

## ZASTOSOWANIE CIENKICH WARSTW METALI I ICH TLENKÓW W PREPARATYCE PRÓBEK DO BADAŃ Z ZASTOSOWANIEM SKANINGOWEJ MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ

### Streszczenie

Skaningowa mikroskopia elektronowa wymaga aby próbka była przewodząca, lub pokryta warstwą przewodzącego materiału. Pomimo tego że złoto jest metalem najczęściej używanym do pokrywania próbek, jest także bardzo drogie, więc autorzy postanowili sprawdzić czy inne metale lub stopy metali będą nadawać się do pokrywania próbek. Próbki były pokrywane w procesie sputteringu magnetronowego przy pomocy urządzenia LINE 440 (Alliance Concept), a obserwacje przeprowadzone na mikroskopie Hitachi TM3000. Próbki były pokryte miedzią, stopem miedzi i galu, cyną i tlenkiem cyny. Obrazy otrzymane w czasie eksperymentu były porównywalne z próbkami pokrytymi złotem.

### WSTĘP

Prowadzone na całym świecie badania naukowe związane z mikrobiologią wymuszają opracowanie technik pozwalających analizować struktury biologiczne w skali mikro. Dostępność rozwiązań umożliwia już nie tylko obserwację organizmów w skali mikro ale i o wiele mniejszych, nawet do pojedynczych struktur atomowych. Coraz częściej z dyscyplin materiałowych, dla których dostępne były urządzenia powiększające o największej rozdzielczości, zaawansowana technologia jest adoptowana do obserwacji w naukach związanych z naukami medycznymi [1-2]. Przykładem takiego stanu rzeczy jest mikroskopia elektronowa. Na chwilę obecną jest to najbardziej użyteczna metoda obserwacji próbek materiałów stałych, ale także próbek biologicznych [9]. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) to metoda dająca wiele informacji na temat struktury wirusów, komórek prokariotycznych i eukariotycznych. W mikrobiologii metoda ta jest wykorzystywana do badania organelli komórkowych, pojedynczych komórek i skomplikowanych struktur wytwarzanych przez mikroorganizmy, takich jak biofilm. SEM umożliwia nie tylko analizę budowy komórek, ale też interakcji zachodzących pomiędzy mikroorganizmami [10]. Jednym z ograniczeń mikroskopii elektronowej jest, konieczność przewodzenia prądu przez badaną próbkę, lub pokrycia próbki warstwą przewodzącego materiału. Złoto, z powodu swoich właściwości elektrycznych i chemicznych, jest najczęściej wykorzystywanym metalem do pokrywania próbek biologicznych [4]. Ze względu na wysoki koszt pozyskiwania próbek napyłanych złotem, prowadzone są badania nad zastosowaniem innych metali w procesie przygotowywania próbek biologicznych do analizy z zastosowaniem mikroskopu elektronowego ale również tych samych próbek z użyciem mikroskopii optycznej – przewodniki przezroczyste.

Celem prezentowanego materiału jest przybliżenie rezultatów prac prowadzonych w Centrum Badań nad Innowacjami Państwowej Szkoły Wyższej na temat oceny przydatności wybranych metali i ich związków do pokrywania próbek biologicznych analizowanych za pomocą mikroskopu elektronowego oraz zastosowania związków transparentnych umożliwiających jednoczesną ocenę próbek w mikroskopie elektronowym i optycznym [5-8]

### 1. MATERIAŁ I METODY

Celem badań było określenie, który metal może zastąpić złoto, przy pokrywaniu próbek biologicznych, przygotowywanych do obserwacji w mikroskopie elektronowym, i jeżeli było by to możliwe, przyszłych obserwacji w mikroskopie optycznym. Szczególny nacisk podczas prowadzonych prac położono na obniżenie kosztów procesu przy zachowaniu możliwie największej ilości cech metalu szlachetnego (a nawet zwiększenie wachlarza możliwości dzięki warstwom transparentnym). Materiał biologiczny jaki zastosowano do badań otrzymano w sposób następujący: namnażanie szczepów *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* przeprowadzono w bulionie tryptozowo-sojowym (Biomerieux), natomiast *Candida albicans* w płynnym podłożu Sabouraud (Biomerieux). Następnie badane komórki zostały odwirowane, zawieszono w wodzie destylowanej i naniesiono na szkiełka nakrywkowe. Preparaty zostały wysuszone w temperaturze pokojowej.

W kolejnym etapie próbki pokryto cienką warstwą następujących substancji: miedzi, stopu miedzi z galem, cyny i tlenku cyny. Do eksperymentu zastosowano magnetron Line 440 H4 No9 (Alliance Concept) umożliwiający nanoszenie cienkich warstw metodą sputteringu. Na proces sputteringu wymienionych materiałów ma wpływ kilka czynników, takich jak: moc generatora (mająca bezpośredni udział w ilości nanoszonego materiału w jednostce czasu), udział gazów roboczych (w analizowanym przypadku argonu i tlenu). Rolą argonu jest utrzymanie plazmy w komorze roboczej natomiast tlen bierze bezpośredni udział w składzie nanoszonej warstwy – tlenki materiałów. Manipulując wskazanymi powyżej parametrami wykonano serię napyłek materiałów na próbki biologiczne wg parametrów zawartych w poniższej tabeli (Tabela. 1). Proces sputteringu jest podzielony na dwa etapy:

- presputtering – uruchomienie urządzenia bez próbki. Celem procesu jest przygotowanie źródła nanoszonego materiału (m.in. usunięcie potencjalnych zanieczyszczeń);
- sputtering – proces z próbką. Bezpośrednie nanoszenie warstwy.

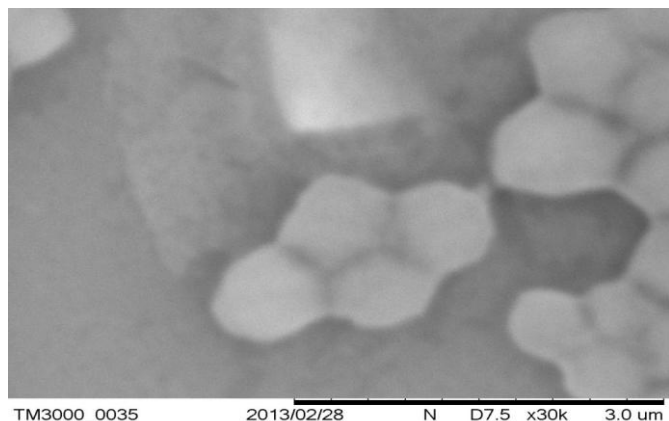
**Tab. 1.** Parametry nanoszenia warstw w procesie sputteringu magnetronowego

|                              | Miedź   | Miedź z galem | Cyna    | Tlenek cyny |
|------------------------------|---------|---------------|---------|-------------|
| <b>presputtering</b>         |         |               |         |             |
| Moc/Generator                | 600W/RF | 500W/DC       | 500W/RF | 800W/RF     |
| Przepływ argonu[sccm]        | 100     | 100           | 100     | 50          |
| Przepływ tlenu[sccm]         | 0       | 0             | 0       | 0           |
| Czas [s]                     | 60      | 15            | 15      | 25          |
| <b>sputtering</b>            |         |               |         |             |
| Moc/Generator                | 600W/RF | 500W/DC       | 600W/RF | 800W/RF     |
| Szybkość transportera [mm/s] | 800     | 500           | 500     | 200         |
| Przepływ argonu[sccm]        | 100     | 100           | 50      | 100         |
| Przepływ tlenu[sccm]         | 0       | 0             | 0       | 12          |
| Czas [s]                     | 180     | 180           | 180     | 600         |

## 2. WYNIKI BADAŃ

Obserwacja pokrytych w magnetronie próbek przeprowadzona była w mikroskopie elektronowym Hitachi TM3000 Table top SEM pod pełną próżnią i z 15kV napięciem przyspieszającym. Przykładem otrzymanych zobrazowań jest Rys. 1.

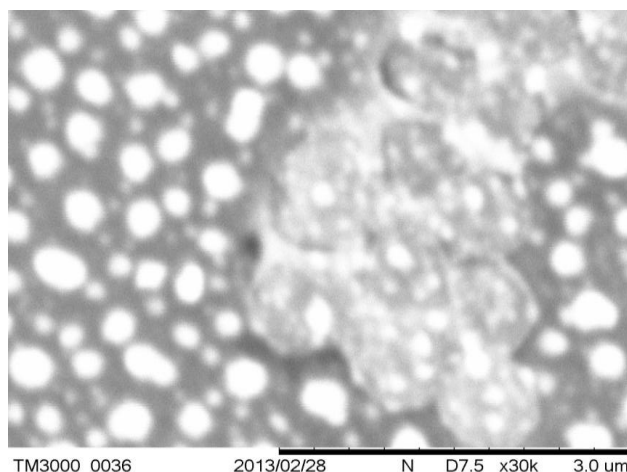
Autorzy rozpoczęli badania od miedzi, wybranej z powodu swoich właściwości elektrycznych - jest teraz najlepszym metalem przewodzącym. Próbki pokryte miedzią wykazują niski szum, a obrazy z nich uzyskane są ostre, lecz kontrast wizualnie jest niski (Rysunek. 1). Dodatkowym mankamentem jest fakt, że miedź bardzo szybko się utlenia. Po utlenieniu miedzi, jakość obrazów drastycznie spada.



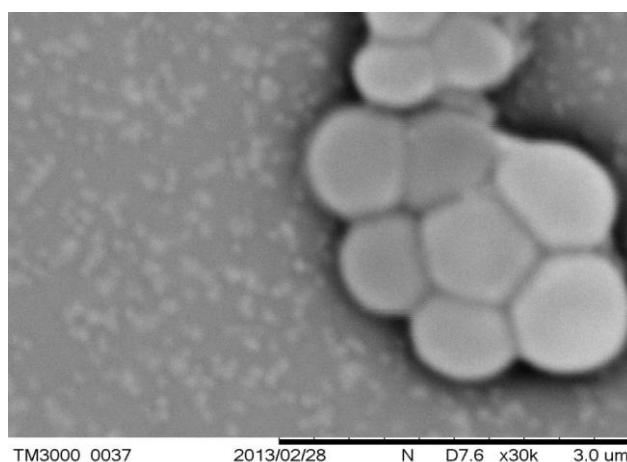
**Rys. 1.** *Staphylococcus aureus* pokryty miedzią. Powiększenie 30 000 razy

Następnym metalem była cyna. Używana w elektronice jako główne spoiwo lutownicze, cyna wykazuje dobre właściwości elektryczne i chemiczne, a jej tlenek także jest przewodnikiem więc utlenianie się powłoki nie stanowiłoby problemu. Niestety obrazy próbek pokrytych cyną były najgorsze ze wszystkich pozyskanych, zdjęcia były ledwo czytelne i pełne artefaktów (Rysunek. 2).

W trzecim etapie autorzy pokryli próbki stopem miedzi z galem. Wykorzystanie galu i związków miedzi z galem (stopu stosowanego w technologii półprzewodnikowej) było bardzo obiecujące (Rysunek. 3).

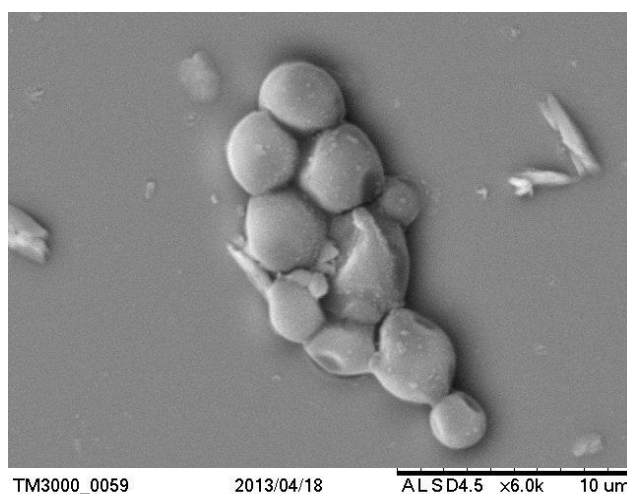


**Rys. 2.** *Staphylococcus aureus* pokryty cyną. Powiększenie 30 000 razy



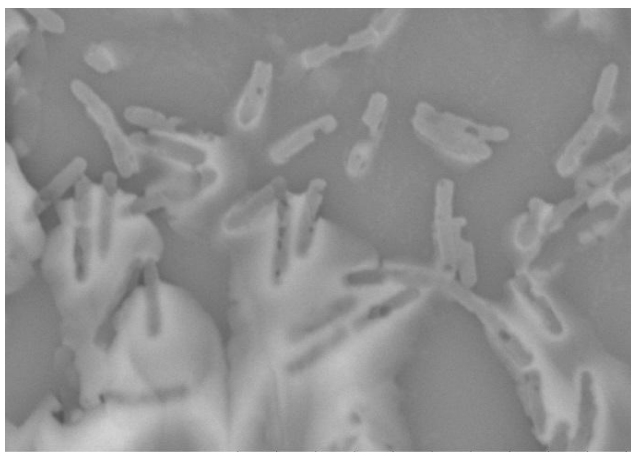
**Rys. 3.** *Staphylococcus aureus* pokryty stopem miedzi z galem. Powiększenie 30 000 razy

Próbki pokryte stopem miedzi i galu dały obrazy o wizualnie większym kontraście niż próbki pokryte miedzią, a zdjęcia tych próbek były ostre i precyzyjne (Rysunek. 4 i 5).



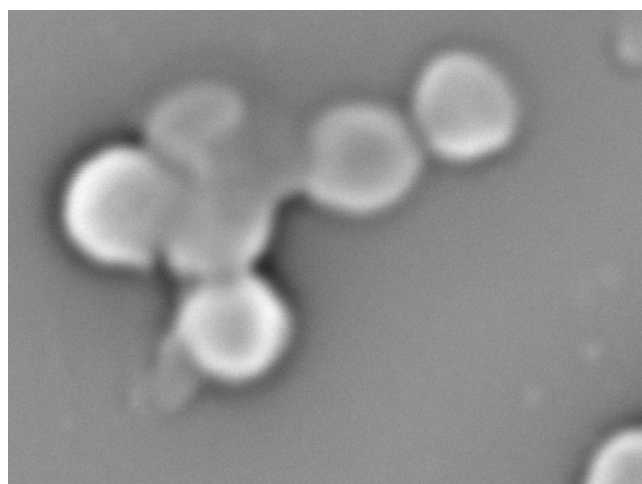
**Rys. 4.** Obraz próbki *Candida albicans* pokryty miedzią z galem

Dodatkowo warstwa metalu na tych próbkach nie utlenia się tak szybko, a nawet zdjęcia utlenionych próbek są podobnej jakości jak nieutlenionych.



**Rys. 5.** Obraz próbki *Pseudomonas aeruginosa* pokryty miedzią z galum

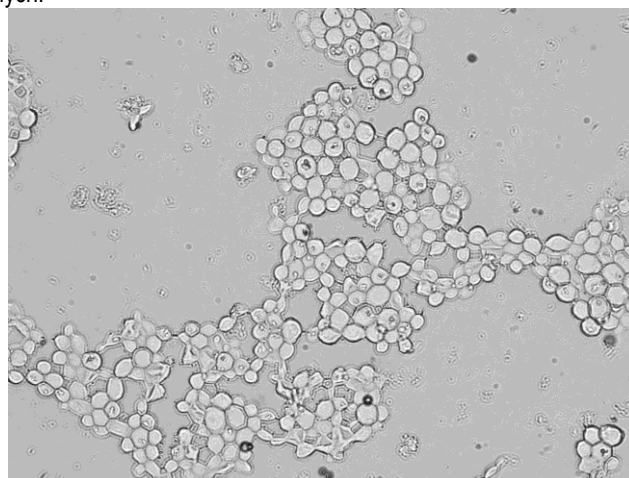
Obiecującą grupę cienkich warstw przewodzących w wymiennych wcześniej założeniach stanowią przewodniki przezroczyste [1-2]. Pomimo tego że jakość obrazów uzyskanych z próbek pokrytych cyną była bardzo słaba, autorzy postanowili napylić próbki tlenkiem cyny (Rysunek. 6).



**Rys. 6.** *Staphylococcus aureus* pokryty tlenkiem cyny. Powiększenie 30 000 razy

Obrazy próbek pokrytych tlenkiem cyny miały jakość porówny-

walną do próbek pokrytych stopem miedzi i galu. Zdjęcia były ostre, o minimalnie mniejszym kontraście niż próbek pokrytych miedzią z galum (Rysunek. 7). Najbardziej zaskakująca była różnica pomiędzy jakością zdjęć próbek pokrytych cyną i tych napylnych tlenkiem cyny. Dodatkowo tlenek cyny jako przewodnik przezroczysty umożliwia także obserwację preparatów w mikroskopach optycznych.



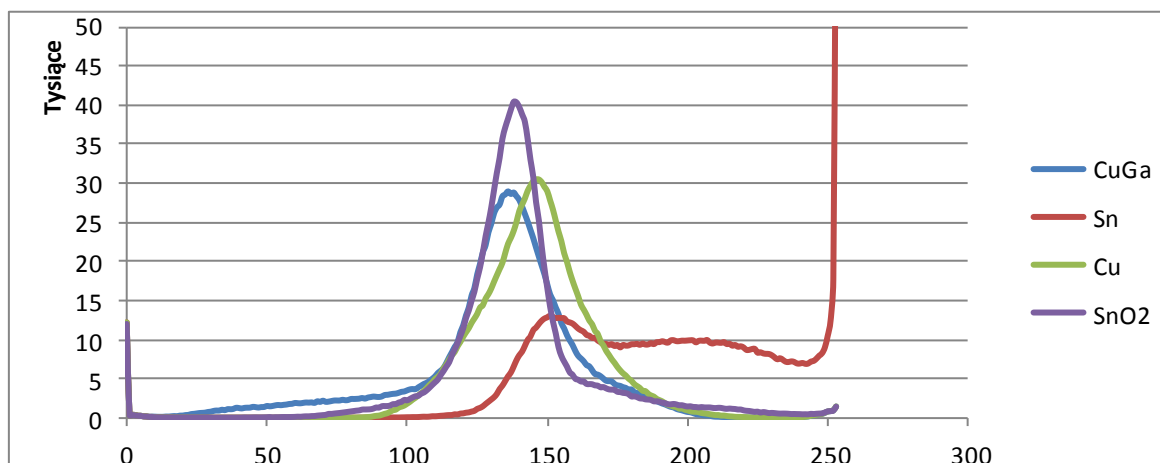
**Rys. 7.** *Candida albicans* pokryta tlenkiem cyny widoczna w mikroskopie optycznym

## PODSUMOWANIE

W celu oszacowania ilościowego jakości naniesionych warstw postanowiono przeanalizować histogramy wytworzonych próbek. Histogram zbiorczy zamieszczony poniżej (Rysunek. 8) potwierdził obserwacje wizualne subiektywne. Jak można zaobserwować na wykresach próbki pokryte stopem miedzi i galu mają największy kontrast, co odpowiada spłaszczonemu wykresowi w postaci krzywej Gaussa.

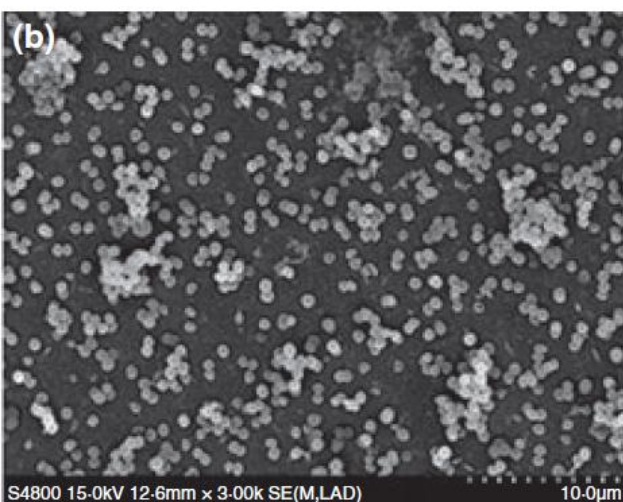
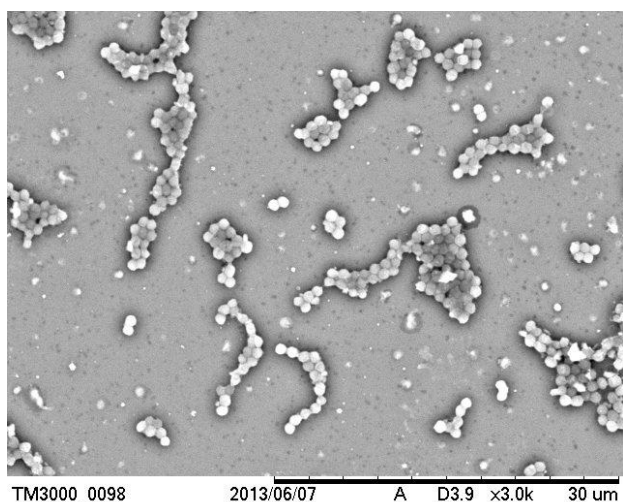
Histogram zdjęć pokrytych miedzią i tlenkiem cyny wykazują podobny kształt, lecz wykresy są bardziej wysmukłe, a krzywa miedzi przesunięta jest w stronę jaśniejszych wartości. Histogram zdjęcia próbki pokrytej cyną potwierdza, że było to najgorsze zdjęcia uzyskane podczas eksperymentu, wykres nie jest krzywą Gaussa.

Jak wspomniano wcześniej, najlepsza jakość obrazu została uzyskana z próbek pokrytych stopem miedzi i galu, a utlenianie się powłoki nie wpłynęło na jakość pozyskiwanych obrazów. W odniesieniu do danych literaturowych można stwierdzić, że jakość obrazu jest porównywalna z próbkami pokrytymi złotem (Rysunek. 9).



**Rys. 8.** Histogram zbiorczy wytworzonych próbek





**Rys. 9.** Porównanie próbek *Staphylococcus aureus* pokrytych stopem miedzi z galem (górne zdjęcie) i złotem (dolne zdjęcie) [3]

Najbardziej zaskakująca jest różnica w jakości obrazów uzyskanych z próbek pokrytych cyną i tlenkiem cyny. Zdjęcia uzyskane z próbek pokrytych cyną były najgorszej jakości, natomiast próbki pokryte tlenkiem cyny dostarczały obrazów prawie tak dobrej jakości jak te pokryte miedzią z galem. Przezroczystość tlenku cyny umożliwia obserwację próbek zarówno w mikroskopie elektronowym jak i w mikroskopie optycznym, dodatkowo użycie już utlenionej powłoki eliminuje problem oksydacji.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sanchez C. i inni. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:47
2. Batzill M., Diebold U. The surface and materials science of tin oxide Department of Physics, Tulane University, 6400 Freret St., Stern Hall 2001, New Orleans, LA 70118, United States *Progress in Surface Science* 79, 2005, 47–154
3. Jia P., Xue Y.J., Duan X.J. and Shao S.H. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254
4. Ruiz-Castell P., Seeing the invisible, 1935–1945 Institut d'Història de la Medicina i de la Ciència 'López Piñero' Universitat de València – CSIC, 0073-2753/13/5102-0221/\$10.00 Science History Publications Ltd, 2013

5. Rossnagel S.M., SputterDeposition W.D. Sproul, K.O. Legg (Eds.), Opportunities for Innovation Advanced Surface Engineering, Technomic Publishing Co, Switzerland, 1995
6. Park M. W., Lee W. W., Lee J. G., Lee Ch. M., A Comparison of the Mechanical Properties of RF- and DC- Sputter-Deposited Cr ThinFilms, *Materials Science Forum* (Volumes 546 - 549), 2007
7. Batzill M., Diebold U., The surface and materials science of thin oxide, *Progress in Surface Science* 79, 47-154, 2005
8. Posadowski W. M., Pulsed magnetron sputtering of reactive compounds, *Thin Solid Films*, vol. 343–344 s. 85–89, 1999
9. Musil J., Baroch P., Vlcek J., Nam K.H., Han J.G., Reactive magnetron sputtering of thin films: present and trends, *Thin Solid Films*, vol. 475 s. 208–218, 2005
10. Kaczmarek D, Modyfikacja wybranych właściwości cienkich warstw TiO<sub>2</sub>, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2008.

## THE APPLICATION OF THIN TRANSPARENT METAL LAYERS AND THEIR OXIDES IN PREPARATION OF BIOLOGICAL SAMPLES FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

### Abstract

*Paper discussed the impact of alcohol on the psychophysical properties of human and its metabolism. Particular attention was paid to the influence of alcohol on driving ability. Authors proposed action to be taken to reduce*

Autorzy:

doc. dr inż. **Tomasz Grudniewski** – Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej, Wydział Nauk Ekonomicznych i Technicznych, Katedra Nauk Technicznych, Zakład Informatyki, knt@pswbp.pl

dr inż. **Marta Chodyka** – Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej, Wydział Nauk Ekonomicznych i Technicznych, Katedra Nauk Technicznych, Zakład Informatyki, m.chodyka@dydaktyka.pswbp.pl

inż. **Sławomir Czernik** – Centrum Badań nad Innowacjami Państwowej Szkoły Wyższej im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

mgr **Dorota Plewik** – Centrum Badań nad Innowacjami Państwowej Szkoły Wyższej im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej