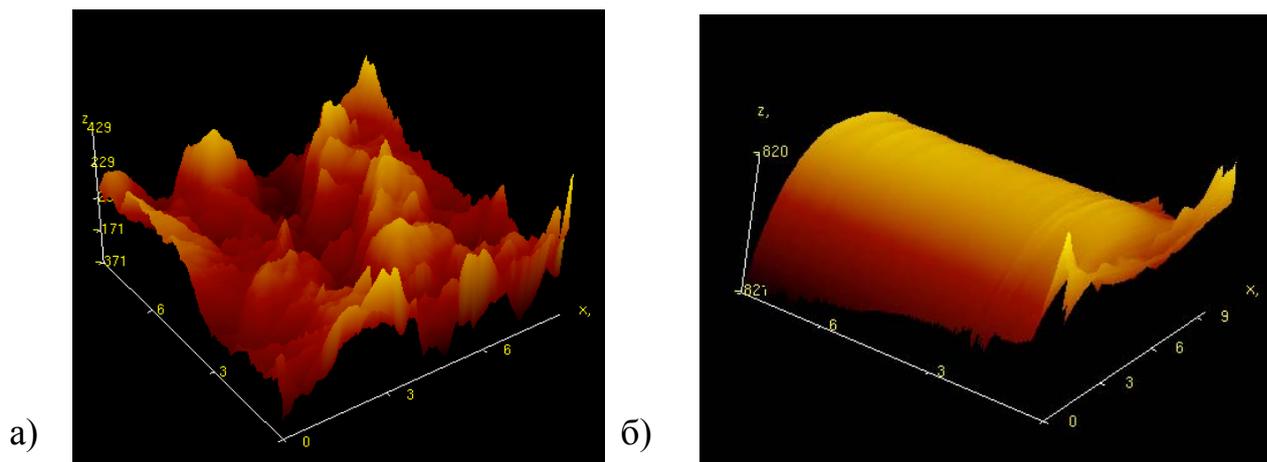
Проведение эксперимента осуществляется в следующей последовательности:

- включение прибора и вызов программы NanoEducator;
- установка образца и после установка датчика с зондом;
- выбор режима сканирования (атомно-силовая микроскопия АСМ, сканирующая туннельная микроскопия СТМ, спектроскопия и литография);
- выбор участка для сканирования;
- предварительный подвод зонда вручную;
- поиск резонанса и установка рабочей частоты (только для режима АСМ);
- автоматический подвод зонда;
- выбор параметров сканирования и сканирование.

Информация, полученная с помощью сканирующего зондового микроскопа, хранится в виде СЗМ кадра – матрицы, имеющей размер 200×200 или 300×300 элементов. Визуализация СЗМ кадров производится средствами компьютерной графики, в основном в виде цветных двухмерных (2D) или трехмерных (3D) изображений.

При 2D визуализации каждой точке поверхности присваивается цвет определенного тона в соответствии с высотой точки поверхности. При 3D визуализации изображение поверхности строится в аксонометрической перспективе, что дает возможность подчеркнуть отдельные особенности рельефа.

Оценка полученного изображения может характеризоваться морфологией поверхности, которая описывается сложным рельефом с большим количеством пиков и впадин (рис. 11, а) или простым спокойным рельефом без явных перепадов высот (рис. 11, б).



**Рис. 11.** Пример 3D изображения поверхности, полученной с помощью СЗМ NanoEducator:

- а) поверхность со сложным рельефом;*  
*б) поверхность со спокойным рельефом*

Также полученное изображение поверхности может характеризоваться количественными параметрами: площадью сканирования, перепадом высот на этой площади, степенью шероховатости поверхности и другими. При необходимости существует возможность дополнительной обработки и количественного анализа изображения.

## **2.5. Контрольные вопросы**

1. Опишите алгоритм регистрации двумерного изображения поверхности.
2. Опишите алгоритм регистрации 3D изображения.
3. Дайте качественную и количественную интерпретацию 3D изображения, полученного в ходе работы.

## **Лабораторная работа № 3 ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОДЫ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

### **3.1. Цель работы**

1. Получить изображение поверхностей микробиоценозов водных сред.
2. Освоить навыки обработки и представления экспериментальных результатов.

### 3.2. Краткие теоретические сведения

В воде могут встречаться следующие микроорганизмы:

1. Бактерии палочковидной формы с выростом, оканчивающимся «почкой». По форме эти клетки относятся к группе «Почкующиеся или обладающие выростами бактерии». Например, вид *Prostecobacter fusiformis*, представляющий собой клетки веретеновидной или вибриоидной формы,  $0.5 \div 0.9 \times 2 \div 5$  мкм без учета выростов. Каждая клетка образует хотя бы одну полярную простеку. Простеки  $0.1 \div 0.2$  мкм в диаметре плавно сужаются от полюса клетки, но с утолщением на конце. Хорошо растут в среде, содержащей  $\leq 0,1\%$  органического вещества. Температура роста от 1 до  $40^{\circ}\text{C}$ . Обнаруживаются в воде, почве и сточных водах.

2. Микроорганизмы, изогнутые и замкнутые в характерные кольца, образующие цепочки по форме тела и диаметру завитка относятся к группе «Неподвижные грамотрицательные изогнутые бактерии». Например, виды *Ancylobacter aquaticus* или *Runella slithyformis*. Для более точной идентификации требуется применение дополнительных методов, например, биохимических тестов.

3. Вытянутые микроорганизмы спиралевидной формы, которые относятся к группе «Спирохет». Верхним покровом спиралевидной клетки служит многослойная наружная мембрана, покрывающая протоплазматический цилиндр – цитоплазму с ядерной оболочкой, окруженную цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой. Вокруг спирально закрученного протоплазматического цилиндра обвиты периплазматические жгутики. Жгутики служат компонентами двигательного аппарата клетки. В отличие от жгутиков других бактерий, периплазматические жгутики спирохет обвиты вокруг тела клетки и, будучи окружены наружной мембраной, локализованы полностью внутри клетки. Например, это микроорганизмы *Spirocheta plicatilis* – спиралевидные клетки диаметром  $0.2 \div 0.75$  мкм и длиной  $5 \div 250$  мкм, обитающие в водных средах.

При санитарно-микробиологических исследованиях воды определяют микробное число – количество микробов в 1 мл воды; колититр – наименьшее количество или наибольшее разведение воды, в котором еще обнаруживается кишечная палочка; колиинекс – число кишечных палочек в 1 л воды.

### ***3.3. Рабочее задание***

Получение изображения и обработка экспериментальных данных выполняется студентом или группой студентов на одном приборе под присмотром преподавателя. В качестве образцов для исследования могут использоваться тестовые образцы или любые другие по выбору преподавателя.

### ***3.4. Порядок выполнения работы***

1. Выберите и подготовьте самостоятельно биологические образцы для исследований с помощью сканирующей зондовой микроскопии.

2. Используя систему оптического контроля NanoEducator, выберите участок поверхности образца и получите несколько обзорных сканов размерами 70×70 мкм в режиме атомно-силовой микроскопии.

3. Выберите на полученном изображении один из микроорганизмов или простейшее и проведите сканирование поверхности с применением метода фазового контраста (режим сканирования АСМ+фаза).

4. Проведите обработку и анализ полученных изображений, постарайтесь идентифицировать полученные бактерии, простейшие или водоросли.

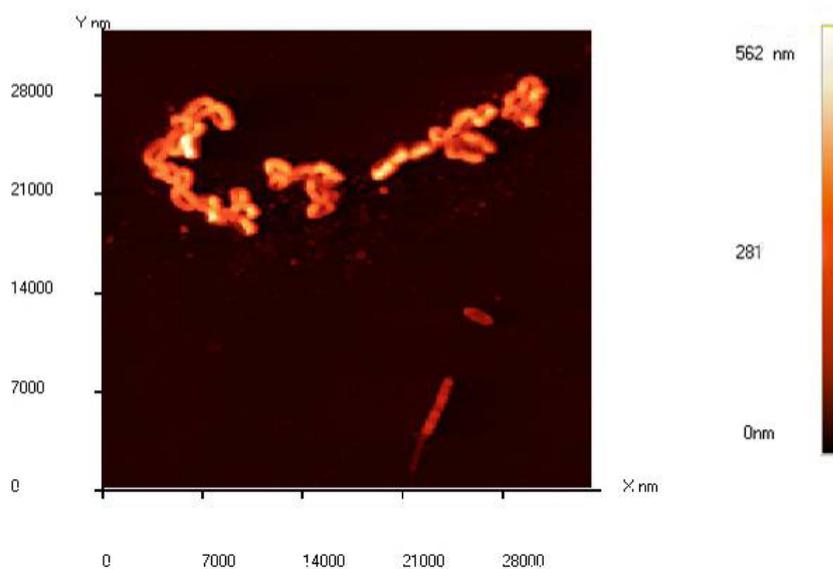
Пробы воды налейте в чашки Петри, на дно которых предварительно поместите чистые обезжиренные покровные стекла, экспозиция 1 - 2 недели. Чашки Петри закройте и инкубируйте при температуре от 17 до 22 С°. Затем извлеките стекла и аккуратно промойте несколько раз опуская препарат в стакан с дистиллированной водой. Высушите покровные стекла при комнатной температуре.

Затем проводите обзорные сканирования в нескольких участках препарата, поскольку микробиота воды отличается чрезвычайным разнообразием.

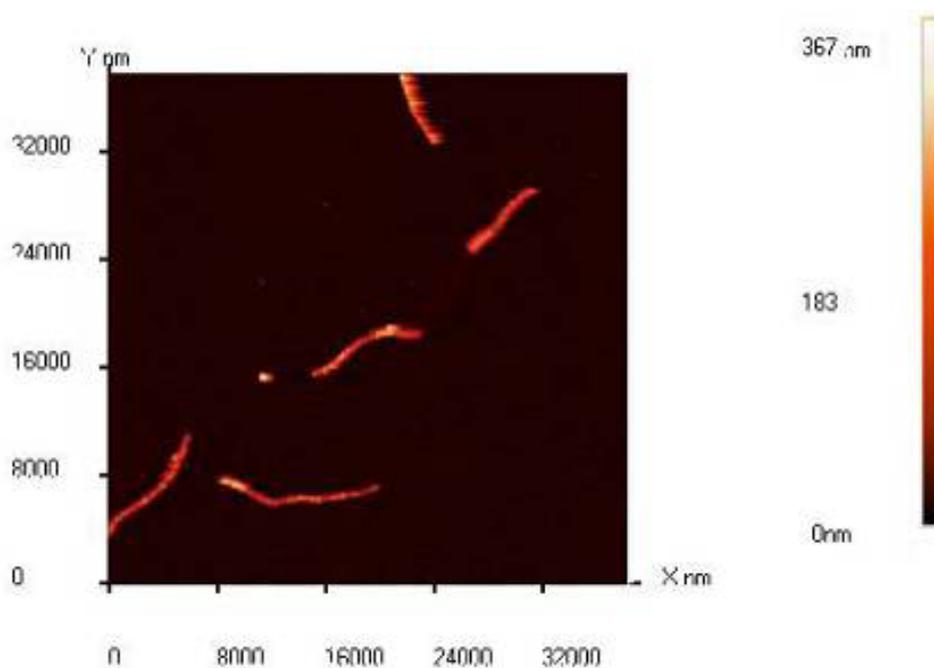
**Дистиллированная вода.** На рис. 12-13 представлены примеры сканированных изображений препаратов, полученных из дистиллированной воды при инкубации в течение 1-й и 2-х недель.

На препаратах из дистиллированной воды могут встречаться микроорганизмы 4-х типов:

- микроорганизмы палочковидной формы с выростом;
- кольцеобразные микроорганизмы, лежащие цепочками;
- отдельно лежащие клетки правильной палочковидной формы;
- вытянутые микроорганизмы спиралевидной формы.



**Рис. 12.** Обзорное сканированное изображение препарата, полученного из дистиллированной воды. Инкубация – 1 неделя



**Рис. 13.** Обзорное сканированное изображение препарата, полученного из дистиллированной воды. Инкубация – 2 недели

Для определения типа микроорганизма нужно оценить его размеры и морфологию. Для этого уменьшите размер области сканирования и просканируйте каждый из микроорганизмов. После чего, перейдя к просмотру полученных сканов с помощью программы Scan Viever и

используя инструменты в данной программе для обработки данных, оцените размеры клеток. Результаты измерений внесите в табл. 2.

Таблица 2

№	СЗМ-изображение	Форма и размер микроорганизмов
1		
2		
...		

Убедитесь в том, что найденная в дистиллированной воде микробиота представлена преимущественно бактериальными формами. Для определения групповой и видовой принадлежности бактерий воспользуйтесь определителем Берджи. С помощью сканирующего зондового микроскопа можно увидеть уникальные морфологические структуры бактерий и точно определить их размеры, что позволяет в классификации использовать преимущественно бактериальную морфологию (форму и размеры бактерий).

### ***3.5. Контрольные вопросы***

1. Назовите основные разновидности СЗМ.
2. Опишите основные методы работы АСМ и их назначение.
3. Какие преимущества дают СЗМ исследования биологических объектов.

## **Лабораторная работа № 4 ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЗОНДОВ ДЛЯ ПРИБОРА NANOEDUCATOR С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ТРАВЛЕНИЯ**

### ***4.1. Цель работы***

1. Познакомиться с различными видами зондов для сканирующей зондовой микроскопии.
2. Освоить методику изготовления зондов для микроскопа NanoEducator с помощью универсального устройства травления игл.

### ***4.2. Краткие теоретические сведения***

Существует много видов СЗМ зондов, различающихся различной геометрией. Важно использовать в эксперименте соответствующий зонд для того, чтобы отобразить интересующие особенности на поверхности образца.

**Зонды для атомно-силовой микроскопии (АСМ).** Один из видов зондов представляет собой пирамидку из нитрида кремния с квадратным основанием и со сторонами приблизительно 5 мкм длиной. Кантилеверы с зондами получают путем напыления  $\text{Si}_3\text{N}_4$  в ямки травления от дислокаций на поверхности Si, литографией и последующим травлением подложки. Отношение сторон (высоты к основанию) определяется геометрией ямки травления и составляет приблизительно 1:1, с радиусом кончика около  $20 \div 50$  нм. Для изготовления кремниевых зондов конической формы применяется достаточно сложный технологический процесс, включающий в себя операции фотолитографии, ионной имплантации, химического и плазменного травления. Получающиеся в результате заострения плазменным травлением зонды имеют коническую форму с радиусом основания  $3 \div 6$  мкм и высотой  $10 \div 30$  мкм (что дает отношение сторон  $3 \div 5:1$ ). Радиус кончика составляет приблизительно  $10 \div 20$  нм. В результате данных технологических операций изготавливается целый набор зондовых датчиков на одной кремниевой пластине. Для проведения электрических измерений на зонд наносятся проводящие покрытия из различных материалов (Au, Pt, Cr, W, Mo, Ti,  $\text{W}_2\text{C}$  и др.). В магнитных датчиках зонды покрываются тонкими слоями ферромагнитных материалов таких, как Co, Fe, CoCr, FeCr, CoPt и др.

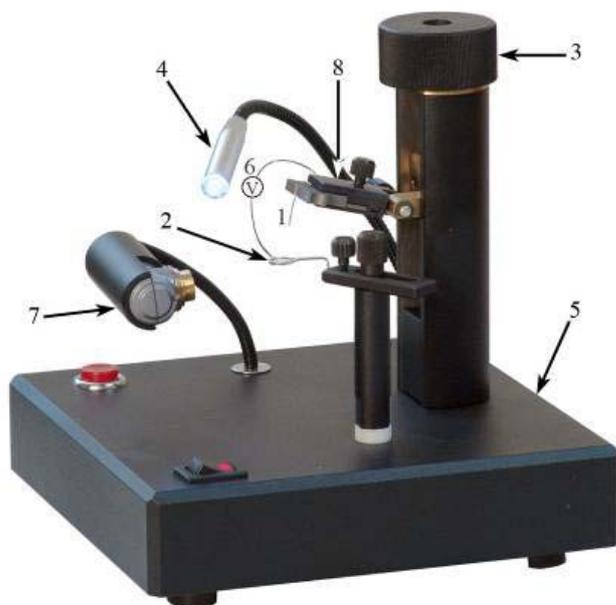
Для проведения специальных измерений особо узких углублений/щелей используются специальные виды зондов, называемых вискерными (“Whisker type”) или супертипами. Эти зонды имеют очень острые кончики с большим отношением сторон, позволяющие им проникать в узкие углубления, в то время как стандартные зонды не могут измерить дно и почти вертикальные боковые стенки. Типичные размеры составляют: длина  $1.5 \div 2$  мкм, отношение сторон  $> 10:1$  и радиус кончика 10 нм.

**Зонды для сканирующей туннельной микроскопии (СТМ),** как правило, изготавливаются из тонкой вольфрамовой проволоки. Для изготовления острых зондов с большим отношением сторон эти проволоки затачивают с использованием процесса электрохимического травления. Отношение сторон составляет обычно 5:1 с радиусом кончика порядка 10 нм. При получении атомных изображений сканируется относительно малый диапазон на плоской поверхности, поэтому общая геометрия зонда не критична для этого применения. Применяемая в этом случае методика изготовления зондов – перерезывание проволоки с помощью обыкновенных ножниц. Перерезывание производится под углом порядка 45 градусов с одновременным натяжением проволоки на разрыв. При перерезывании происходит пластическая деформация проволоки в месте резки и обрыв ее под действием растягивающего усилия. В результате в месте разреза формируется вытянутое острие с не-

ровным (рваным) краем с многочисленными выступами (волоками), один из которых и оказывается рабочим элементом зонда, который будет участвовать в процессе туннелирования.

### 4.3. Рабочее задание

В сканирующем зондовом микроскопе NanoEducator используют универсальные зонды, которые подходят для проведения измерений как в АСМ, так и в СТМ и представляют собой заостренный конец вольфрамовой проволоки. На рис. 14 показано устройство для травления игл (УТИ), предназначенное для восстановления затупившегося или изготовления нового зонда методом электрохимического травления. Принцип действия УТИ основан на том, что при протекании электрического тока между раствором щелочи и помещенным в нее металлом происходит электрохимический процесс травления металла, при котором атомы металла переходят в раствор.



**Рис. 14.** Конструкция устройства для травления игл для СЗМ NanoEducator:

1 – отрезок вольфрамовой проволоки; 2 – кольцо; 3 – винт перемещения по вертикали; 4 – подвижный светодиодный осветитель; 5 – основание; 6 – источник переменного электрического напряжения; 7 – микроскоп; 8 – держатель

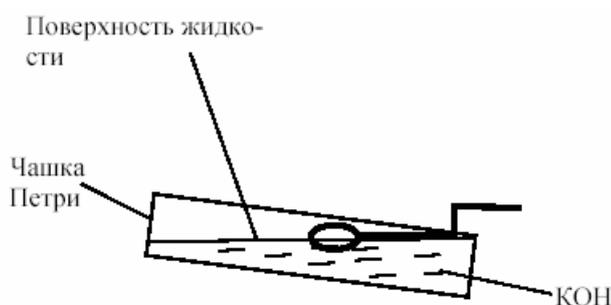
УТИ работает следующим образом. Отрезок вольфрамовой проволоки 1 закреплен на держателе 8, который перемещается вверх и вниз по вертикали вручную при помощи винта 3. Вращая винт 3, проволоку опускают в кольцо 2 до нужной глубины. Кольцо изготовлено из никромовой проволоки и в процессе травления не участвует. Предвари-

тельно на кольцо 2 вешается капля 5% раствора КОН или NaOH. После этого включается источник переменного или постоянного электрического напряжения 6, обозначенный буквой V. Происходит процесс перетравливания вольфрамовой проволоки и образования острой иглы. Оператор наблюдает за процессом травления в оптический микроскоп 7. Освещение обеспечивается подвижным светодиодным осветителем 4. Все элементы конструкции закреплены на основании 5. После окончания травления иглу 1 вместе с держателем 8 поднимают в верхнее положение и вынимают.

#### **4.4. Методика восстановления затупившегося зонда**

Если зонд затупился, нужно осуществить его «подтравливание» в соответствии со следующим алгоритмом:

1. Подключите УТИ к адаптеру, входящему в комплект поставки, подключите адаптер к электрической сети 220 В.
2. Убедитесь, что режим травления выключен (не горит красная лампочка на выключателе).
3. Поверните кольцо 2 в сторону от держателя 8 на установке УТИ.
4. Вставьте датчик с зондом в держатель 8.
5. Установите, держатель с датчиком в такое положение, чтобы зонд 1 был в вертикальном положении.
6. Поднимите винтом 3 держатель 8 с датчиком в верхнее положение так, чтобы кончик зонда 1 был выше кольца 2.
7. Поверните кольцо 2 так, чтобы оно оказалось под зондом 1.
8. Отрегулируйте положение оптического микроскопа так, чтобы кольцо 2 было в фокусе микроскопа (рис. 13).
9. Поверните кольцо 2 в прежнее положение и навесьте на него каплю 5% раствора КОН из чашки Петри, как показано на рис. 15. Прикоснитесь поверхностью жидкости к кольцу и опустите чашку вниз. На кольце образуется капля раствора.



**Рис.15.** Навешивание капли раствора КОН

10. Снова поверните кольцо под зонд 1 и опустите кончик зонда в середину капли (рис. 15), вращая винт 3, до тех пор, пока игла не коснется поверхности щелочи. В оптическом микроскопе будет виден образовавшийся с иглой мениск (рис. 16).



**Рис. 16.** Образование мениска при касании кончика иглы поверхности жидкости

11. Слегка поднимите острие так, чтобы самый ее кончик был выше основной поверхности жидкости, но мениск сохранялся. Это необходимо для того, чтобы в процессе травления участвовал только кончик зонда, который касается мениска.

12. Включите процесс травления выключателем. При этом загорится лампочка на выключателе, и жидкость начнет «кипеть». После того, как кончик иглы, касающийся мениска, перетравится, поверхность щелочи потеряет электрический контакт с зондом и процесс «кипения» прекратится.

#### ***4.5. Контрольные вопросы***

1. Укажите, какие факторы могут влиять на качество полученных изображений в СЗМ.
2. Опишите виды зондов, используемые в АСМ и их назначение.
3. Какие зонды используют в приборе NanoEducator.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время сканирующие зондовые микроскопы нашли применение практически во всех областях науки. В физике, химии, биологии используют в качестве инструмента исследования АСМ. В частности, такие междисциплинарные науки, как биофизика, материаловедение, биохимия, фармацевтика, нанотехнологии, физика и химия поверхности, электрохимия, исследование коррозии, электроника, фотохимия и многие другие.

Для студентов всех специальностей и направлений, изучающих циклы естественнонаучных дисциплин, было бы интересно и полезно изучить принцип работы прибора NanoEducator, чтобы использовать его в лабораторных, учебно-исследовательских и научно-исследовательских работах.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: в 2 т: пер. с англ. / под ред. Р. Кельнера, Ж.-М.-Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. М. : Мир, ООО «Издательство АСТ», 2004. – Т.2. – 728 с.
2. Миронов, В.Л.. Основы сканирующей зондовой микроскопии. / В.Л. Миронов – М.: Техносфера, 2005. – 144 с.
3. Сканирующая зондовая микроскопия, спектроскопия и литография: учеб. пособие (для программ. обеспеч. под Mac OS X) ЗАО «НТ-МДТ». – М., Зеленоград, 2008. – 152 с.
4. Сканирующий зондовый микроскоп Nanoeducator. Руководство пользователя прибора. М., Зеленоград: «НТ-МДТ», 2008. – 135 с .
5. Бинниг, Г. Сканирующая туннельная микроскопия – от рождения к юности/ Г. Бинниг, Г. Рорер //Нобел. чтения по физике. УФН, Т. 154, вып. 2, 1996. – 261 с.
6. Руска, Э. Развитие электронного микроскопа и электронной микроскопии/ Э. Руска. // Нобел. чтения по физике. УФН, Т. 154, вып. 2, 1996. – 243 с.
7. Борн, М. Основы оптики/ М. Борн, Э. Вольф – М.: Наука, 1973.
8. Определитель бактерий // Берджи. Хоулт Дж., Криг Н., П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. - М.: Мир, 1997. Т. № 2.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Техника безопасности правила работы со сканирующим зондовым микроскопом NANOEDUCATOR.....	4
1. Лабораторная работа № 1. Знакомство с основами сканирующей зондовой микроскопии.....	5
2. Лабораторная работа № 2. Исследование поверхности твердого тела.....	15
3. Лабораторная работа № 3. Изучение микрофлоры воды с помощью сканирующей зондовой микроскопии.....	19
4. Лабораторная работа № 4. Изготовление зондов для прибора NANOEDUCATOR с помощью электрохимического травления.	22
Заключение .....	27
Библиографический список.....	27

### СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Методические указания  
к выполнению лабораторных работ  
по дисциплинам «Концепции современного естествознания»,  
«Физика и концепции современного естествознания»,  
«Современная аналитическая химия»  
для студентов всех специальностей и направлений

Составители: Рудаков Олег Борисович  
Усачев Сергей Михайлович  
Кукина Ольга Борисовна  
Черноусова Ольга Валентиновна

Редактор Черкасова Т.О.

Подписано в печать 8. 11. 2010. Формат 60x84 1/ 16. Уч.-изд. л. 1,7.  
Усл.-печ. л. 1,8. Бумага писчая. Тираж 200 экз. Заказ №

---

Отпечатано: отдел оперативной полиграфии  
издательства учебной литературы и учебно-методических пособий  
Воронежского государственного архитектурно-строительного университета  
394006 Воронеж, ул. 20-летия Октября, 84