

Mikroskopia świetlna i konfokalna

Przemysław Snopiński, Paweł Jarka, Marcin Bilewicz*

Mikroskopia świetlna

Najprostszą metodą badania materiałów jest ich obserwacja okiem nieuzbrojonym. Ilość dostrzeganych szczegółów struktury materiału zwiększa się w miarę przybliżania badanego obiektu do oka dzięki temu, że jest on obserwowany pod coraz większym kątem. Dzieje się tak wyłącznie do momentu, gdy obiekt znajdzie się w tzw. odległości dobrego widzenia. Dla normalnego oka odległość ta wynosi 250 mm.

Osiąganie ostrych, a jednocześnie bogatszych w szczegóły obrazów, obserwowanych z odległości mniejszej niż 250 mm staje się możliwe z wykorzystaniem lupy bądź mikroskopu świetlnego. Za-

sadniczym celem prowadzenia obserwacji z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego jest jakościowa oraz ilościowa analiza mikrostruktury. Prowadzi ona przede wszystkim do identyfikacji tworzących ją składników (faz) oraz ustalenia rodzaju, wielkości, ilości, rozmieszczenia i morfologii składników tworzących mikrostrukturę. Badania techniką mikroskopii świetlnej umożliwiają między innymi:

- określenie kształtu oraz pomiar wielkości ziarna w strukturze materiałów polikrystalicznych, zarówno jedno- jak i wielofazowych;
- ujawnienie wad mikrostruktury w postaci mikroporowatości, mikropęknięć, niejednorodności struktury

oraz segregacji pierwiastków stopowych;

- ujawnienie oraz pomiar grubości warstw powierzchniowych o zmienionej strukturze, będącej zamierzonym bądź ubocznym skutkiem procesów technologicznych.

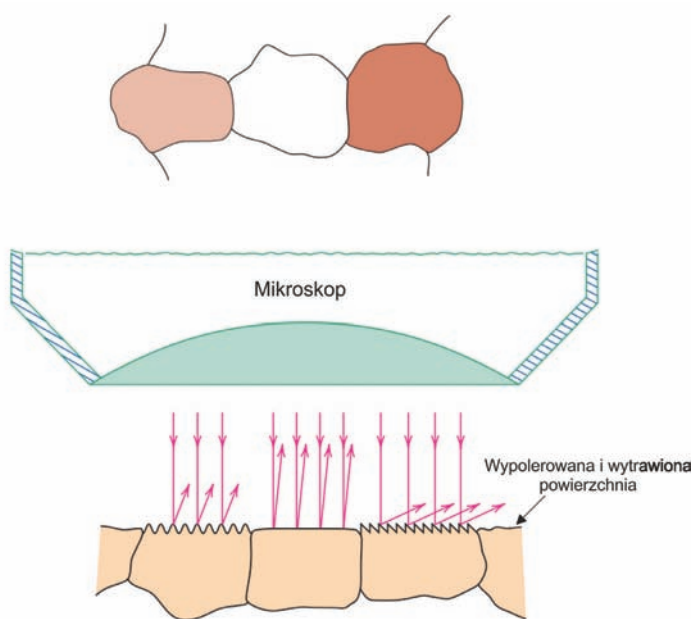
Aby możliwe było wykonanie badań z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego niezbędne jest wykonanie odpowiedniej preparatyki obserwowanych próbek, których powierzchnia powinna być uprzednio zeszlifowana oraz wypolerowana. Ujawnienie mikrostruktury odbywa się w procesie trawienia przez zastosowanie odpowiednich odczynników chemicznych. Dla przykładu reaktywność chemiczna ziarn w materiałach polikrystalicznych zmienia się od ziarna do ziarna. Rysunek 1 przedstawia schematycznie

sposób w jaki światło padające na próbkę odbija się od wytrawionej powierzchni zglądu metalograficznego (ziarn stopu), które charakteryzują się zróżnicowaną orientacją krytalograficzną. Przykładowe zdjęcie mikrostruktury materiału polikrystalicznego przedstawiono na rysunku 2.

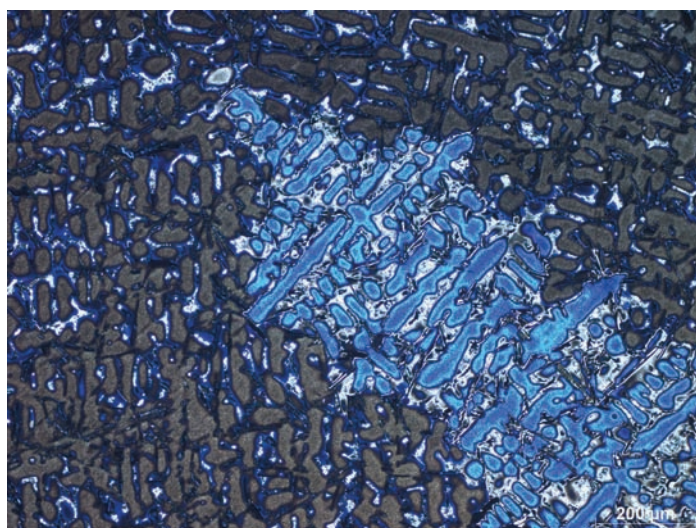
Biorąc pod uwagę różne możliwości powstawania kontrastu od szczegółów mikrostruktury w obrazie mikroskopowym, współczesne mikroskopy świetlne dysponują następującymi sposobami prowadzenia obserwacji mikrostruktury:

- w jasnym polu widzenia;
- w ciemnym polu widzenia;
- w świetle spolaryzowanym;
- w kontraście interferencyjnym.

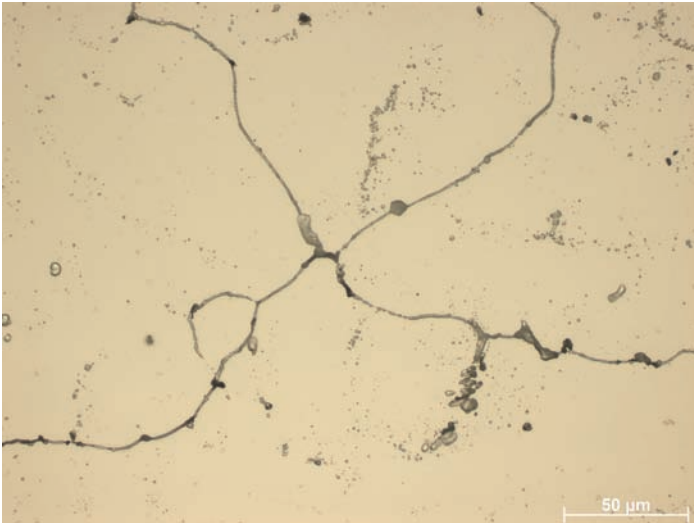
Podstawową metodą badań w mikroskopii odbiciowej jest



Rys. 1. Schemat ilustrujący sposób w jaki padające światło odbija się od powierzchni wypolerowanego i wytrawionego zglądu materiału polikrystalicznego



Rys. 2. Obraz mikrostruktury odlewniczego stopu aluminium z krzemem



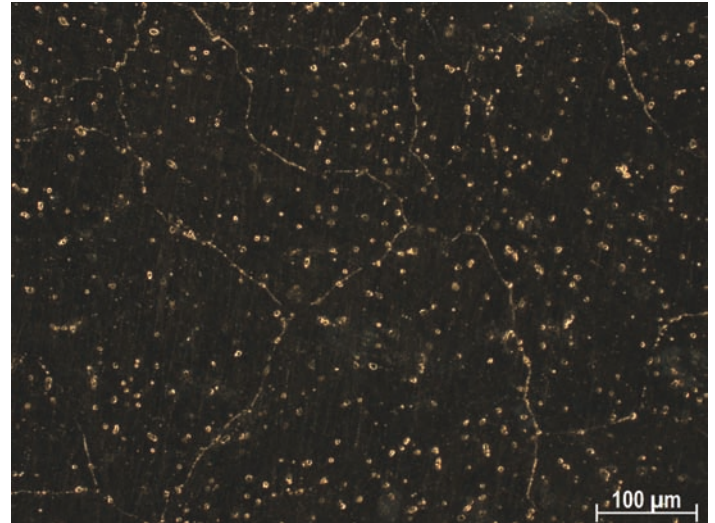
Rys. 3. Mikrostruktura stopu aluminium obserwowana w jasnym polu widzenia

obserwacja szczegółów mikrostruktury w jasnym polu widzenia. Jeżeli powierzchnia zglądu jest idealnie wypolerowaną płaską powierzchnią metaliczną o jednakowej zdolności odbijania światła, to wiązka światła po odbiciu od niej trafi z powrotem do obiektywu, bez zmiany rozkładu w tej wiązce natężenia i barwy światła. Otrzymany obraz mikroskopowy będzie więc w takim przypadku pozbawiony jakichkolwiek szczegółów, jasny oraz tak samo jednorodny pod względem rozkładu natężenia i barwy światła jak wiązka oświetlająca. Taki sposób prowadzenia obserwacji nazywa się badaniem w jasnym polu widzenia.

W opisanym powyżej szczególnym przypadku obserwacji powierzchni zglądu metalograficznego pozbawionego punktów odniesienia, ogniskowanie mikroskopu należy wykonać na obraz brzegów przysłony polowej. Zgodnie z zasadą działania oświetlacza Kohlera, obraz tej przysłony tworzy się dokładnie w płasz-

czyźnie przedmiotowej mikroskopu. Zogniskowanie mikroskopu w taki sposób sprawia, że w polu widzenia na jasnym tle widoczne są brzegi przymkniętej przysłony polowej, co oznacza równie ostre zogniskowanie obrazu na powierzchnię obserwowanego zglądu.

W obrazie mikroskopowym wykorzystując ten typ obserwacji na ogólnym jasnym tle mogą ujawnić się tylko takie szczegóły mikrostruktury powodujące znaczne zmniejszenie (w stosunku do tła) lub całkowity zanik światła w ich obrazie. Szczegółami takimi na wypolerowanej powierzchni zglądu mogą być przecięte jego płaszczyzną, pozbawione zdolności do odbijania światła, obszary występowania faz bądź wtrąceń niemetalicznych oraz wszelkie nieciągłości ich osnowy metalicznej, powodujące efekt rozproszenia światła (np. mikropory, mikropęknięcia). Przykład struktury stopu aluminium obserwowanej w jasnym polu widzenia zamieszczono na rysunku 3.

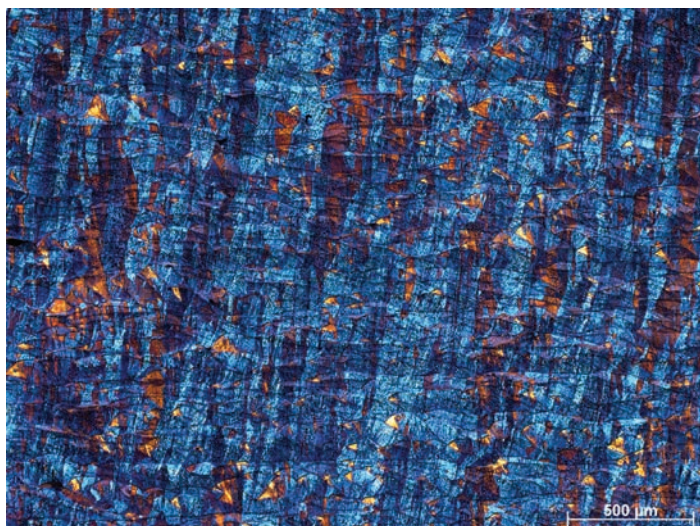


Rys. 4. Mikrostruktura stopu AlMg3 obserwowana w ciemnym polu widzenia. Na zdjęciu widoczne są drobne wydzielenia oraz granice ziaren

Celem zapewnienia możliwości wykorzystania pełnej zdolności rozdzielczej mikroskopu przy obserwacji tych szczegółów powierzchni zglądu, w obrazie których w polu jasnym brakowało światła należy zmodyfikować bieg wiązki w taki sposób by uzyskać odwrócenie kontrastów w obrazie w stosunku do obrazu obserwowanego w jasnym polu widzenia (zastosować obserwację w ciemnym polu widzenia). W technice tej odpowiednio przygotowany zgląd metalograficzny oświetlony jest wiązką skośną do jego powierzchni (oświetlacz wykonany z pierścienia szklanego ustawiony pod kątem 45° do osi optycznej obiektywu). W ten sposób uzyskuje się efekt czarnego tła obrazu, na którym pojawiają się jasne kontury nierówności, których powierzchnia nie jest prostopadła do głównej osi optycznej obiektywu. Zaletą obserwacji w ciemnym polu widzenia jest możliwość

maksymalnego wykorzystania apertury obiektywu, co zapewnia jednocześnie wykorzystanie pełnej zdolności rozdzielczej. Obserwacje mikroskopowe prowadzone przy takim sposobie oświetlenia badanej powierzchni zglądu są szczególnie przydatne do kontrastowego ujawniania granic ziaren metali i ich stopów oraz identyfikacji wtrąceń niemetalicznych (rys. 4). Barwę wydzieleni można jednak ocenić wyłącznie przy oświetlaniu preparatu światłem białym.

Celem badań metalograficznych w świetle spolaryzowanym jest wykrywanie anizotropii szczegółów powierzchni obserwowanego zglądu. Zastosowanie światła spolaryzowanego w badaniach mikroskopowych pozwala na uzyskanie w obrazie ich mikrostruktury kontrastu od faz i składników strukturalnych optycznie czynnych w stosunku do takiego światła, tzn. zmieniających stan jego polaryzacji.



Rys. 5. Mikrostruktura stali po procesie selektywnego spiekania laserowego. Na rysunku widać stos warstw, których połączenie ze sobą nastąpiło w wyniku oddziaływania cieplnego w głąb materiału. Struktury przypominające rybie łuski reprezentują pojedynczą linię skanowania wraz ze strefą wpływu ciepła

Poza możliwością obserwacji przy jednoczesnym zastosowaniu polaryzatora i analizatora można prowadzić obserwację przy wprowadzaniu w bieg promieni samego analizatora. Uzyskuje się wtedy interesujące informacje o własnościach optycznych składników mikrostruktury wykazujących silną anizotropię. W świetle spolaryzowanym można również prowadzić obserwację zglądów trawionych. Utworzony podczas chemicznego trawienia relief na granicach ziaren daje efekty optyczne zależne od ich usytuowania względem płaszczyzny polaryzacji. Pojawiają się efekty cieni o różnej intensywności w zależności od orientacji krystalograficznej (rys. 5).

Wykonując obserwację w świetle spolaryzowanym istnieje możliwość popełnienia błędów, które związane są z niewłaściwym przygotowaniem zglądów:

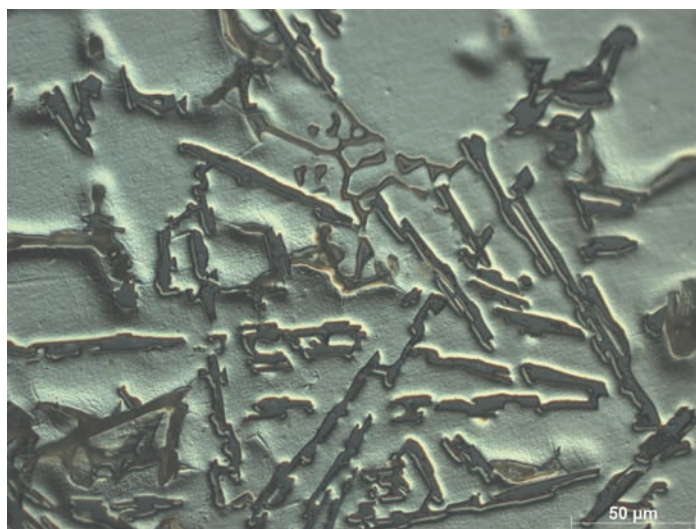
- wytworzenie podczas polerowania na powierzchni zglądu warstewki Beilby'ego, powodującej brak kontrastu w świetle spolaryzowanym;
 - zbyt duży relief oraz warstwy tlenkowe, mogące tworzyć się na powierzchni próbki w trakcie trawienia chemicznego utrudniają lub uniemożliwiają ocenę anizotropii składników strukturalnych.
- Badania mikroskopowe z wykorzystaniem „kontrastu Nomarskiego” opierają się na wykorzystaniu zjawiska kontrastu interferencyjnego w świetle spolaryzowanym, z wykorzystaniem interferencji różniczkowej. W technice NIC (ang. Nomarski Interference Contrast) lub – częściej – DIC (ang. Differential Interference Contrast) obraz tworzony jest w wyniku podziału światła spolaryzowanego przez odpowiedni pryzmat (tzw. pryzmat Wollastona) na dwie wiązki. W rezultacie obserwuje się próbkę w świetle interferują-

cych promieni świetlnych, tj. wiązki normalnej oraz wiązki nieznacznie przesuniętej w fazie, co daje wrażenie obrazu przestrzennego (rys. 6).

Mikroskopia konfokalna w badaniach materiałowych

Mikroskopia konfokalna jest modyfikacją mikroskopii świetlnej. W porównaniu z tradycyjną mikroskopią optyczną cechuje się zwiększonym kontrastem, większą głębią ostrości oraz zdolnością rozdzielczą. Podstawy mikroskopii konfokalnej zostały opracowane i opatentowane przez Marvina Minskiego w latach 60-tych XX wieku. Wysoka jakość obrazowania w przypadku mikroskopii konfokalnej uzyskiwana jest przez zastosowanie zmian konstrukcyjnych tradycyjnego mikroskopu optycznego. Zastosowanie przesłony pierścieniowej przed detektorem (z ang. pinhole), pozwalającej na sterowanie wielkością otworu umożliwia odcięcie sygnału dochodzącego spoza płaszczyzny ogniskowania,

zwiększając kontrast obrazu. W tradycyjnym mikroskopie optycznym tzw. „szerokiego pola”, preparat oświetlany jest przez źródło światła w całości. Padające światło odbija od powierzchni preparatu (lub fluoruje w przypadku mikroskopu fluorescencyjnego), po czym sygnały te są zbierane przez obiektyw. Rozwiązanie to zmniejsza kontrast, ponieważ tło wobec sygnału z miejsca ogniskowania jest wysokie. Dodatkowo rozdzielczość pionowa mikroskopu konfokalnego bezpośrednio skorelowana z grubością płaszczyzny ogniskowania jest zależna od zastosowanych soczewek obiektywu oraz własności badanej próbki. Drugą najważniejszą zmianą konstrukcyjną mikroskopu konfokalnego jest zastosowanie źródła światła w postaci lasera. Zastosowanie lasera pozwala na uzyskanie bardzo wąskiej (w przybliżeniu punktowej) wiązki światła o dużej mocy oraz możliwość jej płynnej regulacji.



Rys. 6. Mikrostruktura stopu aluminium z krzemem obserwowana z wykorzystaniem kontrastu interferencyjno-różniczkowego



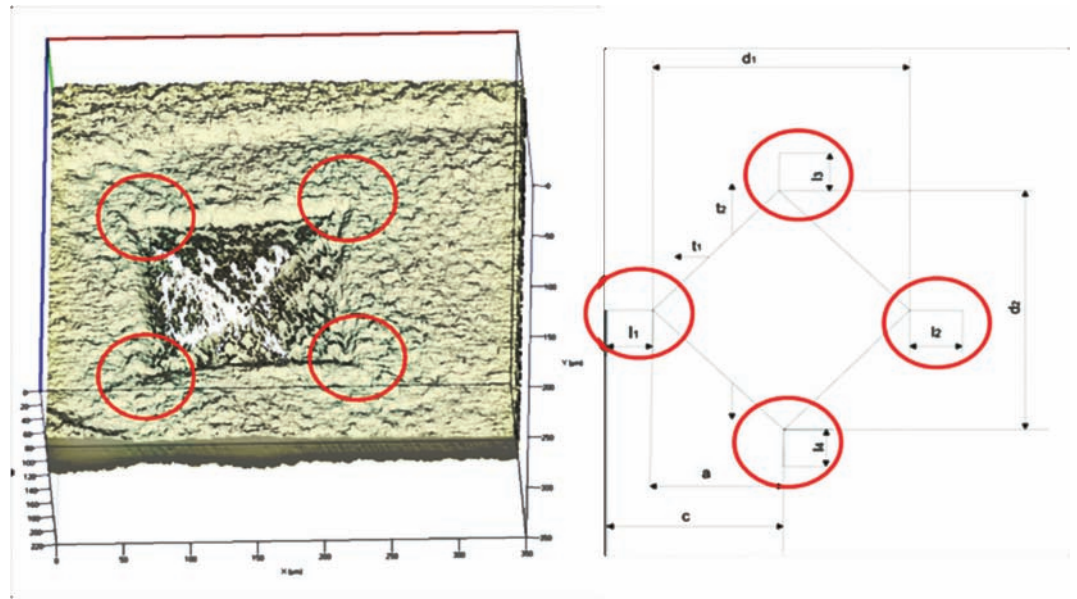
Obecnie używa się głównie dwóch typów mikroskopów konfokalnych:

- skanujące laserowe mikroskopy konfokalne (ang. Scanning Laser Confocal Microscopes);
- mikroskopy konfokalne z wirującym dyskiem (ang. Spinning-Disk Confocal Microscopes).

Z punktu widzenia badań materiałowych mikroskopia konfokalna stosowana jest głównie do badań wymagających zwiększonej jakości obrazowania, badań biomateriałów po implantacji, czy badań topografii powierzchni materiałów.

Zalety mikroskopu konfokalnego:

- zastosowanie przesłony z małym otworem przed detektorem pozwala na odcięcie sygnału dochodzącego spoza płaszczyzny ogniskowania, co skutkuje powiększeniem kontrastu i jakości uzyskanego obrazu;
- możliwość wizualizacji żywych preparatów;
- możliwość rekonstrukcji obrazu 3D i 4D (w czasie rzeczywistym);
- możliwość rejestrowania obrazów cienkich warstw preparatu (rejestracji serii przekrojów optycznych na różnych głębokościach preparatu);
- możliwość tworzenia obrazów kolejnych płaszczyzn preparatów i tworzenia modelu trójwymiarowego;
- eliminowanie problemu poświaty wynikającej z warstw preparatu leżących poza płaszczyzną ogniskowania;
- lepsza rozdzielczość niż w obrazach uzyskanych przy użyciu tradycyjnej mikroskopii optycznej.



Rys. 7. Wyznaczanie współczynnika odporności na kruche pękanie K_{IC} metodą Palmquista

Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna

Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna polega na detekcji wypromieniowanego światła zaabsorbowanego uprzednio przez badany materiał. Emitowane światło w stosunku do światła absorbowanego charakteryzuje się większą długością fali. Obrazowanie opiera się na pomiarze fluorescencji związków chemicznych powiązanych z określonymi typami komórek wraz z strukturami wewnątrzkomórkowymi lub grupami chemicznymi. W tym celu stosowane są liczne metody barwienia tzw. barwnikami fluorescencyjnymi. Konstrukcja przesłony w detektorze umożliwia użycie w powstawaniu obrazu tylko fluorescencji emitowanej z miejsca ogniskowania.

Techniki fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej

Technika FRET (ang. Förster Resonance Energy Transfer) wykorzystuje mechanizm trans-

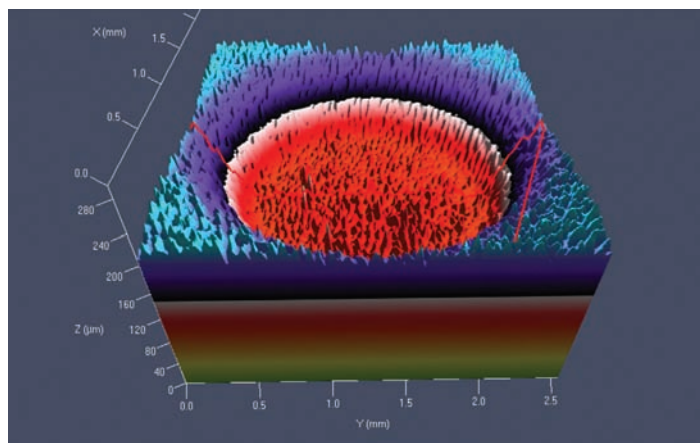
feru energii między dwoma chromoforami nie będący promieniowaniem. Zasada działania tej techniki opiera się na wytworzeniu transferu energii pomiędzy sondami fluorescencyjnymi tworzącymi donor i akceptor bez wytworzenia fotonu. Tego rodzaju transport jest możliwy w przypadku gdy widma emisji donora i akceptora nakładają się w wyniku ułożenia dipoli pary donor-akceptor w odległości 1-10 nm. W technice FRET wzbudzany selektywnie donor powoduje spadek fluorescencji donora, natomiast znaczący wzrost fluorescencji akceptora.

W naukach biomedycznych technika znajduje zastosowanie w badaniu mechanizmów działania oraz dynamiki makrocząsteczek biologicznych (białek, DNA, RNA).

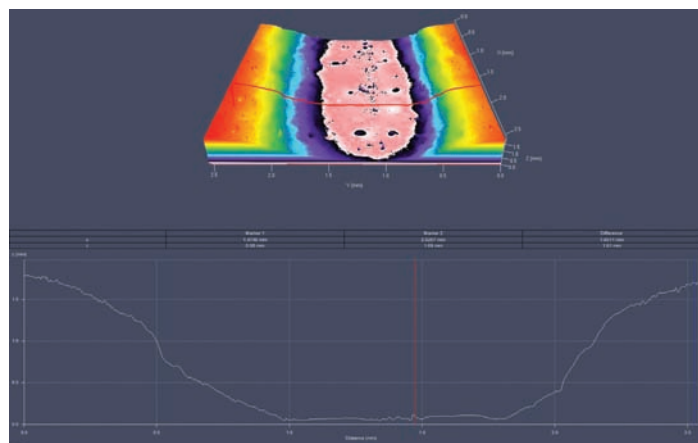
Technika FRAP (ang. Fluorescence Recovery after Photobleaching) polega na określaniu ruchliwości wyznaczonych sond fluorescencyjnych przyłączonych do białek

i lipidów wiązaniami kowalencyjnymi. Badanie opiera się na wygaszeniu fluorescencji sondy w określonym obszarze materiału przez impuls światła laserowego o dużej intensywności. Prowadzi to do powstania w danym obszarze materiału dwóch części sondy fluorescencyjnej: wygaszonej oraz niewygaszonej. Przywrócenie fluorescencji w wygaszonym regionie następuje w przypadku wykazywania przez molekułę zdolności do przemieszczania, natomiast całkowicie ciemny obraz sugeruje molekułę nieruchomą. Technika FRAP umożliwia szacowanie procentowej zawartości poszczególnych frakcji w materiale np. białek.

Technika FLIP (ang. Fluorescence Loss in Photobleaching) jest wariantem techniki FRAP. W metodzie tej rejestrowana jest strata fluorescencji w obszarze materiału otaczającym obszar wybielony. Strata fluorescencji w badanym obszarze jest następ-



Rys. 8. Teksturowana laserowo powierzchnia stali pokrytej powłoką TiN



Rys. 9. Profil wytarcia powierzchni spiekanej stali narzędzowej po teście odporności na ścieranie

stwem ruchu poprzecznego białek komórkowych w obszarach połączonych. Obserwacja fluorescencji w niepołączonych obszarach materiału, w których nie jest ograniczona, sugeruje ciągłość preparatu.

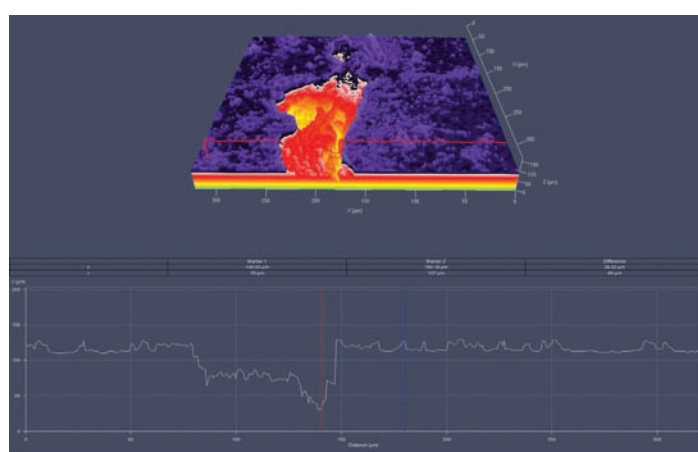
Mikroskopia konfokalna w obrazowaniu materiałów inżynierskich

Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa CLSM (ang. Confocal Laser Scanning Microscopy) jest najczęściej stosowaną w inżynierii materiałowej odmianą mikroskopii konfokalnej. Wysoka jakość obrazowania uzyskiwana w przypadku mikroskopii konfokalnej, jak również możliwość badań topografii powierzchni stanowią o coraz częstszym zastosowaniu konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego. Podczas obrazowania promień lasera o określonej długości fali skanuje powierzchnię preparatu punkt po punkcie (odpowiednio wzdłuż osi X i Y), a uzyskany obraz jest pozbawiony nieostrych elementów i obrazów pozostających poza ogniskową obiektywu. Aparat sterują-

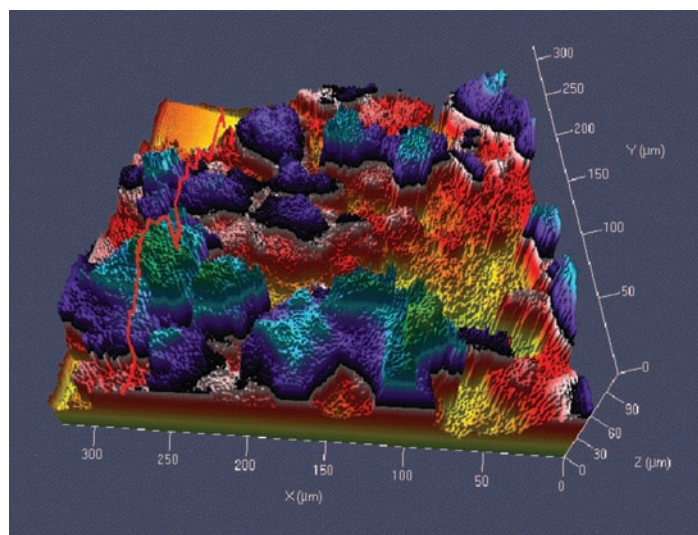
cy pozwala na dokonywanie tzw. przekrojów optycznych preparatu. Urządzenie umożliwia zmianę płaszczyzny ogniskowania przez ruch stolika mikroskopu wzdłuż osi Z. Podczas badania promień lasera automatycznie skanuje preparat o grubości 50-100 µm na kolejnych, coraz głębszych płaszczyznach ogniskowania, zgodnie z ustawieniami operatora. Następnie program komputerowy składa serię obrazów w jeden trójwymiarowy obraz współogniskowy (konfokalny).

Przykłady zastosowania mikroskopii konfokalnej w obrazowaniu materiałów inżynierskich

Mikroskopia konfokalna umożliwiającą wykonywanie obrazowania o wysokiej jakości wykorzystywana jest w badaniach, których wiarygodność w dużej mierze zależy od dokładności pomiarów elementów powierzchni. Na rysunku 7 przedstawiono przykład wyznaczania współczynnika odporności na kruche pękanie K_{Ic} metodą Palmquista, polegający na dokładnym pomia-



Rys. 10. Profil uszkodzenia powierzchni stali narzędzowej



Rys. 11. Profil zmian wywołanych korozją na powierzchni materiału

rze długości kruchych pęknięć po badaniu twardości metodą Vickersa. *Dokończenie na str. 35.*



Literatura

- [1] Clark D.K., Nacham O., Pur-slow A.J., Pierson A.S., Ande-son L.J. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A re-view. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 934, 9-21.
- [2] Santos E., Albo J., Irabien A. Magnetic ionic liquid: syn-thesis, properties and applica-tions. *RSC Advances*, 2014,4, 40008-40018.
- [3] Szymanowski J. Wybrane fizykochemiczne aspekty wy-dzielania jonów metali. Mem-brany - teoria i praktyka, 2003, 30-46.
- [4] Tomé C.L., Marrucho M.I. Ionic liquid-based materials: a platform to design enginee-red CO₂ separations mem-branes. *Chemical Society Re-views*, 2016, 45, 2785-2824.
- [5] Strona internetowa: <http://zcha.amu.edu.pl/pliki/mikroekstrakcja/5.pdf>

- [6] Makoś P., Boczkaj G. Che-mometryczne podejście do optymalizacji dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz (DLLME), jako me-tody przygotowania próbek do rozdzielania i oznaczania krezoli w ściekach rafineryj-nych. *Camera Separatoria*, 2014, 6(2), 65-71.
- [7] Anuszevska L.E. Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wy-robów medycznych. *Gazeta Farmaceutyczna*, 2010, 5, 36-38.
- [8] Joseph A., Żyła G., Thomas I.V., Nair R.P., Padmanabhan A.S., Mathew S. Paramagnetic ionic liquids for advanced ap-plications: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 218, 319-331.
- [9] Strona internetowa: <http://www.kfm.p.lodz.pl/dydaktyka/FPI/FPI-wyklad-13b.pdf>

Dokończenie ze str. 22.

Realizacja przekrojów optycz-nych umożliwia – w przy-padku badań materiałowych – tworzenie obrazów topo-graficznych; przykładem zastosowania mikroskopii konfokalnej w obrazowaniu topografii materiałów jest ob-ras teksturowanej laserowo powierzchni stali pokrytej po-włoką TiN przedstawiony na rysunku 8. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwia ponad-to pomiar głębokości wytarc po

testach odporności na ścieranie (rys. 9), nieciągłości i uszkodzeń powierzchni materiałów meta-lowych, polimerowych oraz ceramicznych (rys. 10) lub zmian spowodowanych ko-rozją (rys. 11) przez tworzenie profilu powierzchni.

* *Zakład Technologii Proce-sów Materiałowych, Zarządza-nia i Technik Komputerowych w Materiałoznawstwie, Insty-tut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Wydział Me-chaniczny Technologiczny, Po-litechnika Śląska w Gliwicach*

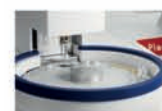


Pomiary w laboratorium chemicznym

Rozwiązania METTLER TOLEDO do laboratorium obejmują automatyczne pomiary analityczne, wydajne opracowywanie procesów chemicznych oraz automatyzację pomiarów laboratoryjnych i procesów produkcyjnych. Dodatkowe usługi gwarantują zgodność z oficjalnymi normami oraz spójne i dokładne dane pomiarowe.

Produkty i rozwiązania

Automatyzacja badań chemicznych
Wagi, ważenie laboratoryjne
Instrumenty analityczne
Pipety i końcówki
Analiza termiczna



www.mt.com

METTLER TOLEDO