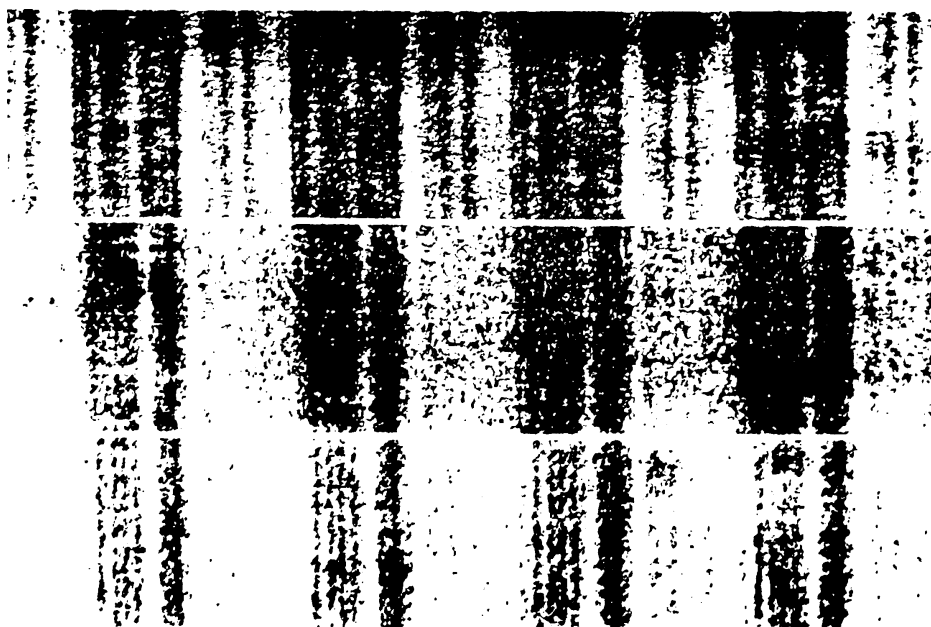


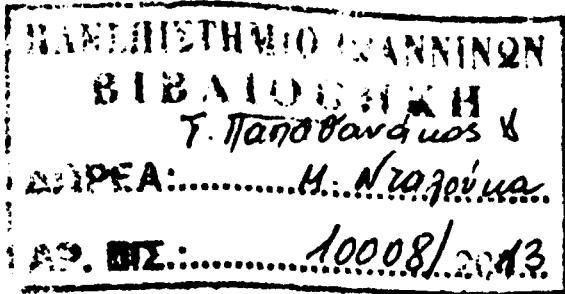
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

# ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ ΤΖΑΦΛΙΔΟΥ  
ΓΙΑΝΝΗΣ ΛΕΟΝΤΙΟΥ





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το βιβλίο αυτό προέρχεται από τη συλλογή και επεξεργασία των σημειώσεων που χράφτηκαν τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια για τις ανάγκες των μαθημάτων της Βιοφυσικής και της Ιατρικής Φυσικής του Ιατρικού Τμήματος αρχικά και του Φυσικού στη συνέχεια. Εύλογο είναι επομένως ότι απευθύνεται σε φοιτητές και των δύο τμημάτων.

Πιστεύοντας ότι καλύπτουμε ένα κενό στον αντίστοιχο χώρο παραδίδουμε το βιβλίο αυτό στους φοιτητές μας και ελπίζουμε στην παραγωγική κριτικότητος με στόχο τη συνεχή βελτίωσή του.

ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ ΤΖΑΦΛΙΔΟΥ

ΓΙΑΝΝΗΣ ΛΕΟΝΤΙΟΥ

Ιωάννινα, Ιανουάριος 1994



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελίδα

Εισαγωγή	1
1. Τα ηλεκτρόνια και η αλληλεπίδρασή τους με την ύλη	2
1.1 Γενικά	2
1.2 Ιδιότητες των ηλεκτρονίων	2
1.3 Παραγωγή δέσμης ηλεκτρονίων	4
1.4 Ηλεκτρομαγνητικός φακός	6
1.5 Αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίων με το υλικό του εξεταζόμενου δείγματος	10
1.6 Δευτερογενή φαινόμενα	13
2. Βασικοί τύποι ηλεκτρονικών μικροσκοπίων	
2.1.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (TEM)	18
2.1.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (SEM)	22
2.1.3 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως-διελεύσεως (STEM)	24
2.2 Φθορίζουσα οθόνη	24
2.3 Περίθλαση-Διακριτικό όριο	24
2.4 Βάθος πεδίου-Βάθος εστίας	28
3. Σφάλματα ηλεκτρομαγνητικών φακών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	
3.1 Σφαιρικό σφάλμα	30
3.2 Χρωματικό σφάλμα	31
3.3 Αστιγματισμός-Διόρθωση αστιγματισμού	33
3.4 Παραμόρφωση του ειδώλου (distortion)	36
4. Μόλυνση του δείγματος (contamination)	38



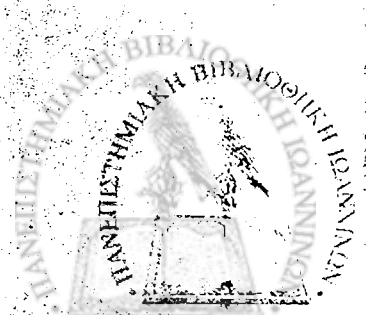
## 5. Αντίθεση (contrast)

5.1 Η προέλευση αντιθέσεως στο είδωλο	38
5.2 Αύξηση της αντιθέσεως	40

## 6. Προετοιμασία του βιολογικού δείγματος για παρατήρηση στο TEM

6.1 Σταθεροποίηση	41
6.2 Στερέωση	42
6.3 Τομή	42
6.4 Χρώση	43
6.5 Προστατευτικές μεμβράνες δείγματος	45

Βιβλιογραφία	47
--------------	----



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μικροσκόπιο είναι ένα σύστημα που μετατρέπει το αντικείμενο σε είδωλο. Ενδιαφερόμαστε να κάνουμε το είδωλο πολύ μεγαλύτερο από το αντικείμενο. Με άλλα λόγια να μεγεθύνουμε το αντικείμενο.

Πολλοί άνθρωποι όταν ερωτούνται ποιο είναι το κυριότερο πλεονέκτημα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε σχέση με το οπτικό μικροσκόπιο απαντούν: "Μεγεθύνει πολύ περισσότερο απ' ό τι το οπτικό μικροσκόπιο". Αυτή η απάντηση είναι απόλυτα σωστή, αλλά η μεγαλύτερη μεγέθυνση είναι ένα δευτερεύον πλεονέκτημα. Το κυριότερο πλεονέκτημα είναι η "Διακριτική Ικανότητα".

Διακριτική ικανότητα (αν αναφερθούμε στο μικροσκόπιο σαν όργανο και όχι στο είδωλο) είναι η ικανότητα του μικροσκοπίου να διακρίνει τις μικρές λεπτομέρειες. Μια από τις αιτίες που το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει πολύ καλύτερη διακριτική ικανότητα απ' ό τι το οπτικό μικροσκόπιο είναι ότι το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων είναι χιλιάδες φορές μικρότερο από το μήκος κύματος του φωτός. Θα καταλάβουμε σε άλλη ενότητα γιατί το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων επηρεάζει τη διακριτική ικανότητα.

Όπως γνωρίζουμε, τα ηλεκτρόνια φέρουν φορτίο. Αυτό δεν σημαίνει μόνο ότι στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ηλεκτρομαγνητικούς φακούς, αλλά υπάρχει και η πιθανότητα η δέσμη των ηλεκτρονίων να σκεδαστεί σε διάφορες διευθύνσεις. Στην ιδιότητα αυτή βασίστηκαν οι επιστήμονες για την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως.

Και στους δύο τύπους ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (διελεύσεως και σαρώσεως) μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και να έχουμε ένα είδωλο σε οποιαδήποτε μεγέθυνση (μέσα σε μια μεγάλη περιοχή π.χ. μέχρι  $\times 100.000$ ) χωρίς ν' αλλάξουμε φακούς.

Επομένως, τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια προσφέρουν καλύτερη διακριτική ικανότητα, μεγαλύτερη μεγέθυνση και μεγαλύτερο βάθος πεδίου απ' ό τι τα οπτικά μικροσκόπια. Αυτές είναι οι αιτίες που τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια



είναι σήμερα τόσο διαδεδομένα αν και κοστίζουν πολύ ακριβά.

## 2. ΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑ ΚΑΙ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ

### 1.1. Γενικά

Όταν εργαζόμαστε με οπτικό μικροσκόπιο έχουμε την τάση να αγνοούμε τις αλληλεπιδράσεις του φωτός με την ύλη. Λαμβάνουμε υπόψη μας μόνο, ότι αρκετό φως διαπερνά το υλικό του εξεταζόμενου δείγματος ή ανακλάται από αυτό κι έτσι μπορούμε εύκολα να δούμε το είδωλο και να υποθέσουμε ότι το υλικό του δείγματος δεν έχει πάθει καμιά αλλοίωση από το γεγονός ότι φως έχει περάσει ή ανακλαστεί από το δείγμα.

Όμως, όταν εργαζόμαστε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρονίων με το υλικό που εξετάζουμε, μπορεί να έχουν σπουδαίες συνέπειες.

Είναι λοιπόν απαραίτητο για να αντιληφθούμε τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την έννοια της πληροφορίας που μπορεί να μας δώσει, να καταλάβουμε τη φύση των δυνατών αλληλεπιδράσεων πρώτον μεταξύ της δέσμης των ηλεκτρονίων και των άλλων τμημάτων του μικροσκοπίου (π.χ. φακοί, κάμερα) και δεύτερον μεταξύ των ηλεκτρονίων και των ατόμων του δείγματος. Για να γίνει αυτό κατανοητό θα πρέπει να μελετήσουμε με περισσότερες λεπτομέρειες τη φύση των ηλεκτρονίων και τις δυνατές αλληλεπιδράσεις ενός ηλεκτρονίου και ενός ατόμου.

### 1.2. Ιδιότητες των ηλεκτρονίων

Ένα ηλεκτρόνιο  $e$  αν το θεωρήσουμε σαν σωματίο, φέρει αρνητικό φορτίο περίπου  $1,6 \times 10^{-19}$  Cb και έχει μάζα ηρεμίας  $m_e$ , περίπου  $9 \times 10^{-31}$  Kg. Αν ένα ηλεκτρόνιο επιταχυνθεί από μια μεγάλη διαφορά δυναμικού  $V$ , τότε η ταχύτητά του  $u$ , μπορεί να πλησιάσει την ταχύτητα του φωτός  $c$ . Από τη θεωρία της σχετικότητας έχουμε τη σχέση:



$$m = \frac{m_e}{\sqrt{1 - \frac{u^2}{c^2}}} \quad (1)$$

Αν τώρα θεωρήσουμε το ηλεκτρόνιο σαν υλικό κύμα, τότε το μήκος κύματός του πρέπει να συνδυαστεί με τη σχέση του de Broglie:

$$\lambda = h/mu \quad (2)$$

όπου  $h$  είναι η σταθερά του Planck. Μπορούμε επίσης να εξισώσουμε την ενέργεια  $eV$  που δίνεται στο ηλεκτρόνιο, με την ενέργεια που προέρχεται από τη σχετική αλλαγή της μάζας:

$$E = eV = (m - m_e)c^2 \quad (3)$$

Αν συνδυάσουμε τις εξισώσεις (1),(2) και (3) βρίσκουμε ότι το μήκος κύματος του ηλεκτρονίου εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού ή δυναμικό επιταχύνσεως, με τον εξής τρόπο:

$$\lambda^2 = h^2 / (2eVm_e + e^2V^2/c^2) \quad (4)$$

Από τη σχέση (4) όταν αντικαταστήσουμε τις τιμές  $h, e, m_e$ , και  $c$  έχουμε :

$$\lambda = \sqrt{\frac{1.5}{V - 10^{-6}V^2}} \text{ nm} \quad (5)$$

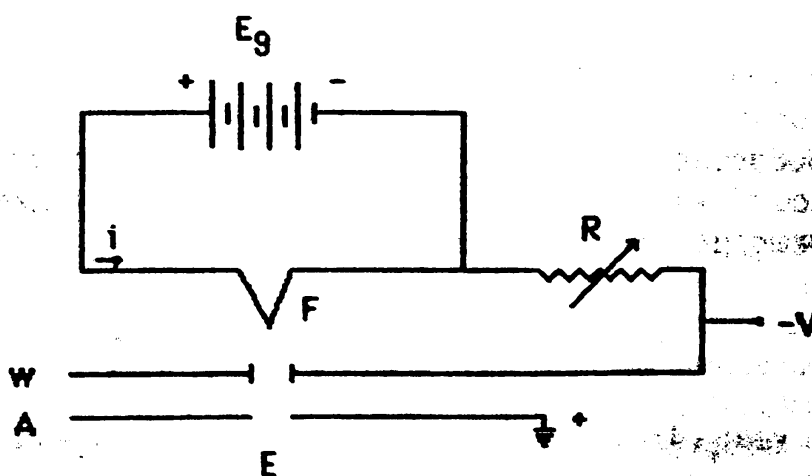
Από τα δυναμικά που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία ( $>20KV$ ) τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται και αποκτούν μια ταχύτητα που είναι σημαντική αν τη συγκρίνουμε με την ταχύτητα του φωτός και επομένως τα αποτελέσματα της σχετικότητας γίνονται αρκετά σημαντικά. Έτσι, για τον υπολογισμό του μήκους κύματος ( $\lambda$ ) πρέπει να χρησιμοποιείται η σχέση (5).



### 1.3. Παραγωγή δέσμης ηλεκτρονίων

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος εξαγωγής ηλεκτρονίων από το εσωτερικό των μετάλλων είναι η θερμιονική εκπομπή ηλεκτρονίων από ένα πυρακτωμένο νήμα βοήφραμιου.

Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια αφού επιταχυνθούν από μια διαφορά δυναμικού δεκάδων ή εκατοντάδων KV, παράχουν μια δέσμη ηλεκτρονίων γνωστής ενέργειας και επομένως γνωστής ταχύτητας και μήκους κύματος. Η διάταξη παραγωγής και επιταχύνσεως των ηλεκτρονίων δίνεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Διάταξη θερμιονικής εκπομπής ηλεκτρονίων.

Συνήθως σαν κάθοδος χρησιμοποιείται ένα νήμα βοήφραμιου (F). Το νήμα θερμαίνεται με τη διέλευση ρεύματος  $i$ , ενώ βρίσκεται σε υψηλό αρνητικό δυναμικό ως προς τη χειωμένη άνοδο (A) και ως προς το υπόλοιπο μέρος του μικροσκοπίου.

Τα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από το πυρακτωμένο νήμα επιταχύνονται γρήγορα προς την άνοδο και αναγκάζονται να περάσουν μέσα από την οπή ενός κυλίνδρου W (κύλινδρος Wehnelt) που βρίσκεται σε υψηλότερο αρνητικό δυναμικό ως προς το νήμα και μπορεί με τη βοήθεια της αντιστάσεως R να ρυθμίσει τη διάμετρο της ηλεκτρονιακής δέσμης. Αυτό οφείλεται στο ότι η διάμετρος της δέσμης εξαρτάται από το εμβαδό της επιφάνειας του νήματος που εκπέμπει τα ηλεκτρόνια το οποίο μπορεί να ρυθμιστεί από τη διαφορά δυναμικού μεταξύ νήματος και κυλίνδρου.





Το πιο σπουδαίο χαρακτηριστικό της διατάξεως αυτής είναι ότι λειτουργεί σαν φακός γιατί οι ακτίνες που διαχράζουν τα ηλεκτρόνια διασταυρώνονται σε μια περιοχή του χώρου E (ανάλογη του κύκλου ελάχιστης συχχύσεως των οπτικών μικροσκοπίων). Η διάμετρος της περιοχής E, είναι πολύ σπουδαία παράμετρος στον υπολογισμό της διακριτικής ικανότητας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Το σύστημα θερμιονικής εκπομπής ηλεκτρονίων είναι ικανοποιητικό για πολλούς σκοπούς αλλά η λαμπρότητα της ηλεκτρονιακής δέσμης είναι περιορισμένη. Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία ορίζουμε τη λαμπρότητα  $\Lambda$  ως την πυκνότητα ρεύματος ανά μονάδα στερεάς γωνίας:

$$\Lambda = I/4\pi S \quad (\text{μονάδα : } A \text{ mm}^{-2} \text{ sr}^{-1}) \quad (6)$$

Με άλλα λόγια η λαμπρότητα είναι το μέτρο του πόσα ηλεκτρόνια ανά δευτερόλεπτο μπορούν να προσπέσουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή του εξεταζόμενου δείγματος. Για τη συσκευή της θερμιονικής εκπομπής η λαμπρότητα μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση (7) των Richardson και Dushman:

$$\Lambda = \frac{I}{4\pi S} = \frac{A T^2 e^{-\frac{b}{kT}}}{4\pi} \quad (7)$$

όπου για νήμα βολφραμίου έχουμε:

σταθερά	$A = 1,2 \text{ A mm}^{-2} \text{sr}^{-1}$
θερμοκρασία	$T = 2800^\circ \text{ K}$
έργο εξόδου	$b = 4,52 \text{ eV} = 4,52 \times 1,602 \times 10^{-19} \text{ J} = 7,241 \times 10^{-19} \text{ J}$
σταθερά Boltzmann	$K = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J sr}^{-1}$

Επομένως από τη σχέση (7) η λαμπρότητα της ηλεκτρονιακής δέσμης είναι της τάξης του  $\Lambda \sim 5 \times 10^{-3} \text{ A mm}^{-2} \text{ sr}^{-1}$ .

Η λαμπρότητα αυτή είναι αρκετά ικανοποιητική για τα περισσότερα ηλεκτρονικά μικροσκόπια διελεύσεως αλλά χρειάζεται μεγαλύτερη λαμπρότητα για τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια σαρώσεως.



Επειδή μεγαλύτερη λαμπρότητα από εκείνη που δίνεται από την εξίσωση (7) δεν μπορούμε να έχουμε χρησιμοποιώντας τη συσκευή θερμιονικής εκπομπής ηλεκτρονίων, γι αυτό χρησιμοποιούμε μια άλλη μέθοδο εξαγωγής ηλεκτρονίων που είναι το *ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο*. Αυτή τη μέθοδο θα περιγράψουμε αμέσως παρακάτω.

Αν ένα μέταλλο βρεθεί μέσα σ' ένα πολύ ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο ( $>10^9 \text{ V/m}$ ) υπάρχει μια μεγάλη πιθανότητα ένα ηλεκτρόνιο να εγκαταλείψει το εσωτερικό του μετάλλου κι αν ακόμη η ενέργειά του είναι μικρότερη από το έργο εξόδου. Αυτό γίνεται γιατί μπορεί να συμβεί το γνωστό "φαινόμενο σήραχτος".

Έτσι με τον τρόπο αυτό μπορούν να εκπέμπονται από ένα κομμάτι βορφαρίου πολύ περισσότερα ηλεκτρόνια από ότι κατά τη θερμιονική εκπομπή και επομένως η λαμπρότητα της δέσμης μπορεί να αυξηθεί μέχρι και ένα εκατομμύριο φορές.

Δυστυχώς όμως ο μόνος τρόπος παραγωγής ενός τόσο ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου ( $>10^9 \text{ V/m}$ ), είναι το μέταλλο να έχει σχήμα πολύ οξείας ακίδας (διάμετρος ακίδας - 0,1  $\mu\text{m}$ ) που είναι εξαιρετικά εύθραυστη. Η άλλη μεγάλη δυσκοιλία είναι ότι το κενό του συστήματος πρέπει να είναι μικρότερο από  $10^{-9}$  Torr σε αντίθεση με το σύστημα θερμιονικής εκπομπής που το κενό είναι  $10^{-4}$  ή  $10^{-5}$  Torr. Αυτό σημαίνει ότι το σύστημα ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου είναι πολύ ακριβό και γι' αυτό για την ώρα δεν αξιοποιείται.

Όμως, ένα πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι ότι η εκπομπή ηλεκτρονίων δεν εξαρτάται από τη θερμοκρασία του μετάλλου και επομένως το μέταλλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 1.4. Ηλεκτρομαγνητικός φακός

Το 1926 ανακαλύφθηκε από τον Busch ότι μια δέσμη ηλεκτρονίων μπορεί να εστιαστεί από ένα ηλεκτροστατικό ή μαγνητικό πεδίο. Και οι δύο αυτοί τύποι πεδίου έχουν χρησιμοποιηθεί στους φακούς ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σήμερα ο ηλεκτρομαγνητικός φακός χρησιμοποιείται παγκοσμίως γι' αυτό κι είναι ο μόνος φακός που θα μελετήσουμε.



Για να καταλάβουμε τη λειτουργία του ηλεκτρομαγνητικού φακού θα πρέπει να μελετήσουμε τη δύναμη που επιδρά σ' ένα ηλεκτρόνιο που κινείται μέσα σ' ένα μαγνητικό πεδίο.

Αν ηλεκτρόνιο (φορτίου  $e$ ) κινείται με ταχύτητα  $u$  μέσα σ' ένα μαγνητικό πεδίο εντάσεως  $H$ , τότε στο ηλεκτρόνιο θα εξασκηθεί μια δύναμη  $F$  (Laplace) που το μέτρο της είναι:

$$F = euH\sin\phi \quad (8)$$

( $\phi$  είναι η γωνία που σχηματίζουν τα ανύσματα  $\vec{u}$  και  $\vec{H}$ ) και η διεύθυνσή της είναι κάθετη στο επίπεδο που σχηματίζουν οι διευθύνσεις της ταχύτητας και της εντάσεως του μαγνητικού πεδίου.

Η σχέση (8) σε ανυσματική μορφή γράφεται ως εξής:

$$\vec{F} = -e [\vec{u} \cdot \vec{H}] \quad (9)$$

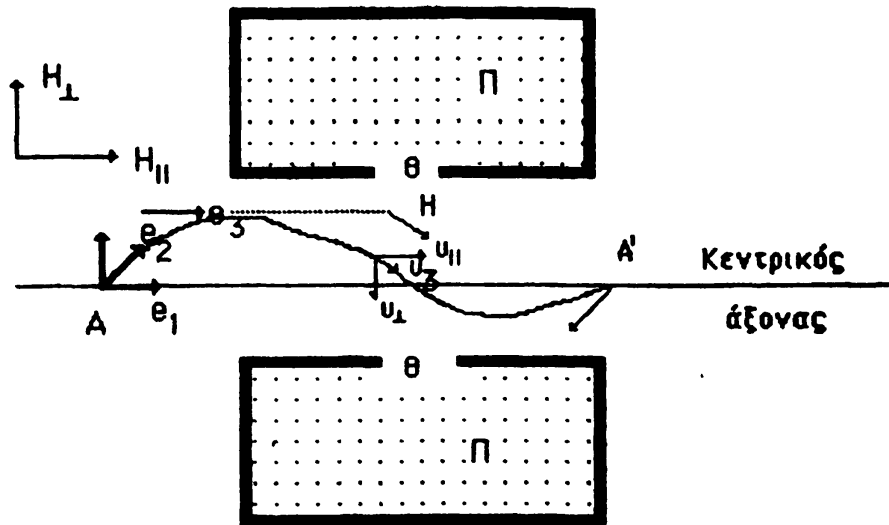
Ένας τυπικός ηλεκτρομαγνητικός φακός είναι έτσι κατασκευασμένος ώστε να αναπτύσσει ένα μαγνητικό πεδίο που η έντασή του να έχει παράλληλη διεύθυνση με τη διεύθυνση των ηλεκτρονίων (σχήμα 2).

Αν ένα ηλεκτρόνιο  $e_1$  κινείται κατά μήκος του κεντρικού άξονα τότε η ταχύτητά του είναι παράλληλη με την ένταση του πεδίου και επομένως (από τη σχέση 8)  $\sin\phi=0$  που συνεπάγεται  $F=0$ .

Ας μελετήσουμε τι θα συμβεί στην περίπτωση που ένα ηλεκτρόνιο όπως το  $e_3$  (σχήμα 2) κινείται έξω από τον κεντρικό άξονα αλλά παράλληλα προς αυτόν.

Στην περίπτωση αυτή όταν το ηλεκτρόνιο  $e_3$  φθάσει στο μαγνήτη βρίσκεται σε ένα πεδίο που η έντασή του  $H$  δεν είναι παράλληλη με την ταχύτητα του ηλεκτρονίου.





Σχήμα 2: Ηλεκτρομαγνητικός φακός

Μπορούμε να αναλύσουμε την ένταση  $H$  σε δύο συνιστώσες. Στην  $H_{//}$  που είναι παράλληλη με την ταχύτητα του ηλεκτρονίου και την  $H_{\perp}$  που είναι κάθετη προς την ταχύτητα του ηλεκτρονίου.

Η  $H_{//}$  δεν επηρεάζει το ηλεκτρόνιο (όπως έχει πιο πάνω αναφερθεί  $F=0$ ).

Η  $H_{\perp}$  έχει σαν αποτέλεσμα την εξάσκηση μιας δύναμης  $F_{\perp} = e v H_{\perp}$  πάνω στο ηλεκτρόνιο. Αυτή η δύναμη αναγκάζει το ηλεκτρόνιο να διαγράφει ελικοειδή τροχιά κατά μήκος του φακού (αν το μαγνητικό πεδίο είναι ομοιογενές το ηλεκτρόνιο διαγράφει κύκλο ακτίνας  $\rho = mv/eH$ ).

Μόλις το ηλεκτρόνιο αρχίζει τη σπειροειδή του κίνηση η ταχύτητά του  $v_3$  παύει να είναι παράλληλη με τον κεντρικό άξονα. Έτσι έχουμε δύο συνιστώσες ταχύτητας τις  $v_{//}$  και  $v_{\perp}$ .

Συνεπώς τώρα στο ηλεκτρόνιο εξασκούνται δύο δυνάμεις  $F_1 = e v_{\perp} H_{\perp}$  και  $F_2 = e v_{//} H_{//}$  με διεύθυνση πάντα προς τον κεντρικό άξονα. Το ηλεκτρόνιο εξ' αιτίας της δύναμης  $F_2$  διαγράφει όλο και μικρότερη ακτίνα κατά την ελικοειδή του τροχιά μέσα στο μαγνητικό πεδίο.



Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μια παράλληλη δέσμη ηλεκτρονίων που εισέρχεται στο φακό να εστιάζεται σ' ένα σημείο.

Μια άλλη περίπτωση είναι το ηλεκτρόνιο να κινείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ταχύτητά του να σχηματίζει μια μικρή γωνία με τον κεντρικό άξονα (όπως π.χ. το ηλεκτρόνιο  $e_2$  του σχήματος 2).

Και στην περίπτωση αυτή, αναλύουμε την ταχύτητα  $u$  σε δύο συνιστώσες τις  $u_{//}$  και  $u_{\perp}$  και η υπόλοιπη ανάλυση είναι η ίδια όπως στην περίπτωση του ηλεκτρονίου  $e_3$ .

Αποδεικνύεται ότι όλα τα ηλεκτρόνια που περνούν από ένα σημείο  $A$  και έχουν το αυτό μέτρο ταχύτητας αλλά σχηματίζουν διαφορετικές μικρές γωνίες με τον κεντρικό άξονα αναγκάζονται από το φακό, αφού διαγράψουν ελλικοειδείς κινήσεις να εστιασούν σ' ένα σημείο  $A'$ .

Ένας ηλεκτρομαγνητικός φακός μπορεί να κατασκευαστεί όπως φαίνεται στο σχήμα 2, από πηνίο (Π) με μεγάλο αριθμό σπειρών περιτυλιχμένων γύρω από ένα κυλινδρικό πυρήνα μαλακού σιδήρου.

Ο πυρήνας φέρει οπή κατά μήκος του κεντρικού του άξονα μέσα από την οποία περνάει η δέσμη των ηλεκτρονίων καθώς και πολύ μικρό άνοιγμα ( $\theta$ ) γύρω από το οποίο αναπτύσσεται το μαγνητικό πεδίο. Επειδή το μαγνητικό πεδίο εκτείνεται πάρα πολύ λίγο κατά μήκος του κεντρικού άξονα, ο ηλεκτρομαγνητικός φακός συμπεριφέρεται σαν λεπτός φακός και η κλασσική γεωμετρική οπτική μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και στην ηλεκτρονική οπτική.

Μεταβάλλοντας το ρεύμα που περνάει μέσα από το πηνίο, μπορούμε να ρυθμίσουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου και επομένως και την εστιακή απόσταση του ηλεκτρομαγνητικού φακού.

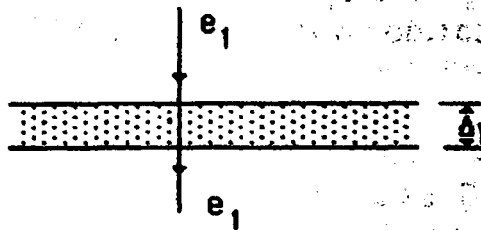


### 1.5. Αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίων με το υλικό του εξεταζόμενου δείγματος

Είναι σημαντικό να καταλάβουμε τις δυνατές αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρονίων με τα άτομα του υλικού του εξεταζόμενου δείγματος. Υπάρχουν μόνο τέσσερις πιθανές περιπτώσεις αλληλεπιδράσεως που δίνονται παραστατικά στα σχήματα 3(α-δ).

Η πρώτη περίπτωση που έχει και τις λιχότερες πιθανότητες να συμβεί είναι το προσπίπτον ηλεκτρόνιο να περάσει μέσα από το υλικό χωρίς να αλληλεπιδράσει με αυτό κατά κανένα τρόπο (σχήμα 3(α)).

Η πιθανότητα να συμβεί αυτό αυξάνει με την ελάττωση του πάχους του δείγματος ( $\Delta l \ll 1 \mu\text{m}$  για τα περισσότερα υλικά).

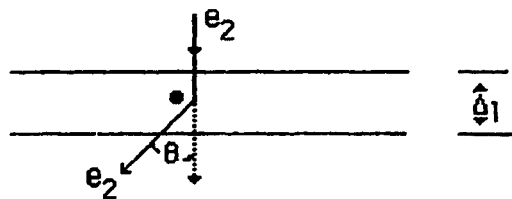


Σχήμα 3(α): Καμιά αλληλεπίδραση ηλεκτρονίου με το υλικό του εξεταζόμενου δείγματος.

Η δεύτερη πιθανότητα είναι το ηλεκτρόνιο να περάσει πολύ κοντά από τον πυρήνα ενός ατόμου που όπως ξέρουμε φέρει θετικό φορτίο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το ηλεκτρόνιο να εκτραπεί από την τροχιά του λόγω ηλεκτροστατικής έλξης.

Ανάλογα από πόσο κοντά το ηλεκτρόνιο περνάει από τον πυρήνα και ανάλογα από την ταχύτητά του, μπορεί να εκτραπεί από την τροχιά του μόνο ελαφρά (σχήμα 3(β)) ή μπορεί να εκτραπεί σχεδόν  $180^\circ$  και να χυρίσει πάλι πίσω κατά την ίδια διεύθυνση που ήρθε (οπισθοσκέδαση του ηλεκτρονίου). Η γωνία  $\theta$  στις περισσότερες περιπτώσεις βρίσκεται μεταξύ αυτών των δύο άκρων.





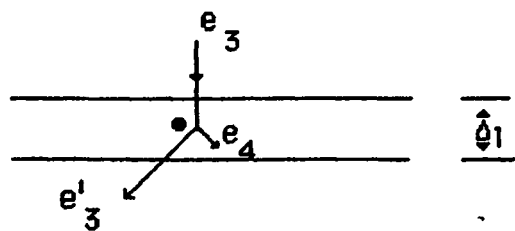
Σχήμα 3(β): Ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίου.

Το σημαντικό σημείο αυτού του τύπου της σκεδάσεως είναι ότι το ηλεκτρόνιο στην ουσία δεν χάνει ενέργεια. Αλλάζει τη διεύθυνσή του αλλά όχι την ενέργειά του και επομένως *δεν επιβραδύνεται*. Αυτός ο τύπος σκεδάσεως ονομάζεται *ελαστική σκέδαση*.

Συγκεκριμένα, η οπισθοσκέδαση είναι φαινόμενο που μπορεί να παρουσιαστεί μέσα στο δείγμα σε βάθος μέχρι μερικά  $\mu m$ . Η ανίχνευση των ηλεκτρονίων οπισθοσκεδαζόμενων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανάλογης τεχνικής απεικονίσεως στην ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Η τεχνική αυτή που μας δίνει πληροφορίες για τη μορφολογία και τη σύνθεση μιας μικρής περιοχής του δείγματος, στηρίζεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των οπισθοσκεδαζομένων ηλεκτρονίων εξαρτάται από το μέσο ατομικό αριθμό  $Z$  του δείγματος.

Η τρίτη πιθανότητα είναι το ηλεκτρόνιο να αλληλεπιδράσει με ένα από τα τροχιακά ηλεκτρόνια του ατόμου. Σ' αυτή την περίπτωση τα δύο ίδια φορτισμένα σωματάρια απωθούν το ένα το άλλο και μέρος της ενέργειας του ηλεκτρονίου που προσπίπτει μεταδίδεται σε ηλεκτρόνιο του ατόμου (πλανητικό ηλεκτρόνιο  $e_4$ , σχήμα 3(γ)). Το πλανητικό ηλεκτρόνιο μπορεί να απορροφήσει αρκετή ενέργεια ώστε να εκκαταλείψει το άτομο όπου



Σχήμα 3(γ): Μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίου.



ανήκει, αφήνοντας μια κενή θέση στον φλοιό του ατόμου. Το ηλεκτρόνιο που προσπίπτει έχει χάσει ενέργεια και έχει επομένως επιβραδυνθεί. Επίσης έχει αλλάξει τη διεύθυνσή του. Αυτός ο τύπος σκεδάσεως ονομάζεται *μη ελαστική σκέδαση*.

Το αρχικό λοιπόν ηλεκτρόνιο μετά από ένα αριθμό μη ελαστικών σκεδάσεων θα μπορούσε να χάσει όλη του την ενέργεια και να απορροφηθεί από το υλικό του δείγματος (ελεύθερο ηλεκτρόνιο του υλικού).

Η απορρόφηση των ηλεκτρονίων εξαρτάται από την αρχική τους ενέργεια καθώς και από το είδος και το πάχος του υλικού του δείγματος. Γι' αυτό το λόγο σε δείγματα πάχους μεγαλύτερου του 1μm πολύ λίγα ηλεκτρόνια μεταδίδονται τελείως μέσα από το δείγμα.

Η απορρόφηση ακολουθεί τους ίδιους νόμους που ακολουθεί η απορρόφηση φωτός ή ακτίνων  $X$  σ' ένα στερεό αλλά η σημαντική διαφορά οφείλεται στο γραμμικό συντελεστή απορροφήσεως  $\mu$ . Η απορρόφηση δίνεται από την έκφραση:

$$I = I_0 e^{-\mu(\Delta l)} \quad (10)$$

όπου  $I$  είναι η ένταση των ηλεκτρονίων που περνούν το δείγμα πάχους  $\Delta l$  και  $I_0$  η ένταση των προσπιπόντων ηλεκτρονίων.

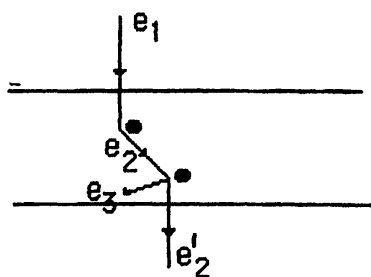
Τέλος, η πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι ο συνδυασμός των δύο προηγουμένων (σχήμα 3(δ)). Δηλαδή ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να υποστεί ελαστική και μη ελαστική σκέδαση, πιθανώς πολλές φορές, μέχρι να απορροφηθεί ή μέχρι να φθάσει στην άλλη πλευρά του δείγματος, αφού διαγράψει μια διαδρομή ζιγκ-ζαγκ μέσα στο δείγμα (σχήμα 3(ε)).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι όταν μια δέσμη ηλεκτρονίων-περάσει μέσα από ένα πολύ λεπτό δείγμα, εξασθενεί αισθητά λόγω σκεδάσεως (και απορροφήσεως) αριθμού ηλεκτρονίων από τα άτομα του υλικού του δείγματος.

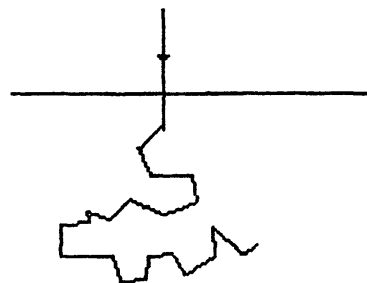
Επειδή η εξασθένιση αυτή εξαρτάται από το υλικό των διαφόρων στοιχείων του δείγματος, η δέσμη που εξέρχεται από το δείγμα μας δίνει πληροφορίες για τα διάφορα στοιχεία του δείγματος (π.χ. για τη μεμβράνη ή τον πυρήνα ενός κυττάρου).







3δ



3ε

Σχήμα 3(δ,ε): (δ) Ελαστική και μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίου.  
(ε). Ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να σκεδαστεί πολλές φορές αφού εισέλθει σ' ένα δείγμα.

Η περίπτωση αυτή είναι ανάλογη με την περίπτωση φωτεινής δέσμης που περνά μέσα από ένα διαφανές βιολογικό δείγμα. Με βάση την αρχή αυτή έχει αναπτυχθεί το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διελεύσεως (ή TEM: TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE) που όπως θα δούμε παρουσιάζει πολλές αναλογίες με το κοινό οπτικό μικροσκόπιο.

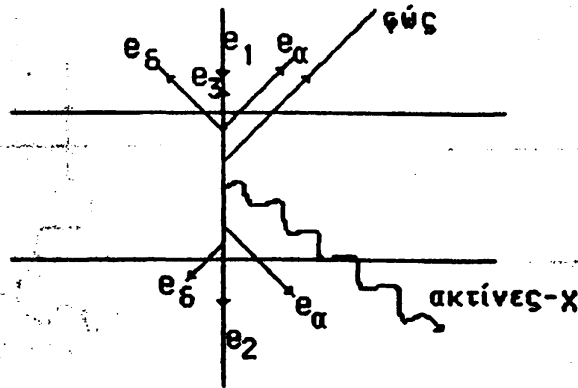
### 1.6. Δευτερογενή φαινόμενα

Επειδή ορισμένες τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και αναλύσεως στηρίζονται σε δευτερογενή φαινόμενα που παράγονται σ' ένα δείγμα μετά την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων-ατόμων, είναι απαραίτητο να αναφερθούμε στα σπουδαιότερα από τα φαινόμενα αυτά. Μερικά από τα δευτερογενή φαινόμενα συνοψίζονται στο σχήμα 4.

Όπως είπαμε στα προηγούμενα, ένα ηλεκτρόνιο  $e_3$  της αρχικής δέσμης (σχήμα 3(γ)) μπορεί με μη ελαστική σκέδαση να προσφέρει ενέργεια σ' ένα εσωτερικό ηλεκτρόνιο ώστε να το αποδεσμεύσει από το άτομο που ανήκει.

Αν αυτό συμβεί κοντά στην επιφάνεια του δείγματος (σε βάθος  $< 20\text{nm}$ ), το ελεύθερο ηλεκτρόνιο μπορεί να έχει προσλάβει αρκετή κινητική ενέργεια ( $Ee_4 > \text{έργο εξόδου}$ ) ώστε να περάσει έξω από την επιφάνεια του δείγματος





Σχήμα 4: Μια σύνοψη δευτερογενών φαινομένων.

και να εμφανιστεί σαν δευτερογενές ηλεκτρόνιο ( $e_5$ ).

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλή ενέργεια της τάξης των eV σε αντίθεση με τα προσπίπτοντα αρχικά ηλεκτρόνια  $e_1$  (σχήμα 4) που έχουν ενέργεια της τάξης των KeV. Ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων που παράγονται επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Μερικοί απ' αυτούς είναι:

(α) ο αριθμός των πρωτογενών ηλεκτρονίων που προσπίπτουν στο δείγμα (λαμπρότητα αρχικής δέσμης)

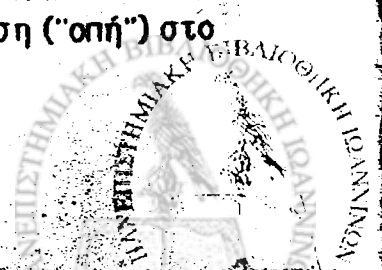
(β) η ενέργεια των πρωτογενών ηλεκτρονίων,  $Ee_1$ . Ο μεγαλύτερος αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων παρουσιάζεται μάλλον σε δυναμικό επιταχύνσεως περίπου 1KV

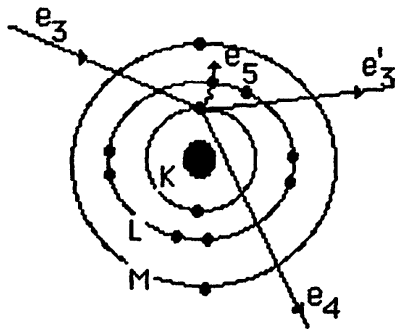
(γ) η διεύθυνση της αρχικής δέσμης των ηλεκτρονίων ως προς το δείγμα

(δ) ο μέσος ατομικός αριθμός  $Z$ , των ατόμων του δείγματος.

Συγκεκριμένα ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι ανάλογος του  $Z^{1/3}$ . Όπως θα δούμε λόγω της τελευταίας περιπτώσεως, η ανίχνευση των δευτερογενών ηλεκτρονίων επέτρεψε την ανάπτυξη του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σαρώσεως (ή SEM: SCANNING ELECTRON MICROSCOPE).

Κάθε φορά που ένα ηλεκτρόνιο  $e_3$  της αρχικής δέσμης σκεδάζεται μη ελαστικά με ένα εσωτερικό ηλεκτρόνιο  $e_4$  π.χ. του φλοιού K (σχήμα 5(α)) μπορεί να το εκδιώξει και να δημιουργήσει έτσι μια κενή θέση ("οπή") στο





Σχήμα 5(α) : Ηλεκτρόνια Auger

φλοιό αυτό του ατόμου.

Η "οπή" στον εσωτερικό φλοιό είναι δυνατόν να συμπληρωθεί από ένα ηλεκτρόνιο  $e_5$  των επόμενων εξωτερικών φλοιών π.χ. των L ή M, με ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου  $\chi$  χαρακτηριστικής ενέργειας, π.χ.  $h\nu = E_L - E_K = \Delta E$ .

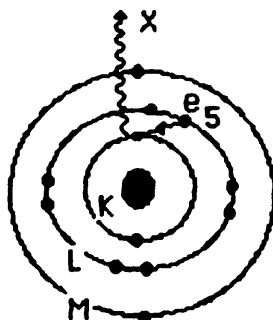
Υπάρχει πιθανότητα το φωτόνιο αυτό να εκπέμπει ακτινοβολία  $\chi$ , μήκους κύματος  $\lambda$  που εξαρτάται από τη διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  (σχήμα 5(β)).

Το ενεργειακό φάσμα της ακτινοβολίας αυτής είναι σύνθετο, δηλαδή αποτελείται από ένα συνεχές φάσμα (λόγω ακτινοβολίας πέδησης ή Bremsstrahlung κ.ά.) που πάνω σ' αυτό επικάθεται ένα γραμμικό φάσμα.

Το γραμμικό φάσμα, επειδή είναι χαρακτηριστικό του υλικού του δείγματος, έχει πολύ ενδιαφέρον για την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Στην ανάλυση του φάσματος αυτού στηρίζεται ολόκληρη τεχνική μικροαναλύσεως που επιτρέπει ακόμα και τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών στοιχείων που περιέχονται σε μικρή περιοχή του δείγματος.

Υπάρχουν συστήματα που συνδυάζουν απεικόνιση (σύστημα SEM) με ταυτόχρονη μικροανάλυση της επιλεχμένης περιοχής του δείγματος. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται με επιτυχία για στοιχεία μεγάλου σχετικά ατομικού αριθμού,  $Z > 10$ .





Σχήμα 5(β): Εκπομπή ακτινοβολίας -X.

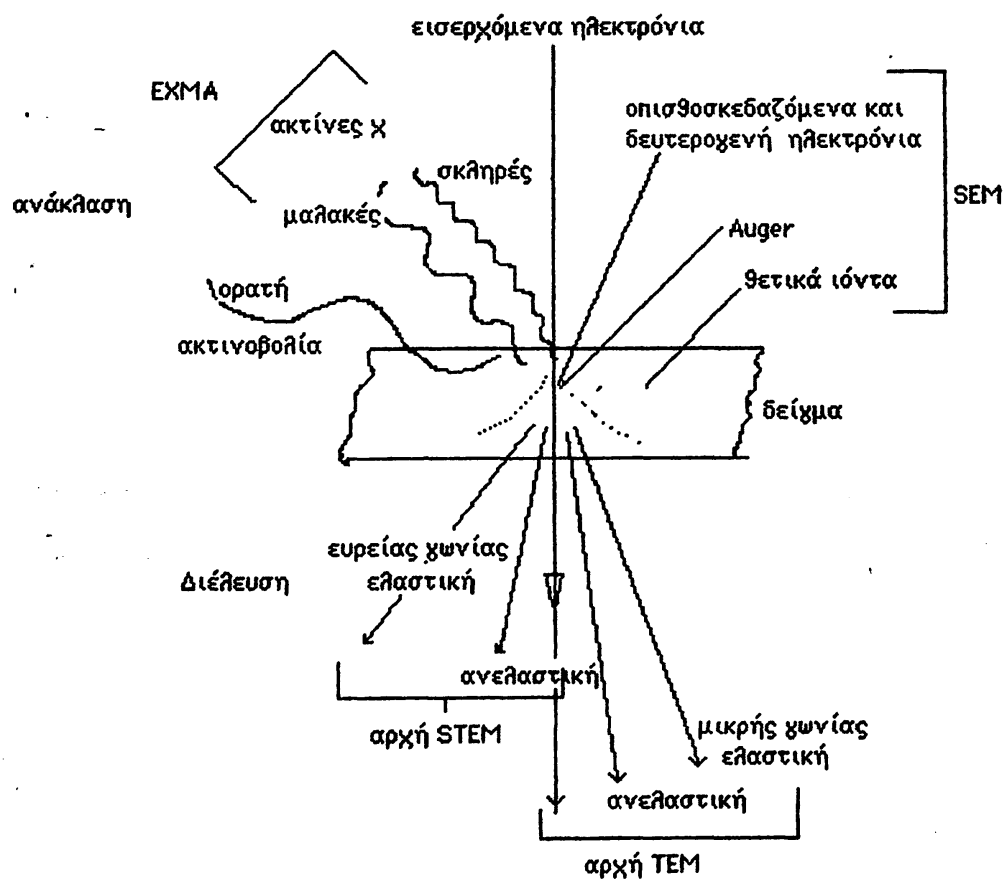
Είναι επίσης δυνατόν το άτομο να εκπέμψει φωτόνια στην ορατή περιοχή του φάσματος (cathodoluminescence). Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται τεχνική ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (ανάλογη του SEM) που η απεικόνιση μιας περιοχής του δείγματος είναι δυνατή με την ανίχνευση του παραχόμενου φωτός ( αντί των δευτερογενών ηλεκτρονίων στο SEM).

Συνήθως η τεχνική αυτή συνδυάζεται στο SEM με τη βοήθεια συστήματος κατόπτρων και φωταγωγών για τη συλλογή και μεταφορά του φωτός σε ειδικό ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή). Ο συνδυασμός αυτός επιτρέπει την ταυτόχρονη σύγκριση των δύο ειδώλων.

Τέλος, είναι δυνατόν το εκπεμπόμενο φωτόνιο να μη μπορέσει να εγκαταλείψει το άτομο, αλλά να απορροφηθεί προσφέροντας όλη του την ενέργεια σε ένα από τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών φλοιών (εσωτερική μετατροπή). Το ηλεκτρόνιο αυτό αφού απορροφήσει ενέργεια π.χ.  $h\nu = E_L - E_K$ , μπορεί να αποδεσμευτεί από το άτομο και να εμφανιστεί σαν ηλεκτρόνιο Auger ( $e_a$ ), χαρακτηριστικής ενέργειας.

Το γεγονός αυτό, το εκμεταλλευόμαστε σε ειδική τεχνική αναλύσεως χημικών στοιχείων (Auger Electron Spectrometry, AES). Η τεχνική αυτή αναλύσεως που βασίζεται σε ηλεκτρόνια Auger, μπορεί να ενσωματωθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως. Με το σύστημα αυτό η μορφολογική απεικόνιση μιας περιοχής του δείγματος μπορεί να συμπληρωθεί και από την εικόνα της κατανομής ενός χημικού στοιχείου στην ίδια περιοχή του δείγματος.



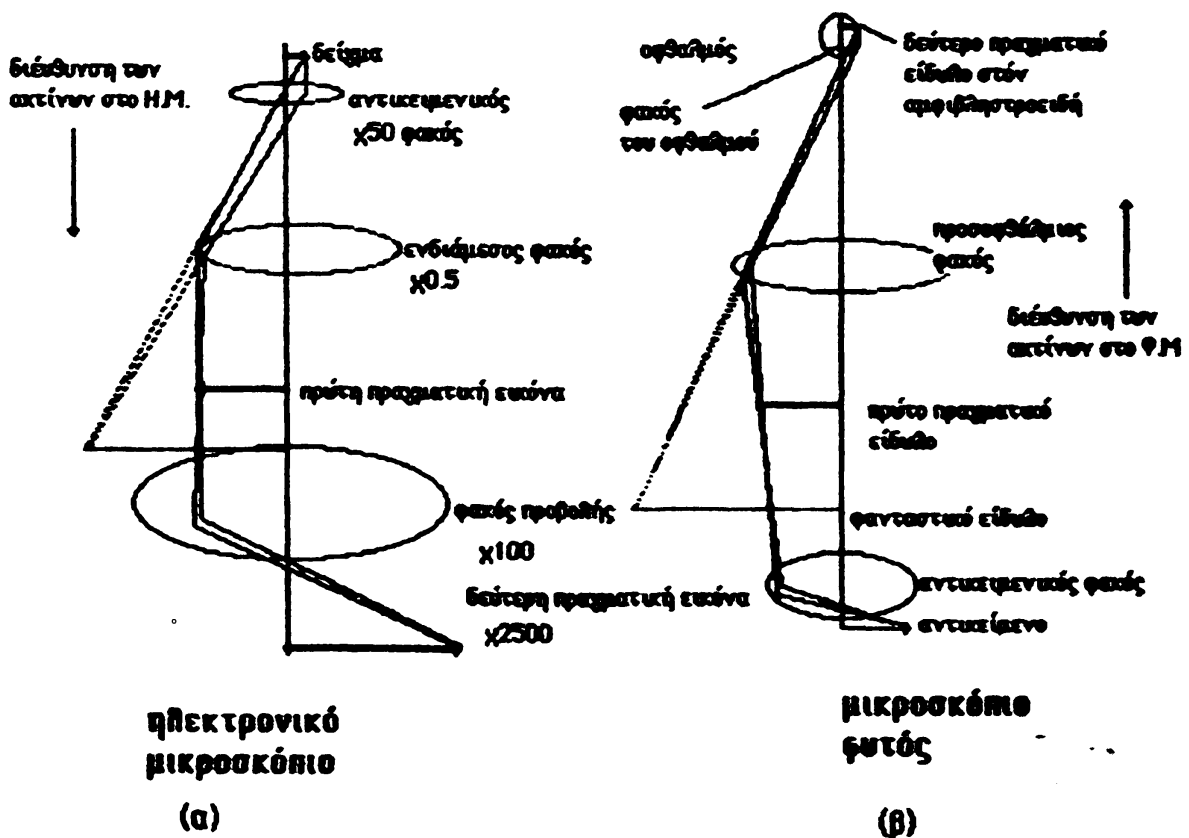


Σχήμα 5(γ): Διάγραμμα βασικών αλληλεπιδράσεων ηλεκτρονίων με το εξεταζόμενο δείγμα.

## 2. ΒΑΣΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ

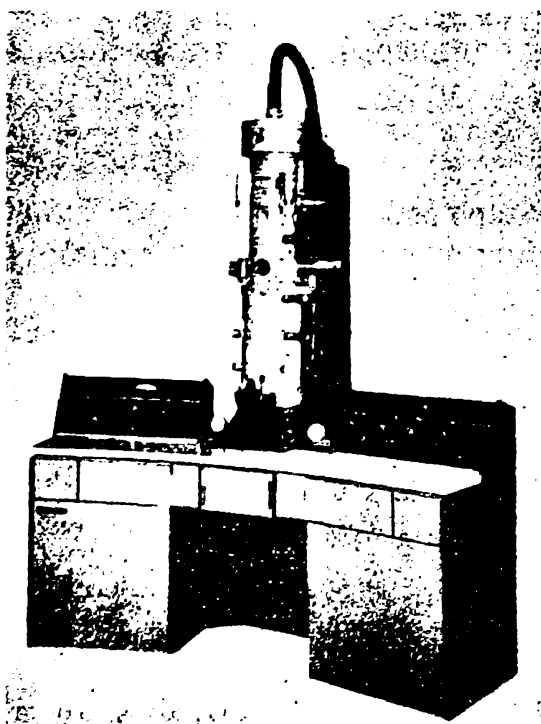
### 2.1.1. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (TEM)

Το μικροσκόπιο αυτό, παρουσιάζει πολλές αναλογίες με το κοινό οπτικό μικροσκόπιο, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6, ενώ το σχήμα 7 δείχνει την εξωτερική όψη ενός τύπου μικροσκοπίου διελεύσεως. Στα TEM τα ηλεκτρόνια παράγονται με θερμιονική εκπομπή και επιταχύνονται από δυναμικό που κυμαίνεται μεταξύ 20KV και 100 ή 125 KV.



Σχήμα 6: (α) Εσωτερική διαρρύθμιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διελεύσεως, (β) εσωτερική διαρρύθμιση κοινού οπτικού μικροσκοπίου.





Σχήμα 7: Εξωτερική όψη ενός τύπου ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διελεύσεως

Η ακριβής τιμή του δυναμικού εξαρτάται από τη φύση του δείγματος. Ιδιαίτερα αν το πάχος του δείγματος είναι πολύ μεγάλο, είναι πλέονέκτημα να χρησιμοποιηθεί πολύ υψηλό δυναμικό.

Παρ' όλο ότι υπάρχουν μικροσκόπια υψηλής τάσης ( $>1\text{MV}$ ), η διάδοσή τους είναι περιορισμένη επειδή έχουν πολύ μεγάλες διαστάσεις και το κόστος τους είναι μεγάλο.

Κάτω από την πηγή παραγωγής ηλεκτρονίων υπάρχει το σύστημα φακών συλλέκτη. Ο σκοπός του φακού συλλέκτη είναι να φωτίσει το δείγμα.

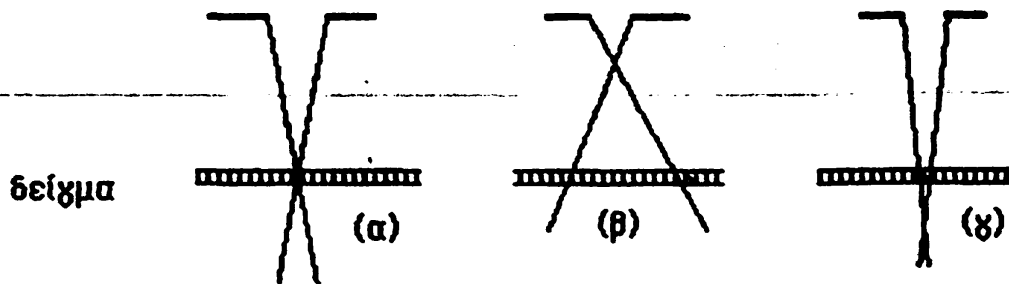
Ο φακός αυτός μπορεί να εστιάσει τη δέσμη των ηλεκτρονίων κατευθείαν πάνω στο δείγμα. Δηλαδή οι ακτίνες της δέσμης διασταυρώνονται πάνω στο επίπεδο του δείγματος, με αποτέλεσμα να φωτίζουν μια πολύ μικρή περιοχή, με μεγάλη ένταση (σχήμα Β(α)).

Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "εστιασμός" (focusing). Η δέσμη μπορεί να εστιαστεί πάνω (σχήμα Β(β)) ή κάτω (σχήμα Β(γ)) από το επίπεδο του δείγματος. Και στις δύο περιπτώσεις η δέσμη απλώνεται πάνω στο δείγμα κι έτσι φωτίζεται μια μεγαλύτερη περιοχή με ελαττωμένη ένταση.



Επειδή χρειάζεται περισσότερο ρεύμα για την εστίαση της δέσμης πάνω από το δείγμα, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "υπερεστιασμός" (overfocusing).

Επειδή χρειάζεται λιγότερο ρεύμα για την εστίαση της δέσμης κάτω από το δείγμα, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "υποεστιασμός" (underfocusing).



Σχήμα 8: Εστιασμός δέσμης ηλεκτρονίων (α) πάνω στο δείγμα, (β) πάνω από το επίπεδο του δείγματος, (γ) κάτω από το επίπεδο του δείγματος

Κάτω από το σύστημα φακών συλλέκτη βρίσκεται ο θάλαμος που μέσα σ' αυτόν τοποθετείται το δείγμα. Στο θάλαμο αυτό υπάρχουν λεπτοί μηχανισμοί που μπορούν:

- 1) να κρατούν το πάρα πολύ μικρό δείγμα σε μια καθορισμένη θέση ως προς τον αντικειμενικό φακό
- 2) να μετακινούν το δείγμα (μικρομετρικά -  $1\mu\text{m}$ ) ως προς τον κεντρικό άξονα του μικροσκοπίου για να είναι δυνατή η εξέταση διαφόρων περιοχών του
- 3) να μεταβάλλουν τη γωνία που σχηματίζει το δείγμα με τη δέσμη των ηλεκτρονίων και
- 4) να επιτρέπουν την αλλαγή ενός δείγματος με ένα άλλο σε μικρό σχετικά χρονικό διάστημα, παρά τη χαμηλή πίεση που υπάρχει στο θάλαμο ( $\sim 10^{-4}$  Torr).

Αν τέλος λάβουμε υπόψη ότι και ο παραμικρός κραδασμός του δείγματος θα μπορούσε να δημιουργήσει προβλήματα στην απεικόνιση του μεγεθυνμένου ειδώλου, είναι φανερό ότι η κατασκευή των μηχανισμών αυτών απαιτεί υψηλή τεχνολογία.





Ο αντικειμενικός φακός είναι ένας πολύ ισχυρός φακός. Αυτός ο φακός αναγκάζει την ηλεκτρονιακή δέσμη που έχει περάσει μέσα από το δείγμα να εστιαστεί ακόμη μια φορά σ' ένα σημείο κάτω από το δείγμα.

Σε μικρή απόσταση κάτω από αυτό το σημείο εστίασεως, σχηματίζεται ένα μεγεθυσμένο ( $\sim \times 100$ ) ενδιάμεσο είδωλο. Η ποιότητα του ειδώλου που παράχεται από τον αντικειμενικό φακό είναι εκείνη που προσδιορίζει την ποιότητα του τελικού ειδώλου.

Επομένως, ο αντικειμενικός φακός είναι εκείνος που προσδιορίζει τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου και επομένως είναι εδώ όπου τα διάφορα σφάλματα είναι πολύ σημαντικά.

Το μέγεθος του ειδώλου που σχηματίζεται από τον αντικειμενικό φακό (δηλαδή η μεγέθυνση που παράχεται από το φακό αυτό) παραμένει σταθερή.

Η αύξηση ή η ελάττωση του ρεύματος που περνάει από τον αντικειμενικό φακό έχει μόνο σαν αποτέλεσμα να σχηματισθεί το είδωλο καλύτερα εστιασμένο. Το είδωλο τελικά μεγεθύνεται από το φακό προβολής.

Η μεγέθυνση που παράχεται από το φακό προβολής εξαρτάται από το ρεύμα που περνάει από το πηνίο του φακού.

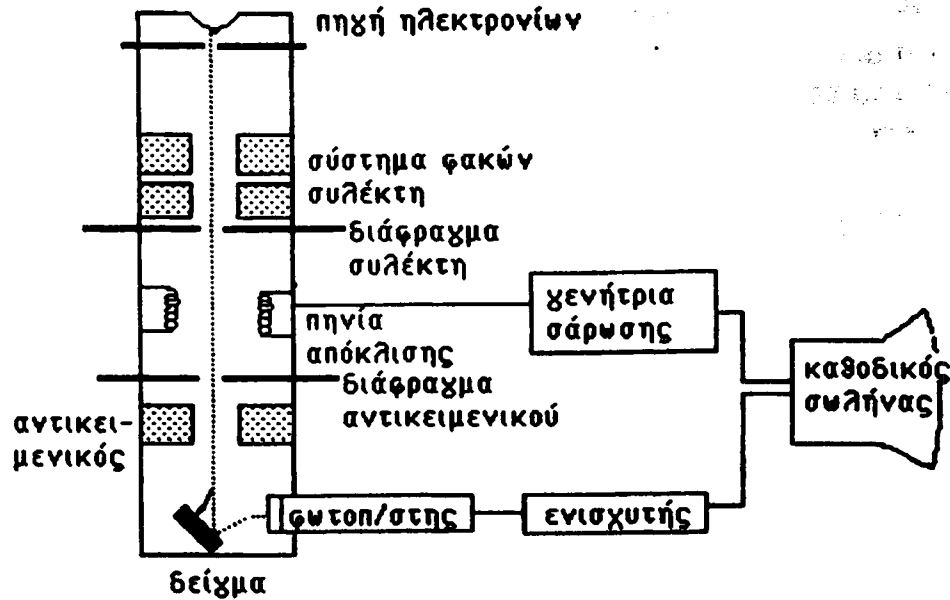
Αυξάνοντας το ρεύμα η ηλεκτρονιακή δέσμη εστιάζει ψηλότερα ως προς τον κεντρικό άξονα. Αυτό σημαίνει ότι η δέσμη απλώνεται σε μεγαλύτερη έκταση τη στιχμή που φθάνει στην οθόνη. Όσο περισσότερο απλώνεται η δέσμη, τόσο μεγαλύτερη είναι και η μεγέθυνση του ειδώλου.

Το τελικό είδωλο σχηματίζεται πάνω σε φθορίζον διάφραγμα, έτσι ώστε να μπορούμε να το δούμε (συνήθως χρησιμοποιώντας διοφθάλμια συστήματα φακών) μέσα από ένα χυάλινο παράθυρο. Επίσης, μπορούμε να το απεικονίσουμε σε φωτογραφικό φιλμ (που βρίσκεται μέσα σε κάμερα).



### 2.1.2. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (SEM)

Απλό σχηματικό διάγραμμα του μικροσκοπίου αυτού φαίνεται στο σχήμα 9.



Σχήμα 9: Διάγραμμα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως.

Στο μικροσκόπιο αυτό, τα ηλεκτρόνια που παράγονται συνήθως (όπως και στα TEM) με θερμιονική εκπομπή, επιταχύνονται από δυναμικό 20 KV ως 50 KV.

Η σχηματιζόμενη ηλεκτρονιακή δέσμη, περνώντας μέσα από δύο ή τρεις ηλεκτρομαγνητικούς φακούς του συλλέκτη, λεπταίνει συνεχώς ώστε στην περιοχή του δείγματος η διάμετρός της να είναι περίπου 5 - 10 nm.

Με τη βοήθεια των πηνίων απόκλισης, η δέσμη σαρώνει όλη την εξεταζόμενη επιφάνεια του δείγματος παράγοντας συνεχώς δευτερογενή ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας.

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που παράγονται σε κάθε σημείο του δείγματος μπορούν να καταμετρηθούν από ειδικό ανιχνευτή ηλεκτρονίων.

Το σήμα από το σύστημα ανιχνεύσεως, ελέγχει το δυναμικό στο



ηλεκτρόδιο διαμορφώσεως ενός καθοδικού σωλήνα, δηλαδή ελέγχει τη λαμπρότητα της φωτεινής κηλίδας στην οθόνη του καθοδικού σωλήνα.

Επιπλέον, με τη βοήθεια της γεννήτριας σαρώσεως, η δέσμη των ηλεκτρονίων του καθοδικού σωλήνα σαρώνει την οθόνη απεικόνισης σε συγχρονισμό με τη σάρωση που κάνει η δέσμη ηλεκτρονίων του μικροσκοπίου στην εξεταζόμενη περιοχή του δείγματος.

Με τον τρόπο αυτό στην οθόνη του καθοδικού σωλήνα παίρνουμε το είδωλο της περιοχής του δείγματος που σαρώνει η δέσμη. Αυτό οφείλεται στο ότι ο αριθμός των δευτερογενών ηλεκτρονίων που ανιχνεύονται, εξαρτάται άμεσα από την "τοπογραφία" της επιφάνειας και τη χημική σύσταση των εξεταζόμενων στοιχείων του δείγματος.

Αν και με τον τρόπο αυτό δημιουργίας του ειδώλου μπορούμε να έχουμε μεγάλες μεγεθύνσεις ο περιορισμός σε αυτό το είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι η διακριτική ικανότητα.

Εδώ, το διακριτικό όριο εξαρτάται από τη διάμετρο της δέσμης των ηλεκτρονίων.

Λόγω σφαλμάτων, δεν είναι σκόπιμο να μικρύνουμε τη διάμετρο της δέσμης πάρα πολύ. Στα σύγχρονα SEM, χρησιμοποιώντας διάμετρο δέσμης περίπου 5 nm, το διακριτικό όριο είναι μικρότερο από 10 nm.

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως γίνεται βασικά διερεύνηση μόνο της επιφανειακής μορφολογίας του δείγματος, γιατί όπως είπαμε, τα δευτερογενή ηλεκτρόνια για να εξέλθουν από το δείγμα χωρίς να απορροφηθούν πρέπει να παραχθούν κοντά στην επιφάνεια του δείγματος.

Επομένως, το είδωλο που παίρνουμε στην περίπτωση αυτή είναι μια τρισδιάστατη εικόνα της εξωτερικής επιφάνειας του εξεταζόμενου στοιχείου που δεν μας δίνει πληροφορίες για το εσωτερικό περιεχόμενο του στοιχείου αυτού.

Επειδή με το SEM γίνεται μελέτη της επιφανειακής μόνο μορφολογίας, το δείγμα δε χρειάζεται να είναι πολύ λεπτό γεγονός που απλουστεύει πολύ τη διαδικασία της προετοιμασίας του.



Επιπλέον, ο σχετικά μικρός αριθμός ηλεκτρομαχνητικών φακών στα SEM, απλοστεύει πολύ τη ρύθμιση και τη λειτουργία τους.

### 2.1.3. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως-διελεύσεως (STEM)

Η ανάπτυξη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σαρώσεως-διελεύσεως (STEM) κατόρθωσε να συνδυάσει τα πλεονεκτήματα του TEM και του SEM στο αυτό σύστημα.

Το STEM είναι βασικά ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως στο οποίο όμως τα ηλεκτρόνια που ανιχνεύονται για το σχηματισμό του είδωλου, είναι τα ηλεκτρόνια που κατορθώνουν να διαπεράσουν το δείγμα, όπως στο TEM, και όχι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια.

## 2.2. Φθορίζουσα οθόνη

Φθορισμός είναι η ιδιότητα εκπομπής ηλεκτρομαχνητικής ακτινοβολίας κάτω από την επίδραση ηλεκτρομαχνητικού ή ηλεκτρονιακού βομβαρδισμού.

Ορισμένα υλικά εκπέμπουν ορατό φως κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Το φαινόμενο αυτό είναι χρήσιμο στην ηλεκτρονική μικροσκοπία γιατί κάνει ορατό το είδωλο που σχηματίζουν τα ηλεκτρόνια.

Γι' αυτό το λόγο κάτω από το φακό προβολής είναι τοποθετημένη μια οθόνη φτιαγμένη από υλικό που μπορεί να φθορίζει π.χ. σουλφίδιο του ψευδαργύρου. Η οθόνη εκπέμπει ορατό φως όταν βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια.

## 2.3. Περίθλαση - Διακριτικό όριο

Η περίθλαση είναι έμφυτη στο φως και στην ηλεκτρονιακή δέσμη λόγω της κυματικής φύσης της.

Δεν μπορεί να εξαληφθεί αν και η επίδρασή της στο είδωλο μπορεί να ελαττωθεί στο ελάχιστο.



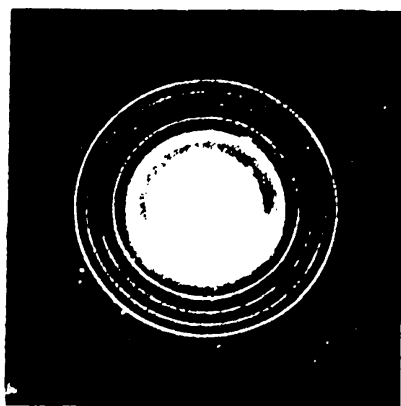
Η περίθλαση προέρχεται από τις ανωμαλίες του αντικειμένου και από την παρουσία των διαφραγμάτων (κυρίως του αντικειμενικού φακού) που μέσα από τις οπές τους είναι αναγκασμένη να περάσει η δέσμη των ηλεκτρονίων. Η περίθλαση που δημιουργείται από το διάφραγμα του αντικειμενικού φακού έχει σπουδαίες συνέπειες στη διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Λόγω περιθλάσεως, το είδωλο ενός σημείου του αντικειμένου δεν είναι ποτέ σημείο αλλά κηλίδα που έχει ένα κεντρικό κύκλο ακτίνας  $\delta$ .

Ο κεντρικός κύκλος είναι περιτριχυρισμένος από ένα αριθμό αμυδρών κροσσών κύκλων (diffraction fringes) όπως φαίνεται στο σχήμα 10. Η ακτίνα ( $\delta$ ) του κεντρικού κύκλου της κηλίδας δίνεται από την εξίσωση:

$$\delta = \frac{0.61 \lambda}{\eta \eta \mu \frac{\alpha}{2}} \quad (11)$$

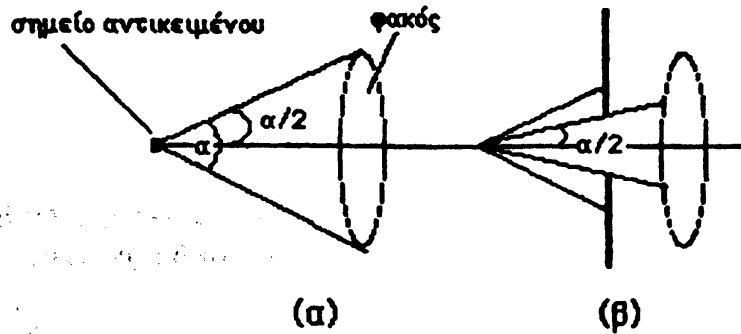
όπου  $\lambda$ =μήκος κύματος,  $\eta$ =δείκτης διαθλάσεως του μέσου μεταξύ αντικειμένου και φακού και  $\alpha$ =το γωνιακό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού που εξαρτάται από τη διάμετρο του φακού ή από το διάφραγμα (σχήμα 11).



Σχήμα 10: Ένα υπόδειγμα περιθλάσεως



Ακόμη, επειδή το γωνιακό άνοιγμα είναι πολύ μικρό μπορούμε να



Σχήμα 11: Το γωνιακό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού περιορισμένο (α) από τη διάμετρο του φακού, (β) από ένα διάφραγμα του φακού.

θεωρήσουμε ότι  $\eta \alpha/2 = \alpha/2$ .

Επίσης, επειδή ο χώρος μέσα στο φακό καλύπτεται από αέρα ο δείκτης διαθλάσεως  $n$  ισούται με τη μονάδα. Επομένως η σχέση (11) μπορεί να γραφεί:

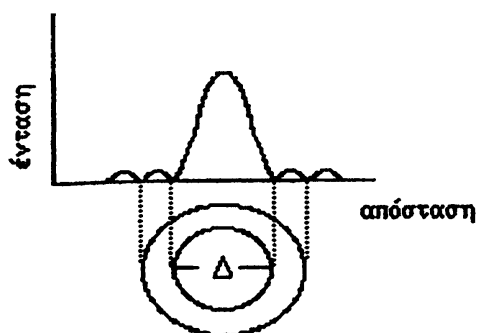
$$\delta = 0,61\lambda / (\alpha/2) = 1,22\lambda/\alpha \quad (12)$$

Για να ξεχωρίσουμε δύο σημεία πρέπει τα είδωλά τους (κηλίδες) να βρίσκονται μεταξύ τους σε μια ορισμένη απόσταση ώστε να διακρίνονται σαν δύο κηλίδες και όχι να φαίνονται σαν μία. Η ελάχιστη αυτή απόσταση καλείται *διακριτικό όριο*.

Αν σχεδιάσουμε την ένταση του φωτός για όλους τους κύκλους που αποτελούν μια κηλίδα, θα έχουμε μια κατανομή όμοια μ' αυτή του σχήματος 12.

Ο κεντρικός κύκλος είναι πολύ πιο έντονος από κάθε άλλο κύκλο και περιέχει τα 84% της όλης εντάσεως του φωτός. Επομένως, θα μπορούσαμε να αγνοήσουμε τους αμυδρούς κύκλους και να υποθέσουμε ότι όλο το φως πέφτει στον κεντρικό κύκλο της κηλίδας διαμέτρου ( $\Delta$ ).



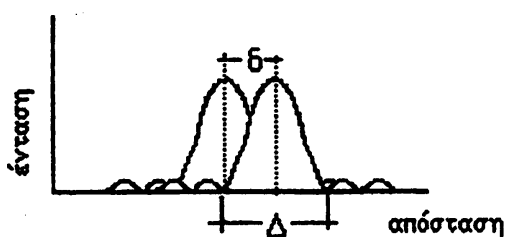


Σχήμα 12: Κατανομή της εντάσεως του φωτός για όλους τους κύκλους μιας κηλίδας.

Τώρα θα πρέπει να μελετήσουμε το πόσο μακριά θα πρέπει να είναι δύο απ' αυτές τις κηλίδες ώστε να μπορούμε να τις ξεχωρίσουμε σαν δύο (αυτή η απόσταση είναι το διακριτικό όριο που ορίσαμε πιο πάνω).

Ο Rayleigh υπέδειξε το ακόλουθο κριτήριο: όταν το μέγιστο της εντάσεως ενός κύκλου συμπίπτει με το πρώτο ελάχιστο του δευτέρου, τότε τα δύο σημεία μόλις μπορούν να διακριθούν.

Αυτό επεξηγείται στο σχήμα 13 από το οποίο φαίνεται ότι το διακριτικό όριο είναι  $\Delta/2 = \delta$  (της σχέσης 12).



Σχήμα 13: Κριτήριο Rayleigh

Ο όρος "αριθμητικό άνοιγμα" (A) (numerical aperture) χρησιμοποιείται στα οπτικά και στα ηλεκτρονικά μικροσκόπια και ισούται με τον όρο  $\alpha/2$ . Επομένως η σχέση (11) μπορεί να γραφεί:

$$\delta = 0,61\lambda/A \quad (13)$$



Η διακριτική ικανότητα είναι το αντίστροφο του διακριτικού ορίου, δηλαδή

$$\Delta = 1/\delta = a/1,22\lambda \quad (14)$$

Για να επιτύχουμε την καλύτερη διακριτική ικανότητα είναι φανερό ότι χρειαζόμαστε το μικρότερο δυνατό μήκος κύματος  $\lambda$  και τις μεγαλύτερες δυνατές τιμές για το γωνιακό άνοιγμα  $a$  του αντικειμενικού φακού.

Στην πράξη όμως η διακριτική ικανότητα περιορίζεται πολύ από τα σφάλματα των ηλεκτρομαγνητικών φακών.

#### 2.4. Βάθος πεδίου-Βάθος εστίας

Για να είναι σαφής η απεικόνιση του ειδώλου πρέπει το παρατηρούμενο αντικείμενο να βρίσκεται σε μια ορισμένη θέση και απόσταση από τον αντικειμενικό φακό.

Η μικρή περιοχή γύρω από τη σωστή θέση του αντικειμένου που μέσα σ' αυτή το είδωλο εξακολουθεί να απεικονίζεται καθαρά, λέγεται βάθος πεδίου,  $\Delta l$ .

Το βάθος πεδίου εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου και τη μεγέθυνση που χρησιμοποιείται. Καθώς η διακριτική ικανότητα βελτιώνεται και η μεγέθυνση αυξάνεται το βάθος πεδίου γίνεται μικρότερο.

Μια ικανοποιητική προσέγγιση του  $\Delta l$  μπορεί να μας δώσει η σχέση:

$$\Delta l = \frac{\lambda}{\eta \eta_m^2 \frac{a}{2}} + \frac{1}{7M \eta_m \frac{a}{2}} \quad (15)$$

όπου  $M$  είναι η μεγέθυνση.

Όπως έχουμε αναφέρει στην προηγούμενη ενότητα, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι  $n=1$  και  $\eta_m/2 = a/2$  και επομένως η σχέση (15) γίνεται:

$$\Delta l = 4\lambda/a^2 + 2/7Ma \quad (16)$$





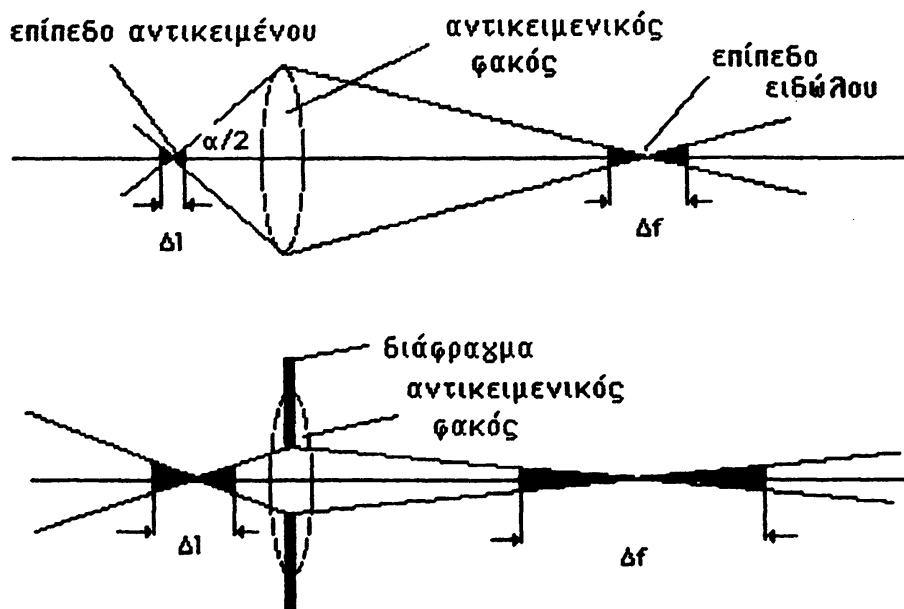
Από την παραπάνω σχέση είναι φανερό ότι αν δεν θυσιάσουμε μέρος της διακριτικής ικανότητας (π.χ. μικραίνοντας το  $\alpha$ ) ή της μεγεθύνσεως  $M$ , δεν μπορούμε να αυξήσουμε το βάθος πεδίου.

Η αύξηση του βάθους πεδίου πολλές φορές χρειάζεται, όπως όταν θέλουμε να εντοπίσουμε το είδωλο στο ξεκίνημα μιας παρατήρησης.

Η μικρή περιοχή που μέσα σ' αυτή το είδωλο εξακολουθεί να είναι καθαρά εστιασμένο, λέγεται βάθος εστίας,  $\Delta f$ .

Αυτό σημαίνει ότι αν ένα αντικείμενο βρίσκεται σ' ένα σημείο μέσα στην περιοχή που αντιπροσωπεύει το βάθος πεδίου, το είδωλο θα εξακολουθεί να εστιάζεται καθαρά.

Το βάθος πεδίου και το βάθος εστίας αυξάνονται αν ελαττώσουμε το γωνιακό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού όπως φαίνεται στο σχήμα 14.

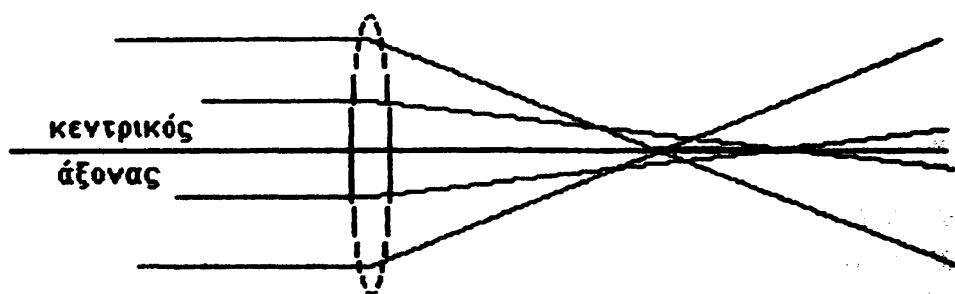


Σχήμα 14: Αύξηση του βάθους πεδίου και βάθους εστίας με ελάττωση του γωνιακού ανοίγματος του αντικειμενικού φακού που γίνεται με ένα διάφραγμα.

### 3. ΣΦΑΛΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΦΑΚΩΝ ΣΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

#### 3.1. Σφαιρικό σφάλμα

Το σφαιρικό σφάλμα οφείλεται στην ανικανότητα του φακού να φέρει όλες τις ακτίνες που εισέρχονται σ' αυτόν σε κοινή εστία (σχήμα 15).



Σχήμα 15: Σφαιρικό σφάλμα

Έτσι, οι ακτίνες που διέρχονται από το περιφερειακό μέρος του φακού εστιάζονται σε διαφορετικό επίπεδο από εκείνο που εστιάζονται οι ακτίνες που περνούν κοντά από τον κεντρικό άξονα. Αυτό οδηγεί στην αμαύρωση (blurring) του ειδώλου και επομένως στον περιορισμό της διακριτικής ικανότητας.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ιδιαίτερα σημαντικό είναι το σφαιρικό σφάλμα που δημιουργείται στον αντικειμενικό φακό γιατί όπως έχει προηγουμένα αναφερθεί ο φακός αυτός σχηματίζει το αρχικό είδωλο του εξεταζόμενου δείγματος.

Το σφαιρικό σφάλμα μπορεί να ελαττωθεί με τη χρησιμοποίηση μόνο του κεντρικού τμήματος του μαγνητικού πεδίου του φακού.

Αυτό επιτυγχάνεται με την ελάττωση της οπής του διαφράγματος του αντικειμενικού φακού. Έτσι, μόνο τα ηλεκτρόνια που περνούν αρκετά κοντά από τον κεντρικό άξονα του φακού μπορούν να περάσουν μέσα από την οπή του διαφράγματος για να σχηματίσουν το είδωλο.



Όμως, τα άκρα της οπής του διαφράγματος, προκαλούν σφάλματα περιθλάσεως που περιορίζουν τη διακριτική ικανότητα. Ο αντικειμενικός φακός πρέπει τότε να είναι έτσι κατασκευασμένος ώστε να δημιουργεί ένα συμβιβασμό μεταξύ της ελαττώσεως του σφαιρικού σφάλματος και της ελαττώσεως των σφαλμάτων λόγω περιθλάσεως.

Σύμφωνα με τον Agar, ο καλύτερος συμβιβασμός επιτυγχάνεται με ημιγωνιακό άνοιγμα  $\alpha/2 \sim 10^{-2} \text{rad}$ . Το ημιγωνιακό άνοιγμα συνδέεται με το μέγεθος της οπής του διαφράγματος με την ακόλουθη σχέση:

$$\alpha/2 = \text{διάμετρος της οπής του διαφράγματος}/2f \quad (17)$$

όπου  $f$  = η εστιακή απόσταση του αντικειμενικού φακού. Επίσης μπορεί ναδειχθεί ότι το διακριτικό όριο σε σχέση με το σφαιρικό σφάλμα δίνεται από την εξίσωση:

$$\delta = K.C_S.f.(\alpha/2)^3 \quad (18)$$

όπου  $C_S$  = συντελεστής σφαιρικού σφάλματος ( η παράμετρος αυτή εξαρτάται από την κατασκευή του φακού ), τα  $f$  και  $\alpha$  αντιπροσωπεύουν τα ίδια μεγέθη όπως στη σχέση (17).

Χρησιμοποιώντας τις σχέσεις (12) και (18) έχουμε:

$$0,6\lambda / (\alpha/2) = K.C_S.f.(\alpha/2)^3 \text{ από την οποία παίρνουμε:}$$
$$\alpha/2 = (0,6\lambda / K.C_S.f)^{1/4}$$

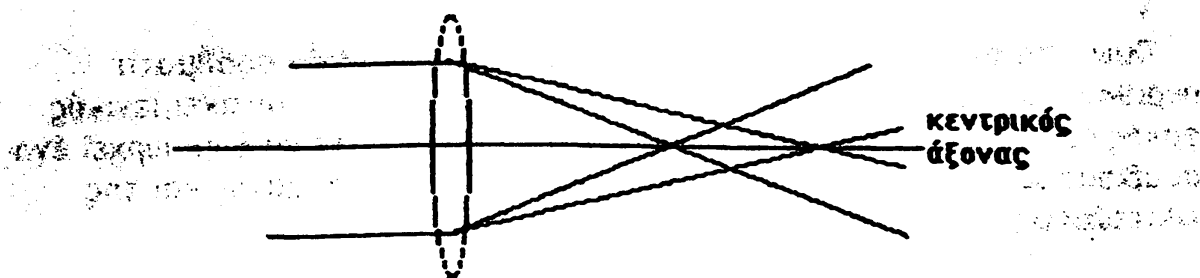
Αντικαθιστώντας την τιμή αυτή στη σχέση (12) έχουμε:

$$\delta = 0,6^{3/4} \lambda^{3/4} (K.C_S.f)^{1/4} \quad (19)$$

### 3.2. Χρωματικό σφάλμα

Το χρωματικό σφάλμα οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια με διαφορετική ταχύτητα και επομένως με διαφορετικό μήκος κύματος εστιάζονται σε διαφορετικά επίπεδα (σχήμα 16). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αμαύρωση του ειδώλου.





Σχήμα 16: Χρωματικό σφάλμα. Τα ηλεκτρόνια με μικρότερο μήκος κύματος εστιάζονται πλησιέστερα στο φακό απ' ότι τα ηλεκτρόνια με μεγαλύτερο μήκος κύματος.

Το μήκος κύματος της ηλεκτρονιακής δέσμης καθορίζεται από το δυναμικό. Επομένως κάθε αλλαγή δυναμικού, προκαλεί αλλαγή στο μήκος κύματος των ηλεκτρονίων και συνεπώς χρωματικό σφάλμα. Είναι απαραίτητο λοιπόν το δυναμικό να είναι σταθερό.

Χρωματικό σφάλμα επίσης παράχεται από το γεγονός ότι κατά τη θερμιοτική εκπομπή όλα τα ηλεκτρόνια δεν έχουν την ίδια αρχική ταχύτητα. Όμως, το χρωματικό σφάλμα που δημιουργείται από την αιτία αυτή δεν είναι πολύ μεγάλο.

Μια άλλη αιτία χρωματικού σφάλματος είναι τα μόρια ουσιών που βρίσκονται στο εσωτερικό του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ή στους φακούς και που προκαλούν τη μόλυνση του δείγματος (contamination). Τα μόρια αυτά μπορεί να επιβραδύνουν τα ηλεκτρόνια και επομένως να αυξήσουν το μήκος κύματος. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η σχολαστική καθαριότητα του εσωτερικού του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αν θέλουμε να έχουμε πολύ καλή διακριτική ικανότητα.

Ίσως ο πιο σπουδαίος παράγοντας που δημιουργεί το χρωματικό σφάλμα είναι το πάχος του δείγματος που πρόκειται να εξεταστεί.

Όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του δείγματος τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια θα σκεδαστούν από αυτό. Τα ηλεκτρόνια που σκεδάζονται με μεγάλη γωνία, πέφτουν έξω από το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και χάνονται από τη δέσμη. Όμως, μερικά ηλεκτρόνια που σκεδάζονται από το δείγμα δεν σκεδάζονται αρκετά ισχυρά ώστε να χαθούν από τη δέσμη. Αυτά τα ηλεκτρόνια έχουν χάσει ενέργεια και συνεπώς η ταχύτητά τους έχει ελαττωθεί και έτσι παράχουν χρωματικό σφάλμα που έχει σαν αποτέλεσμα



την αύξηση της διαμέτρου του κεντρικού κύκλου της κηλίδας περιθλάσεως.

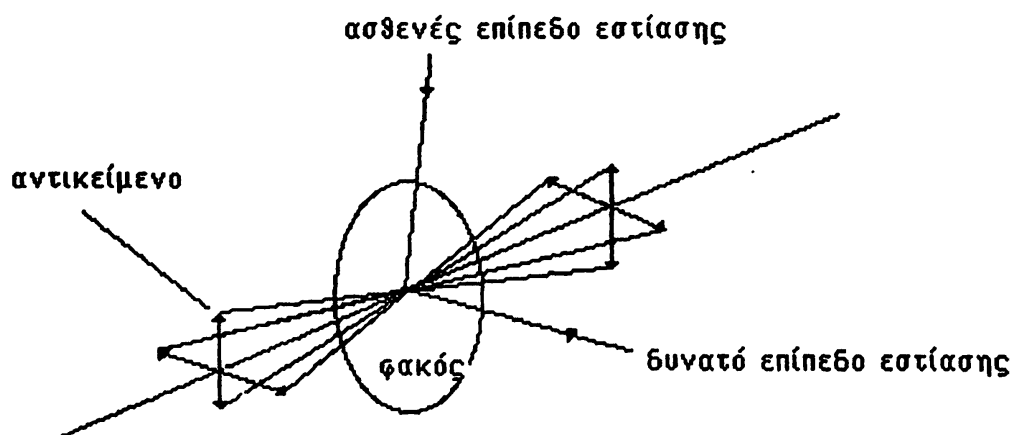
Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "electron noise" και είναι ένας από τους παράγοντες που περιορίζει τη διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

### 3.3. Αστιγματισμός - Διόρθωση αστιγματισμού

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μια σπουδαία αιτία αστιγματισμού είναι το μη συμμετρικό μαγνητικό πεδίο των φακών.

Η εστιακή απόσταση όλων των φακών κατά μία διεύθυνση, είναι λίγο διαφορετική από την εστιακή απόσταση κατά μία άλλη διεύθυνση. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις ατέλειες των οπών των φακών και στις ανομοιογένειες των πόλων (σχήμα 17).

Λόγω της αιτίας αυτής το είδωλο ενός εξεταζόμενου δείγματος θα είναι υπερεστιασμένο (overfocused) κατά μία διεύθυνση και υποεστιασμένο (underfocused) κατά μία άλλη. Με άλλα λόγια, δεν μπορούμε να φέρουμε



Σχήμα 17: Αιτία αστιγματισμού. Αν ο φακός έχει μη συμμετρικό μαγνητικό πεδίο, θα έχει μεγαλύτερη ένταση σ' ένα επίπεδο και μικρότερη σ' ένα άλλο επίπεδο κάθετο του πρώτου. Έτσι το είδωλο ενός αντικειμένου θα είναι εστιασμένο κατά μία διεύθυνση και κατά άλλη διεύθυνση όχι.

ένα σημείο του αντικειμένου σε αληθινή εστία.



Ο αστιγματισμός που δημιουργείται στον αντικειμενικό φακό επηρεάζει τη διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Αστιγματισμός επίσης εμφανίζεται και στο σύστημα φακών συλλέκτη αλλά επηρεάζει το φωτισμό του δείγματος και όχι τη διακριτική ικανότητα.

Τέλος, ο αστιγματισμός που δημιουργείται στους φακούς προβολής δεν έχει επίδραση στην ποιότητα του ειδώλου

Μπορούμε να διορθώσουμε τον αστιγματισμό των φακών συλλέκτη αυξάνοντας την εστιακή απόσταση του αστιγματικού φακού κατά μία μόνο διεύθυνση. Αυτό μπορεί να γίνει προσθέτοντας ένα κυλινδρικό φακό σωστής εστιακής απόστασης κατά τη σωστή διεύθυνση.

Η διόρθωση του αστιγματισμού του αντικειμενικού φακού είναι πιο δύσκολη. Ο προσανατολισμός του πεδίου και η διεύθυνση της εντάσεώς του με το διορθωτή αστιγματισμού, απαιτεί πολύ προσεκτική παρατήρηση των κροσσών περιθλάσεως (Fresnel fringes) αρκετών σημείων του δείγματος.

Γι αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται ένα φιλμ ( μεμβράνη) άνθρακος που περιέχει οπές. Κροσσοί περιθλάσεως μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν στα άκρα των οπών.

Αν ο αντικειμενικός φακός είναι τέλειος χωρίς αστιγματισμό, το άκρο μιας οπής όταν βρίσκεται σε τέλεια εστίαση δεν εμφανίζει κροσσούς περιθλάσεως (σχήμα 18(β)). Στην πραγματικότητα όμως υπάρχουν κροσσοί περιθλάσεως λόγω της κυματικής φύσης της ηλεκτρονιακής δέσμης, αλλά όταν το είδωλο είναι τέλεια εστιασμένο οι κροσσοί είναι τόσο λεπτοί που δεν διακρίνονται με το μικροσκόπιο:

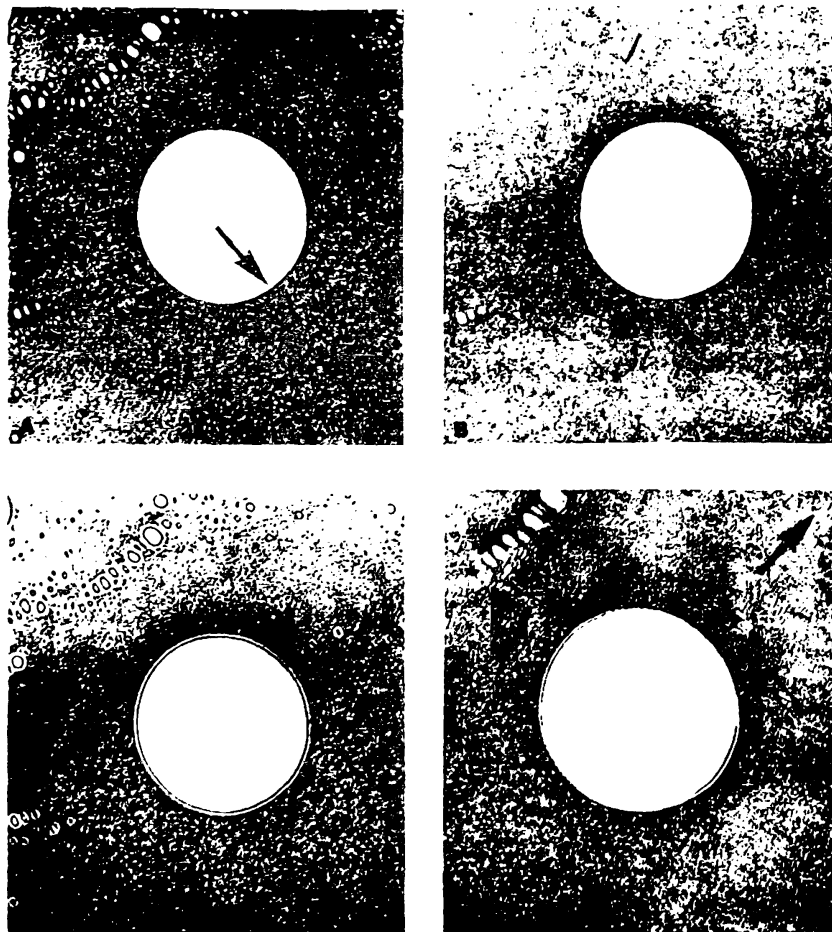
Όταν το είδωλο είναι υπερεστιασμένο (over focused), το πλάτος των κροσσών αυξάνεται και έτσι γίνονται ορατοί σαν φωτεινή γραμμή που βρίσκεται έξω από το σκούρο άκρο της οπής (σχήμα 18(γ)).

Όταν το είδωλο είναι υποεστιασμένο (under focused), το πλάτος των κροσσών αυξάνεται αλλά είναι ορατοί σαν φωτεινή γραμμή που βρίσκεται μέσα από το σκούρο άκρο της οπής (σχήμα 18(α)).

Αν ο αντικειμενικός φακός έχει αστιγματισμό, οι οπές στη μεμβράνη του



άνθρακα δεν μπορούν να εστιαστούν τέλεια αλλά είναι υπερεστιασμένες κατά μία διεύθυνση και υποεστιασμένες ή εστιασμένες κατά μία άλλη διεύθυνση όπως φαίνεται στο σχήμα 18(δ).



Σχήμα 18: (α) Οπή μεμβράνης άνθρακος υποεστιασμένη (underfocused). Μια λευκή γραμμή μόλις μπορεί να διακριθεί μέσα από το μαύρο άκρο της οπής, (β) οπή εστιασμένη (χωρίς κροσσούς), (γ) οπή υπερεστιασμένη (overfocused). Μια άσπρη γραμμή μόλις διακρίνεται έξω από το μαύρο άκρο της οπής, (δ) αστιγματισμός του αντικειμενικού φακού. Η οπή είναι εστιασμένη κατά μία διεύθυνση αλλά υπερεστιασμένη κατά μία άλλη.

Από την εμφάνιση λοιπόν των οπών της μεμβράνης άνθρακος μπορούμε να καταλάβουμε αν ο αντικειμενικός φακός έχει αστιγματισμό ή όχι.

Με τη βοήθεια του διορθωτή αστιγματισμού και με την παρατήρηση των οπών της μεμβράνης άνθρακος, ο αστιγματισμός μπορεί να διορθωθεί αλλά θα πρέπει να ελέγχεται συχνά.



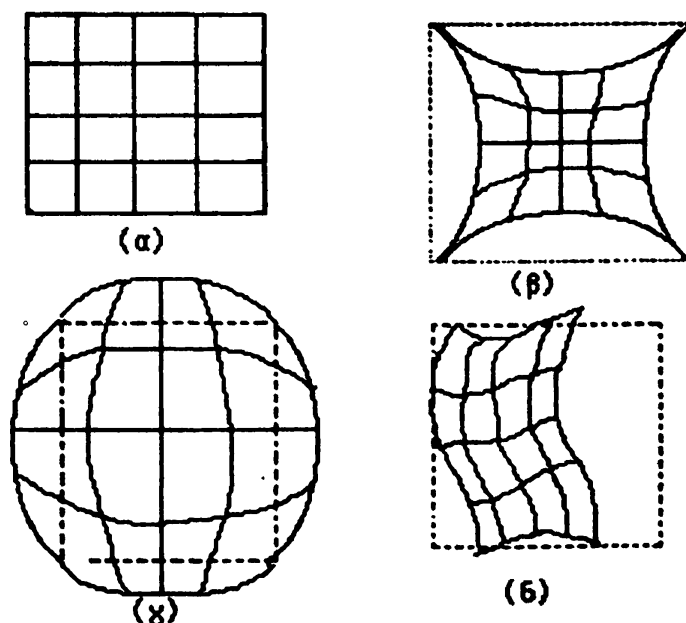
### 3.4. Παραμόρφωση του ειδώλου (Distortion)

Η παραμόρφωση του ειδώλου αφορά κυρίως τους φακούς προβολής.

Δημιουργείται από το γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια που περνούν από την περιφέρεια του φακού επηρεάζονται από το μαγνητικό πεδίο του κατά διαφορετικό τρόπο από ότι τα ηλεκτρόνια που περνούν κοντά από τον κεντρικό άξονα.

Έτσι, όλα τα μέρη του ειδώλου δεν έχουν την ίδια μεγέθυνση. Ιδιαίτερα σε χαμηλές μεγεθύνσεις, η περιφέρεια του ειδώλου μπορεί να είναι μεγεθυσμένη περισσότερο από το κέντρο. Αυτή η παραμόρφωση είναι γνωστή σαν "pincushion παραμόρφωση" (σχήμα 19(β)).

Επίσης μπορεί να συμβεί το αντίστροφο. Δηλαδή το κέντρο του ειδώλου να είναι μεγεθυσμένο περισσότερο από την περιφέρεια. Αυτή η παραμόρφωση ονομάζεται "barrel παραμόρφωση" (σχήμα 19(γ)).



Σχήμα 19: Παραμόρφωση του ειδώλου  
(α) είδωλο χωρίς παραμόρφωση (β) pincushion παραμόρφωση (γ) barrel παραμόρφωση (δ) σφαιροειδής παραμόρφωση





Αυτά τα δύο είδη παραμορφώσεως είναι αποτελέσματα του σφαιρικού σφάλματος. Διορθώνονται μερικώς με διευθέτηση της εντάσεως και της διευσύσεως του μαχνητικού πεδίου των φακών προβολής.

Όπως προηγούμενα έχουμε αναφέρει, ένα ηλεκτρόνιο όταν διέρχεται από ένα ηλεκτρομαχνητικό φακό εκτελεί σπειροειδή κίνηση. Αν συνδυάσουμε την κίνηση αυτή με την παραμόρφωση, έχουμε σαν αποτέλεσμα τη σπειροειδή παραμόρφωση του ειδώλου (spiral distortion), σχήμα 19(δ).

Αυτό το είδος της παραμορφώσεως μπορεί να ελαττωθεί περιτυλίχοντας το σύρμα του αντικειμενικού φακού και του φακού προβολής κατά αντίθετο διεύθυνση έτσι ώστε η σπειροειδής παραμόρφωση που παράχεται από τον ένα φακό να εξαλείφεται από την παραμόρφωση που παράχεται από τον άλλο.

Λόγω των συνεπειών της παραμορφώσεως του ειδώλου, για τη μελέτη ενός δείγματος δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μεγεθύνσεις μικρότερες από X1000.



#### 4. ΜΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (contamination)

Ακόμη και σε κενό  $10^{-4}$  ή  $10^{-5}$  Torr στο εσωτερικό του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, υπάρχει ένας αριθμός μορίων αερίου (gas). Αυτά τα μόρια είναι είτε μόρια υδρογονάνθρακος είτε μόρια ατμού ύδατος.

Τα μόρια υδρογονάνθρακος δημιουργούνται από την εξάτμιση του λαδιού των αντλιών, από το λιπαντικό που χρησιμοποιήθηκε στις συνδέσεις διαφόρων τμημάτων της στήλης κενού, από τα μέρη που τα έχουμε αγγίξει με τα δάκτυλα πριν τα βάλουμε μέσα στο μικροσκόπιο και από τα ακάθαρτα πλέγματα δειγμάτων. Αυτά τα μόρια θα μολύνουν το δείγμα που εξετάζουμε.

Μόρια ατμού ύδατος, προέρχονται από το φωτογραφικό φιλμ ή πλάκες που βρίσκονται στην κάμερα. Όταν δεν υπάρχει ηλεκτρονιακή δέσμη μερικά από τα μόρια υδρογονάνθρακος παραμένουν στην επιφάνεια του δείγματος.

Όταν η δέσμη των ηλεκτρονίων βομβαρδίζει το δείγμα, αντιδρά με αυτά τα μόρια υδρογονάνθρακος. Κατ' αρχάς συμβαίνει πολυμερισμός των μορίων υδρογονάνθρακος που τα εμποδίζει να αφήσουν την επιφάνεια του δείγματος.

Περαιτέρω βομβαρδισμός έχει σαν αποτέλεσμα την ελευθέρωση των μορίων υδρογόνου από τα μόρια υδρογονάνθρακος, αφήνοντας πάνω στο δείγμα ένα στρώμα από καθαρό άνθρακα. Αυτό όχι μόνο αφανίζει τις λεπτομέρειες του δείγματος αλλά και κάνει το δείγμα να κάμπτεται γιατί το στρώμα του άνθρακος και το δείγμα έχουν διαφορετικό συντελεστή διαστολής. Γενικώς, οδηγεί στην ελάττωση της διακριτικής ικανότητας.

Είναι φανερό ότι είναι απαραίτητος ένας πολύ λεπτομερής καθαρισμός του εσωτερικού του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για την παραγωγή λιχότερων μορίων υδρογονάνθρακος.

#### 5. ΑΝΤΙΘΕΣΗ (CONTRAST)

##### 5.1. Η προέλευση αντιθέσεως στο είδωλο

Τα άτομα του δείγματος αναγκάζουν αρκετά από τα ηλεκτρόνια της αρχικής δέσμης να σκεδαστούν. Αν η σκέδαση είναι αρκετά ισχυρή τότε τα ηλεκτρόνια θα πέσουν έξω από το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και δεν



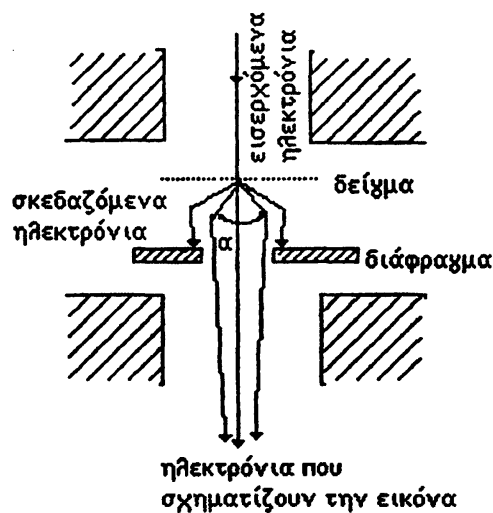
θα συνεισφέρουν στο σχηματισμό του ειδώλου (σχήμα 20).

Έτσι, μ' αυτό τον τρόπο δημιουργείται αντίθεση στο είδωλο που σχηματίζεται στην οθόνη ή που μπορεί να αποτυπωθεί στο φιλμ της κάμερας.

Οι σκούρες περιοχές στη φθορίζουσα οθόνη αντιπροσωπεύουν μέρη του δείγματος όπου τα άτομα έχουν σκεδάσει τα ηλεκτρόνια ισχυρά ώστε να χαθούν από τη δέσμη.

Οι φωτεινές περιοχές αντιπροσωπεύουν μέρη όπου τα ηλεκτρόνια έχουν κατορθώσει να περάσουν μέσα από το δείγμα και να ενεργοποιήσουν το φώσφορο της φθορίζουσας οθόνης.

Όπως έχει προηγουμένα αναφερθεί, το ποσό της σκεδάσεως εξαρτάται από το πάχος του δείγματος και τον ατομικό αριθμό των υλικών που αποτελούν το δείγμα. Αν το ποσό της δέσμης που σκεδάζεται είναι λιγότερο από 5%, τότε το είδωλο δεν είναι ορατό στον οφθαλμό.



**Σχήμα 20:** Η μικρή οπή του διαφράγματος του αντικειμενικού φακού έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντίθεσης. Αυτό οφείλεται στο ότι όσο μικρότερη είναι η οπή τόσο περισσότερα σκεδασμένα ηλεκτρόνια αποκρίνονται από το διάφραγμα και τόσο λιγότερα περνούν από αυτό για να σχηματίσουν το είδωλο.



Με χαμηλά δυναμικά, τα ηλεκτρόνια έχουν λιγότερη ενέργεια και σκεδάζονται ευκολότερα. Στην περιοχή των δυναμικών που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία, η αντίθεση είναι αντιστρόφως ανάλογη του δυναμικού.

Αν το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού είναι μικρό, περισσότερα σκεδασμένα ηλεκτρόνια θα αποκοπούν από το διάφραγμα του φακού και λιγότερα θα περάσουν από την οπή του διαφράγματος για να σχηματίσουν το είδωλο. Έτσι, η αντίθεση θα αυξηθεί. Η αύξηση της αντιθέσεως οφείλεται στην πολύ μικρή τιμή του λόγου:

$$(A_{διδλ} + A'_{σκ}) / (A_{απορ} + A_{σκ}) \quad (20)$$

όπου  $A_{διδλ}$ : αριθμός ηλεκτρονίων που περνούν το δείγμα χωρίς αλληλεπίδραση

$A_{απορ}$ : αριθμός ηλεκτρονίων που απορροφήθηκαν στο δείγμα

$A'_{σκ}$ : αριθμός ηλεκτρονίων που σκεδάστηκαν μέσα στο δείγμα και περνούν την οπή του διαφράγματος του αντικειμενικού φακού για να σχηματίσουν το είδωλο

$A_{σκ}$ : αριθμός ηλεκτρονίων που σκεδάστηκαν μέσα στο δείγμα και δεν περνούν από την οπή του διαφράγματος του αντικειμενικού φακού

Η διαφορά της τιμής του λόγου αυτού σε δύο γειτονικά σημεία του ειδώλου καθορίζει και την αντίθεση (contrast), μεταξύ των δύο σημείων.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι παράγοντες που επηρεάζουν την αντίθεση στην ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι οι εξής:

1. το πάχος του δείγματος
2. η παρουσία στο δείγμα ατόμων με μεγάλο ατομικό αριθμό
3. το δυναμικό επιταχύνσεως
4. το μέγεθος της οπής του διαφράγματος του αντικειμενικού φακού

## 5.2. Αύξηση της αντιθέσεως

Ο πυρήνας του ατόμου καθώς και το νέφος των ηλεκτρονίων γύρω απ' αυτόν, σκεδάζουν τα ηλεκτρόνια και επομένως το ποσό σκεδάσεως αυξάνεται με τον ατομικό αριθμό.



Τα περισσότερα από τα άτομα στους βιολογικούς ιστούς έχουν μικρό ατομικό αριθμό (π.χ.  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{12}\text{C}$ ,  ${}^{14}\text{N}$ ,  ${}^{16}\text{O}$  κ.λπ.) και συνεπώς η σκεδαστική ικανότητα των ηλεκτρονίων αυτών των ατόμων είναι πολύ μικρή.

Επιπλέον, η σκέδαση δεν διαφέρει πολύ από ένα μέρος του δείγματος σε άλλο. Αυτό σημαίνει ότι η αντίθεση στις βιολογικές ουσίες είναι πολύ μικρή. Αύξηση της αντιθέσεως μπορεί να γίνει με αύξηση της τοπικής μάζας περιοχών του αντικειμένου με συλλεκτική προσέγγιση ορισμένων ουσιών (με μεγάλο ατομικό αριθμό) που ονομάζονται ηλεκτρονιακές χρώσεις (electron stains).

## 6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΣΤΟ TEM

Η προετοιμασία του δείγματος είναι μια πολύ λεπτή εργασία που απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ειδικό τεχνολογικό εξοπλισμό.

Η δυσκολία οφείλεται στο ότι το δείγμα πρέπει να είναι πάρα πολύ λεπτό.

Επιπλέον, η τομή ενός τόσο λεπτού δείγματος δεν πρέπει να έχει σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση των μορφολογικών του στοιχείων.

Τέλος, για τους λόγους που αναφέραμε στην προηγούμενη παράγραφο, η αντίθεση (contrast) του ειδώλου ενός βιολογικού δείγματος είναι πολύ φτωχή γι' αυτό είναι απαραίτητη η χρώση.

Για την προετοιμασία ενός βιολογικού δείγματος ακολουθούνται συνήθως τα εξής στάδια: 1) σταθεροποίηση (fixation), 2) στερέωση (embedding), 3) μικροσκοπική τομή (sectioning) και 4) χρώση (staining).

### 6.1. Σταθεροποίηση

Ο σκοπός της σταθεροποίησης είναι η διατήρηση της κυτταρικής δομής ακριβώς όπως ήταν πριν το κύτταρο σκοτωθεί. Σταθεροποίηση των ιστών σημαίνει την εμπόδιση της αυτολύσεως, της προσβολής από βακτήρια και των αλλαγών της δομής σε όγκο και σχήμα.



Με άλλα λόγια οι σκοποί της σταθεροποίησης είναι η γρήγορη διατήρηση της δομής με ελάχιστες αλλαγές από τη ζώσα κατάσταση καθώς και η προφύλαξη της δομής κατά τη διάρκεια της στερέωσης, της τομής και άλλων μεταχειρίσεων.

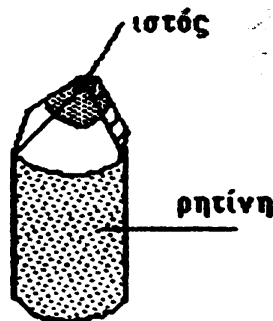
Οι πιο διαδεδομένοι σταθεροποιητές που χρησιμοποιούνται στην οπτική και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι οι αλδεΐδες, φορμαλδεΐδη και χλωταραλδεΐδη. Τα μόρια των ουσιών αυτών σχηματίζουν χιαστούς δεσμούς (cross-links) με τα μόρια του βιολογικού δείγματος.

## 6.2. Στερέωση

Για να κοπεί ο σταθεροποιημένος ιστός σε πολύ λεπτά τμήματα, είναι απαραίτητο να γίνει στερέωση του ιστού μέσα σε στερεωτικό υλικό που θα το στηρίξει και θα ελαττώσει την καταστροφή που θα προέρθει από την κοπή. Το βιολογικό υλικό πρώτα αφυδατώνεται με αλκοόλη διαφόρων βαθμών και τελικά στερεώνεται μέσα σε ειδική ρητίνη.

## 6.3. Τομή (κοπή)

Η τομή λεπτών δειγμάτων από το κομμάτι της ρητίνης, μέσα στην οποία βρίσκεται ο ιστός (σχήμα 21), γίνεται στον υπερμικροτόμο.



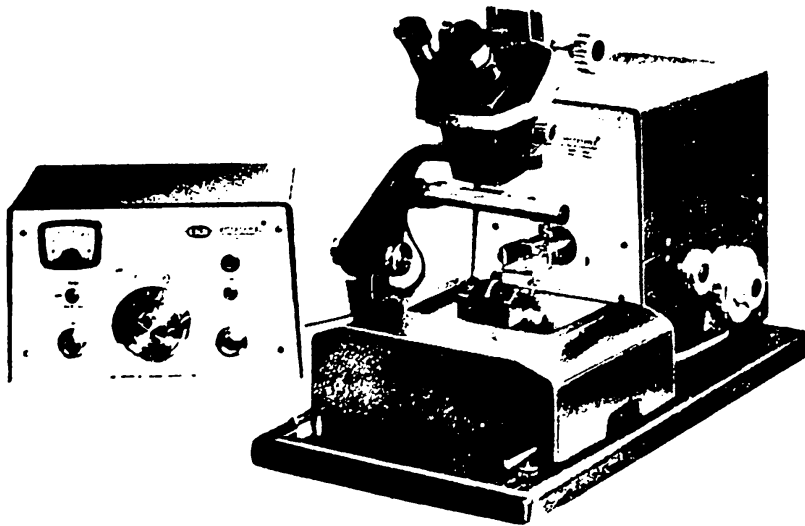
Σχήμα 21: Τεμάχιο ρητίνης μέσα στην οποία βρίσκεται ο βιολογικός ιστός.

Ένας τύπος υπερμικροτομού φαίνεται στο σχήμα 22.

Για την κοπή των μικρών τμημάτων (τομών) χρησιμοποιείται ένα μαχαίρι, φτιαγμένο από διαμάντι ή φρεσκοκομμένο γυαλί, που είναι



προσηρτημένο σ' ένα τμήμα του υπερμικροτόμου. Το πάχος των τομών μπορεί να κριθεί από το χρώμα που έχουν καθώς επιπλέουν στο υγρό όπου συλλέγονται.



Σχήμα 22: Εξωτερική όψη ενός τύπου υπερμικροτόμου.

Έχει γίνει γενικά αποδεκτό ότι υπάρχει η εξής σχέση μεταξύ του χρώματος των τομών και του πάχους τους.

Χρώμα	Πάχος
Σκούρο γκριζο	<40 nm
Γκριζο (φαιό)	40-50 nm
Ασημί	50-70 nm
Χρυσάφι	70-90 nm
Ερυθροκίανο	>90 nm

Τέλος, οι τομές τοποθετούνται σε μικρό χάλκινο πλέγμα (grid) ώστε να διευκολύνεται ο χειρισμός και η μεταφορά τους.

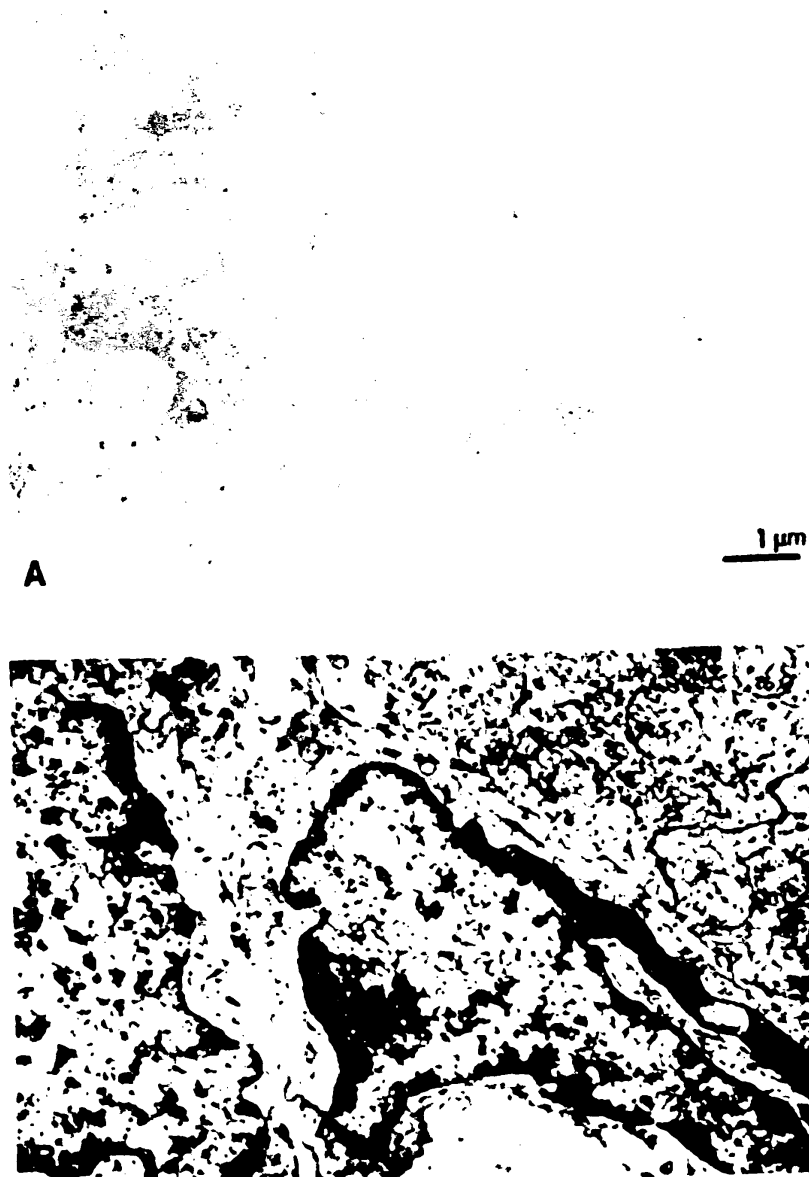
#### 6.4. Χρώση

Το τελευταίο βήμα πριν δούμε το βιολογικό δείγμα στο ηλεκτρονικό



μικροσκόπιο είναι η χρώση με την οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί επιτυγχάνεται αύξηση της αντιθέσεως στο είδωλο.

Το σχήμα 23 δείχνει χαρακτηριστικά ένα βιολογικό υλικό χωρίς χρώση και με χρώση.



Σχήμα 23: (α) ιστός χωρίς χρώση (β) ιστός όπου έχει γίνει χρώση με οξικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο.





Οι τεχνικές της χρώσης που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι δύο: (1) θετική χρώση, (2) αρνητική χρώση.

Η θετική χρώση είναι η τεχνική όπου ιόντα βαρέων μετάλλων σε διάλυμα, αντιδρούν με το δείγμα και το μεγαλύτερο μέρος του χρωστικού διαλύματος απομακρύνεται με πλύσιμο με απεσταχμένο νερό.

Στην αρνητική χρώση το μεγαλύτερο μέρος της χρώσης απομακρύνεται χωρίς πλύσιμο.

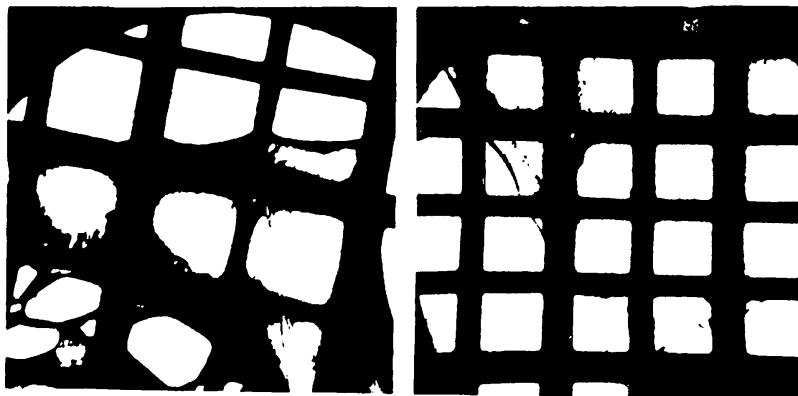
### 6.5. Προστατευτικές μεμβράνες δείγματος

Σε ειδικές περιπτώσεις βιολογικού δείγματος (π.χ. ιός, βακτήρια, κολλογόνο), η ουσία τοποθετείται πάνω σε λεπτή προστατευτική μεμβράνη (φιλμ) που είναι τοποθετημένη πάνω σε χάλκινο πλέγμα (grid).

Οι πιο κοινές προστατευτικές μεμβράνες είναι τρεις: 1) κολλόδιος μεμβράνη 2) formvar μεμβράνη, 3) μεμβράνη από εξατμισμένο άνθρακα.

Οι μεμβράνες του τελευταίου τύπου είναι στέρεις, λεπτές ( $\sim 2\text{nm}$ ) και χρησιμοποιούνται κυρίως για εργασία όπου απαιτείται μεγάλη διακριτική ικανότητα.

Το σχήμα 24 μας δείχνει σε μεγέθυνση ένα χάλκινο πλέγμα με προστατευτική μεμβράνη.



Σχήμα 24: Χάλκινο πλέγμα με προστατευτική μεμβράνη

Πρέπει να σημειώσουμε, ότι από τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος εξαρτάται το ποιές λεπτομέρειες από τα μορφολογικά του στοιχεία θα απεικονιστούν και το τι απώλειες και παραμορφώσεις μπορούν να εμφανιστούν.

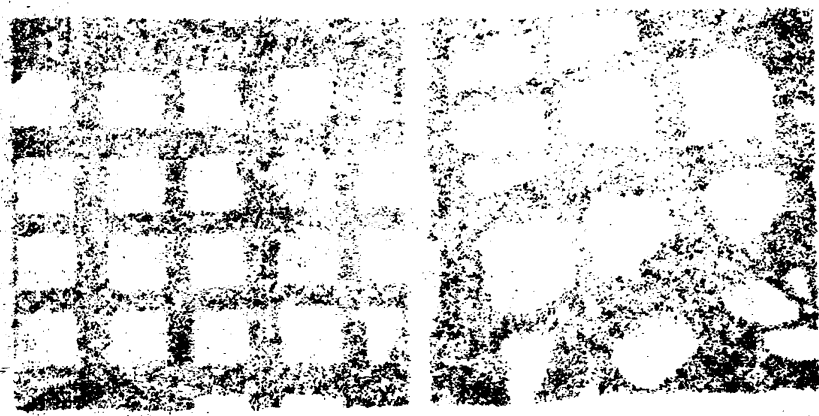
Επομένως, είναι απαραίτητο ο ηλεκτρονικός μικροσκοπιστής να γνωρίζει καλά τις φυσικές και βιοχημικές επιδράσεις επάνω στο δείγμα στα διάφορα στάδια της προετοιμασίας του και ακόμη τα αποτελέσματα αυτών των επιδράσεων στη μορφολογία και στη χημική σύνθεση της εξεταζόμενης περιοχής.

20

Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η προετοιμασία του δείγματος πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή, καθώς οι διαδικασίες αυτές μπορεί να επηρεάσουν το δείγμα και να οδηγήσουν σε παραμορφώσεις ή απώλειες των πληροφοριών που περιέχονται σε αυτό.

Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας μικροσκοπικής ανάλυσης, το οποίο πρέπει να αντιμετωπίζεται με ιδιαίτερη προσοχή και γνώση.

Επομένως, είναι απαραίτητο ο ηλεκτρονικός μικροσκοπιστής να γνωρίζει καλά τις φυσικές και βιοχημικές επιδράσεις επάνω στο δείγμα στα διάφορα στάδια της προετοιμασίας του και ακόμη τα αποτελέσματα αυτών των επιδράσεων στη μορφολογία και στη χημική σύνθεση της εξεταζόμενης περιοχής.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

*Goodhew, P.J.* (1975) *Electron Microscopy and Analysis.*  
Wykeham Publications (London) Ltd

*Weakley, B.S.* (1972) *A Beginner's Handbook in Biological Electron  
Microscopy.* Longman Group Ltd

*Meek, G.A.* (1977) *Practical Electron Microscopy for Biologists.*  
John Wiley and Sons Ltd.

*Healey, P.* (1972) *Microscopes and Microscopic Life.*  
Hamlyn Publishing Group Ltd.



Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο με δαπάνη  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κ.Α. Πανεπιστημιακού Τυπογραφείου. ....

Copyright : Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Απαγορεύεται η μερική ή ολική ανατύπωση, καθώς και η  
λήψη φωτοαντιγράφων από το βιβλίο χωρίς τη γραπτή  
άδεια του Τμήματος Δημοσιευμάτων του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων και του συγγραφέα.

Διατίθεται και στο Βιβλιοπωλείο του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων, Δαμπύλη, 451 10 Ιωάννινα τηλ. 21801.

ΔΙΑΝΕΜΕΤΑΙ ΔΩΡΕΑΝ στους φοιτητές.

