

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziky

**Skenovací tunelovací mikroskopie ve školní
laboratoři**

Bakalářská práce

Autor: Lenka Lejsková
Studijní program: B1701 Fyzika
Studijní obor: Fyzika se zaměřením na vzdělávání,
Matematika se zaměřením na vzdělávání
Vedoucí práce: RNDr. Daniel Jezbera

Hradec Králové

květen 2022

Zadání bakalářské práce

Autor: Lenka Lejsková

Studium: S19FY026BP

Studijní program: B1701 Fyzika

Studijní obor: Fyzika se zaměřením na vzdělávání, Matematika se zaměřením na vzdělávání

Název bakalářské práce: Skenovací tunelovací mikroskopie ve školní laboratoři.

Název bakalářské práce AJ: Scanning Tunneling Microscopy in a school laboratory.

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce je vyzkoušet využití školního skenovacího tunelovacího mikroskopu pro výuku ve školní laboratoři. V teoretické části práce budou popsány fyzikální principy tunelovací mikroskopie a její využití ve vědecké i technické praxi. V praktické části bude provedena řada měření školních vzorků, které ukáží uspořádání atomů na povrchu pevných látek. Měření budou provedena na STM mikroskopu z Laboratoře experimentů z moderní fyziky.

Vůjtek M., Kubínek R., Mašláň M., Nanoskopie, 2012

Langfahl-Klabes J., Scanning Tunneling Microscopy (STM) – Operating Instructions and Experiments, PHYWE Systeme, 2013

Garantující pracoviště: Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce RNDr. Daniel Jezbera

Oponent: doc. RNDr. Jan Šlégr, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 11.8.2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne 05. 05. 2022



Lenka Lejsková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu RNDr. Danielu Jezberovi za čas, který mi věnoval, za cenné rady, připomínky a také ochotu při vedení mé práce. Zároveň děkuji za možnost vyzkoušení nového experimentu.

Anotace

LEJSKOVÁ, L. *Skenovací tunelovací mikroskopie ve školní laboratoři*. Hradec Králové, 2022. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Daniel Jezbera. 60 s.

Bakalářská práce se zabývá skenovacím tunelovacím mikroskopem a jeho možnostmi využití ke studiu povrchu pevných látek v atomovém měřítku. V teoretické části jsou uvedeny historické souvislosti a přehled mikroskopických metod. Zvláštní kapitola je věnována mikroskopii skenující sondou, kde je podrobněji rozebrán skenovací tunelovací mikroskop. Praktická část zahrnuje popis experimentu a získaných snímků povrchu zlata a vysoce uspořádaného pyrolytického grafitu (HOPG) včetně jejich analýzy a následné diskuze výsledků.

Klíčová slova

grafit, mikroskopické metody, skenovací tunelový mikroskop, tunelový jev, zlato

Annotation

LEJSKOVÁ, L. *Scanning Tunneling Microscopy in a school laboratory*. Hradec Králové, 2022. Bachelor Thesis at Faculty of Science at University of Hradec Králové. Bachelor Thesis Supervisor RNDr. Daniel Jezbera. 60 p.

The bachelor's thesis deals with a scanning tunneling microscope and its possibilities of use to study the surface of solids on an atomic scale. The theoretical part presents the historical context and an overview of microscopic techniques. A special chapter is devoted to scanning probe microscopy, where the scanning tunneling microscopy is analysed in more detail. The practical part includes a description of the experiment and the obtained images of the surface of gold and highly ordered pyrolytic graphite (HOPG), including their analysis and subsequent discussion of the results.

Keywords

gold, graphite, microscopic techniques, scanning tunneling microscope, tunneling effect

Obsah

Úvod	8
1 Historie mikroskopu od antiky po současnost.....	9
1.1 Jednoduchý mikroskop.....	9
1.2 Složený mikroskop.....	11
2 Světelná mikroskopie.....	14
2.1 Základy světelné mikroskopie.....	14
2.2 Rozlišení a zvětšení optického mikroskopu.....	15
2.3 Rozlišovací schopnost.....	16
2.3.1 Abbého kritérium rozlišitelnosti.....	19
2.4 Metoda procházejícího světla a tmavého pole	20
2.4.1 Historie.....	20
2.4.2 Základní fyzikální princip	21
2.5 Metoda fázového kontrastu	21
2.5.1 Historie.....	21
2.5.2 Základní fyzikální princip	21
2.6 Polarizační mikroskopie	22
2.6.1 Historie.....	22
2.6.2 Základní fyzikální princip	22
2.7 Fluorescenční mikroskopie	23
2.8 Konfokální mikroskopie.....	24
3 Elektronová mikroskopie	25
3.1 Historie elektronového mikroskopu.....	25
3.2 Fyzikální základy	26
3.2.1 Elektronová optika	26
3.2.2 Rozlišovací mez a zobrazovací schopnosti elektronového mikroskopu	27
3.3 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	28
3.4 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)	30
4 Mikroskopie skenující sondou.....	31
4.1 Historie	31
4.2 Skenovací tunelový mikroskop	31
4.2.1 Základní princip.....	32

4.2.2	Teorie STM.....	34
4.2.3	Laterální rozlišení STM.....	35
4.2.4	Princip měření.....	37
4.2.5	Hroty pro STM.....	38
4.2.6	Aplikace a využití STM	40
5	Praktická část	43
5.1	Experiment a jeho komponenty.....	43
5.2	Software MeasureNano	46
5.2.1	Softwarové rozhraní	46
5.2.2	Panel pro měření.....	47
5.2.3	Práce s dokumenty a grafy	48
5.2.4	Analýza dat	49
5.3	Krystalická struktura použitých vzorků	50
5.3.1	Grafit	50
5.3.2	Zlato.....	51
5.4	Měření na STM, výsledky a jejich analýza	51
5.4.1	Měření na skenovacím tunelovém mikroskopu.....	51
5.4.2	HOPG	51
5.4.3	Zlato.....	55
	Závěr.....	58
	Použitá literatura	59

Úvod

Ačkoli tématem mé bakalářské práce je skenovací tunelový mikroskop, budou zde rozepsány i další typy mikroskopií pro lepší pochopení a návaznost. Nejprve se zaměřím na samotnou historii mikroskopování a mikroskopů od dob antických až po současnost. Historické souvislosti bývají na některých školách často opomenuty například v samotné výuce fyziky a dalších přírodovědných předmětech, s čímž mám i osobní zkušenosti. Ovšem tyto informace mohou zaujmout nejen pozornost žáků, ale mohou být také přínosné a obohacující či nadchnout pro dané téma. Proto i mě samotnou tato historická část zaujala.

Další dvě kapitoly budou věnovány světelné a elektronové mikroskopii. Jednak budou popsány základní principy, ale také různé typy mikroskopických metod světelné mikroskopie (např. metoda fázového kontrastu, metoda tmavého a světlého pole,...) i elektronové mikroskopie (rastrovací a transmisní elektronová mikroskopie). V úvodu každé metody bude opět zmínka o jejich historii.

Poslední kapitolou teoretické části bude mikroskopie skenující sondou, do které zařazujeme právě skenovací tunelovací mikroskop. Bude zde vysvětlen jeho fyzikální princip a jeho možnosti využití v praxi.

V praktické části bude ukázána řada výsledků z měření povrchů vysoce uspořádaného pyrolytického grafitu (HOPG) a zlata na skenovacím tunelovacím mikroskopu. Z těchto výsledků bude provedena a popsána analýza struktury povrchu daných vzorků.

1 Historie mikroskopu od antiky po současnost

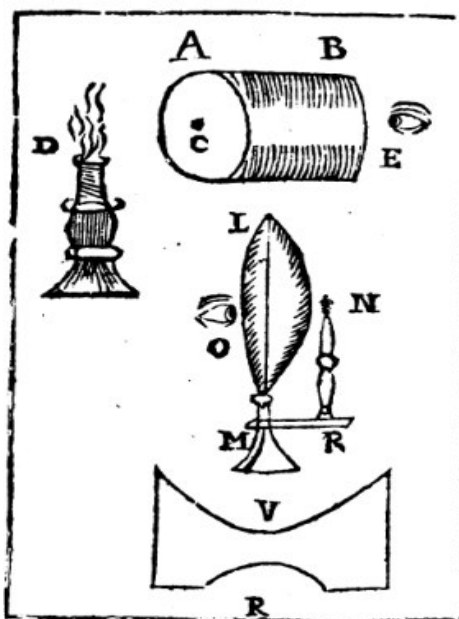
Mikroskopie je jedna z nejzajímavějších vědeckých technik. Vhled do tak malých rozměrů vedl ke zcela novému chápání struktury různých materiálů a forem života (Langfahl-Klabes, 2013).

1.1 Jednoduchý mikroskop

Již římskí filozofové zmiňovali tzv. hořící sklo, což je velká konvexní čočka, která soustřeďuje slunečné paprsky do malého prostoru, a tím dochází ke vznícení exponovaného povrchu (Sherwood, a další, 2019).

Obecné principy odrazu s určitou představou o lomu světla a zejména optické vlastnosti zakřivených zrcadel byly popsány Euklidem (nebo alespoň autorem používajícím jeho jméno) ve 3. století před naším letopočtem a stejně tak i matematikem Ptolemaiem ve druhém století našeho letopočtu. Tyto znalosti byly předány do Evropy Arabem Alhazenem (zemřel 1038), který rozvinul myšlenky svých předchůdců. Aplikoval je na zakřivená zrcadla ve značných detailech a s velkou matematickou dovedností. Alhazen si byl vědom působení odrazných ploch, které vznikly rotací kuželosečky, a proto byl schopen přesně promítat zvětšené obrazy.

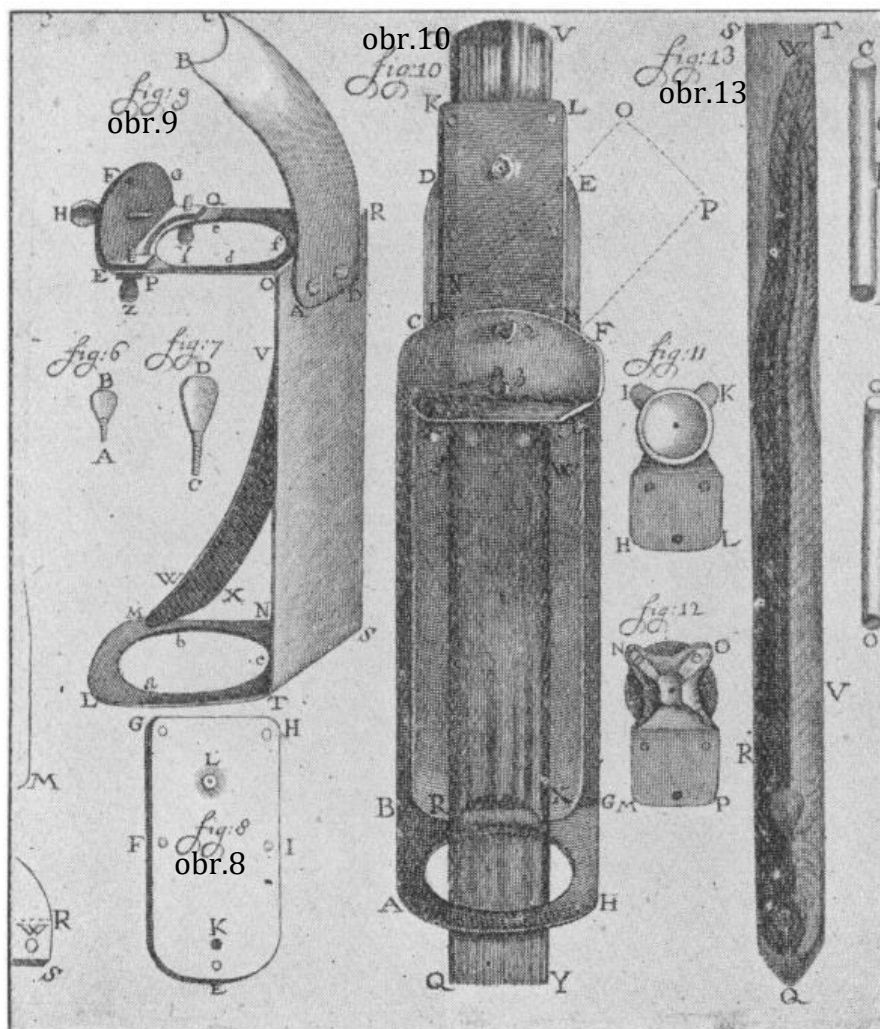
V 16. století stále více rostl zájem o poznání ve vědecké oblasti. Všestranný génius Leonardo da Vinci (1452–1519) již zkoumal některé účinky konkávních a konvexních skel. Dále některé optické vlastnosti čoček vyslovil Francesco Maurolico (1494–1575), matematik a astronom ze Sicílie, a později i Kepler (1571–1630). Nejstarší mikroskopy se skládaly z krátké trubice z neprůhledného materiálu



Obr. 1: Kircherovo schéma jednoduchého mikroskopu. Zkoumaný předmět je na skleněné desce (C) a osvětlen svíčkou (D) (Singer, 1914, str. 250).

s čočkou na jednom konci a z ploché skleněné desky na druhém konci, na kterou byl umístěn zkoumaný předmět (obr. 1). Často se využívaly pro pozorování drobného hmyzu. Tento typ mikroskopu byl po roce 1663 běžně využíván v Holandsku.

Byl to však Antony van Leeuwenhoek, kdo zdokonalil tyto nástroje. Přinesl mimořádnou zručnost v broušení a leštění čoček s krátkou ohniskovou vzdáleností. Leeuwenhoekův úspěch byl z velké části způsoben nejen jeho metodou broušení, ale také dovedností, se kterou nasazoval své čočky, které byly přesně umístěny do nepatrného otvoru v kovové desce. Zkoumaný předmět byl pevně uchycen ve stojanu a seřízen šroubem k desce (viz obr. 2). Tímto způsobem s pomocí dutých kovových reflektorů se mu podařilo využít procházejícího světla průhlednými předměty.



Obr. 2: Leeuwenhoekův mikroskop. Skládá se pouze z kovového plátu (detail v obr. 8) proraženého malým otvorem, do kterého je nasazena čočka (L). Tato deska pasuje na rám (podrobně obr. 9), do kterého se umístí trubice (obr. 13) obsahující např. malého živého úhoře. Seřizovacím šroubem lze zaostřit ocas úhoře a prozkoumat kapilární oběh. Zařízení je smontováno v detailu na obr. 10 (Singer, 1914, str. 252, upraveno).

S těmito nástroji Leeuwenhoek udělal obrovský pokrok. Vířníky (kmen sladkovodních živočichů, menších než 0,5 mm) viděl snadno a v roce 1683 rozlišil dokonce bakterie (desítky až desetiny mikrometrů). Leeuwenhoekovy výzkumy představují vrchol „práce“ provedené pomocí jednoduchého mikroskopu. Další mikroskopické práce byly prováděny již se složeným mikroskopem (Singer, 1914).

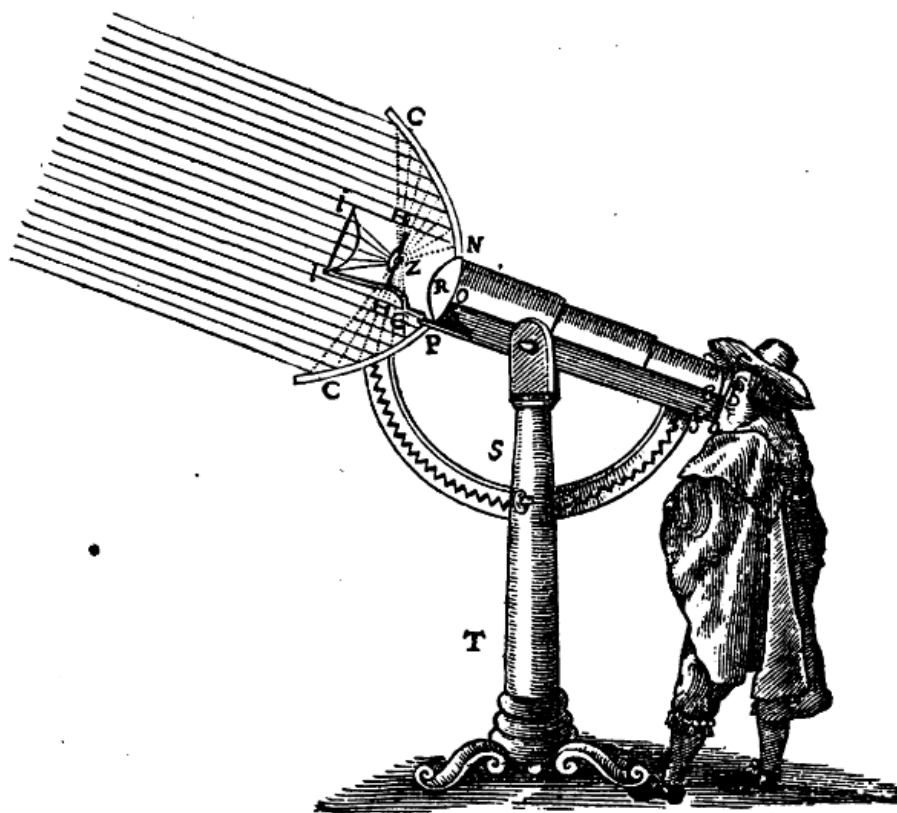
1.2 Složený mikroskop

Nejstarší historie složeného mikroskopu je neoddelitelně spojena s historií dalekohledu. Ponecháme-li stranou určitá neověřitelná tvrzení, pravděpodobně prvním, kdo navrhl možnost využití systému čoček za účelem zjevného přiblížení vzdáleného objektu, byl anglický matematik Leonard Digges (zemřel 1571). Zdá se, že Diggesův systém byl v kombinaci s dírkovou komorou (camera obscura), bohužel jeho detailnější popis nebyl nikdy zveřejněn.

Praktickou aplikaci kombinace dvou čoček do mikroskopu nebo dalekohledu provedl Holanďan Zacharias Jansen. Narodil se v Middelburgu v Holandsku asi v roce 1580 a kolem roku 1590, když byl ještě chlapec a pracoval v obchodě svého otce, který vyráběl brýle, náhodou objevil princip dalekohledu tím, že dal dvě čočky k sobě do trubice.

Nicméně skutečná práce na uvedení do povědomí vědeckého světa spočívala na Galileovi. Galileův spis „Sidereus Nuncius“ (čili Hvězdný posel) obsahuje mj. první hrubý nástin dráhy paprsků světla v dvoučočkové soustavě, jejíž teorii jasněji vyjádřil Johannes Kepler v roce 1611. I když významný podíl na vynálezu složeného mikroskopu mají Galileo a Kepler, nelze opomenout práci Willebrorda Snella van Royena (1581–1626) o odrazu a lomu světla a jeho vyslovení „sinusového zákona“ kolem roku 1620.

Zvláštní a odchylná forma složeného mikroskopu byla popsána v roce 1637 filozofem Descartem v jeho díle „Optika“. Tento přístroj, který byl ve skutečnosti upraveným dalekohledem, sestával z nastavitelného tubusu nesoucího dvě čočky (obr. 3). Okulár byl plankonkávní (ploskodutý), zatímco dvojitý konvexní objektiv byl namontován ve středu konkávního zrcadla přizpůsobeného ke koncentraci paralelních paprsků na objekt. Paprsky byly na objekt koncentrovány i pomocí druhé plankonvexní (ploskovypuklé) čočky umístěné v přímé linii světla na způsob moderního kondenzoru. Zařízení je nešikovné a nezdá se, že by si někdy získalo popularitu, i když zvyk umisťovat objektiv do středu konkávní odrazné plochy byl dočasně obnoven v 18. století.



Obr. 3: Descartův upravený dalekohled. Z jeho eseje „Optika“, 1637 (Singer, 1914, str. 263).

Prvním, kdo zřejmě nejlépe pochopil principy složeného mikroskopu a kdo si uvědomil účinek řady kombinovaných čoček, byl Eustachio Divini, který v roce 1663 používal kombinaci šesti čoček. Zatímco Johannes Zahn v roce 1685 dobře ilustruje dráhu světelných paprsků v přístroji ze čtyř čoček. Po tomto datu složené mikroskopy získávaly na popularitě a poté, co Newton ukázal teoretickou možnost achromatického nástroje (koriguje barevnou vadu), byla zaváděna řada vylepšení (Singer, 1914).

Na přelomu 18. století si David Gregory (1661–1708), přítel Sira Isaaca Newtona (1642–1727), všiml, že různé druhy skla rozložily barevné spektrum v různém rozsahu. Gregory navrhl, že by se dala vytvořit kombinace dvou druhů skel, u které by nedocházelo k žádnému rozkladu spektra. První komerční achromatické objektivy se objevily v roce 1824 a byly francouzské výroby. Achromatické objektivy byly během 19. století rychle zdokonalovány. Díky nim se zvýšilo rozlišení mikroskopu, ale snížil se kontrast. Během dalších sta let bylo rozlišení dále vylepšeno pomocí apochromatického objektivu.

Až do počátku 19. století se mělo za to, že samotné zdokonalování čoček povede k rozlišení nekonečně malých struktur. Astronom George B. Airy (1801–1892) ale ukázal, že světlo z hvězdy nebude nikdy soustředěno do jednoho bodu, ale pouze do prstence. Proto v mikroskopii musí také existovat omezující úhlová vzdálenost

mezi samostatně svítícími objekty tak, abychom je od sebe mohli rozlišit. Tento úhel by závisel na poloměru čočky a vlnové délce světla. V roce 1873 Ernest Abbe (1840–1905) dospěl v podstatě ke stejnému závěru, čímž dal konceptu numerické apertury praktický význam (viz kapitola 2.3.1).

Na začátku 20. století již měly mikroskopy rozlišovací schopnosti pro pozorování přirozených struktur, jako jsou např. rozsivky nebo šupiny křídel motýlů a poté i umělých vláken (Rochow, a další, 1994).

2 Světelná mikroskopie

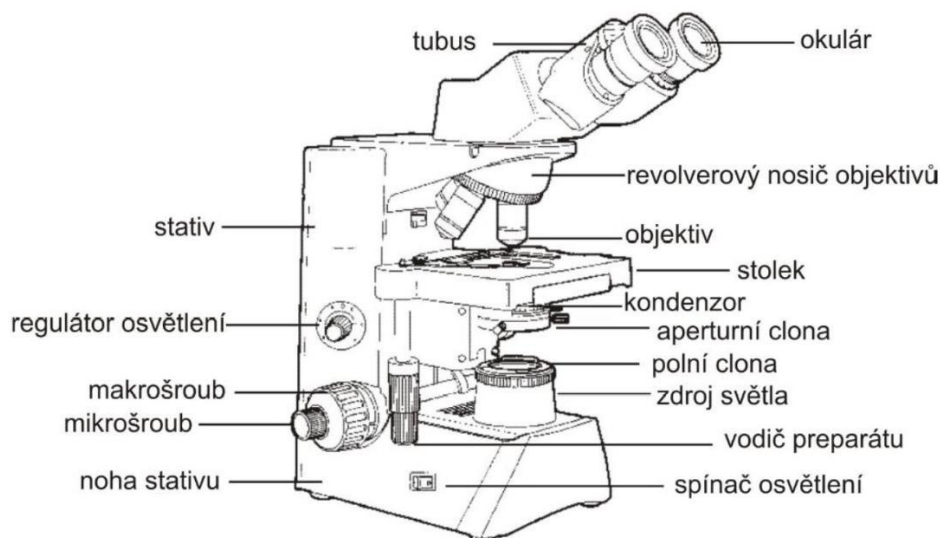
Způsoby mikroskopického zobrazování se rozlišují na základě druhu záření procházejícího do objektu nebo podle způsobu uspořádání optické soustavy. Mikroskopické metody můžeme rozdělit do následujících kategorií:

1. Světelná (optická) mikroskopie
 - 1.1. Metoda procházejícího světla
 - 1.2. Metoda tmavého pole
 - 1.3. Metoda fázového kontrastu
 - 1.4. Polarizační mikroskopie
 - 1.5. Fluorescenční mikroskopie
 - 1.6. Konfokální mikroskopie
2. Elektronová mikroskopie
 - 2.1. Transmisní mikroskopie
 - 2.2. Skenovací elektronová mikroskopie (Gajghate, 2017)

2.1 Základy světelné mikroskopie

Světelná mikroskopie se řídí zákony geometrické optiky. Světlo je část elektromagnetického záření o rozsahu vlnových délek 400–760 nm. Vlnění je charakterizováno amplitudou, vlnovou délkou (frekvencí), fází a šíří se ve vlnoplochách (množina bodů se stejnou fází). Platí Huygensův princip, kdy každá vlna se stává zdrojem nekonečně mnoha elementárních vlnoploch. Při setkání dvou či více vln vzniká interference, vytvářená vektorovým součtem okamžitých amplitud vlnění. Zákony geometrické optiky lze odvodit z Fermatova principu – světlo se šíří z jednoho bodu do druhého po takové dráze, že doba potřebná k proběhnutí této dráhy nabývá nejmenší hodnotu. Optické přístroje jsou založeny především na zákonu odrazu a lomu světelných paprsků.

Mikroskop se skládá z části optické a mechanické. Optickou část tvoří okulár, objektiv, osvětlovací soustava a mechanickou tvoří tubus a jeho nosič, revolverové zařízení, křížový stolek s pérovými svorkami, makrometrický a mikrometrický šroub (Smékal, 1995).



Obr. 4: Části optického mikroskopu.

(http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/1_BUBCV_2018.pdf, str.3)

2.2 Rozlišení a zvětšení optického mikroskopu

Rozlišení optického mikroskopu má své limity dané fyzikálními principy. Nejprve uvedeme rozlišovací mez lidského oka. Vzdálenost mezi dvěma body, které je lidské oko schopné rozlišit, se nazývá zrková ostrost. Mění se přímo se vzdáleností mezi objektem a okem. Konvenční zrková vzdálenost, při které je oko schopné bez větších problémů pozorovat drobné předměty, je 25 cm. V této vzdálenosti dokáže oko rozlišit dva body, které jsou od sebe 0,15 mm (Rochow, a další, 1994).

Celkové zvětšení mikroskopu je dáno vztahem

$$\Gamma = \beta_{OB} \cdot \Gamma_{OK}, \quad (2.1)$$

kde

$$\beta_{OB} = \frac{\Delta t}{f'_{OB}} \quad (2.2)$$

je příčné zvětšení objektivu, a

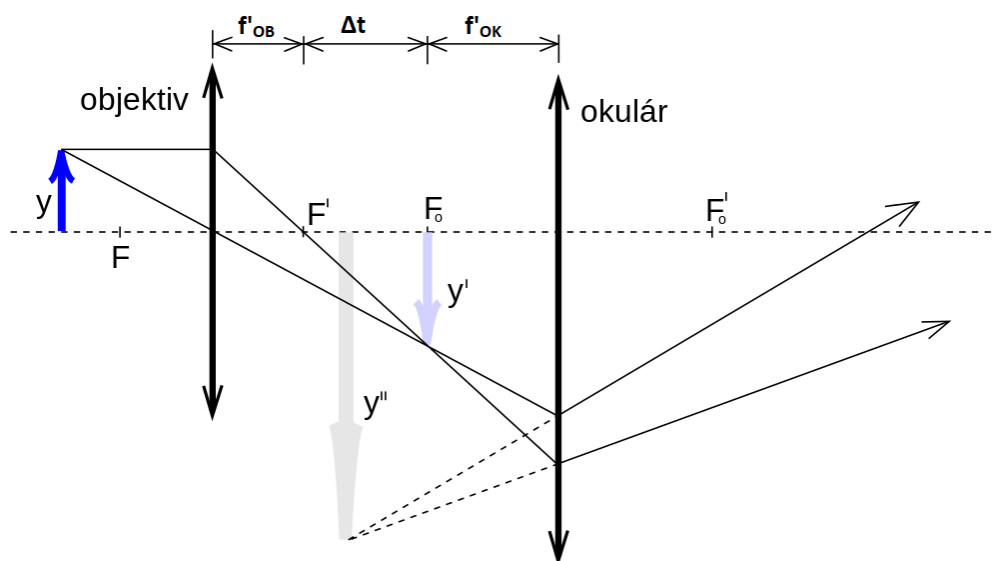
$$\Gamma_{OK} = \frac{L}{f'_{OK}} \quad (2.3)$$

je úhlové zvětšení okuláru, přičemž

Δt je optický interval

L je zrková konvenční vzdálenost (250 mm)

f'_{OK}, f'_{OB} jsou obrazové ohniskové vzdálenosti okuláru a objektivu (Smékal, 1995).



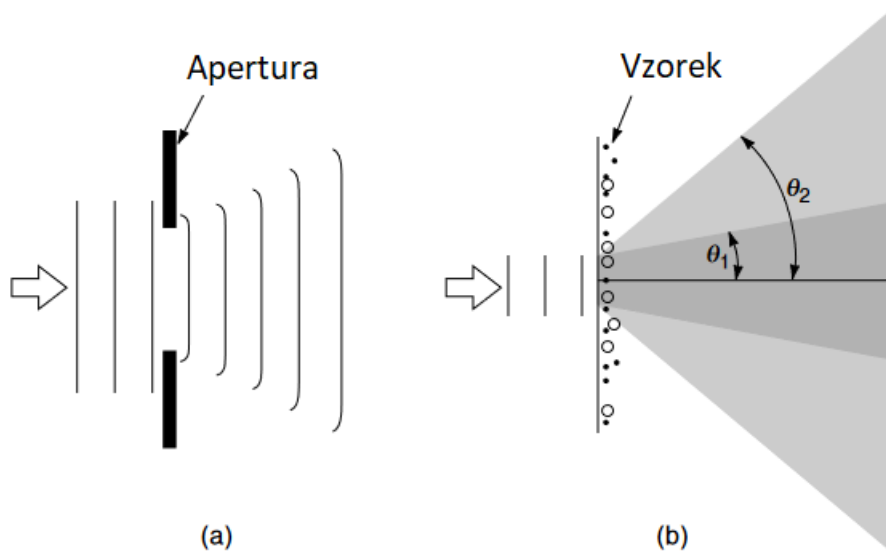
Obr. 5: Schéma optického zobrazování mikroskopem; y je výška předmětu, y' výška obrazu vytvořeného objektivem, y'' výška celkového obrazu předmětu, F a F_o jsou předmětová ohniska objektivu a okuláru, F' a F'_o pak obrazová ohniska objektivu a okuláru, f'_{OB} a f'_{OK} obrazové ohniskové vzdálenosti objektivu a okuláru, Δt je optický interval (https://www.wikiskripta.eu/w/Optick%C3%BD_mikroskop, upraveno).

2.3 Rozlišovací schopnost

Na rozlišovací schopnost klademe v mikroskopii větší důraz než na zvětšení. Výše jsme uváděli limity lidského oka. Ve schopnosti rozlišovat jemné detaily v optické soustavě mikroskopu je rozhodující objektiv. Okulár zobrazí obraz vytvořený objektivem, tzn. sám nepřispívá k rozlišení dalších detailů (Hejtmánek, 2001), (Smékal, 1995).

Na rozlišovací mez mikroskopu má vliv ohyb (difrakce) a interference světla, numerická apertura a také kondenzor a vady čoček. Difrakce je šíření světla, ke kterému dochází, když paprsek světla interaguje s předmětem. V závislosti na okolnostech a typu vzorku je ohybové světlo vnímáno různými způsoby. Pokud je např. paprsek světla nasměrován na okraj předmětu, zdá se, že se světlo ohýbá kolem předmětu do jeho geometrického stínu, což je oblast, kterou paprsek přímo neosvětluje (obr. 6–a). Zvláště zajímavý je obraz bodového zdroje světla v mikroskopu, protože obrazy se skládají z nespočetného množství překrývajících se bodů. Vlny vycházející z bodu v rovině objektu se ohýbají na okrajích čočky objektivu, což způsobuje, že obraz bodu vypadá jako skvrna. Obraz bodu v mikroskopu tedy vůbec není bod, ale difrakční obrazec. Kvůli difrakci obraz předmětu nikdy dokonale ne-

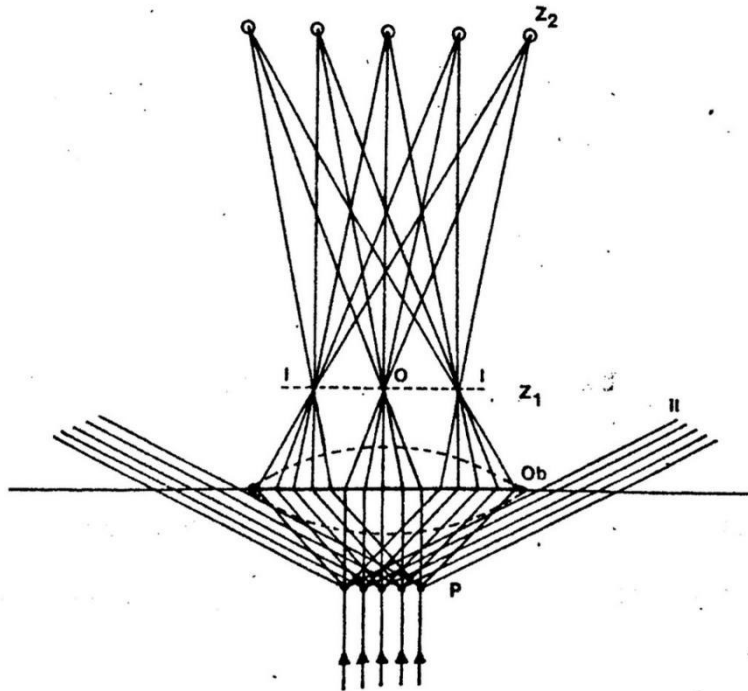
reprezentuje skutečný objekt a existuje spodní hranice, pod kterou optický systém nedokáže rozlišit strukturální detaily. Difrakci můžeme také pozorovat, když paprsek světla osvětlí sklíčko mikroskopu pokryté jemným prachem či škrábanci (obr. 6–b). Velikost rozptylu a úhel šíření paprsku závisí na velikosti a hustotě částic ohýbajících světlo. V případě osvětlených vzorků v mikroskopu existují dvě primární místa difrakce: jedno ve vzorku samotném a druhé v otvoru čočky objektivu. Pokud světlo prochází objektem, ale neabsorbuje se ani se neohýbá, zůstává neviditelné (Murphy, 2001).



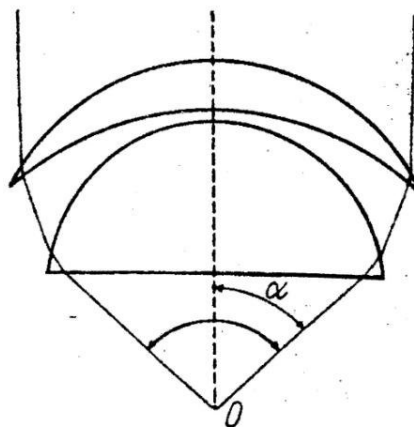
Obr. 6: Difrakce na apertuře (otvor) a na substrátu obsahujícím jemné částice. (a) Elektrické pole rovinné vlnoplochy se při průchodu aperturou ruší difrakcí. (b) Substrát obsahující vrstvu směsi jemných částic (průměr 0,2 a 2 μm) ohýbá dopadající rovinnou vlnoplochu do rozptýlených paprsků, které se rozbíhají pod různými úhly. Úhel šíření θ je nepřímo úměrný velikosti částic (Murphy, 2001, str. 63).

Difrakce popisuje rozptyl světla objektem do divergentních vln, interference pak rekombinaci a sčítání dvou nebo více superponovaných vln. Pokud budeme uvažovat preparát jako rovinnou optickou mřížku, při průchodu světla mřížkou nastane interference světla (obr. 7) a vznikají maxima a minima. Superpozicí svazků ohybových maxim vzniká obraz každého bodu preparátu a je tím kvalitnější, čím více ohybových maxim se na jeho vzniku účastní. Maxima se od maxima nultého řádu odklánějí o daný úhel. Procházejí objektivem pouze pokud je otvor objektivu při zaostření dostatečně velký, aby došlo k zachycení kuželu paprsků obsahující maxima alespoň prvního řádu. Čím je tento tzv. aperturní úhel (obr. 8) větší, tím jsou do objektivu zachyceny paprsky vyšších ohybových řádů a tím je objektiv schopen rozlišit jemnější detaily preparátu, tj. mikroskop má lepší rozlišovací schopnost. Aperturní úhel je maximální úhel odklonu dvou protilehlých krajních

paprsků od optické soustavy, při kterém ještě vstupují do zaostřeného objektivu z bodu na optické ose. Aby bylo dosaženo co největšího aperturního úhlu, je první čočka složeného objektivu plankonvexní. Nejmenší vzdálenost dvou bodů předmětu, které jsou v obraze ještě rozlišitelné, nazýváme rozlišovací mez (Smékal, 1995).



Obr. 7: Vznik ohybových maxim (Smékal, 1995, str. 19).



Obr. 8: Aperturní úhel (Smékal, 1995, str. 20).

2.3.1 Abbého kritérium rozlišitelnosti

Ernst Abbe (obr. 9) pozoroval, že ohybové světlo ze vzorku vytváří difrakční obrazec objektu v zadní ohniskové rovině (difrakční rovině) čočky objektivu. Podle Abbého teorie, interference mezi difraktovanými paprsky 0. a vyššího řádu v rovině obrazu generuje kontrast obrazu a určuje limit prostorového rozlišení, které může objektiv poskytnout. Pro vytvoření obrazu je třeba, aby objektiv zachytil světlo



Obr. 9: Ernst Abbe, 1840–1905 (Murphy, 2001, str. 78).

z alespoň dvou řádů difrakce. Pokud je čočkou zachycováno světlo pouze jednoho difrakčního řádu (pouze 0. řádu), nedochází k interferenci a nevytváří se žádný obraz. Pokud rozšíříme tyto úvahy, čím větší je počet řádků difrakce zachycených objektivem, tím ostřejší a lépe rozlišené jsou detaily v obrazu (Murphy, 2001).

Budeme uvažovat vzorek ve tvaru optické mřížky kolmé k optické ose (obr. 10). V obrazové ohniskové rovině objektivu vzniká primární ohybový obraz. Interferenční maximum v P' vzniká tehdy, je-li dráhový rozdíl paprsků vycházejících ze sousedních štěrbin 1 a 2, vzdálených d (mřížková konstanta), roven celočíselnému násobku vlnové délky použitého světla. Tedy platí-li

$$\delta = n \cdot d \cdot \sin \alpha = k \cdot \lambda, \quad (2.4)$$

kde n je index lomu, α je aperturní úhel, k je řád maxima.

Dle Abbého kritéria je pak rozlišovací mez

$$d_{min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{A}, \quad (2.5)$$

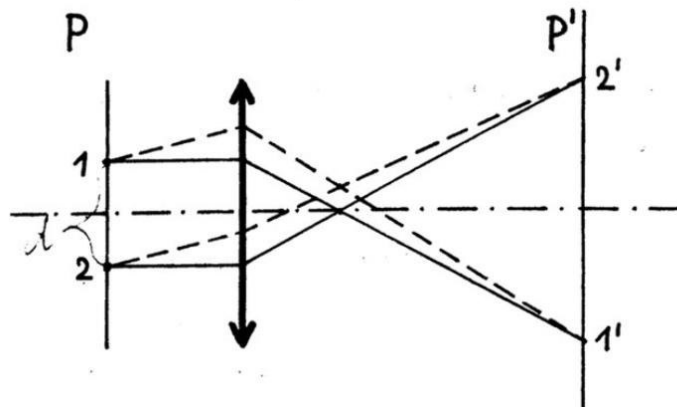
kde definujeme numerickou (číslnou) aperturu vztahem

$$A = n \cdot \sin \alpha , \quad (2.6)$$

Rozlišovací schopnost mikroskopu je

$$R = \frac{1}{d_{min}} = \frac{A}{\lambda} , \quad (2.7)$$

a je tedy přímo úměrná numerické apertuře jeho objektivu při dané vlnové délce použitého světla a je nepřímo úměrná vlnové délce při konstantní numerické apertuře. Zvýšení rozlišovací schopnosti můžeme tedy provést zvětšením numerické apertury (zvětším aperturního úhlu, zvětšením indexu lomu) nebo zmenšením vlnové délky, např. užitím UV záření. Z Abbého teorie také vyplývá, že užitečné zvětšení mikroskopu je $\leq 1000 A$ a rozlišovací schopnost pak $0,25 \mu\text{m}$ (Smékal, 1995).



Obr. 10: K Abbého kritériu (Smékal, 1995, str. 21).

2.4 Metoda procházejícího světla a tmavého pole

2.4.1 Historie

Až do roku 1880 byly prakticky všechny mikroskopy využívající viditelné světlo procházející vzorkem bez kondenzorů, které byly později zavedeny ze dvou důvodů: rostoucí význam bakteriologie a dostupnost Abbeho kondenzoru vyráběného firmou Zeiss. Žhavicí vlákno jako zdroj světla se zaostřuje nerovnoměrně, takové osvětlení může být oslňující. V roce 1893 August Kohler publikoval článek obhajující zaostření zdroje světla, jako je žárovka, ve vstupní rovině kondenzoru. Manipulace s clonou také řídí velikost osvětleného pole podle používaného objektivu, čímž se vyloučí oslnění.

Uvádí se, že Leeuwenhoek někdy používal osvětlení tmavého pole, ale není to jisté. Dvě století po Leeuwenhoekovi použil Lister (v roce 1830) mikroskopii v tmavém poli k využití světla rozptýleného povrchy a dalšími nerovnostmi. Speciální kon-

denzory v tmavém poli pro objektivu s vyšším výkonem dal k dispozici Francis H. Wenham (1823–1908), který použil paraboloidní kondenzor a centrální zarážku k vytvoření dutého kužele světla nasměrovaného mimo úhlový kužel objektivu (Rochow, a další, 1994).

2.4.2 Základní fyzikální princip

Metoda světlého pole je úvodní metodou optické mikroskopie. Jedná se o soustavu dvou spojných čoček, která vytváří obraz zvětšený, skutečný a převrácený. Pozorovaný objekt má světlé pozadí a tmavé obrysy.

Podmínky tmavého pole se získají nasvícením preparátu pod šikmým úhlem tak, aby přímé, nedifraktované paprsky nebyly zachycovány čočkou objektivu. Tmavého pole lze rychle dosáhnout pomocí optiky světlého pole otočením hlavy kondenzoru tak, aby paprsky osvětlovaly preparát šikmo. Objektiv zachytí pouze ohýbané světlo ze vzorku a přímé vlny procházejí nezachycené na jednu stranu čočky. Nevýhodou je, že jednosměrné osvětlení vysoce lámavých předmětů může způsobit velké množství odlesků. Při použití objektivů vysokých číselných apertur, zejména imerzních objektivů, je nutné použít imerzní kardioidní kondenzory, jejichž přední čočka se spojuje se spodní stranou preparátu imerzním olejem (Murphy, 2001).

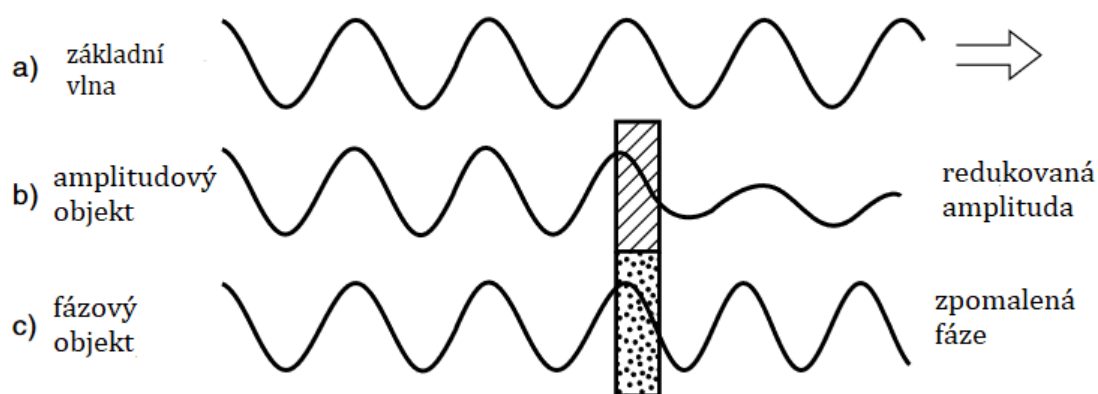
2.5 Metoda fázového kontrastu

2.5.1 Historie

Ve 30. letech 20. století Frits Zernike, holandský fyzik na univerzitě v Groningenu, vytvořil optickou soustavu, která mohla transformovat fázové rozdíly v rozdíly amplitudové. Vývoj optiky s fázovým kontrastem je skvělým příkladem toho, jak základní výzkum v teoretické optice vedl k praktickému řešení pozorování neobarvených průhledných předmětů ve světelném mikroskopu. Za svůj vynález a teorii tvorby obrazu získal Zernike Nobelovu cenu za fyziku v roce 1953.

2.5.2 Základní fyzikální princip

V případě obarvených histologických preparátů nebo vzorků s přirozeně se vyskytujícími pigmenty jsou specifické vlnové délky absorbovány barvivy nebo pigmenty, což umožňuje, aby se předměty při osvětlení bílým světlem jevíly barevně. Při monochromatickém osvětlení pomocí barevného filtru doplňujícího barvu vzorku, např. modrý objekt zkoumaný žlutým filtrem, je amplituda paprsků objektu výrazně snížena, což vede k vysoce kontrastnímu obrazu. Takové objekty se nazývají amplitudové, protože přímo vytvářejí rozdíly amplitud v obraze, které jsou okem detekovány jako rozdíly v intenzitě (obr. 11). Ačkoli většina průhledných biologických vzorků světlo neabsorbují, ohýbají světlo a způsobují fázový posun v paprscích světla, které jimi procházejí; proto se jim říká fázové objekty. Mikroskopy s fázovým kontrastem se vyznačují optikou, která transformuje rozdíly ve fázi vln ohybu objektu na rozdíly v obraze, takže objekty vypadají, jako by byly opticky obarveny (Murphy, 2001).



Obr. 11: Efekt amplitudy a fáze objektu na světelnou vlnu. (a) Referenční vlna s charakteristickou amplitudou, vlnovou délkou a fází. (b) Amplitudový objekt absorbuje energii a snižuje amplitudu, ale nemění fázi vznikajícího paprsku. (c) Fázový objekt mění rychlost a posouvá fázi, ale ne amplitudu, vznikajícího paprsku (Murphy, 2001, str. 99, upraveno).

2.6 Polarizační mikroskopie

2.6.1 Historie

Polarizátor a analyzátor se používají jako pár v polarimetru ke studiu optické aktivity kapalin nebo v polariskopu ke studiu optických vlastností pevných látek. Louis Pasteur (1822–1895) použil tento pár se svým mikroskopem na vinných kyselinách a jejich solích a objevil tak novou třídu chemických izomerů.

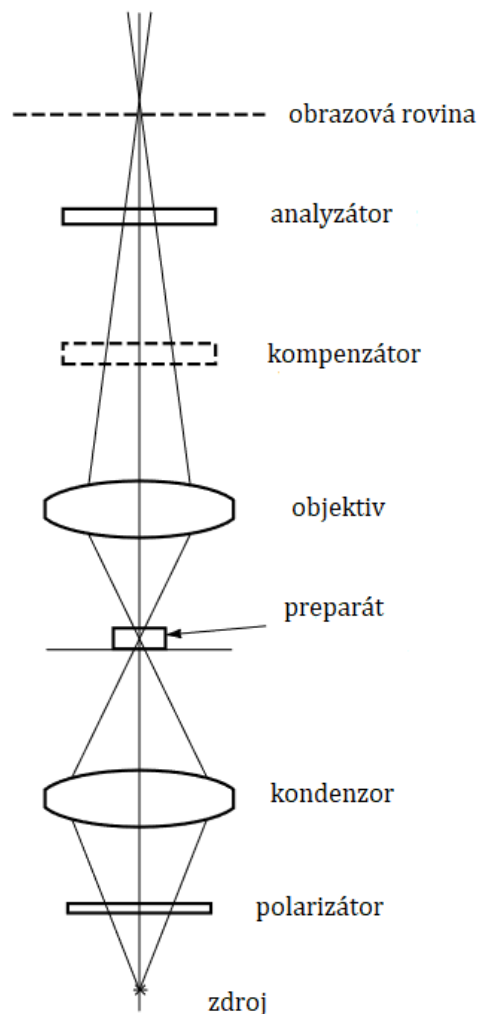
V roce 1932 Edwin H. Land vynalezl polarizační fólii Polaroid, která nahradila kalcit jako polarizátor a analyzátor v moderních mikroskopech s polarizovaným světlem, používaných v petrografii, chemii, metalografii a dnes hlavně v biologii. Mezi mnoho Landových vynálezů patří fotosenzitivní film Polaroid a také fotoaparát. Ty ovlivnily nejen světelnou mikroskopii, ale i všechny ostatní mikroskopie (Rochow, a další, 1994).

2.6.2 Základní fyzikální princip

Polarizační mikroskop je složený mikroskop vybavený polarizátorem a analyzátozem a pokud je potřeba také kompenzátozem. Polarizátor je umístěn mezi světelným zdrojem a preparátem, obvykle blízko předního otvoru kondenzoru; analyzátor je mezi preparátem a okem, běžně v určité vzdálenosti za zadní clonou objektivu (obr. 12). Kompenzátor (někdy též retardér) je dvojlomná deska, která se používá k měření rozdílů optických drah a ke zlepšení viditelnosti. Tvorba obrazu v polarizačním mikroskopu je založena na schopnosti polarizace světla, kdy zkoumaný preparát vykazuje optickou aktivitu a je schopen stáčet rovinu polarizovaného světla. Odchytky vln polarizovaného světla uspořádaných molekul objektu vedou k fázovým zpožděním mezi vzorkovacími paprsky, což umožňuje změny amplitudy v rovině obrazu závislé na interferenci. Tvorba obrazu je tedy založena

na principech difrakce, interference, ale také na existenci molekulárního uspořádání.

V polarizačním mikroskopu se struktury obecně jeví jako jasné na tmavém pozadí. Tato technika byla využita ke studiu mnoha uspořádaných buněčných struktur jako jsou např. aktinová a myozinová vlákna v myofibrilách příčně pruhovaného svalstva, kondenzovaná DNA v jádrech spermií apod. Postupně byl však polarizační mikroskop vytlačen elektronovou mikroskopií (Murphy, 2001).



Obr. 12: Komponenty polarizačního mikroskopu (Murphy, 2001, str. 137, upraveno).

2.7 Fluorescenční mikroskopie

Na rozdíl od jiných forem světelné mikroskopie založených na vlastnostech absorpce světla, rozdílech optických drah, fázových gradientech a dvojlomu preparátu, umožňuje fluorescenční mikroskopie vizualizaci specifických molekul, které fluoreskují v přítomnosti excitačního světla. Pomocí této techniky lze studovat množství, intracelulární umístění a pohyb makromolekul, malých metabolitů a iontů. Nefluorescenční molekuly jsou označeny fluorescenčním barvivem nebo flu-

ochromem, aby byly viditelné. Díky velké specifičnosti a relativní jednoduchosti fluorescenční mikroskopie je dnes nejčastěji používaným způsobem světelné mikroskopie v biomedicínském výzkumu.

Fluorescence je emise fotonů atomy nebo molekulami, jejichž elektrony jsou přechodně stimulovány do vyššího excitačního stavu energií z vnějšího zdroje. Když fluorescenční molekula absorbuje foton příslušné vlnové délky, elektron je excitován do vyššího energetického stavu a téměř okamžitě se zhroutí zpět do svého počátečního stavu. V procesu energetického kolapsu může molekula uvolnit absorbovanou energii jako fluorescenční foton. Emitovaný fluorescenční foton typicky vykazuje nižší frekvenci vibrací a delší vlnovou délku než excitační foton, který byl absorbován. Během fluorescence probíhají absorpční a reemisní události téměř současně, což je interval mezi 10^{-9} – 10^{-12} sekundami. Perioda mezi buzením a emisí není okamžitá a trvá zlomky sekund až minut (Murphy, 2001).

2.8 Konfokální mikroskopie

Tlusté fluorescenční vzorky, např. tkáňové řezy, mohou představovat problémy pro konvenční širokoúhlou fluorescenční optiku, protože jasné fluorescenční signály z objektů mimo ohniskovou rovinu zvýrazňují pozadí a poskytují snímky s nízkým kontrastem. Konfokální mikroskopie řeší tento problém odmítnutím signálů z blízkých zdrojů nad a pod ohniskovou rovinou. Je toho dosaženo opticky osvětlením preparátu zaostřeným skenovacím laserovým paprskem (bodové skenování) a umístění dírkové apertury v rovině obrazu před elektronický fotonový detektor. Touto technikou lze zkoumat fluorescenční vzorky i reflexní povrchy (Murphy, 2001).

3 Elektronová mikroskopie

Elektronové mikroskopy jsou vědecké přístroje, které využívají oproti světelné mikroskopii paprsek elektronů emitovaných ve vakuu a elektromagnetické čočky. Předmět nelze vnímat našima očima přímo. Obraz vytvořený elektronovými mikroskopy je zobrazován CRT nebo rentgenovými deskami. Vlnové délky elektronů jsou o mnoho řádů menší než vlnové délky fotonů viditelného světla. Proto má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost – rozlišovací mez je 0,2 nm a může dosáhnout vyššího zvětšení (až 1 000 000 krát). Pro porovnání: rozlišovací mez světelných mikroskopů, jak jsme již uvedli, dosahuje 250 nm, rozlišovací mez lupy se zvětšením 10x je 0,025 mm a rozlišovací mez oka je 0,25 mm.

Existují 2 základní druhy elektronových mikroskopů, klasifikované podle toho, jak dochází k zobrazování detailů ve vzorku elektrony: přenosem, skenováním a emisí. Mezi elektronové mikroskopy řadíme transmisní (TEM) a rastrovací (SEM, z angl. scanning electron microscopy) mikroskopii (Gajghate, 2017), (Smékal, 1995), (Rochow, a další, 1994).

3.1 Historie elektronového mikroskopu

Dvě události ve 20. letech 20. století přinesly rozvoj elektronového mikroskopu. Jednou z nich bylo zjištění z de Broglieho teorie (1924), že částice mají vlnové vlastnosti a velmi krátké vlnové délky jsou spojeny s elektronovým paprskem o vysoké energii. Další událostí byla Buschova ukázka v letech 1926–1927, že vhodně tvarované magnetické pole lze použít jako čočku k vytvoření elektronových mikroskopů. Busch a Ernst Ruska zahájili studie elektromagnetických čoček v letech 1928–1929 a publikovali popis elektronového mikroskopu v roce 1932. V roce 1934 Ruska popsal konstrukci svého typu elektronového mikroskopu, který poprvé překonal rozlišení světelných mikroskopů. Ruska a von Borries společně navrhli a postavili praktický mikroskop pro společnost Siemens & Halske, ale druhá světová válka zabránila jeho prodeji a použití. Později v roce 1986 byla udělena Nobelova cena za fyziku společně Ruskovi za jeho průkopnickou práci a Heinrichu Rorerovi a Gerdu Binnigovi za následný vývoj rastrovacího tunelového elektronového mikroskopu.

V Anglii vyrobil Metropolitan Vickers v roce 1939 prototyp elektronového mikroskopu, který byl vyvinut do řady vylepšených modelů. Ve 40. letech 20. století společnosti ve Francii, Německu, Japonsku a dalších zemích vyvinuly a vyrobily tento typ mikroskopu, nyní známý jako rastrovací transmisní elektronový mikroskop (STEM).

Jedním z nejvýznamnějších praktických problémů bylo získání tenkých vzorků, pro dostatečnou propustnost elektronů. Ve vědě a biologii tak vývoj elektronové mikroskopie závisel především na odpovídajícím zdokonalení mikrotomie tak, aby vznikaly tenčí vzorky než jaké vyžaduje světelná mikroskopie (Rochow, a další, 1994).

3.2 Fyzikální základy

Princip elektronové optiky je založen na vlastnostech elektrických a magnetických polí zakřivovat dráhu elektronů (Smékal, 1995).

3.2.1 Elektronová optika

Elektronová optika má mnoho společného se světelnou optikou. Můžeme si představit jednotlivé elektrony opouštějící objekt a zaostřené do obrazu, obdobně jako fotony ve viditelném světle. Abychom získali ekvivalent konvexní čočky pro elektrony, je nutné, aby se velikost vychýlení zvyšovala s rostoucí odchylkou elektronového paprsku od optické osy. Pro takové zaostřování se nelze spoléhat na lom materiálu, jako je sklo, protože elektrony jsou silně rozptýleny a absorbovány brzy po vstupu do pevné látky. Místo toho využíváme elektrostatického náboje elektronu. Elektron je vychylován elektrickým polem. Případně můžeme využít toho, že se elektrony ve svazku pohybují; paprsek je proto ekvivalentní elektrickému proudu v drátu a může být vychýlen magnetickým polem (Egerton, 2005).

Charakter magnetických indukčních čar lze přirovnat k optickým vlastnostem zakřivených ploch skleněných čoček ve světelném mikroskopu. Proto hovoříme o magnetických, resp. elektrostatických či elektromagnetických čočkách v elektronovém mikroskopu. Nejjednodušší typy elektrostatických čoček jsou ve tvaru kruhových otvorů a dutých válců, další byly konstruovány ve tvaru kruhových elektrod a kruhových clon (např. imerzní elektrostatická čočka), nebo také jako tzv. elektronové dělo – katoda je z termoemisního wolframového vlákna ve tvaru písmene „V“. Rané elektronové mikroskopy používaly elektrostatické čočky, avšak moderní přístroje s elektronovým paprskem používají elektromagnetické čočky, které vyžadují vysokonapěťovou izolaci a mají nižší aberace (odchyšky) (Smékal, 1995), (Egerton, 2005).

K zaostření elektronového paprsku využívá elektromagnetická čočka magnetické pole vytvářené cívkou. Stejně jako v elektrostatickém případě by rovnoměrné pole (kolmo k paprsku) způsobilo výchylku, ale nedošlo by k zaostření. K tomu je potřeba pole s osovou symetrií. Takové pole je generováno krátkou cívkou, viz obr. 13. Při průchodu elektronu magnetickým polem síla, která na něj působí, mění velikost i směr – je tedy reprezentována vektorovou veličinou \vec{F} . Podle elektromagnetické teorie je

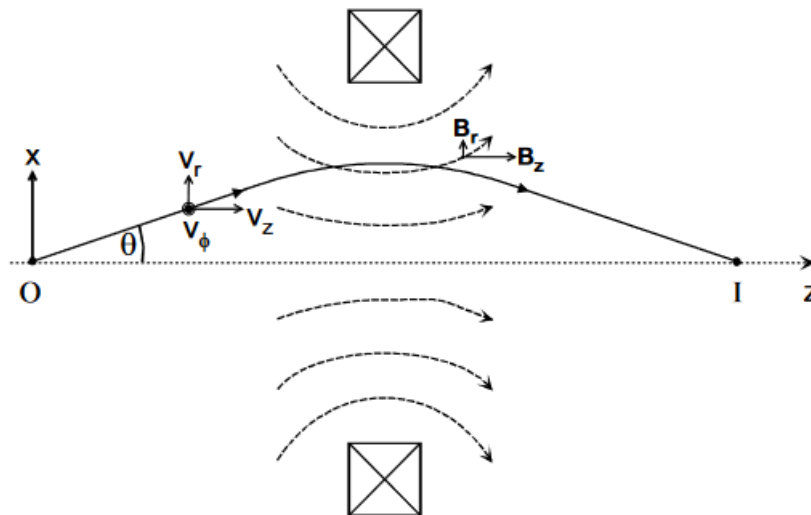
$$\vec{F} = -e(\vec{v} \times \vec{B}), \quad (3.1)$$

kde e je záporný náboj elektronu ($e = -1,602 \cdot 10^{-19}$), \vec{v} jeho vektor rychlosti a \vec{B} je magnetické pole, které představuje velikost magnetické indukce B a také směr. Vektorový operátor v rovnici 3.1 představuje dvě následující vlastnosti:

1. Směr \vec{F} je kolmý na \vec{v} i \vec{B} . V důsledku toho nemá \vec{F} žádnou složku ve směru pohybu, což znamená, že velikost rychlosti v zůstává po celou dobu konstantní. Ale protože směr \vec{B} (případně i \vec{v}) se neustále mění v prostoru, mění se i směr magnetické síly.
2. Velikost síly F je dána vztahem:

$$F = evB \sin \varepsilon, \quad (3.2)$$

kde ε je úhel mezi \vec{v} a \vec{B} . Pro pohyb elektronu v ose cívky jsou \vec{v} a \vec{B} v axiálním směru, tedy rovnoběžně (ve směru osy), což dává $\varepsilon = 0$ a $F = 0$ v každém bodě osy a nedochází tak k žádné odchylce dráhy paprsku od přímky. Proto je osou symetrie magnetického pole optická osa (Egerton, 2005).



Obr. 13: Magnetické indukční čáry vytvořené cívkou, zde v řezu, spolu s trajektorií elektronu z bodu „O“ do obrazového bodu „I“ (Egerton, 2005, str. 36).

3.2.2 Rozlišovací mez a zobrazovací schopnosti elektronového mikroskopu
 Kvalita obrazu preparátu a rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je závislá na kvalitě optické soustavy a použitého světelného zdroje, zatímco u elektronového mikroskopu závisí na kvalitě elektromagnetické soustavy, stabilitě napětí mezi anodou a katodou, stabilitě proudů budící elektromagnetické čočky a na kvalitě vakua v tubusu – vakuum potlačuje nebezpečí ionizace zbytkových plynů a výboje mezi anodou a katodou, a zvyšuje životnost zdroje elektronů.

Střední vlnová délka světelných svazků je 500 nm, vlnová délka urychlených elektronů je až $10^5 \times$ menší. Zvětšení elektronového mikroskopu je součinem zvětšení

všech zapojených magnetických čoček zobrazovacího systému mikroskopu (objektiv, projektiv, kondenzor, mezičočky). Hodnoty zvětšení jsou 50 krát u malého zvětšení a 1 000 000 krát u vysokého zvětšení.

Zobrazovací schopnosti elektronové mikroskopie spočívají ve fokusaci svazku elektronů elektromagnetickým polem a na vlnovém charakteru elektronů pohybujících se relativistickou rychlostí.

De Broglieho vlnová délka elektronu je

$$\lambda = \frac{h}{mv}, \quad (3.3)$$

kde h je Planckova konstanta, v je rychlost elektronu a m je relativistická hmotnost elektronu.

Elektrony urychlené napětím U získají kinetickou energii

$$E_k = mc^2 - m_0c^2 = eU, \quad (3.4)$$

kde c je rychlost světla ve vakuu, e je elektrický náboj elektronu a m_0 je klidová hmotnost elektronu.

Pro přibližný výpočet vlnové délky se známé hodnoty U [V] se v praxi užívá vztah

$$\lambda = \frac{1,226}{U^{1/2}}, \quad (3.5)$$

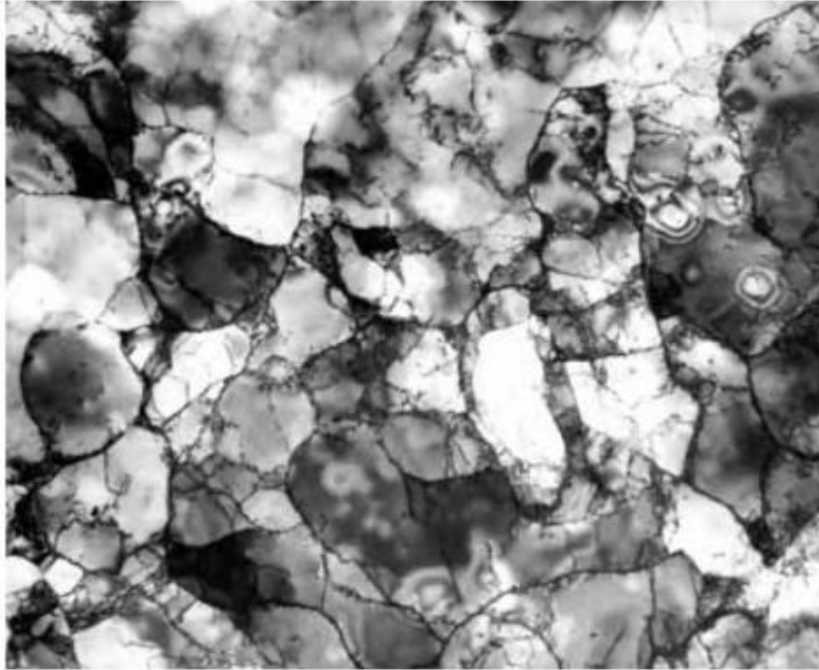
kde vlnová délka je udána v nanometrech, urychlovací napětí ve voltech (Smékal, 1995).

3.3 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Obraz je zde tvořen elektrony procházejícími tenkým vzorkem. TEM je projekční mikroskop i fotomikroskop. Protože elektronový obraz nemůže být viděn přímým okem, je obraz promítán na fluorescenční stínítko a když je připraven, je přenesen na fotografickou desku nebo film.

Paprsek volných elektronů emitovaných ve vakuu může být kondenzován elektromagnetickou (nebo elektrostatickou) čočkou na ještě menší bod na vzorku. Další elektronová čočka, objektiv, zaostřuje vysílaný paprsek na meziobraz, který je zvětšen čočkou projektoru tak, aby vytvořil obraz na fluorescenčním stínítku nebo fotocitlivém materiálu. Zdrojem elektronů je tzv. elektronové dělo umístěné v horní části tubusu mikroskopu. Na rozdíl od skenovacího elektronového mikroskopu, který mapuje povrch vzorku, TEM vzorek prosvěcuje a přináší informaci o jeho objemu (Rochow, a další, 1994).

TEM se ukázal jako neocenitelný pro zkoumání ultrastruktury kovů (např. krystalické defekty). S moderním TEM (rozlišení $\approx 0,2$ nm) je možné zobrazit jednotlivé atomové roviny nebo sloupce atomů. Stejně užitečný byl například v biologických vědách pro zkoumání rostlinných a živočišných tkání, bakterií a virů (Egerton, 2005).



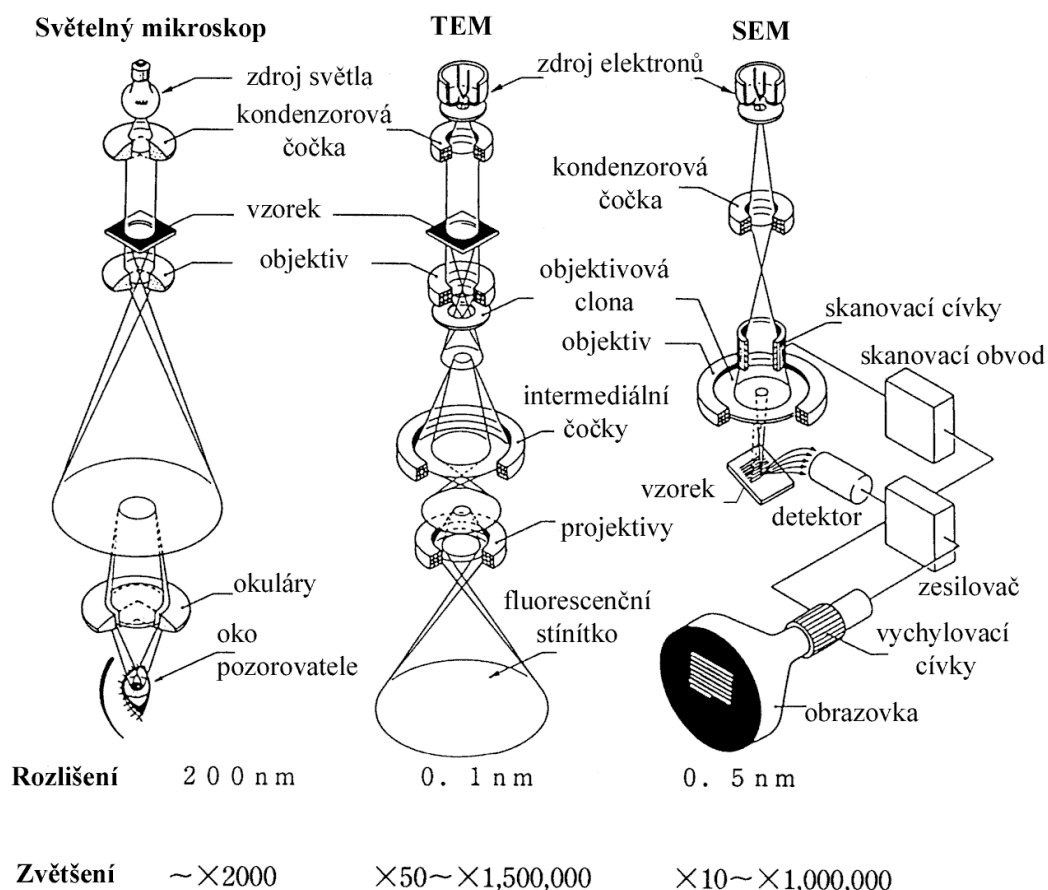
Obr. 14: TEM snímek polykrystalického hliníku. Jednotlivé krystality (zrna) se projevují různými úrovněmi jasu; dislokace jsou viditelné jako tmavé čáry v každém krystalitu. Kruhové proužky (vpravo nahoře) představují místní změny tloušťky vzorku (Egerton, 2005, str. 14).

3.4 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Jedním omezením TEM je to, že pokud není vzorek velmi tenký, elektrony jsou ve vzorku silně rozptýleny nebo absorbovány. Tento problém dal podnět k vývoji elektronových mikroskopů, které jsou schopny zkoumat relativně tlusté vzorky.

Tvorba obrazu v SEM využívá skenovací princip: primární elektrony jsou zaostřeny do elektronové sondy o malém průměru, která je skenována přes vzorek, přičemž se využívá toho, že elektrostatická nebo magnetická pole působící kolmo na paprsek, lze použít ke změně směru pohybu. Současným skenováním ve dvou na sebe kolmých směrech lze pokrýt čtvercovou nebo obdélníkovou oblast vzorku (známou jako rastr) a vytvořit obraz dané oblasti sběrem sekundárních elektronů z každého bodu vzorku.

Moderní SEM poskytuje rozlišení obrazu mezi 1 nm a 10 nm, čili ne tak dobré jako TEM, ale mnohem lepší než světelný mikroskop. Navíc snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu mají relativně velkou hloubku ostrosti (Egerton, 2005).



Obr. 15: Schéma mikroskopů (zleva světelného, TEM a SEM) (http://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/Mikroskopy.gif).

4 Mikroskopie skenující sondou

Mikroskopie skenující sondou využívá pohybu měřicí sondy nad povrchem vzorku v jeho těsné blízkosti (do vzdálenosti 100 nm). Díky takto malé vzdálenosti je možné dosáhnout lepších rozlišení než by u světla odpovídalo difrakční mezi. Mezi základní typy mikroskopů skenující sondou patří skenovací tunelový mikroskop (STM), mikroskop atomárních sil (AFM) a optická mikroskopie v blízkém poli (NSOM, z angl. Near Field Scanning Optical Microscopy) (Vůjtek, a další, 2012).

4.1 Historie

Rozlišení každého mikroskopu závisí na mezní vlnové délce konkrétního použitého záření. Elektronové mikroskopy mají vysokou rozlišovací schopnost, protože vlnové délky elektronových paprsků jsou velmi krátké, například 0,5 nm (5 Å) pro elektronový paprsek urychlený 60 000 V.

Elektronové paprsky stejně jako světlo projevují své částicové vlastnosti. V roce 1973 získal Brian Josephson podíl na Nobelově ceně za fyziku za vysvětlení tunelového jevu, který říká, že pokud se dva elektricky vodivé povrchy přiblíží dostatečně blízko k sobě, elektronové vlny (mračna) obklopující jejich atomy se překrývají. Pokud se mezi vodiče přivede malé napětí, elektrony tunelují z jednoho mraku do druhého. To platí, i když je napětí mnohem nižší, než vyžaduje klasická fyzika.

V polovině 70. let Heinrich Rohrer z laboratoře IBM v Curychu obrátil svou pozornost od fázových přechodů, kritických jevů a magnetických polí k elektrickým a mechanickým vrstvám velmi tenkých oxidů. On a jeho nový výzkumný asistent Gerd Binnig potřebovali vizualizovat nehomogenity v mnohem menším měřítku než mikrometry nebo dokonce nanometry. Koncem roku 1978 se zdálo přirozené použít tunelovací jev vytvořením ostrého hrotu a pokusem ve vakuu. Pokud by poloha hrotu mohla být přesně řízena a přesně naskenována po povrchu, mohli bychom získat podrobnou atomovou mapu. V polovině roku 1979 Rohrer a Binnig předložili svůj první patent na skenovací tunelový mikroskop (STM). V roce 1986 obdrželi Rohrer a Binnig Nobelovu cenu za fyziku (Rochow, a další, 1994).

Zobrazování s rozlišením v atomárním měřítku nebylo k dispozici až do roku 1986, kdy Binnig, Quate a Gerber vynalezli mikroskop atomárních sil (AFM) (Salapaka, a další, 2008). AFM (stejně jako STM) skenuje povrch pohybem hrotu v jedné linii, ale hrot je ve skutečném kontaktu s materiálem a snímá nepatrné síly mezi atomy. Původní AFM používal diamantový hrot připevněný na malé zlaté fóliové pružině (Rochow, a další, 1994).

4.2 Skenovací tunelový mikroskop

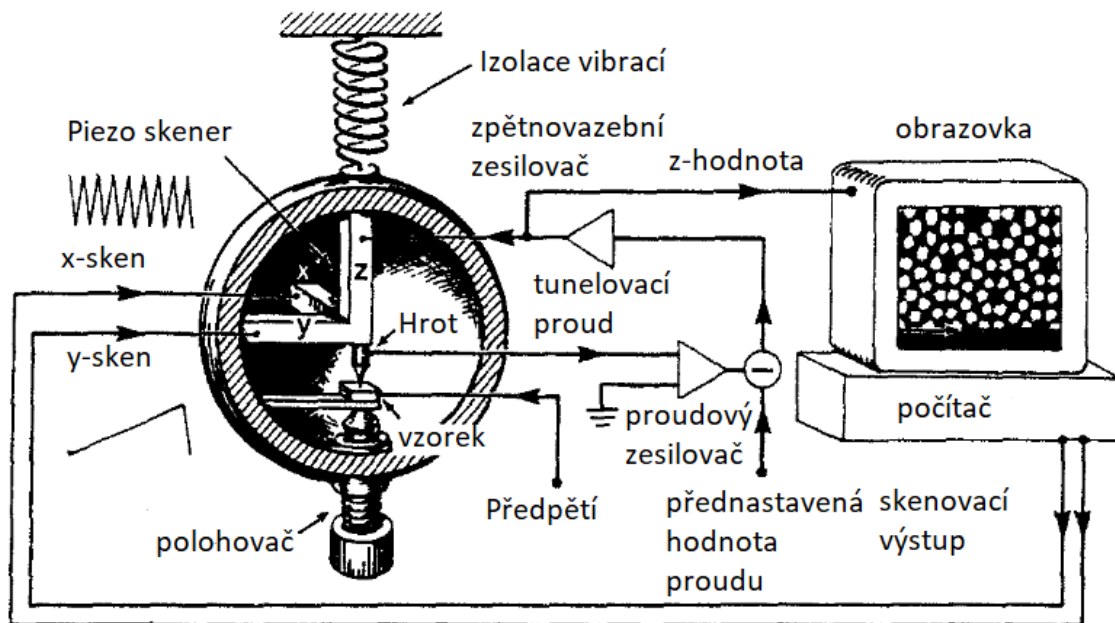
Navzdory svému koncepčně jednoduchému principu fungování dokáže skenovací tunelový mikroskop rozlišit struktury v atomárním měřítku v reálném prostoru

na prakticky jakémkoli druhu vodivého pevného povrchu v různých prostředích. V průběhu let se ukázalo, že STM je extrémně všestranná a výkonná technika pro mnoho disciplín ve fyzice kondenzovaných látek, chemii, materiálové vědě a biologii. Kromě toho lze STM použít jako nástroj pro výrobu v nanoměřítku či manipulaci s jednotlivými atomy a molekulami (Yao, a další, 2005).

4.2.1 Základní princip

V STM malý ostrý vodivý hrot skenuje povrch vzorku tak blízko, že může protékat takzvaný „tunelovací proud“. Pomocí tohoto proudu lze velmi přesně řídit vzdálenost mezi hrotem a povrchem. Proto je dosaženo vysokého rozlišení tak, že atomové uspořádání kovových povrchů lze „sondovat“ (Langfahl-Klabes, 2013).

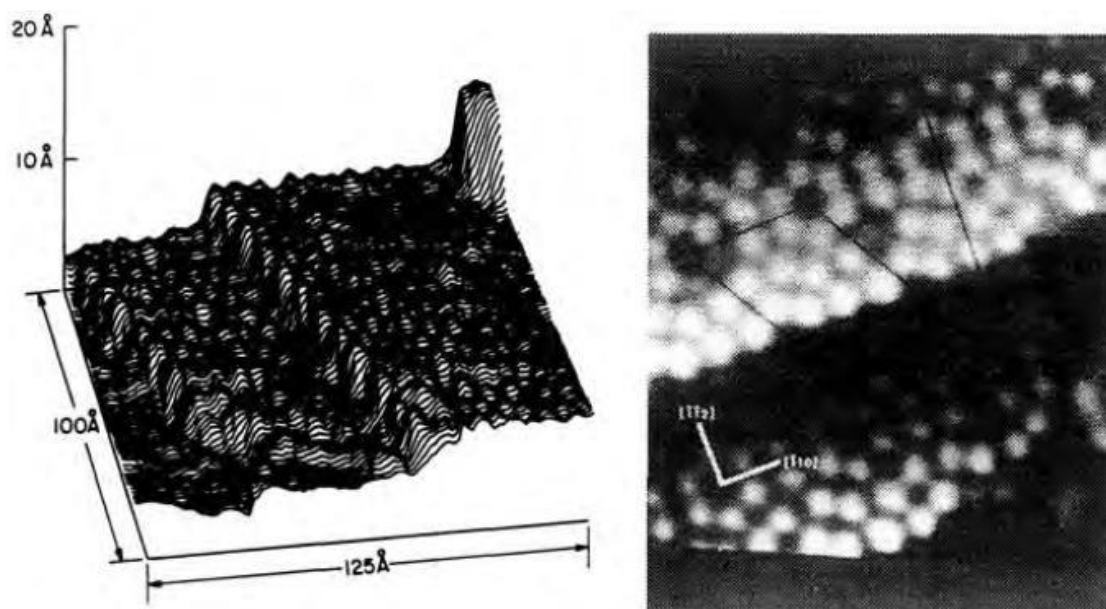
Hrot sondy, obvykle vyrobený ze slitiny wolframu nebo platiny a iridia, je připevněn k pohonu, který se skládá ze tří vzájemně kolmých piezoelektrických měničů: x-piezo, y-piezo a z-piezo. Po přivedení napětí se piezoelektrický měnič roztahuje nebo smršťuje. Pomocí polohovadla a z-piezo se hrot a vzorek přiblíží na několik angstromů ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$) od sebe. Elektronové vlnové funkce v hrotu překrývají elektronové vlnové funkce na povrchu vzorku. Předpětí, aplikované mezi hrot a vzorek, způsobí tok elektrického proudu. Takový proud je kvantově-mechanický jev a dochází k tunelovému jevu (Chen, 1993).



Obr. 16: Schematický diagram skenovacího tunelového mikroskopu (Chen, 1993, str. 1).

Tunelový proud je zesílen proudovým zesilovačem na napětí, které se porovnává s referenční hodnotou. Rozdíl je poté opět zesílen, aby bylo možné ovládat piezo-z. Fáze zesilovačů je zvolena tak, aby poskytovala zápornou zpětnou vazbu: pokud je tunelovací proud větší než referenční hodnota, pak napětí aplikované na piezo-z má tendenci stáhnout hrot z povrchu vzorku a naopak. Proto je prostřednictvím zpětnovazební smyčky ustavena rovnovážná poloha z. Jak hrot skenuje přes rovinu xy , uloží dvourozměrné pole rovnovážných z -poloh, představující obrysový graf povrchu stejného tunelového proudu.

Obrysový graf se zobrazí na obrazovce počítače buď jako řádkový snímek nebo jako snímek ve stupních šedi (obr. 17). Obraz čárového skenování je posloupnost křivek, z nichž každá představuje obrys ve směru x s konstantním směrem y . Křivky s různým y jsou posunuty vertikálně. Obraz ve stupních šedi je podobný černobílému televiznímu obrazu. Světlé body představují vysoké hodnoty (výčnělky) a tmavé body představují nízké hodnoty z (prohlubně).



Obr. 17: Obrázek s řádkovým skenováním a obrázek ve stupních šedi. Oba obrázky představují stejná data shromážděných STM na povrchu křemíku. Rozměry: 10 x 12,5 nm (Chen, 1993, str. 2).

Pro dosažení atomového rozlišení je nezbytná izolace vibrací. Existují dva způsoby, jak dosáhnout vhodného řešení. Prvním je, aby jednotka STM byla co nejpevnější. Druhým je snížení přenosu okolních vibrací na jednotku STM. Běžně používaný systém tlumení vibrací se skládá ze sady pružin a tlumícího mechanismu. Experimenty STM lze provádět v různých prostředích: ve vzduchu, v inertním plynu, ve vakuu nebo v kapalinách, včetně izolačních a kryogenních kapalin a elektrolytů. Provozní teplota se pohybuje od absolutní nuly ($-273,16\text{ }^{\circ}\text{C}$) do několika set stupňů Celsia (Chen, 1993).

4.2.2 Teorie STM

Jak již bylo zmíněno výše, při skenování vzorku vzniká tunelový proud. Tunelování je jev, který vychází z kvantové mechaniky. V klasické fyzice objekt narážející do nepropustné bariéry neprojde. Oproti tomu objekty s velmi malou hmotností, jako je elektron, mají vlnové charakteristiky, které umožňují takovou událost, označovanou jako tunelování. Uvnitř bariéry se vlnová funkce elektronu rozkládá exponenciálně (Langfahl-Klabes, 2013). Jinými slovy můžeme říct, že pravděpodobnost najít elektron za bariérou se nerovná nule a odpovídá rovnici

$$T \sim \exp \left[-\frac{2}{\hbar} \int_0^t \sqrt{2m[E - V(x)]} dx \right], \quad (4.1)$$

kde m je hmotnost elektronu, E jeho energie, $V(x)$ průběh bariéry, \hbar Diracova konstanta (redukovaná Planckova konstanta) a t je šířka bariéry. Integrál (vyjma konstant) v rovnici lze přibližně nahradit součinem efektivní výšky a šířky bariéry (Vůjtek, a další, 2012).

V klasické mechanice je elektron s energií E pohybující se v potenciálu $U(z)$ popsán rovnicí

$$\frac{p_z^2}{2m} + U(z) = E, \quad (4.2)$$

kde m je hmotnost elektronu ($9,11 \cdot 10^{-31}$ kg). V oblastech, kde $E > U(z)$, má elektron nenulovou hybnost p_z . Na druhou stranu elektron nemůže proniknout do jakékoli oblasti s $E < U(z)$, nebo potenciální bariéry (Chen, 1993). V kvantové mechanice je stav téhož elektronu popsán vlnovou funkcí ψ_z , což splňuje Schrödingerovu rovnici

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{\partial^2 \psi_n(z)}{\partial z^2} + U(z)\psi_n(z) = E\psi_n(z), \quad (4.3)$$

kde \hbar je redukovaná Planckova konstanta, z je poloha a m je hmotnost elektronu. Pokud elektron o energii E dopadá na energetickou bariéru o výšce $U(z)$, je elektronová vlnová funkce řešením postupné vlny,

$$\psi_n(z) = \psi_n(0)e^{\pm i\kappa z} \quad (4.4)$$

kde

$$\kappa = \frac{\sqrt{2m(E - U(z))}}{\hbar}, \quad (4.5)$$

pokud $E > U(z)$, což platí pro vlnovou funkci uvnitř hrotu nebo uvnitř vzorku. Uvnitř bariéry, jako je např. mezi hrotem a vzorkem, $E < U(z)$, takže vlnové funkce, které to splňují, jsou rozpadající se vlny,

$$\psi_n(z) = \psi_n(0)e^{\pm\kappa z}, \quad (4.6)$$

kde

$$\kappa = \frac{\sqrt{2m(U-E)}}{\hbar} \quad (4.7)$$

je rozpadová konstanta. Popisuje stav rozpadu elektronu ve směru $+z$ (Langfahl-Klabes, 2013).

Znalost vlnové funkce umožňuje vypočítat hustotu pravděpodobnosti pro tento elektron, který se nachází na určitém místě. V případě tunelového jevu se funkce hrotu a vzorkové vlny překrývají tak, že když jsou pod předpětím, existuje určitá konečná pravděpodobnost nalezení elektronu v oblasti bariéry i na její druhé straně. Předpokládejme, že předpětí je V a šířka bariéry je W . Tato pravděpodobnost P , že elektron v $z = 0$ (levý okraj bariéry) lze nalézt v $z = W$ (pravý okraj bariéry), je úměrná druhé mocnině vlnové funkce,

$$P \propto |\psi_n(0)|^2 e^{-2\kappa W}, \quad (4.8)$$

pokud je předpětí malé, můžeme ve výrazu pro κ nechat $U - E \sim \Phi M$, kde ΦM , pracovní funkce, dává minimální energii potřebnou k přivedení elektronu z obsazené úrovně, z nichž nejvyšší je na Fermiho úrovni (pro kovy při $T = 0$ K), na úroveň vakua (Langfahl-Klabes, 2013). Obecně platí, že pracovní funkce závisí nejen na materiálu, ale také na krystalografické orientaci povrchu, např. pro alkalické kovy je pracovní funkce podstatně nižší. Při zanedbání tepelného buzení je Fermiho hladina horní hranicí obsazených stavů v kovu. Vezmeme-li hladinu vakua jako referenční bod energie $-E_f = -\Phi$ (Chen, 1993). Když je na systém aplikováno malé předpětí V , jsou excitovány pouze elektronické stavy velmi blízko Fermiho hladině. Tyto excitované elektrony mohou tunelovat přes bariéru. K tunelování tedy dochází hlavně u elektronů o energiích blízko Fermiho hladiny (Langfahl-Klabes, 2013).

Tunelování však vyžaduje, aby na druhé straně bariéry byla prázdná hladina stejné energie jakou má elektron, do kterého jiný elektron tuneluje. Tunelovací proud totiž může souviset s hustotou dostupných nebo naplněných stavů ve vzorku. Čím vyšší je hustota dostupných stavů, tím větší je tunelovací proud. Pokud je předpětí V kladné, elektrony v hrotu tunelují do prázdných stavů ve vzorku, pro negativní předpětí se elektrony vytunelují z obsazených stavů vzorku do hrotu (Langfahl-Klabes, 2013).

4.2.3 Laterální rozlišení STM

Exponenciální závislost proudu má vliv i na rozlišení v laterální rovině skenování. Rozlišení v subnanometrových rozměrech vyžaduje mít co nejostřejší hrot (a tím malý poloměr křivosti), nejlépe tak, aby na špičce hrotu byl jen jeden vrcholový atom bez superpozice jednotlivých interakcí. Takový hrot je však těžké vyrobit, ale

díky exponenciální závislosti to není nutné, stačí hrot s makroskopickým zaoblením, je-li jeden atom vyčnívající. Přes atom poté teče proud a efektivní poloměr křivosti odpovídá velikosti atomu. Výčnělek vznikne na hrotu téměř vždy, proto je snadněji vyrobitelný než vrchol kužele.

Oproti světelné mikroskopii, kde jsme již zmiňovali základní limity rozlišení, pro atomární rozměry takový limit neexistuje a můžeme se setkat s definicemi rozlišení založenými

- na velikosti „elektronového vlákna“ mezi hrotem a vzorkem,
- na zvlněnosti ploch konstantního proudu (pro periodické struktury, je-li zvlnění menší než šum v tunelování, bylo dosaženo limitního rozlišení),
- na velikosti nejmenšího rozlišitelného detailu nalezeného v obraze,
- nebo na vlnových základech.

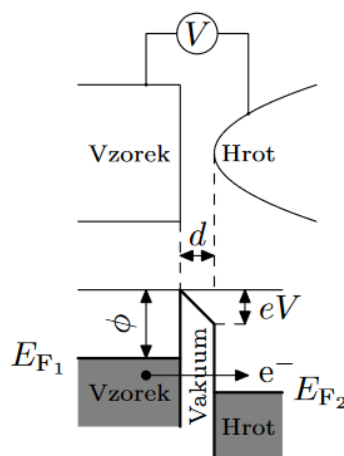
Pro parabolicky tvarovaný hrot s poloměrem R lze rozlišení odhadovat následující úvahou: pokud je vrchol paraboly ve vzdálenosti d nad rovinným povrchem, je jeho atom v laterální poloze x od osy paraboly ve výšce $d + \frac{x^2}{2R}$ a po dosazení do vztahu pravděpodobnosti (4.1) obdržíme Gaussovský profil proudu

$$I(x) \sim \exp\left[-\frac{\kappa x^2}{R}\right], \quad (4.9)$$

kde κ je konstanta (zmiňována ve vztazích 4.4 až 4.7). Rozlišení lze uvažovat jako střední kvadratickou hodnotu, tedy

$$\text{rozlišení} = 0,7 \sqrt{\frac{R}{\kappa}}. \quad (4.10)$$

Dosahovaná laterální rozlišení na atomárně hladkých površích bývají 0,01 nm.



Obr. 18: Tunelovací bariéra po přiložení napětí (Vůjtek, a další, 2012, str. 10).

Dalším aspektem rozlišení je velikost skenovacího kroku. Velikost kroku nepřímo závisí na počtu měřicích bodů, který také ovlivňuje dobu měření jednoho obrazu. Kvůli velké blízkosti sondy je rozlišení v mikrometrových rozsazích ovlivňováno také makroskopickým tvarem hrotu, protože jednak všechny polohy sondy nenulové šířky nejsou fyzikálně možné (např. není možné sledovat póry a hluboké zářezy), jednak se mění poloha bodu nejmenší vzdálenosti od vzorku a rozchází se s polohou středu hrotu, ale v této oblasti je zpravidla možno určit tvar hrotu dostatečně přesně a pokusit se o korekci obrazu. Rozlišení je tedy nutno určovat vždy pro daný typ vzorku a detailu.

Rozlišení dále závisí na konstrukčních parametrech přístroje a prostředí, které souvisí hlavně s přenosy vibrací (vysoká citlivost je zvláště ve vertikálním směru, což je největší složka vibrace budov), na tepelných driftech a proudcích okolí, ale také na stabilitě piezokeramiky (Vůjtek, a další, 2012).

4.2.4 Princip měření

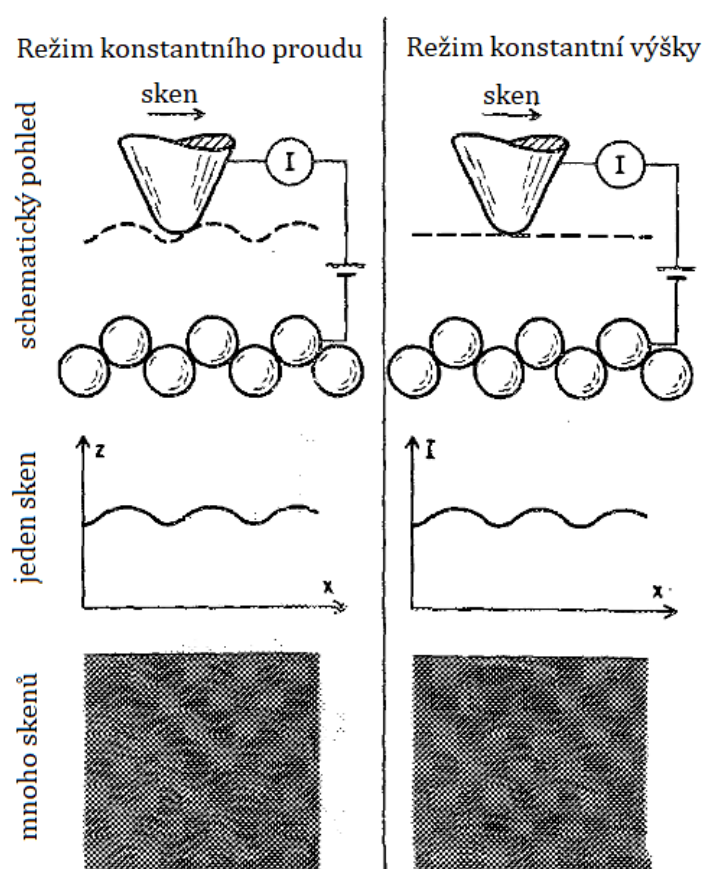
Při měření nejprve dochází k hrubému posuvu vzorku ke hrotu (ve směru z), tento pohyb může být čistě mechanický. Následně dojde k přiložení napětí mezi hrot a vzorek, čímž je umožněn průchod proudu I_0 , a jemným posuvem pomocí piezokeramiky se přiblíží vzorek ke hrotu, aby bylo možné měřit procházející proud (většinou $< 1\text{ nm}$, proud řádově nA , napětí mV až V). Ke skenování dochází po jednom řádku ve směru osy x (tzv. fast scan) a na konci řádku sonda poskočí o jeden krok ve směru osy y (tzv. slow scan) (Vůjtek, a další, 2012).

Rozlišujeme dva způsoby konkrétního měření dle sběru dat:

1. V režimu **konstantního proudu** je hrot přiveden dostatečně blízko k povrchu, na kterém je při vhodném provozním napětí (2 mV – 2 V , měřitelný tunelovací proud. Hrot je snímán přes povrch, zatímco je snímán proud I mezi ním a povrchem. Zpětnovazební síť mění výšku hrotu z , aby byl proud konstantní. Protože se proud mění exponenciálně s mezerou mezi hrotem a povrchem, udržuje se mezera téměř konstantní. V praxi se často místo posunutí Δz ukládá jen odpovídající změna napětí na piezokeramice ΔV_z . Přesnost tohoto režimu je určena hlavně nastavením zpětnovazební sítě.
2. V režimu **konstantní výšky** lze hrot snímat po povrchu v téměř konstantní výšce a konstantním napětí, zatímco je monitorován proud (znázorněno na pravém sloupci na obr. 19). V tomto případě zpětnovazební síť reaguje na to, aby průměrný proud zůstal konstantní. Obraz se opět skládá z několika skenů, které jsou od sebe bočně posunuty ve směru y . V režimu konstantní výšky je také možné skenovat hrot po povrchu v téměř konstantní výšce a konstantním proudu, zatímco je monitorováno napětí. Rychlé změny napětí v důsledku přechodu hrotu přes povrchové prvky, jako jsou atomy, jsou vyneseny proti poloze skenování. Přesnost je

zde určena stabilitou fixované polohy a dynamickým rozsahem snímače proudu.

Každý z těchto režimů má své výhody i nevýhody. Režim konstantního proudu je vhodnější pro měření topografie v limitu rozměrů ≥ 1 nm. Lze s ním sledovat povrchy, které nejsou atomicky rovné. Na druhou stranu režim konstantní výšky umožňuje mnohem rychlejší zobrazování atomicky plochých povrchů, protože na atomy procházející pod hrotem musí reagovat pouze elektronika. Rychlé zobrazování také minimalizuje zkreslení obrazu způsobené piezoelektrickým tečením a tepelným driftem. Jsou však nebezpečné vysoké výčnělky (i vodivé), protože sonda na ně může narazit a může dojít k poškození vzorku či sondy (Hansma, a další, 1987), (Vůjtek, a další, 2012).

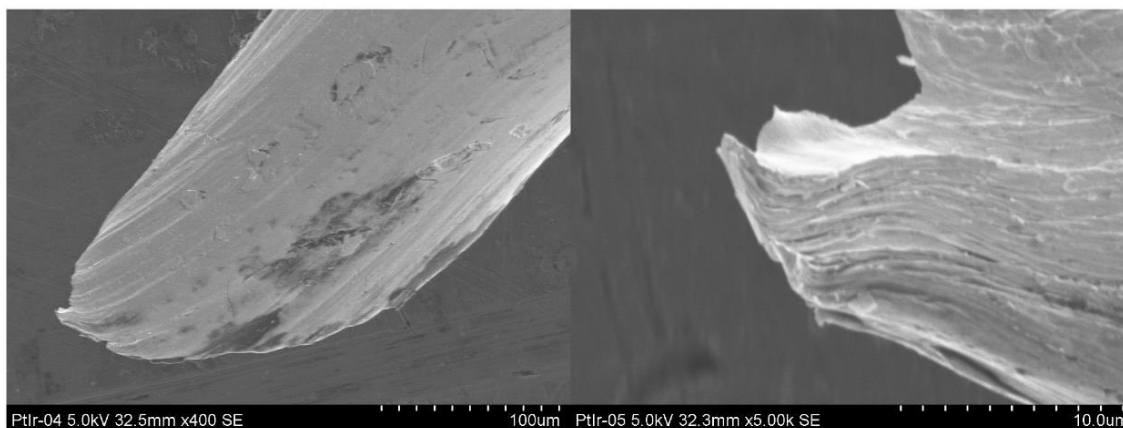


Obr. 19: Režimy konstantního proudu a konstantního výšky skenovacího tunelového mikroskopu. Jedná se o skeny grafitu ve vzduchu pořízené R. Sonnenfeldem (Hansma, a další, 1987, str. 1).

4.2.5 Hroty pro STM

Již Binnig a Rohrer si uvědomovali důležitost přípravy a ošetření hrotu pro skenovací tunelový mikroskop od samého začátku jejich experimentování. Pokud by byl hrot považován za kus souvislého kovu, musí mít poloměr menší než 1 nm. V první sadě experimentů STM byly hroty mechanicky broušeny z molybdenového nebo wolframového drátu o průměru asi 1 mm.

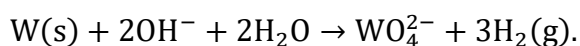
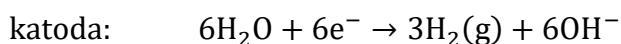
Po hrotu hlavně požadujeme, aby byl vodivý a ostrý. U mechanicky odstřižených hrotů lze dosáhnout rozlišení asi 1 nm. U vyšších rozlišení začíná být nevýhodný nesymetrický tvar takových hrotů a jejich neznámá elektronová struktura. Nicméně i takto připravované hroty používáme dodnes zejména díky jednoduchosti přípravy a lze s nimi dosáhnout atomárního rozlišení na grafitu (obr. 20).



Obr. 20: STM hrot připravený stříháním. Vlevo celkový tvar hrotu, vpravo detail ostrého konce (Vůjtek, a další, 2012, str. 14).

Většina mechanicky připravených hrotů se ale často ukáže jako nepoužitelná, proto se začaly používat hroty připravené chemickým leptáním, které dávají reprodukovatelné tvary a hrot ještě zbaví nečistot. Ideální hrot by měl být čistý, zakončen jedním atomem, dostatečně tuhý a s jednoduchou elektronovou strukturou.

Umění výroby ostrých hrotů pomocí elektrochemického leptání bylo vyvinuto v 50. letech 20. století. Preferovanou metodou pro přípravu hrotů STM je **metoda stejnosměrného napětí**. Drát je upevněný na mikroposuvném šroubu, je ponořený do elektrolytu a je zapojen jako anoda. Katoda je z nerezové oceli nebo platiny umístěná také do kádinky s elektrolytem. Kladné napětí, 4 V až 12 V, je připojeno na drát, který je anodou. K leptání dochází na rozhraní vzduch-elektrolyt. Elektrolytem je NaOH nebo KOH. Celková elektrochemická reakce je:



Leptání trvá několik minut. Když se hrdlo drátu v blízkosti rozhraní ztenčí, váha drátu v elektrolytu krček zlomí. Spodní polovina drátu odpadne. Leptání probíhá rychleji po stranách než z čela, vytváří se současně dva hroty, protože odleptaná vrstva teče po drátě dolů a tím chrání ponořenou část před rozleptáním. Pro odstranění zbytkového NaOH (nebo KOH) z povrchu hrotu je nutné důkladné opláchnutí deionizovanou vodou a čistým alkoholem.

Proces leptání ovlivňuje několik faktorů. Za prvé bylo experimentálně zjištěno, že rychlost leptání je prakticky stálá pro napětí mezi 4 a 12 V. Pod 4 V rychlost leptání výrazně klesá. Za druhé, čím nižší je koncentrace elektrolytu, tím pomalejší je proces leptání. Při reakci se spotřebovává OH^- , roztok by se po několika procesech leptání měl vyměnit. Za třetí, délka drátu v roztoku ovlivňuje poloměr zakřivení konce hrotu. Kratší drát v kapalině je výhodný pro vytvoření ostřejších hrotů. Pro wolframový drát o průměru 0,25 mm je optimální délka drátu v kapalině 1-3 mm.

U **metody střídavého napětí** je mezi vnější válcovou elektrodu a drát přiloženo napětí 2 V, leptání je rychlejší než u stejnosměrného napětí, vyrobený hrot je kónický, ale méně ostrý.

Dalším častým používaným materiálem na hroty je **platina**, případně v kombinaci s iridiem. Lze je vyrábět mechanicky, ale lepších výsledků se opět dosahuje při leptání v roztoku obsahující NaCN a NaOH . Jako protielektroda je použita kruhová folie z niklu. Nejprve dochází k leptání v objemovém rozpouštědle ($60\text{CaCl}_2/36\text{H}_2\text{O}/4\text{HCl}$) při 25 mV střídavého proudu po dobu cca 5 minut, čímž se na drátku vytvoří zúžená oblast. Ve druhém kroku se provede jemné leptání. Část drátu v kapalině se odlomí a vytvoří se dva hroty. Hroty by měly být důkladně opláchnuty, podobně jako v případě wolframových hrotů. Používanými materiály pro výrobu hrotů je také molybden, zlato nebo nikl (Vůjtek, a další, 2012), (Chen, 1993).

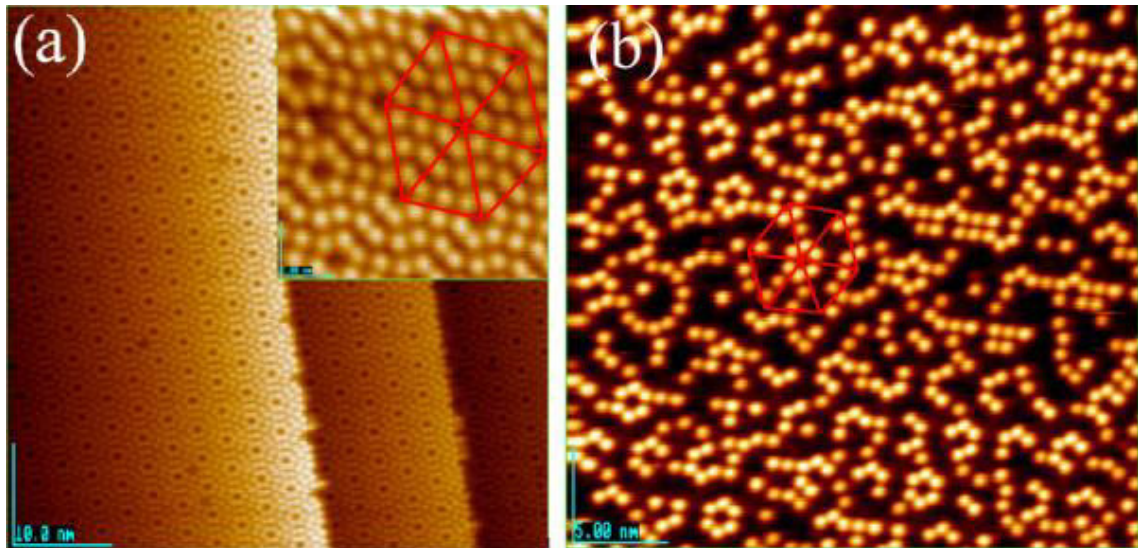
4.2.6 Aplikace a využití STM

Od vzniku skenovacího tunelového mikroskopu se jeho aplikace a využití rychle rozrostly v mnoha oblastech vědních disciplín. Mezi základní využití můžeme zařadit **určování struktury povrchů** (Chen, 1993).

Prvním úspěchem STM bylo zobrazení struktury křemíku $\text{Si}(111) 7 \times 7$ (obr. 21). Rekonstrukce tohoto povrchu byla objevena nízkoenergetickou elektronovou diffrakcí (LEED) v roce 1959. Difrakční obrazec LEED jasně ukázal, že základní buňka tohoto rekonstruovaného povrchu je tvořená 49 atomy křemíku na povrchu $\text{Si}(111)$. Podrobnosti o uspořádání 49 atomů Si v každé vrstvě jedné základní buňky však nelze z LEED jednoznačně určit. Bylo navrženo několik teoretických modelů, ale teprve zobrazení pomocí STM umožnilo definitivně potvrdit jeden z modelů. Dále byly zkoumány povrchy dalších kovů, např. zlata $\text{Au}(100)$, stříbra $\text{Ag}(100)$, germania $\text{Ge}(111)$ a mnoho dalších. (Chen, 1993), (Vůjtek, a další, 2012).

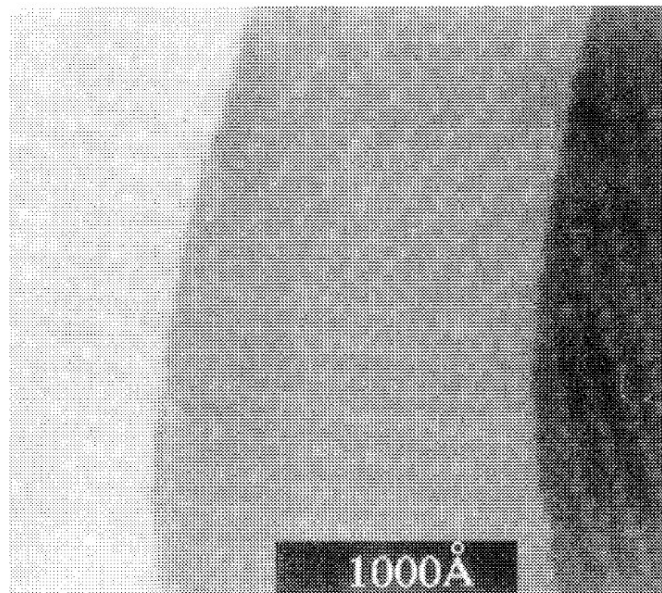
Vznik (nukleace) a růst krystalů je díky schopnosti STM zobrazovat místní struktury atomových detailů lépe a názorněji pochopitelný. Příkladem jevu nukleace je spontánní tvorba uspořádaných Ni ostrůvků vakuovou depozicí Ni na $\text{Au}(111)$. Experiment začíná povrchem Au vyčištěným a žíhaným v ultra vysokém vakuu. Poté je Ni vakuově nanesen odpařováním niklu z wolframového koše vyhřívaného proudem. Vzorek zlata se během vakuové depozice udržuje při poko-

jové teplotě. Po nanesení jedné desetiny monovrstvy niklu na zlatý povrch je pořízen STM snímek povrchu (obr. 22). Namísto vytvoření jednotné niklové vrstvy se atomy Ni shlukují do uspořádaných ostrovních polí. Průměrná vzdálenost mezi středy těchto Ni ostrůvků je 14 nm mezi řadami (Chen, 1993).



Obr. 21: Typický (a) a standardní (b) snímek STM rekonstruovaného povrchu Si(111)-7×7.

(<https://www.researchgate.net/publication/265174795/figure/fig1/AS:196046018879491@1423752421559/Typical-and-standard-STM-image-of-Si111-77-reconstructed-surface-The-typical-STM.png>)

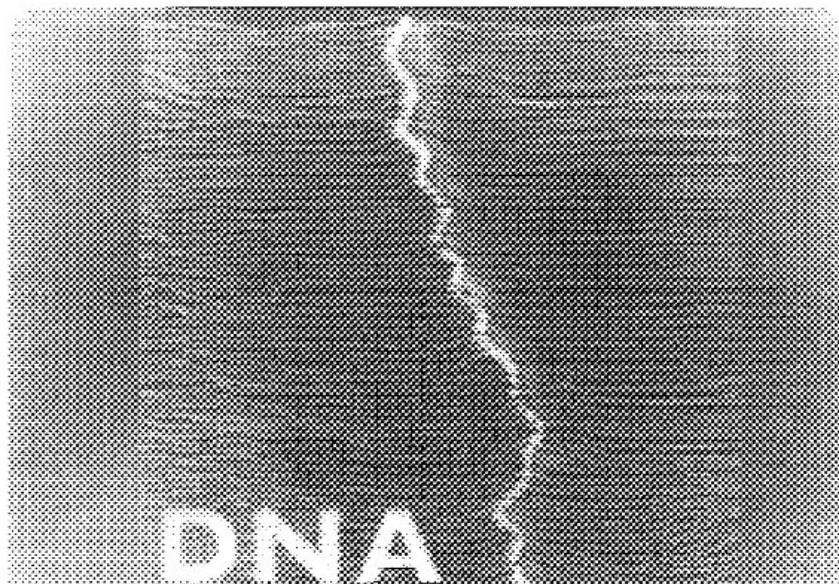


Obr. 22: STM snímek 0,11 monovrstvy Ni na Au(111). Je vidět několik atomicky plochých Au teras, oddělených schody o výšce jednoho atomu. Malé světlé tečky na každé terase jsou jednovrstvé ostrůvky Ni v řadách (Chen, 1993, str. 332).

Velké množství procesů v **mikroelektronice a chemickém průmyslu** závisí na chemických reakcích probíhajících na pevných površích. STM poskytuje jedinečnou příležitost studovat tyto chemické reakce na atomové úrovni. Příkladem jsou reakce na křemíkových površích, které přímo souvisejí s pochopením procesů výroby křemíkových součástek (Chen, 1993).

Významné využití STM nalezneme v **elektrochemickém průmyslu**. Chemický proces na rozhraní elektrolytu a pevného povrchu je po staletí bohatou oblastí vědy a techniky, která zahrnuje aplikace pro elektrolytické pokovování, bezproudové pokovování, korozi a prevenci proti korozi, baterie a mnoho dalších. Dlouhou dobu bylo známo, že elektrochemický proces dramaticky závisí na atomárních detailech povrchu elektrod. Skenovací tunelový mikroskop a také mikroskop atomárních sil (AFM), které pracují také na rozhraní kapalina-pevná látka, poskytují přirozené nástroje pro studium elektrochemického procesu na atomární úrovni (Chen, 1993).

Uplatnění STM nalezneme i v **biologii**. Obr. 23 představuje DNA na uhlíkovém substrátu. Tento obrázek je zajímavý z mnoha důvodů. Ukazuje, že některé adsorbáty jsou zobrazeny spíše jako poklesy než vrcholy; hrot se spíše ponoří směrem k adsorbátu, než aby nad ním stoupal. To ukazuje, že je možné provozovat tunelový mikroskop s hrotem několik nanonemtrů (až 5 nm) od povrchu, protože hrot byl schopen ponořit se dolů k DNA a přesto se jí nedotknout, a co je pravděpodobně nejdůležitější, ukazuje, že tunelovací mikroskopie může přispívat k biologii tím, že poskytuje obrazy makromolekul (Hansma, a další, 1987).



Obr. 23: Obrázek DNA na uhlíkovém substrátu. (Hansma, a další, 1987, str. 19).

5 Praktická část

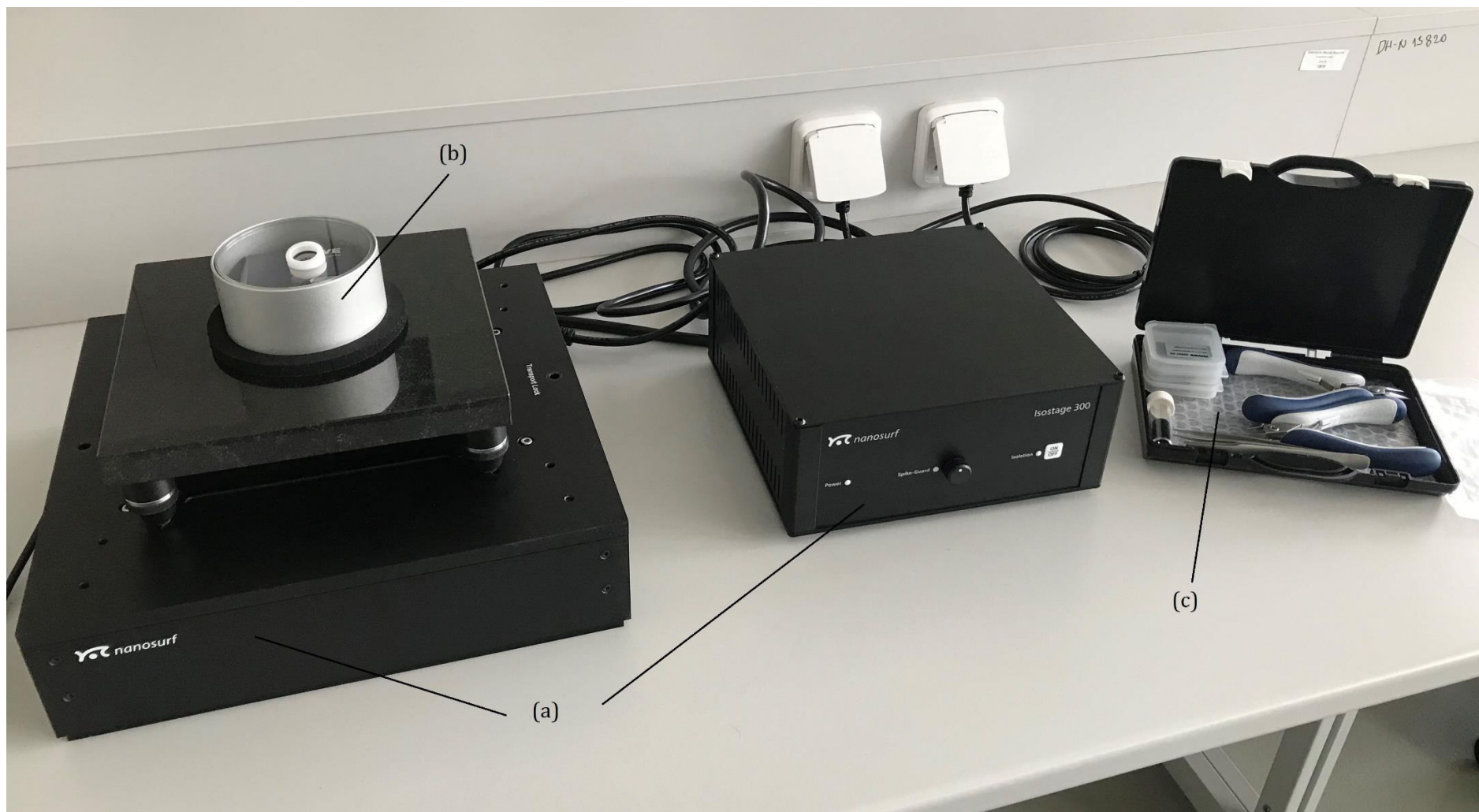
V experimentální části byl použit skenovací tunelový mikroskop německé firmy Phywe Systeme GmbH & Co, na kterém byla provedena řada měření s povrchy vzorků zlata a vysoce uspořádaného pyrolytického grafitu HOPG (Highly ordered pyrolytic graphite), které ukáží uspořádání atomů na jejich povrchu. Tyto vzorky a jejich krystalová struktura budou více rozepsány v kapitole 5.2.

5.1 Experiment a jeho komponenty

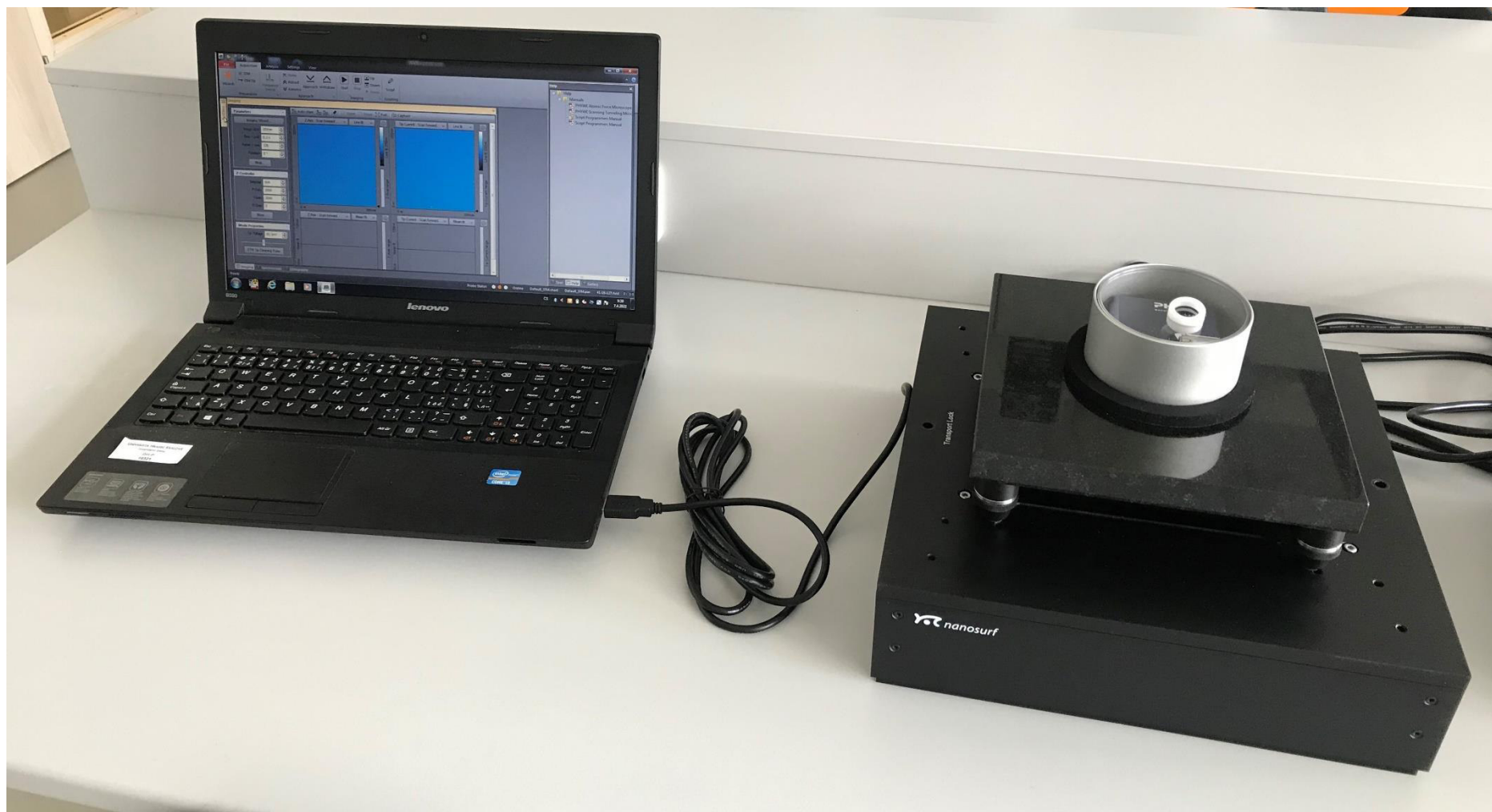
Souprava pro pokus se skládá z několika komponentů. Hlavními jsou řídicí jednotka s namontovanou snímací hlavou, zvětšovací krycí sklo ($10\times$ zvětšení), USB kabel, antivibrační podložka, nabíjecí kabel a adaptér a software MeasureNano potřebný k měření (viz další kapitola). Nutnou součástí je box (kufřík) s nářadím, který obsahuje štípací kleště, ploché kleště, špičatou a zaoblenou pinzetu, platino-iridiový drát (průměr 0,25 mm), držák vzorku, vzorek grafitu (HOPG) a vzorek zlata. V neposlední řadě je třeba k provedení pokusu počítač nebo notebook s nainstalovaným softwarem.



Obr. 24: Hlavní řídicí jednotka s namontovanou snímací hlavou. Ve výřezu je umístěn držák se vzorkem, ke kterému směřuje hrot (Foto: autorka).



Obr. 25: Sestava použitého experimentu skenovacího tunelového mikroskopu. (a) Antivibrační podložka, (b) řídicí jednotka (uvnitř) s ochranným zvětšovací sklem, (c) kufřík s nářadím a se vzorky (Foto: autorka).



Obr. 26: STM připojený k počítači pomocí USB kabelu. Na počítači je spuštěn program MeasureNano (Foto: autorka).



Obr. 27: Kufrík s náradím a vzorky. (a) Krabičky se vzorky povrchů pevných látek (zlato, grafit), (b) držák vzorků, (c) zaoblená pinzeta, (d) špičatá pinzeta, (e) ploché kleště, (f) štípací kleště (Foto: autorka).

5.2 Software MeasureNano

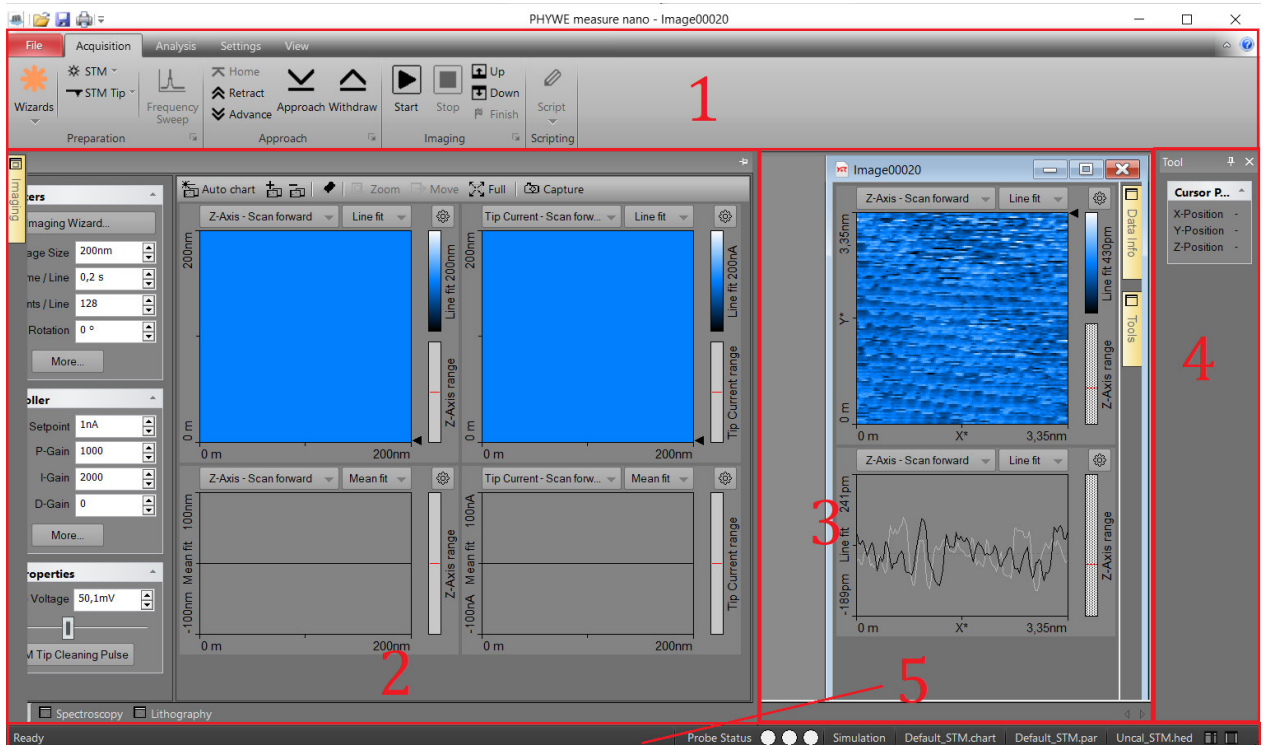
Instalaci programu MeasureNano lze provést z instalačního CD, které je součástí dodávaného experimentu, ale lze jej také stáhnout z oficiálních stránek firmy Phywe. Program lze spustit i bez připojeného mikroskopu k počítači v simulačním módu k prozkoumání systému bez nebezpečí poškození přístroje nebo hrotu STM a ke zpracování dříve naměřených dat.

5.2.1 Softwarové rozhraní

Pomocí softwaru můžeme ovládat mikroskop během zobrazování povrchů a následně je zde možné provádět analýzu dat pro následné zpracování. Po spuštění programu se zobrazí hlavní kontrolní okno (obr. 28), které se skládá z 5 hlavních částí:

1. **Pás karet**, organizuje funkce programu do řady záložek v horní části okna.
2. **Panel pro měření** na levé straně. Oblast obsahuje okna používaná k získávání a zobrazování dat probíhajících měření.
3. **Obrazový panel** uprostřed zobrazuje již dříve uložený dokument z měření.

4. **Informační panel** vpravo. Tato oblast obsahuje několik na sebe naskládaných karet a používá se k řadě přídatných funkcí.
5. **Stavový řádek** ve spodní části. Zobrazuje další informace ke konkrétnímu měření



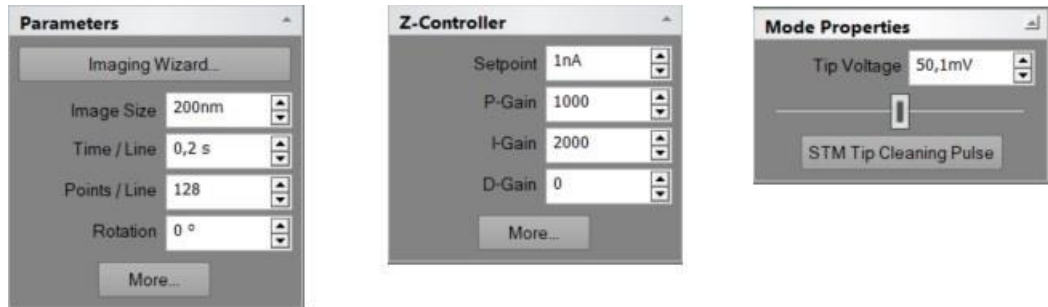
Obr. 28: Softwarové rozhraní v režimu běžné pracovní plochy (autorka).

Pás karet poskytuje přístup ke všem hlavním akcím a příkazům tím, že je seskupuje podle jejich použití. Nabídka „**File**“ (soubor) obsahuje příkazy pro otevření, uložení a tisk měření. Poskytuje také funkci exportu dat. Karta „**Acquisition**“ (sběr dat) zobrazuje různá tlačítka pro přípravu měření, přiblížení vzorku a samotné měření. Následuje karta „**Analysis**“ (analýza), kde nalezneme funkce pro extrakci informací z měření, např. měření vzdálenosti nebo velikosti úhlu. Záložka „**Settings**“ (nastavení) obsahuje funkce pro konfiguraci hardwaru ovladače mikroskopu a kalibraci skenovací hlavy. V kartě „**View**“ (zobrazit) lze přepínat mezi různými režimy zobrazení hlavního kontrolního okna.

5.2.2 Panel pro měření

Okno s názvem „Imaging“, využívané při samotném měření, obsahuje 3 záložky – Parameters, Z-Controller a Mode Properties (obr. 29). Z parametrů nastavujeme velikost obrázku (Image size), při použití šipky nahoru se velikost zdvojnásobí, při použití šipky dolů se velikost zmenší na polovinu. Dále nastavíme čas potřebný k získání jedné datové linky (Time/Line), počet datových bodů na řádek (Points/Line) a rotaci (rotation) – virtuální otočení vzorku. Během zobrazování je interakce hrot-vzorek udržována konstantní pomocí záložky Z-Controller. Jedná se o PID regulátor. Přes „Setpoint“ nastavujeme pracovní bod, tj. tunelovací proud.

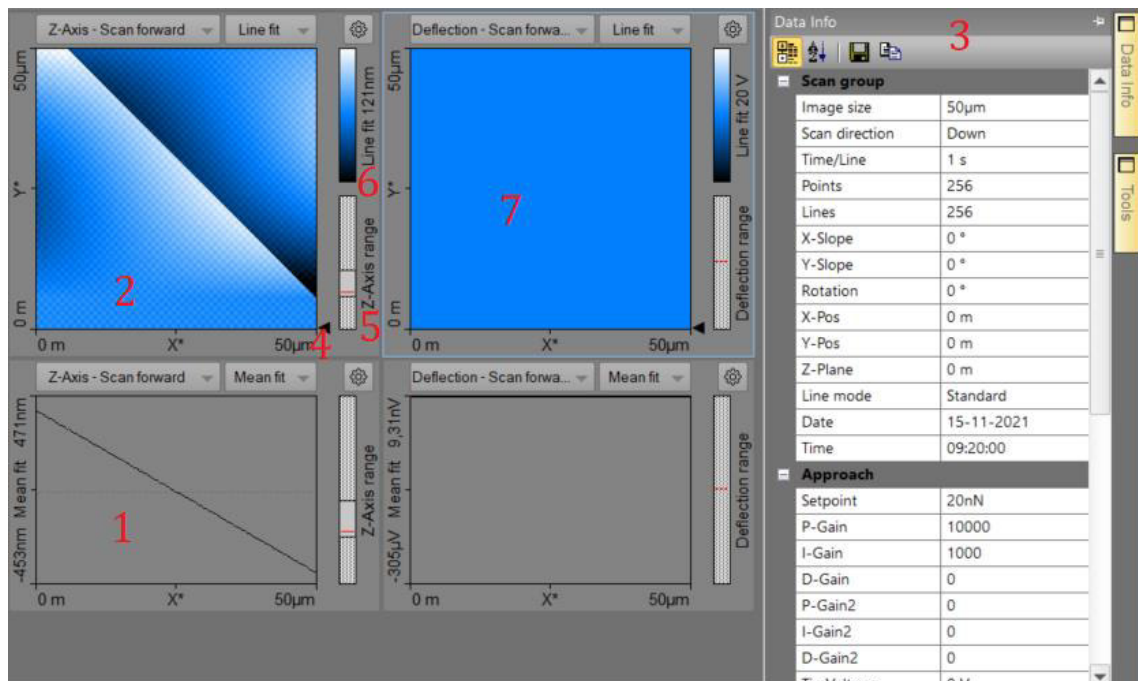
Zvýšením „P-Gain“ se sníží chybový signál. „I-Gain“ také snižuje chybový signál, ale v průběhu času, je nejméně citlivý na šum a obvykle dominantně přispívá k měření topografie. Zvýšení „D-Gain“ snižuje rychlé změny v chybovém signálu, ale také zesiluje vysokofrekvenční šum. V sekci „Mode Properties“, tj. vlastnosti režimu, lze nastavit napětí na hrotu (Tip Voltage). Tento parametr definuje potenciál, jaký má být aplikován na hrot. Napětí, které lze použít, leží mezi -10 V a $+10\text{ V}$.



Obr. 29: Zleva záložky pro nastavení parametrů, PID a napětí na hrotu (autorka).

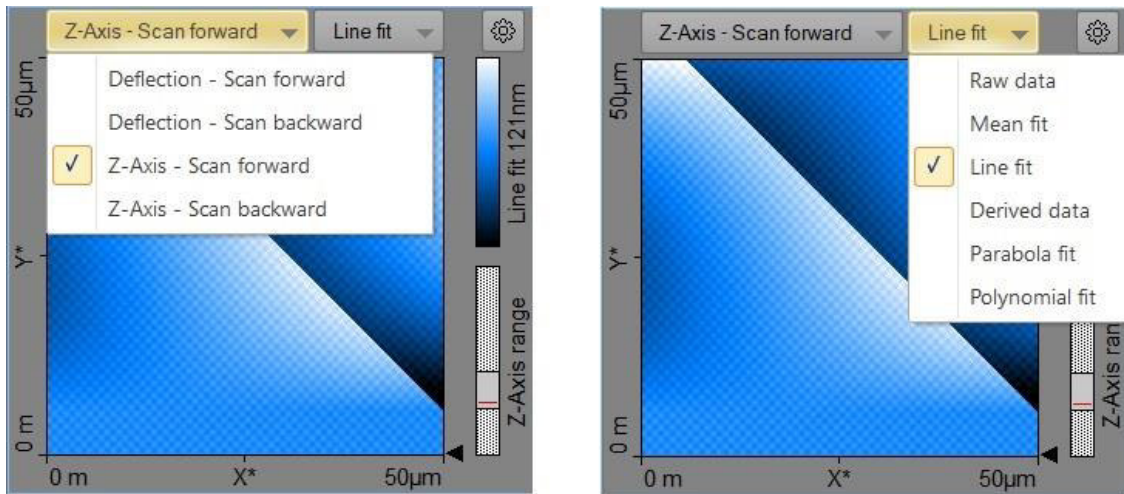
5.2.3 Práce s dokumenty a grafy

Po dokončení měření jsou obrázky uloženy a lze je otevřít a zobrazit v oblasti dokumentů pracovní plochy. Grafy a panel „Data info“ (Informace o datech) společně zobrazují všechny dostupné informace o měření. Panel „Data info“ na pravé straně okna dokumentu měření je ve výchozím stavu minimalizován, lze jej rozbalit po najetí kurzorem na daný panel.



Obr. 30: Prvky dokumentu z měření. (1) Spojnicový graf. (2) Barevný snímek z STM. (3) Panel s informacemi o dokumentu. (4) Šipka pro výběr řádku. (5) Indikátor rozsahu dat se skenovací hlavou v Z-rozsahu jako tečkovaný rámeček, datový Z-rozsah jako plný šedý rámeček a aktuální výška skenovacího řádku jako červená čára. (6) Barevná škála pro datový rozsah Z. (7) Zde je zobrazován chybový signál.

Prvky nadpisu každého grafu zobrazují název signálu a použitý typ filtrování čar pozadí. Kliknutím na každý z těchto titulů se otevře rozbalovací nabídka s dalšími možnými signály nebo filtry.



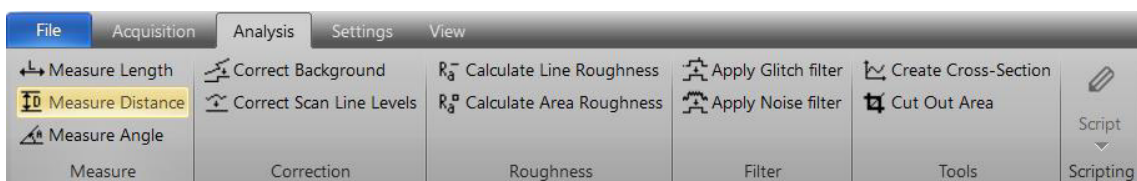
Obr. 31: Nabídka signálu a typu filtrování. Změnou názvů se změní obsah grafu (autorka).

Ovládací systém aplikuje filtry na naměřená data před jejich zobrazením. Dostupné datové filtry jsou:

- Raw data – nezpracovaná data.
- Mean fit – vypočítá střední hodnotu každého řádku datových bodů a odečte toto číslo od nezpracovaných dat měření pro každý datový bod.
- Line fit – vypočítá pro každou linii střední hodnotu a sklon.
- Derived data – vypočítá rozdíl mezi dvěma po sobě jdoucími datovými body (derivace).
- Parabola fit – vypočítá proložení nejmenších čtverců druhého řádu pro každý řádek datových bodů.
- Polynomial fit – vypočítá proložení nejmenších čtverců čtvrtého řádu pro každý řádek datových bodů.

5.2.4 Analýza dat

Získaná data lze nejen zobrazovat v grafech, ale také je analyzovat. Ovládací software má několik nástrojů, které umožňují rychle numerické vyhodnocení a úpravu dat v grafu. Tyto nástroje jsou dostupné na kartě „Analysis“ (Analýza).



Obr. 32: Karta „Analýza“. Všechny zobrazené nástroje lze použít i během získávání měření (autorka).

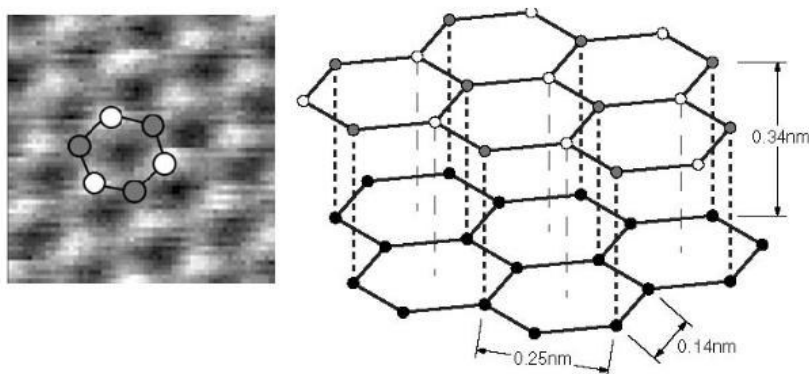
Chceme-li použít nástroj pro rychlé vyhodnocení, nejprve je nutné klepnutím aktivovat graf, který chceme vyhodnotit. Karta analýza nabízí několik dalších záložek pro měření délky, vzdálenosti a úhlu, pro korekci pozadí nebo úrovně skenovacího řádku. Lze zde vypočítat drsnost čáry a plochy, aplikovat na graf filtry pro redukcii šumu a také je možné vytvořit čárový průřez grafu.

5.3 Krystalická struktura použitých vzorků

5.3.1 Grafit

Uhlík je polymorfní. Existuje ve třech formách – diamant, grafit a fullereny. Hlavní rozdíl mezi diamantem a grafitem je, že diamant má trojrozměrnou krystalovou strukturu (kovalentní síťová pevná látka), zatímco grafit se skládá z uhlíkových vrstev (s kovalentní a kovovou vazbou v každé vrstvě) spojených slabou van der Waalsovou interakcí. Uhlíkové vrstvy v grafitu jsou známy jako grafenové vrstvy. Grafit má strukturu vrstev, ve které jsou atomy uspořádány v šestiúhelníkovém vzoru v každé vrstvě. Výsledkem je šestiúhelníková jednotková buňka o rozměrech 0,671 nm a 0,246 nm (Chung, 2002). Vysoce uspořádaný pyrolytický grafit (HOPG) je materiál, který se vyrábí aplikací tlaku na nanosený pyrolytický uhlík při vysokých teplotách (někdy i více než 300 °C). Nejvhodnější HOPG pro aplikaci STM by měl mít velká zrna a krystality, jednotný povrch s minimálními poruchami. Měl by umožňovat snadné štěpení velmi tenkých vrstev (*Mikromasch*).

Po získání obrázku povrchu HOPG ze skenovacího tunelového mikroskopu uvidíme vzor skládající se ze světlých a tmavých skvrn. Vypadá to jako trojrozměrný obraz kuliček ležících vedle sebe, nejedná se ale jednotlivé atomy. Světlé body vykazují topograficky vyšší body a tmavé nižší body. V mřížkovém modelu grafitu (obr. 33) lze vidět, že v krystalové mřížce grafitu jsou dvě různé polohy atomů uhlíku: atom se sousedním atomem v rovině pod (šedá) a atomem bez souseda v mřížce pod (bílá). V důsledku toho se elektrická vodivost povrchu grafitu místně mírně



Obr. 33: Vrstvená struktura grafitu (Langfahl-Klabes, 2013, str. 66).

mění, takže atomy bez sousedů se jeví jako jasnější (vyšší) než ostatní. Pokud mají atomy uhlíku přímé sousedy ve vrstvě pod nimi, budou tyto atomy táhnout elektronovou hustotu od atomů nahoře, takže budou vypadat, že jsou níže (tmavší). Černé skvrny odpovídají prostoru mezi okolními atomy uhlíku a vykazují minimál-

ní hustotu elektronů na povrchu. Tato vrstvená struktura je důvodem, proč má mřížková konstanta mezi světlými „kopci“ vyšší než normální hodnotu 0,246 nm. (Langfahl-Klabes, 2013).

5.3.2 Zlato

Zlato je jedinečný kov s mimořádnými vlastnostmi. Zlato se v přírodě vyskytuje běžně legované stříbrem, ale také palladiem, rtutí a mědí. Zlato je navíc jedním z devíti prvků, které se v přírodě vyskytují ve své přirozené nebo nekombinované formě. Jelikož je zlato velmi měkké, může se shromažďovat a tvořit nugety v říčních korytech. Jednotlivé krystaly jsou poměrně vzácné a malé.

Nativní zlaté krystaly obvykle tvoří zaoblené osmistěny, krychle a dvanáctistěny. Někdy jsou protáhlé ve specifických krystalografických směrech a tvoří rybí kost nebo dendritická dvojčata. Jiné mohou být zploštělé s oktaedrickými, krychlovými nebo trojúhelníkovými plochami. Zlato má plošně centrovanou krystalovou mřížku, což je uzavřená krychle a atom zlata je v každém rohu krychle a uprostřed každé plochy (Lee).

5.4 Měření na STM, výsledky a jejich analýza

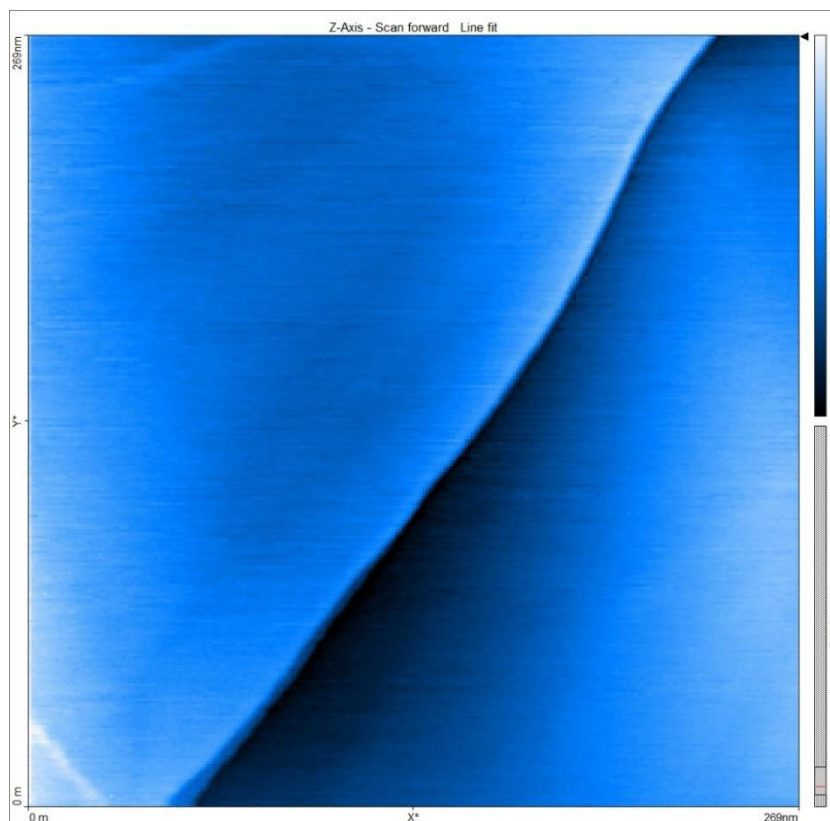
5.4.1 Měření na skenovacím tunelovém mikroskopu

Po vybalení soupravy připravíme vše potřebné k zahájení pokusu pro skenování povrchu vzorků – připojíme skenovací tunelový mikroskop přes USB kabel k počítači, vybereme vzorek, který umístíme pinzetou na držák vzorků a zhotovíme hrot. Výroba hrotu je důležitá a obtížná část přípravy. Připravené hroty nejsou po každé použitelné, pouze přesně řezaný hrot umožňuje optimální měření. Na počítači spustíme program MeasureNano a zahájíme měření, které trvá asi minutu při nízkém rozlišení. Nejprve byla provedena měření o velikosti snímku cca 200×200 nm, poté je možné vybrat část již naměřeného vzorku a provést měření z vybrané oblasti s menší velikostí (např. u grafitu až s rozměry snímku 3×3 nm). I přesto, že bylo provedeno několik desítek měření a vytvořeno velké množství hrotů, měření se celkově nedařilo. Na snímcích se vyskytují artefakty a jejich kvalita je zhoršena chybovým šumem. Použité výsledky v této práci jsou nejlepší, které se povedlo získat.

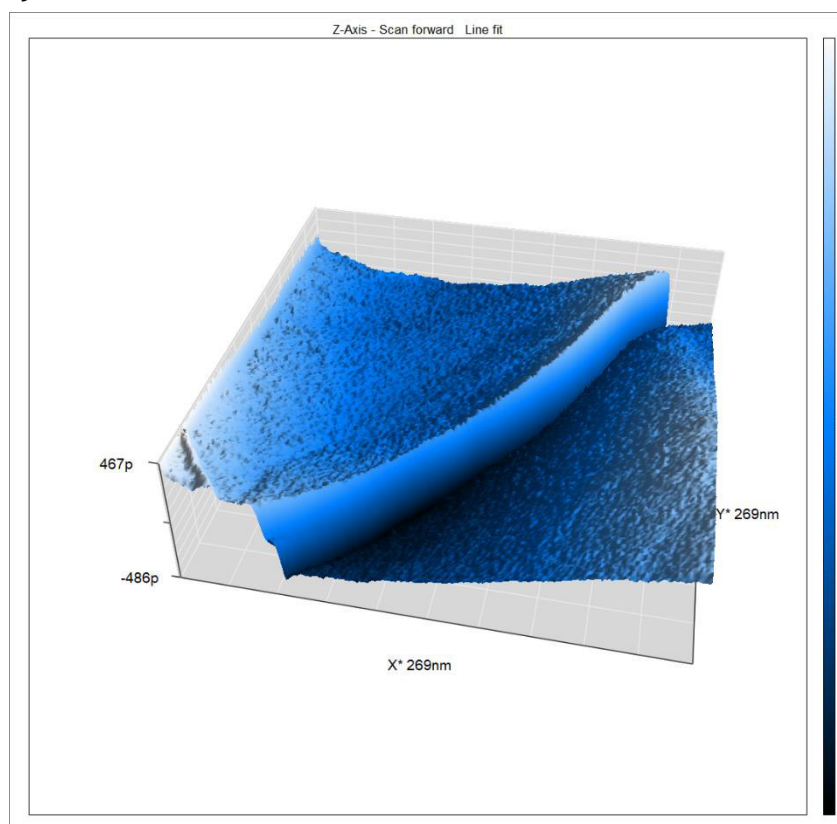
5.4.2 HOPG

Prvním vzorkem je vysoce uspořádaný pyrolytický grafit (HOPG). Byla provedena řada měření s menšími a většími rozměry i různým rozlišením vzorku.

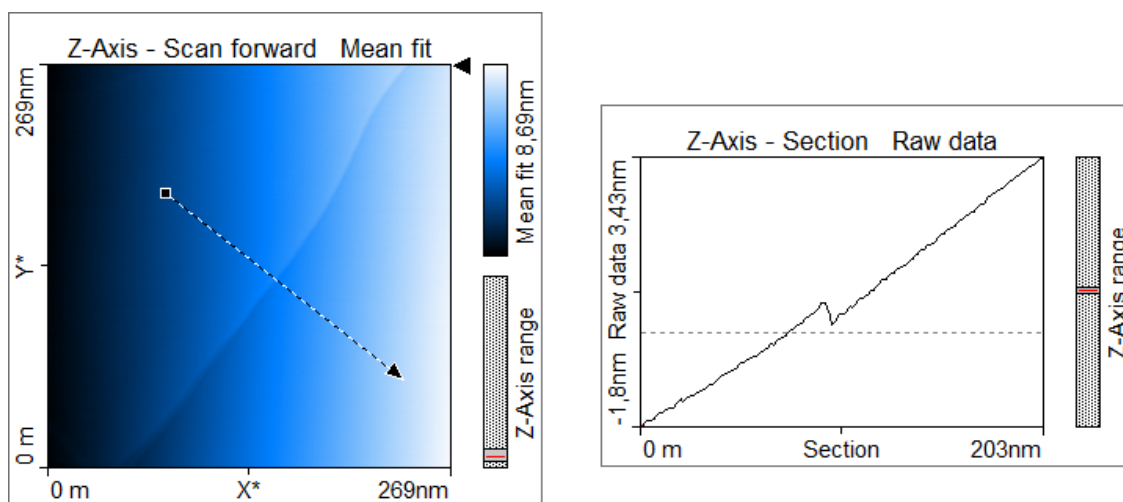
Na obr. 34 je zobrazen povrch vzorku HOPG o rozměrech 256×256 nm. Je zde vidět zářez, který můžeme interpretovat jako přeskok na další grafenovou vrstvu. Její výšku lze ověřit analýzou provedením průřezového grafu (obr. 36). Vzdálenost dvou vrstev grafitu by měla být 0,34 nm (z obr. 33), naměřená hodnota z průřezového grafu je 0,46 nm. Odchylna je pravděpodobně způsobena chybou měření – špatná kalibrace přístroje nebo náhodné rušivé vlivy (otřesy).



Obr. 34: STM obrázek povrchu HOPG v režimu Line fit o rozměrech 256×256 nm (autorka).

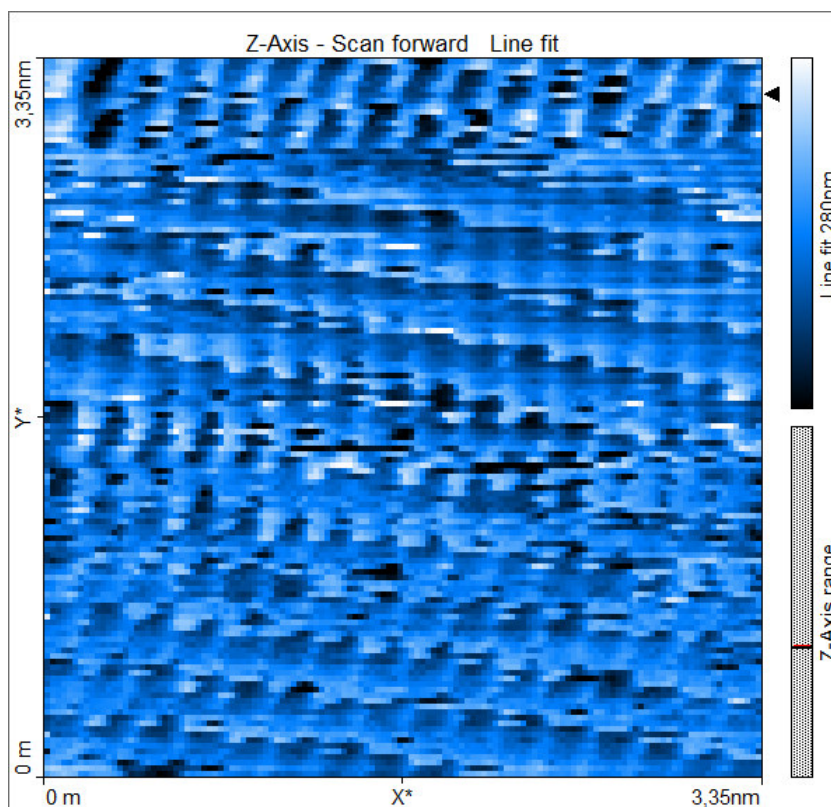


Obr. 35: 3D obrázek povrchu HOPG z obr. 34. Je zde vidět rozhraní dvou uhlíkových vrstev. Sklon 3D obrázku je dán jeho nastavením v programu. V levé horní části je deformace způsobená zobrazením v režimu Line fit (autorka).

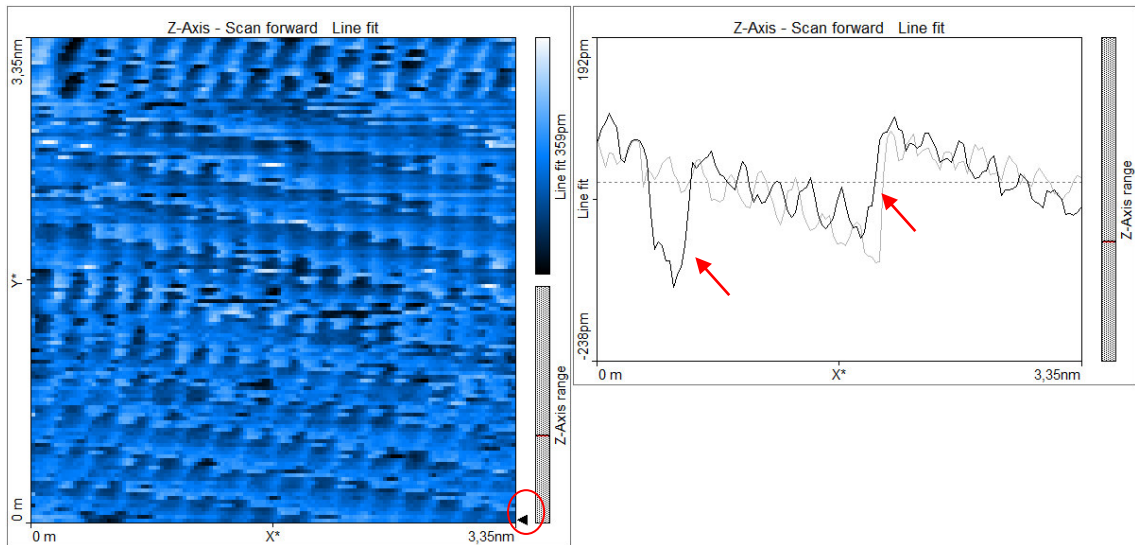


Obr. 36: Analýza STM obrázku HOPG. Vlevo provedení průřezu přes oblast danou šipkou, vpravo je průřezový graf. Řez byl provedeno v režimu Raw data, proto je zde vidět, že vrstvy jsou lineární, drobné odchylky jsou chyby měření (autorka).

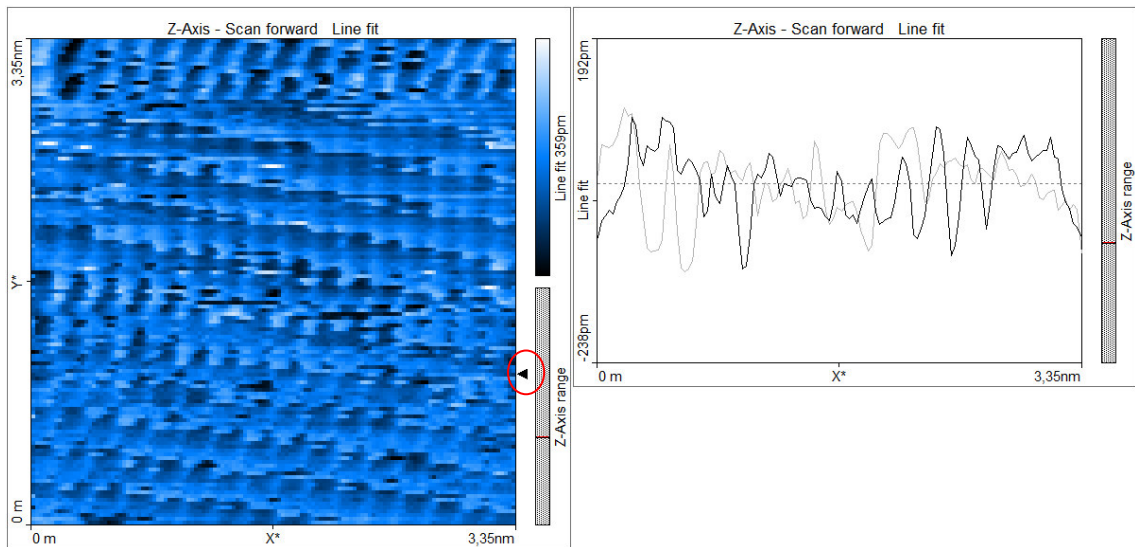
Pokud pozorujeme snímek z nižším rozlišením, struktury jsou lépe rozlišitelné, avšak při blízkých rozlišeních nebylo dosaženo očekávaných výsledků struktury povrchu HOPG. Snímek grafitu na obr. 37 je horší kvality v porovnání s obr. 33, ale i tak je zde možné pozorovat charakteristické struktury pro daný vzorek. Vysoce uspořádaný pyrolytický grafit se skládá z vrstev uhlíkových plátů a lze zde vidět typický šestiúhelníkový vzor.



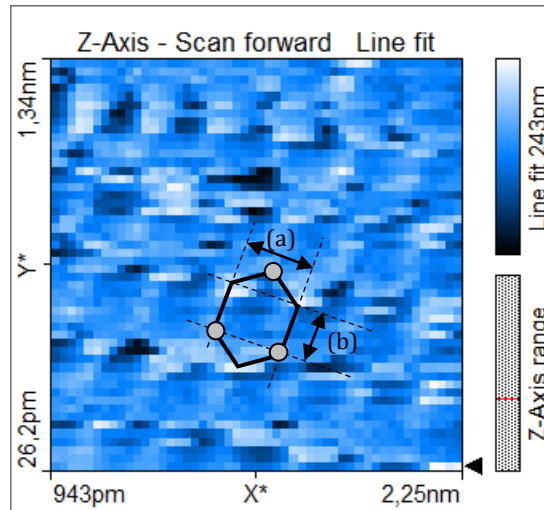
Obr. 37: STM obrázek struktury povrchu HOPG o rozměrech $3,35 \times 3,35$ nm (autorka).



Obr. 38: Snímek povrchu HOPG (stejný s předchozím) s vodorovným řezem v místě řádku označeného černou šipkou. Černý graf v řezu představuje skenování vzorku zleva doprava a šedý graf poté zprava doleva. Jednotlivá maxima a minima v řezu jsou přerušena místy s chybou (označené červenou šipkou). Sklon grafu je způsoben snímáním vzorku v určitém směru, jak je vidět vlevo (autorka).



Obr. 39: Snímek povrchu HOPG s evidentně špatným vodorovným řezem v místě řádku označeného černou šipkou. V tomto řádku je na snímku vidět, že je rozmazaný a struktura povrchu je zde nečitelná (autorka).



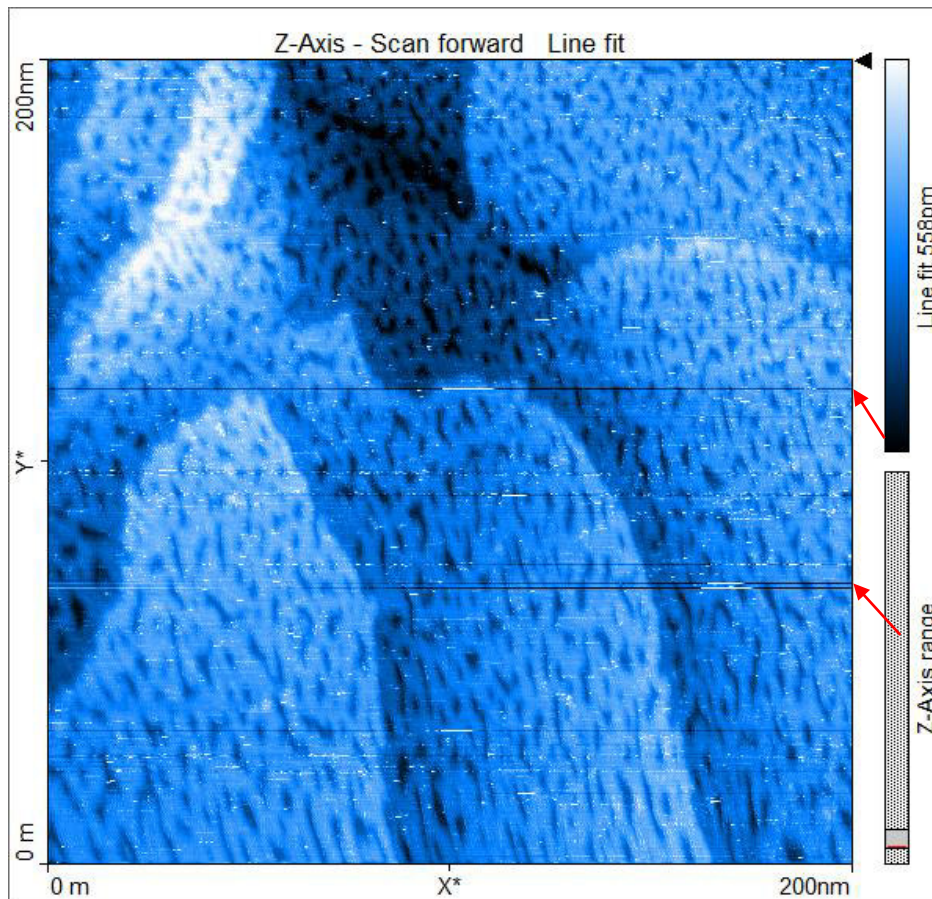
Obr. 40: Detail povrchu HOPG. (a) Mřížková konstanta. (b) Vzdálenost 2 atomů (autorka).

Na obr. 40 v zobrazené šesterečné soustavě lze vidět dva typy atomů uhlíku. Světlejší místa představují vyšší topografii než místa tmavší. V programu MeasureNano jsem provedla měření mřížkové konstanty a vzdálenosti dvou atomů (naznačeno na obr. 40) v několika místech a z těchto hodnot jsem dopočítala průměrné hodnoty. Teoretická hodnota mřížkové konstanty grafitu je 0,25 nm (uvedeno v podkapitole 5.3.1), naměřená hodnota je 0,215 nm. Průměrná hodnota vzdálenosti 2 atomů z pěti různých naměřených vzdáleností je 0,142 nm a teoretická hodnota je 0,14 nm (teoretické hodnoty jsou uvedeny v obr. 33).

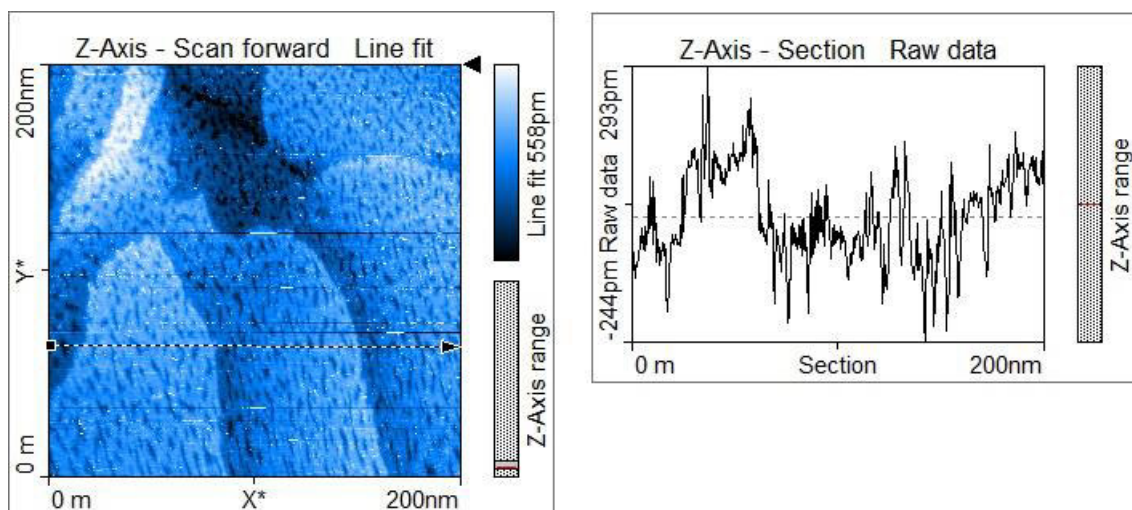
Dále je možné ze získaného obrázku změřit vnitřní úhly šestiúhelníku tvořeného atomy uhlíku. Průměrná hodnota velikosti vnitřního úhlu z 5 provedených měření je $122,4^\circ$ (velikost vnitřního úhlu šestiúhelníku je 120°). Chybu měření přisuzuji především i nízkému rozlišení zhotoveného obrázku a nepřesnostmi při skenování, případně špatné kalibraci přístroje, což následně zhoršuje i kvalitu provedené analýzy. Na vině mohou být i vnější otřesy a nekvalitně zhotovený hrot. I přes tyto chyby se celkové naměřené výsledky blíží hodnotám teoretickým.

5.4.3 Zlato

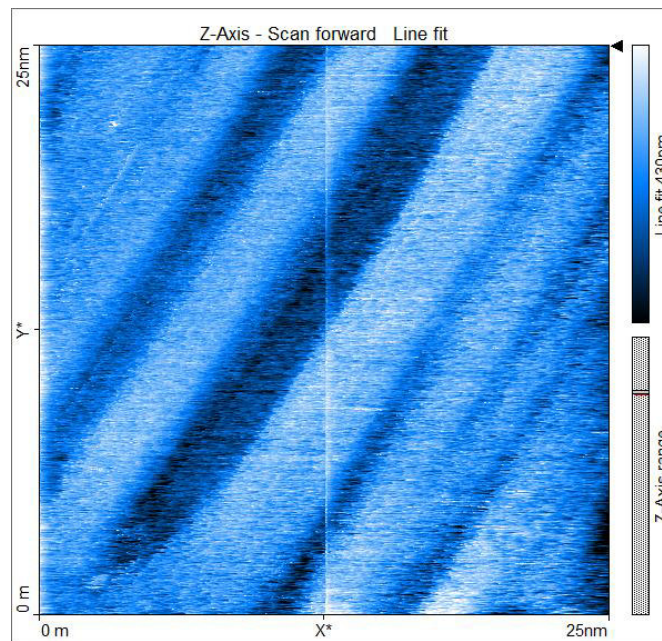
Na obr. 41 je znázorněn povrch zlata. Atomové struktury je obtížné pozorovat, protože elektrony na povrchu jsou homogenněji distribuovány na rozdíl od grafitu. Je možné pozorovat jednotlivé zlaté terasy (obr. 43), které odpovídají vzdálenosti mezi dvěma vrstvy atomů, což je pro zlato 0,29 nm (Piwońsk, a další, 2004). Uvnitř teras jsou vidět četné prohlubně, které se jeví jako tmavé ostrůvky s průměrem 2–6 nm. Tyto prohlubně odpovídají prázdným ostrůvkům v nejvyšší vrstvě zlatého povrchu.



Obr. 41: STM obrázek struktury povrchu zlata o rozměrech 200×200 nm. Místa označená červenou šipkou zobrazují artefakty způsobené pravděpodobně ztrátou kontaktu mikroskopu s hrotem (autorka).



Obr. 42: Analýza vzorku zlata. Vpravo je průřezový graf povrchu zlata přes oblast danou šipkou na snímku vlevo. V průřezovém grafu jsou vidět poklesy, které odpovídají prohlubním (tmavým místům) na snímku povrchu zlata a znázorňují jednotlivé vrstvy atomů. Naměřená vzdálenost dvou vrstev atomů z tohoto průřezu je $0,275$ nm (autorka).



Obr. 43: STM snímek povrchu zlata o rozměrech 25×25 nm zobrazující zlaté terasy a jejich prohlubně (autorka).

Závěr

V teoretické části práce jsou shrnuty poznatky z oblasti mikroskopie a mikroskopických metod. Nejprve je popsána historie mikroskopování od antických začátků až k dnešním moderním technologiím, které umožňují zkoumání struktur v nanometrickém měřítku. Následně jsou uvedeny základy světelné mikroskopie, včetně popisu různých mikroskopických metod. Práce pokračuje přes elektronovou mikroskopii až k mikroskopii skenující sondou, kde jsou probrány fyzikální principy skenovacího tunelovacího mikroskopu.

Praktická část se věnuje experimentu se skenovacím tunelovacím mikroskopem, kde je krátce představeno prostředí programu MeasureNano potřebného k provedení měření a dalšímu zpracování výsledků. Část je věnována popisu povrchů použitých vzorků zlata a vysoce uspořádaného pyrolytického grafitu, jejichž teoretické poznatky jsou ověřeny právě samotným měřením.

Je důležité zmínit, že měření bylo od počátku provázeno problémy, které se i přes provedení několik desítek pokusů nepodařilo odstranit. Získané výsledky tak nejsou ideální a struktura povrchů je obtížněji čitelná oproti ukázkovým snímkům. Na druhou stranu toto problematické měření vedlo k promyšlení a zvážení možných závad. Vzhledem k obtížnosti a nejistým výsledkům experiment není příliš vhodný pro běžnou výuku fyziky na středních školách, nicméně mohl by být využit jako ukáзка a oživení pro žáky např. při výuce optiky, kdy by tak mohli nahlédnout do světa velmi malých rozměrů. Další možností by mohlo být využití například pro speciální kroužek vedený ve škole pro zájemce fyziky.

V práci by bylo možné věnovat se podrobněji oblasti mikroskopie skenující sondou, například různým druhům skenovacího tunelovacího mikroskopu a nebo mikroskopu atomárních sil. Pokud by měření nebylo provázeno problémy, mohly být dále naskenovány povrchy i jiných pevných látek, které by vedly k větší rozmanitosti této práce.

Použitá literatura

1. EGERTON, Ray F. 2005. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. New York : Springer Science+Business Media, 2005. ISBN-13: 978-0387-25800-0.
2. GAJGHATE, Sameer Sheshrao. 2017. *Introduction to Microscopy*. Agartala : National Institute of Technology, 2017.
3. HANSMA, Paul K. a TERSOFF, Jerry. 1987. Scanning tunneling microscopy. [Online] 1987. [Citace: 30. Březen 2022.] https://web.archive.org/web/20200710000814id_/http://www.chtm.unm.edu/~mhz/STM.pdf.
4. HEJTMÁNEK, Milan. 2001. *Úvod do světelné mikroskopie*. Olomouc : Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 2001. ISBN 80-244-0333-1.
5. CHEN, C. Julian. 1993. *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*. New York : Oxford University Press, 1993. ISBN 0-19-507150-6.
6. CHUNG, D. D. L. 2002. *Review Graphite*. Buffalo, USA : Kluwer Academic Publishers, Composite Materials Research Laboratory, 2002.
7. LANGFAHL-KLABES, J. 2013. *Scanning Tunneling Microscopy (STM) - Operating Instructions and Experiments*. Göttingen : PHYWE Systeme, 2013.
8. LEE, Aubrey. Crystallography of gold. *Big rock exploration*. [Online] [Citace: 19. Duben 2022.] <https://bigrockexploration.com/2020/06/crystallography-of-gold/>.
9. *Mikromasch*. [Online] Innovative Solutions Bulgaria Ltd. . [Citace: 19. Duben 2022.] <https://www.spmtips.com/test-structures-HOPG.html>.
10. MIRONOV, Victor. 2004. *Fundamentals of Scanning Probe Microscopy*. Nižnij Novgorod : The Russian Academy of sciences. Institute for physics of microstructures., 2004.
11. MURPHY, Douglas B. 2001. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 0-471-25391-X.
12. PIWOŃSK, I., a další. 2004. *Investigation of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surfaces*. Lodz : Technical University of Lodz, 2004.
13. ROCHOW, Theodore George a TUCKER, Paul Arthur. 1994. *Introduction to microscopy by means of light, electrons, X rays, or acoustics*. 2. New York : Plenum Press, 1994. ISBN 978-1-4899-1515-3.

14. SALAPAKA, Srinivasa M. a SALAPAKA, Murti V. 2008. *Scanning Probe Microscopy*. Minnesota : University of Minnesota, 2008. A control systems perspective on nanointerrogation.
15. SHERWOOD, Andrew N., a další. 2019. *Greek and Roman Technology: A sourcebook of Translated Greek and Roman Texts*. New York : Routledge, 2019. ISBN 978-1138927896.
16. SINGER, Charles. 1914. Notes on the Early History of Microscopy. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1914, Sv. 7, stránky 247–279.
17. SMĚKAL, Petr. 1995. *Experimentální metody biofyziky II*. Ostrava : Ostravská univerzita, 1995. ISBN 80-7042-723-X.
18. VŮJTEK, M., KUBÍNEK, R. a MAŠLÁŇ, M. 2012. *Nanoskopie*. Olomouc : Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3101-4.
19. YAO, Nan a ZHONG LIN, Wang. 2005. *Handbook of microscopy for nanotechnology*. New York : Kluwer academic publishers, 2005. ISBN 1-4020-8003-4.