



Jaana Laitila

Peltier-näytelavan käyttö pyyhkäisyelektronimikroskoopissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

21.1.2025

Tiivistelmä

Tekijä:	Jaana Laitila
Otsikko:	Peltier-näytelavan käyttö pyyhkäiselektronimikroskoopissa
Sivumäärä:	29 sivua + 2 liitettä
Aika:	21.1.2025
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Materiaali- ja pinnoitetekniikka
Ohjaaja:	Lehtori Juha Kotamies

Opinnäytetyö tehtiin Metropolia Ammattikorkeakoululle. Tarkoituksena oli selvittää pyyhkäiselektronimikroskoopin (SEM) lisäosana hankitun Peltier-elementin tuomat mahdollisuudet näytteiden tutkimiseen. Tavoitteena oli myös suorittaa laitteen käyttöönotto koululla olevaan SEM-laitteeseen ja laatia yksinkertainen käyttöohje.

Tavallisesti näytteen on oltava kuiva ja sähköä johtava, jotta sitä voidaan tarkastella SEM-laitteella. Biologisten näytteiden kohdalla näin ei kuitenkaan ole, jos niitä halutaan tutkia mahdollisimman alkuperäisessä tilassa. Peltier-elementti ja vesihöyryn käyttö kuvantamiskaasuna mahdollistaa pinnoittamattomien näytteiden tutkimisen ilman näytteen kuivumista tai rakenteen romahtamista. Kuvantaminen perustuu prosessissa muodostuviin positiivisiin ioneihin. Tämän avulla voidaan myös tutkia erilaisia kemiallisia reaktioita ja muutoksia näytteessä muuttamalla kammion olosuhteita lämpötilan ja vesihöyrynpaineen avulla. Peltier-elementti toimii järjestelmässä näytteen lämpötilan säätämiseen.

Työhön on koottu SEM-laitteen toimintaperiaatteet siltä osin, että ne auttavat ymmärtämään tavallisimpia haasteita johtamattomien näytteiden kuvantamisessa. Tämä työ toimii perehdytysmateriaalina uusille käyttäjille, mutta sen lisäksi on suositeltavaa tutustua SEM-laitteen rakenteeseen ja perustoimintaan ennen käyttöä. Lopputuloksena koulun SEM-laitteeseen saatiin asennettua Peltier-elementti ja sen käyttöönottoon tarvittavat dokumentit.

Avainsanat: Peltier Cooling and Heating stage, pyyhkäiselektronimikroskooppi, biologinen näyte

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Jaana Laitila
Title: Use of a Peltier stage in a scanning electron microscope
Number of Pages: 29 pages + 2 appendices
Date: 21 January 2025

Degree: Bachelor of Engineering
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major: Materials and Surface Engineering
Supervisor: Juha Kotamies, Principal Lecturer

The thesis was made for Metropolia University of Applied Sciences. The aim was to investigate the possibilities of the Peltier element, which was purchased as an accessory for the scanning electron microscope (SEM), for the examination of samples. The aim was also to perform the installation of the instrument on the SEM at the school laboratory and to prepare a simple instruction manual.

Normally, a sample must be dry and electrically conductive in order to be examined by the SEM. However, this is not the case for biological samples if they are to be studied in as pristine a state as possible. The Peltier element and the use of water vapour as a quenching gas allow uncoated samples to be examined without drying the sample or causing structural collapse. Imaging is based on the positive ions generated in the process. This also allows the study of various chemical reactions and changes in the sample by changing the chamber conditions through temperature and water vapour pressure. A Peltier element is used in the system to control the temperature of the sample.

The thesis summarises the principles of SEM to the extent that they help to understand the most common challenges in imaging non-conductive samples. This thesis serves as an introductory material for new users, but it is also recommended to become familiar with the structure and basic operation of the SEM before using it. The final result was the installation of the Peltier element in the school's SEM and the documentation required for its deployment.

Keywords: Peltier Cooling and Heating stage, scanning electron microscope, biological sample

Sisällys

Lyhenteet ja käsitteet

1	Johdanto	1
2	Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate ja sen haasteet biologisten näytteiden tutkimisessa	1
2.1	Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate	2
2.1.1	Näytteen varautuminen	4
2.1.2	Biologisten näytteiden valmistus	5
2.2	Haasteet	5
3	Näytteen tutkiminen vaihtelevan paineen avulla	6
3.1	Toimintaperiaate	7
3.2	Kuvantaminen kaasuympäristössä	7
3.2.1	Säteilyvauriot	9
3.2.2	Ionien vaikutus kuvantamiseen	10
4	Vesihöyryn käyttö systeemissä	11
4.1	Kylläisen höyryn paine	12
4.1.1	Epäpuhtauksien vaikutus höyrynpaineeseen	16
4.1.2	Epätasapainotila	17
4.2	Peltier käyttöalue	18
5	Peltierin asennus ja käyttöönotto	20
6	Yhteenveto	25
	Lähteet	27
	Liitteet	
	Liite 1: Peltier-näytelavan asennusohjeet	
	Liite 2: Peltier käyttöohjeet	

Lyhenteet ja käsitteet

- BSE: *Backscattered electron*. Näytteestä takaisin sironnut elektroni.
- EDS: *Energy Dispersive Spectrometer*. Energiadispersiivinen alkuaine-analysaattori.
- ESEM: *Environmental electron microscope*. Ympäristöpyyhkäisy-elektronimikroskooppi.
- LVSTD: *Low Vacuum Secondary Electron TESCAN Detector*. SE-ilmaisoin matalan tyhjiön olosuhteisiin.
- PA: *Polyamini*.
- PET: *Polyetyleenitereftalaatti*.
- SE: *Secondary electron*. Näytteen pinnasta irtoava elektroni.
- SEM: *Scanning electron microscope*. Pyyhkäisyelektronimikroskooppi.
- VP-SEM: *Variable pressure scanning electron microscope*. Vaihtuvapaineinen pyyhkäisyelektronimikroskooppi.
- Apertuuri: Litteä kappale, jonka erikokoiset aukot mekaanisesti rajaavat elektronisäteen kokoa.
- Detektori: Ilmaisoin, joka muuttaa näytteestä irtoavat elektronit sähkövirraksi kuvanmuodostusta varten.
- Differentiaalipumppaus: Mekanismi, joka erottaa eri painevyöhykkeet toisistaan.
- Resoluutio: Pienin mitta, jolloin pystytään erottamaan kaksi pistettä toisistaan.

1 Johdanto

Työn tavoite on selvittää pyyhkäiselektronimikroskoopiin (SEM) asennettavan Peltier Cooling and Heating stage -elementin tuomia mahdollisuuksia näytteiden tutkimisessa. Tutkimustapoja tarkastellaan etenkin sellaisten näytteiden osalta, jotka ovat herkkiä muuttumaan SEM-laitteen tyhjiöolosuhteissa, kuten esimerkiksi biologiset näytteet. Työssä esitellään aluksi SEM-laitteen peruskäyttöön liittyvää teoriaa ja yleisimpiä haasteita biologisten näytteiden tutkimisessa korkean alipaineen olosuhteissa.

Tämä työ on esiselvitystä, kuinka Metropolian opiskelijat ja opettajat voisivat hyödyntää opetukseen Peltier-elementtiä jatkossa. Laitteen asennus voi laajentaa pyyhkäiselektronimikroskoopin käyttömahdollisuuksia ja sitä kautta mahdollisesti lisätä koulun mikroskoopin hyödyntämistä opetukseen ja tutkimuksiin. Työn käytännön osuus sisältää laitteen asennuksen Metropolian Myyrmäen kampuksella olevaan SEM-laitteeseen ja käyttöön opastavan materiaalin laatimisen.

Tarkoituksena on selvittää, mitä lisäarvoa Peltier-elementti tuo jo olemassa olevan SEM-laitteen kokoonpanoon ja kuinka sujuvaa lisäosan asentaminen on. Tämä opinnäytetyö toimii samalla koosteena tuleville SEM-laitteen käyttäjille perehdytysmateriaalina.

2 Pyyhkäiselektronimikroskoopin toimintaperiaate ja sen haasteet biologisten näytteiden tutkimisessa

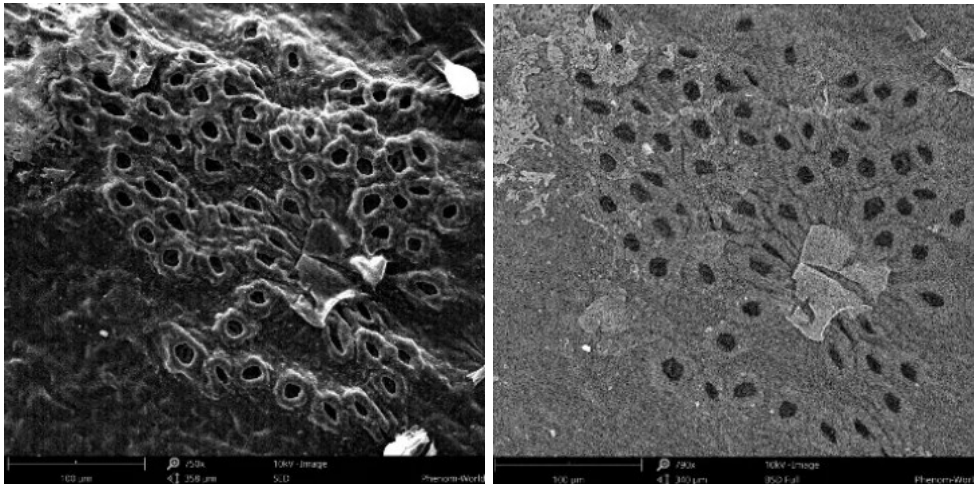
Tässä luvussa tarkastellaan tavanomaisen SEM-laitteen toimintaperiaatteita ja näytteen käsittelyä, jotka vaikuttavat näytteen kuvantamiseen. Lopussa on käsitelty yleisimpiä haasteita johtamattomien näytteiden tutkimisessa SEM-laitteella ja sen aiheuttamia muutoksia itse näytteeseen.

2.1 Pyyhkäisyelektronimikroskoopin toimintaperiaate

Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM) tuotetaan korkearesoluutioista kuvaa materiaalin pinnasta elektronisuihkun avulla. Tarkkuus perustuu kiihdytettyjen elektronien aallonpituuteen, joka on huomattavasti lyhyempi kuin näkyvän valon aallonpituus, johon ihmissilmän tai valomikroskoopin havainnointi perustuu [1, s. 1]. Elektronisuihku on sähkömagneettista värähtelyä, minkä vuoksi sitä voidaan ohjailta erilaisten sähkömagneettisten linssien avulla. Elektronisuihku kohdennetaan ja ohennetaan sähkömagneettisten linssien ja mekaanisten apertuurien avulla, jotta elektronisäde fokusoituu mahdollisimman pienelle alueelle näytteen pintaan. Tämä mahdollistaa näytteen pinnan yksityiskohtien tarkastelun noin kaksi kertaluokkaa suuremmilla suurennuksilla kuin optinen mikroskopia. [2, s. 244.] Tarkasteltavan kohteen löytyminen voidaan aloittaa pienemmällä suurennuksella, minkä jälkeen valitaan tarkasteltava kohde lisä suurennukseen. Tutkitavan kohdan paikantaminen voidaan tehdä myös valomikroskoopin avulla, minkä jälkeen voidaan siirtyä tarkempaan tarkasteluun elektronimikroskoopilla. Suurilla suurennoksilla saadaan esiin pinnan pienet yksityiskohdat, mutta syvystarkkuus kärsii. Hyvin pieneltä alueelta tehdyt pinnan muotojen tulkinnan voivat kuitenkin johtaa virhetulkintoihin, jos tarkastelua ei huomioida isommalta alueelta. [2, s. 244.]

Kuvantaminen SEM-laitteella perustuu sähköiseen vuorovaikutuksesta näytteen ja elektronisuihkun välillä, minkä vuoksi näytteen on oltava sähköä johtava. Elektronisuihkusta tulevien elektronien ja näytteen pinnan atomien yhteentörmäys saa aikaan useita irtoavia hiukkasia. Nämä hiukkaset virittävät erityyppistä säteilyä, jota voidaan käyttää kuvan muodostamiseen tai näytteen analysointiin [2, s. 246]. Jokaiselle säteilylle on oma detektori eli ilmaisim, joka tuottaa kuvaa reaaliajassa ulkoisen näytön kautta elektronisignaalin voimakkuuden mukaan. Kuvanmuodostamisen kannalta tärkeimmät elektronit ovat sekundaarielektronit (SE) ja takaisinsirontaelektronit (BSE) [3]. Detektorille kertynyt signaalin voimakkuus vaikuttaa kuvan valovoimakkuuteen ja kontrastieroihin [2, s. 247].

Sekundaarielektronit ovat matalaenergisiä, ja ne emittoituvat aivan näytteen pinnalta muodostaen pinnan korkeuseroista aiheutuvan kontrastin. Kuvassa 1 vasemmalla näkyvät valaistut ja varjostetut alueet riippuvat siis niiden etäisyydestä SE-detektoriin [1, s. 64].



Kuva 1. Kuvassa vasemmalla SE-detektorilla muodostettu kuva ja oikealla BSE-detektorin tuottama kuva kasvin lehdestä [4]

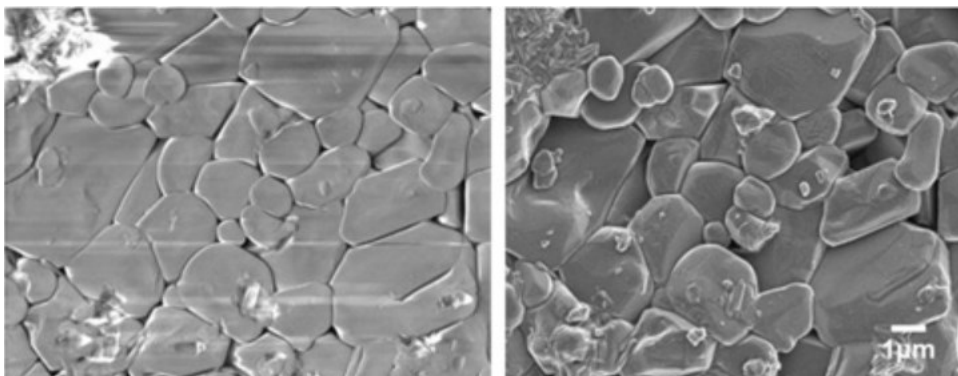
Takaisinsirontaelektronit (BSE) ovat lähes yhtä korkea energisiä kuin primääri-elektronit, jotka tulevat elektronisuihkusta. Tämän vuoksi ne emittoituvat syvemmältä näytteestä kuin sekundaarielektronit. Näytteen sisältämät raskaat alkuaineet tuottavat enemmän elektroneja, ja niistä koostuvat alueet näyttävät kirkkaammilta BSE detektorin tuottamissa kuvissa. [2, s. 246; 1, s. 69.]

Käytännössä SEM-laitteella voidaan tarkastella kaikkia kiinteitä pintoja ja materiaaleja, kunhan näyte mahtuu näytekammioon ja siitä ei vapaudu kaasuja [5]. Tyypillisesti SEM-laitetta käytetään korkeassa alipainetilassa, joka vaatii kuivan ja sähköä johtavan näytteen [1, s. 173]. On tärkeää, että näyte valmistellaan huolellisesti poistamalla kaikki lika, pöly ja muu irtain näytteen pinnasta. Irtain peittää näytteen pintarakenteita ja varautuu helposti sekä voi vaurioittaa olosuhdekammiota ja elektronilähdettä. [2, s. 250; 6.]

2.1.1 Näytteen varautuminen

Sähköä johtamattomat näytteet voidaan pinnoittaa esimerkiksi metallilla, joka vähentää näytteen varautumista. Varautuminen aiheuttaa kohinaa, joka vääristää muodostuvaa kuvaa. Pinnoite suojaa näytettä elektronisuihkun mekaaniselta rasitukselta ja lämpövaikutuksilta. Pinnoitus auttaa myös kuvan muodostuksessa emittoimalla runsaasti sekundaarisia elektroneja. [2, s. 247, 258.] Pinnoitteen tehtävä on siis suojata näytettä vaurioitumiselta sekä mahdollistaa ei johtavien tai vaikeasti stabiloitavien näytteiden kuvantaminen SEM-laitteen olosuhteissa.

Näytteen varautuminen perustuu siihen, että elektronisuihkusta tulevat elektronit keräytyvät näytteeseen eivätkä pääse maadoittumaan näytteen pidikkeen läpi. Sähköä johtava näyte on kontaktissa maadoitettuun pidikkeeseen, joka luo polun elektroneille tämän negatiivisen varauksen purkautumiseen. Johtamattomalla näytteellä tätä polkua ei ole, mikä johtaa näytteen varautumiseen. Tämän seurauksena näytteestä emittoituva sekundaarinen elektronisäteily häiriintyy ja voi aiheuttaa liiallista kirkkautta/tummuutta, vaakasuoria viivoja ja vääristymää vaikeuttaen kuvantamista. [1, s. 161; 7, s. 48.] Kuvassa 2 vasemmalla on esitetty varautunut pinnoittamaton näyte ja oikealla näyte, jonka varautumista on lievennetty kulta-palladiumpinnoitteella. Nähtävissä on kuvan laadun selkeys ja kontrastierot.



Kuva 2. Sekundaarielektronikuvat 10 kV:n kiihdytysjännitteellä päällystämättömästä näytteestä (vasen) ja kulta-palladiumseoksella pinnoitetusta näytteestä (oikea) [8]

On huomioitava, että pinnoite ei tee eristävästä näytteestä sähköä johtavaa, vaan se ainoastaan vähentää varautumisen vaikutusta mahdollistamalla maa-doittamisen. Näin ollen suuren elektronisuihku virran käyttö voi edelleen aiheuttaa varauksen kertymisen näytteen sisälle. [7, s. 52.]

2.1.2 Biologisten näytteiden valmistus

Biologiset näytteet ovat erityisen herkkiä SEM-laitteen tyhjiöolosuhteille niiden vesipitoisuuden ja orgaanisten yhdisteiden vuoksi. Lisäksi tällaiset näytteet ovat sähköisesti eristäviä, joten ne on valmistettava huolellisesti ennen tutkimista. Koska näytteiden on oltava kuivia ja sähköä johtavia, ne vaativat käsittelyä, kuten puhdistus, fiksointi, kuivaus, kiinnitys alustalleen ja päällystäminen [2, s. 250]. Fiksoinnin tarkoitus on tehdä näytteestä kestävä ja säilyttää näytteen rakenne mahdollisimman muuttumattomana. Fiksatiivi pysäyttää solun toiminnot ja kiinnittää näytteen rakenteen muodostaen sidoksia rakennemolekyylien välille [9].

Kuivaus on tärkeä osa, jotta näytteen sisältämä vesi ja muut yhdisteet eivät poistu kaasuna mikroskoopin alipaineessa häiriten kammion toimintaa [10]. Veden haihtuminen voi myös rikkoa näytteen pintarakenteen [2, s. 251]. Lopuksi näyte vaatii vielä hyvän kontaktin alustalleen ja pinnoituksen riittävän sähköjohtavuuden varmistamiseksi.

Kuivia ja kovia näytteitä ei tarvitse fiksoida eikä kuivattaa, vaan niistä puhdistaan irtain huolellisesti, minkä jälkeen ne voidaan suoraan kiinnittää alustalleen ja päällystää. [11, s. 168.] Kiinnitys voidaan tehdä johtavan teipit tai liiman avulla.

2.2 Haasteet

SEM-laitteen näytekammiossa on alipaine eli tyhjiö, joka varmistaa elektronien esteettömän kulkemisen ja estää elektronisädekaaren sähköpurkauksen [12]. Tyhjiö suojaa myös elektronilähdettä hapettumisvaurioilta. Nämä

tyhjiöolosuhteet kuitenkin vaikeuttavat monien näytteiden tutkimista, aiheuttaen mm. kaasun vapautumista tai vettä sisältävien näytteiden kuivumista. Kaasun vapautuessa näytteestä se voi tiivistyä näytteen pinnalle peittäen pintarakenteita tai muuttaa näytteen ominaisuuksia. Kaasun tiivistyessä kammion seinämiin se voi vaikeuttaa näytteen kuvantamista ja mahdollisesti vaurioittaa näytekammiota [13]. Kammion alipaineistettu tila aiheuttaa vettä sisältävien näytteiden runsasta kuivumista, joka vaikuttaa näytteen rakenteeseen ja kokoon. Kammion alipaine haihduttaa veden tai muun nesteen näytteestä rikkoen näytteen pintarakenteen ja aiheuttaen näytteen massan häviämistä. [14, s. 158.]

Näytteen käsittely ja tyhjiöolosuhteet aiheuttavat muutoksia näytteeseen eivätkä vastaa normaaliolosuhteita ja näytteen luonnollista olotilaa. Tämän vuoksi voidaan harkita vaihtoehtoisia tapoja tällaisten näytteiden tutkimiseen olosuhteissa, jotka ovat muunneltavissa näytteen mukaan.

3 Näytteen tutkiminen vaihtelevan paineen avulla

Tavanomaisen SEM-laitteen kammio-olosuhteita muokkaamalla paineen, lämpötilan ja vesihöyryn avulla voidaan saavuttaa biologisille näytteille optimaalisemmat olosuhteet, jotka edustavat paremmin todellista ympäristöä. Tämän vuoksi voidaan tutkia laajempaa skaalaa näytteitä, jotka voivat olla sähköä johtamattomia, likaisia, kosteita, kemiallisesti reaktiivisia tai alipainetilassa kaasua vapauttavia materiaaleja [15].

Muunneltavien olosuhteiden pyyhkäisyelektronimikroskoopeilla on useita nimityksiä kuten Variable pressure SEM (VP-SEM), Environmental SEM (ESEM), Low Vacuum SEM, Wet SEM ja Natural SEM. Erilaisista nimityksistä huolimatta toimintaperiaatteet ovat kuitenkin samat [15]. Suurimman eron tavanomaiseen SEM-laitteeseen näissä tekee eri painevyöhykkeiden käyttö, joka mahdollistaa kaasun läsnäolon näytekammiossa. Kaasuina voidaan käyttää esimerkiksi ilmaa, vesihöyryä, argonia, hiilidioksidia tai typpeä [7, s. 68]. Vesihöyryn käytön etuna on sen runsas ionisoituminen verrattuna muihin kuvantamiskaasuihin. Ionisoitumista on käsitelty tarkemmin luvussa 3.2.2.

Tescan-pyyhkäisyelektronimikroskoopeissa näitä ominaisuuksia voidaan hyödyntää Univac-toiminnolla, joka mahdollistaa vesihöyrynsisäätulojärjestelmän käytön keski- ja matalatyhjiöolosuhteissa [14, s. 159]. Peltier-näytelavan liittäminen tähän järjestelmään mahdollistaa näytteen lämpötilan säädön.

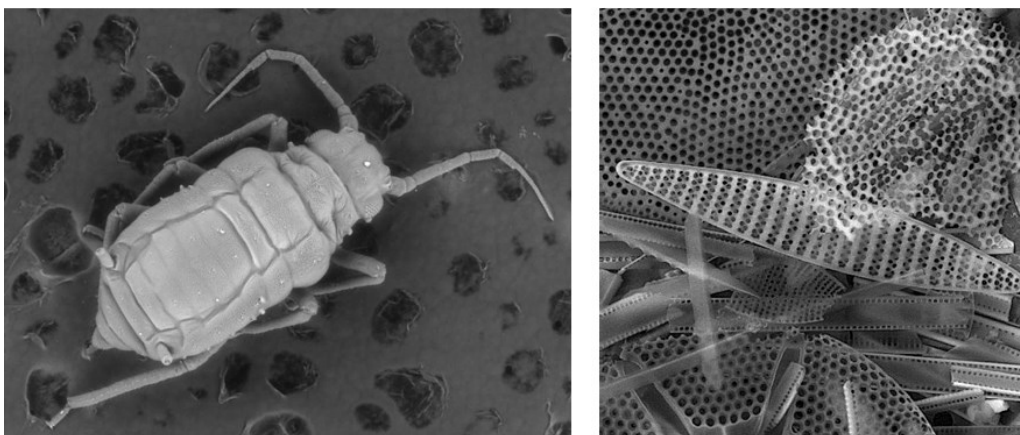
3.1 Toimintaperiaate

Näytekammiioon johdettavan vesihöyryn avulla näytteet voivat olla ns. luonnon-tilassa ja eristävätkin materiaalit voidaan tutkia ilman johtavaa pinnoitetta, minkä vuoksi saadaan tarkempaa tietoa pinnan yksityiskohdista. Näytteen tutkiminen hydratoituneessa tilassa vaatii vesihöyryn muodostumisen SEM-kammiossa, mikä mahdollistaa näytteen ja kosteuden vuorovaikutusten havainnoinnin, kuten faasimuutokset, kiteytymisprosessit [14, s. 158]. Jotta vesihöyryä voidaan käyttää sopivien olosuhteiden aikaansaamiseksi, näytekammiio ja elektronipylväs on eristettävä toisistaan erillisillä painevyöhykkeillä differentiaalipumppauksen avulla. Pumppaus mahdollistaa elektronitykin pysymisen korkeassa tyhjiössä, kun taas näytekammiossa voidaan pitää alhainen alipaine. Tämä avulla voidaan säilyttää riittävä kosteus näytteessä ja varmistaa korkea resoluutioisen kuvan muodostuminen. [16; 1, s. 190.] SEM on varustettu öljydifфуusio- tai turbomolekyyli-pumpulla, mikä estää vesihöyryn pääsyn elektronipylvääseen ja painetta rajoittavan aukot varmistavat riittävän korkean tyhjiön sen komponenteille [1, s. 190]. Mitä pienempi aukon halkaisija on, sitä suuremman paine eron se mahdollistaa näytekammiion ja elektronipylvään välille [1, s. 197].

3.2 Kuvantaminen kaasuympäristössä

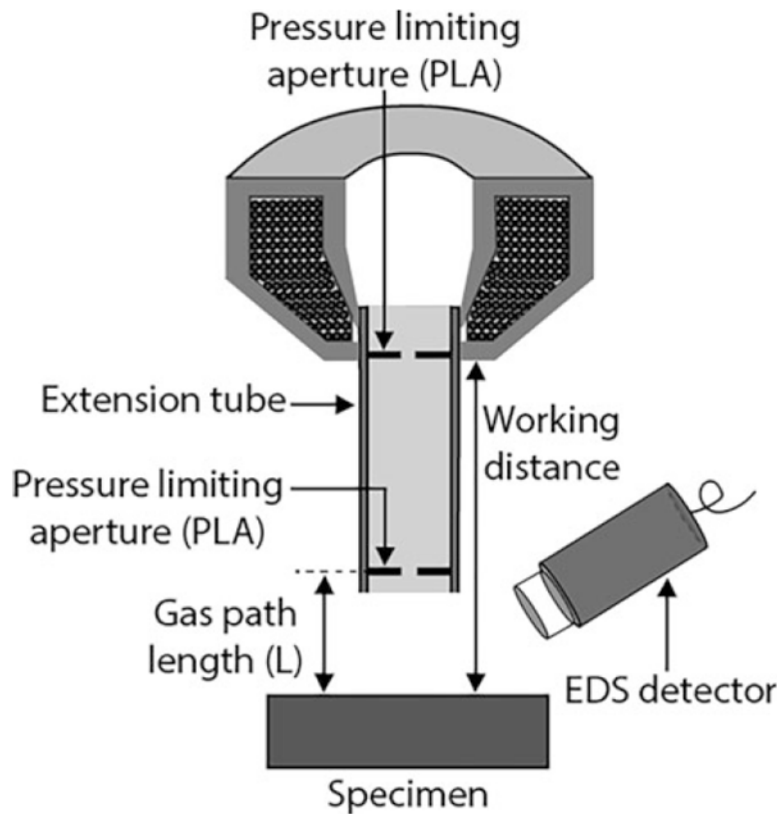
Kuvantaminen perustuu prosessissa syntyviin positiivisesti varautuneisiin ioneihin. Vesihöyryn molekyyliden ja näytteestä emittoituneiden elektronien välisestä törmäyksestä muodostuneet positiiviset ionit ajautuvat takaisin kohti näytteen pintaa, mikä vähentää varauksen muodostumista ja eliminoi tarpeen pinnoittaa näyte. [16.] Sekundaaristen elektronien matalan energian vuoksi ne ovat hyvin herkkiä kaasun paineelle. Korkea kaasun paine lisää kaasumolekyyliden pitoisuutta, jolloin elektronien kaasumolekyyliden yhteentörmäys lisääntyy. [7, s. 74.]

Tämä johtaa elektronien energian vähenemiseen, minkä seurauksena signaalin voimakkuus ei ole riittävä kuvan tuottamiseen. Sen vuoksi on erillinen sekundaarielektroni-ilmaisin LVSTD (Low Vacuum Secondary Tescan Detector), joka on suunniteltu käytettäväksi matalan tyhjiön tilassa. Kuvassa 3 on orgaanisia pinnoittamattomia näytteitä kuvannettuna LVST-detektorilla. Takaisinsironneet elektronit tuottavat hyvän resoluution korkean energiansa vuoksi myös korkeassa paineessa. BSE detektori ei myöskään ole niin herkkä varausvaikutuksille, joten sitä voidaan käyttää matalan tyhjiön tilassa [1 s. 192].



Kuva 3. LVSTD-kuvia matalatyhjiötilassa orgaanisista pinnoittamattomista näytteistä [17, s. 33]

Matalan tyhjiön tilassa haasteena on kaasun ja elektronisuihkun yhteentörmäyksestä aiheutuva säteen siroaminen, joka rajoittaa kuvan resoluutiota. Säteen sirointa levittää elektronit laajemmalle alueelle ja johtaa heikompaan signaaliin elektronien energian heikkenemisen seurauksena. [7, s. 67; 1, s. 196.] Sironnan määrään vaikuttaa kaasumolekyylien pitoisuus ja primäärisäteen kulkemata matka kaasun läpi painetta rajoittavan aukon ja näytteen välillä. Näin ollen mitä suurempi säteen kaasun läpi kulkemata matka on tai mitä korkeampi paine, sitä enemmän sirointa tapahtuu. [1, s. 193.]



Kuva 4. Matalatyhjiötilan kokoonpano, jossa alempi PLA on sijoitettu lähemmäksi näytettä [1, s. 196]

Sirontaa voidaan vähentää matalan tyhjiön tilassa nostamalla kiihdytysjännitettä ja sijoittamalla painetta rajoittava aukko lähemmäksi, jolloin elektronien kulkemata matka kaasun läpi minimoidaan [1, s. 197; 14, s. 20]. Kuvassa 4 on esitetty painetta rajoittavien aukkojen sijainti matala tyhjiö tilassa, sekä säteen kulkemata matka kammiossa kaasunpolun etäisyytenä (gas path length).

3.2.1 Säteilyvauriot

Tavanomaisessa SEM-laitteessa metallipinnoitettuun näytteeseen kohdistuu elektronisuihkusta primäärisäteilyä, jonka tunkeutumissyvyys on yleensä samanlainen riippumatta alla olevasta näytteestä [7, s. 151]. Pinnoitteen puuttumisen takia näyte on kuitenkin erittäin altis primäärisäteilyn vaikutuksille. Vesihöyryn käyttö kuvantamiskaasuna johtaa vesimolekyylien virittymiseen ja siitä syntyvien vapaiden radikaalien ja varautuneiden ionien muodostumiseen, sekä

näytteen sisällä syntyviin radiolyysituotteisiin. Nämä yhdessä johtavat näytteen säteilyvaurioihin. Säteilyvauriot heikentävät kuvan muodostumista ja vaikeuttaa analyysia. Kiihdytysjännitteen voimakkuuden vähentämisellä voidaan vaikuttaa näiden haitallisten tuotteiden syntyyn ja negatiivisen varauksen eliminointiin. [7, s. 156–157.]

3.2.2 Ionien vaikutus kuvantamiseen

Positiiviset ionit syntyvät kaasumolekyylien ionisaation sivutuotteena, ja ne ovatkin hyvin tärkeitä näytteen kuvantamisen kannalta. Näytteestä vapautuvien elektronien ja vesihöyry molekyylien yhteentörmäyksestä syntyy tytärelektroneja, jotka edelleen synnyttävät lisää positiivisesti varautuneita ioneja kaavan 1 mukaan.

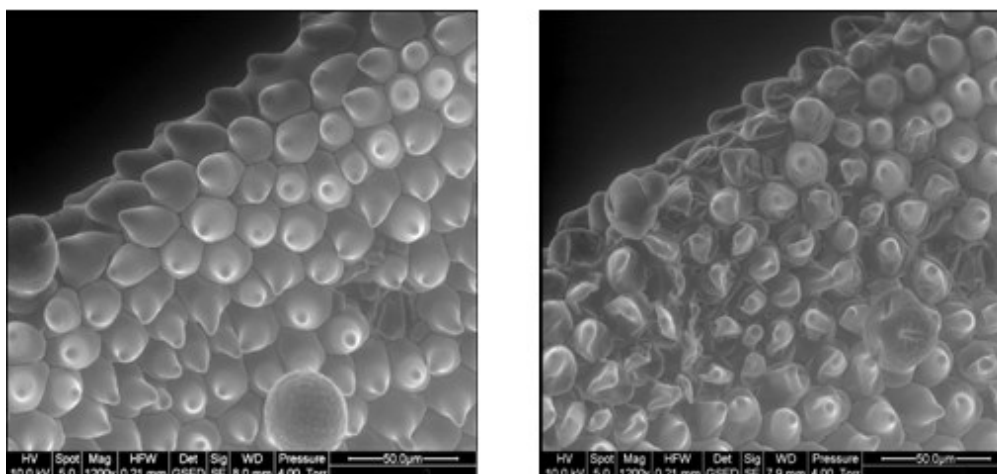


Näyte voi olla negatiivisesti varautunut, mutta näytteen pinnalle kulkeutuneet ionit vähentävät varauksen vaikutuksia ja siten mahdollistavat kuvantamisen. [7, s. 158.] Ionisoitumisen voimakkuuteen vaikuttaa mm. työskentelyetäisyys, kaasun paine sekä näytteen emittoivat ominaisuudet [16; 7, s.159]. Ionien syntyminen on voimakkaampaa elektroneja kiihdyttävällä anodilla, joka sijaitsee elektrodin läheisyydessä. Tämä johtaa viiveeseen ionien pääsemisessä näytteen pintaan.

Ionit ovat massaltaan suurempia kuin elektronit, minkä vuoksi ne nähdään olevan lähes paikallaan kiihtyviin elektroneihin verrattuna. Ionien hidas liikkumisnopeus verrattuna elektroneihin selittää kuvantamiseen vaikuttavien signaalien voimakkuutta. Viive negatiivisen varauksen alkamisen ja positiivisten ionien virittymisen välillä lisää signaalin voimakkuutta, kun taas signaali heikkenee elektronisäteiden osuessa näytteen kohtaan, jossa positiivisia ioneja on ylimäärä. [7, s.159–160.]

4 Vesihöyryn käyttö systeemissä

Jotta näytettä voidaan tarkastella mahdollisimman lähellä sen luonnollista tilaa, on oltava optimaaliset ja stabiilit olosuhteet. Suljetun SEM-kammion olosuhteita on muutettava siten, että vesipitoinen näyte pysyy stabiilina eikä vesi pääse haihtumaan tai kondensoitumaan (kuva 5) [14, s. 159]. Veden haihtuminen saadaan aikaan alentamalla kammion painetta tai nostamalla näytteen lämpötilaa, jolloin olosuhteet vastaavat veden faasikaavion höyrystymistilaa. Näin ollen painetta nostamalla tai näytteen lämpötilaa laskemalla vesi alkaa tiivistymään näytteen pinnalle, koska vesi on nesteolomuodossa näissä olosuhteissa.

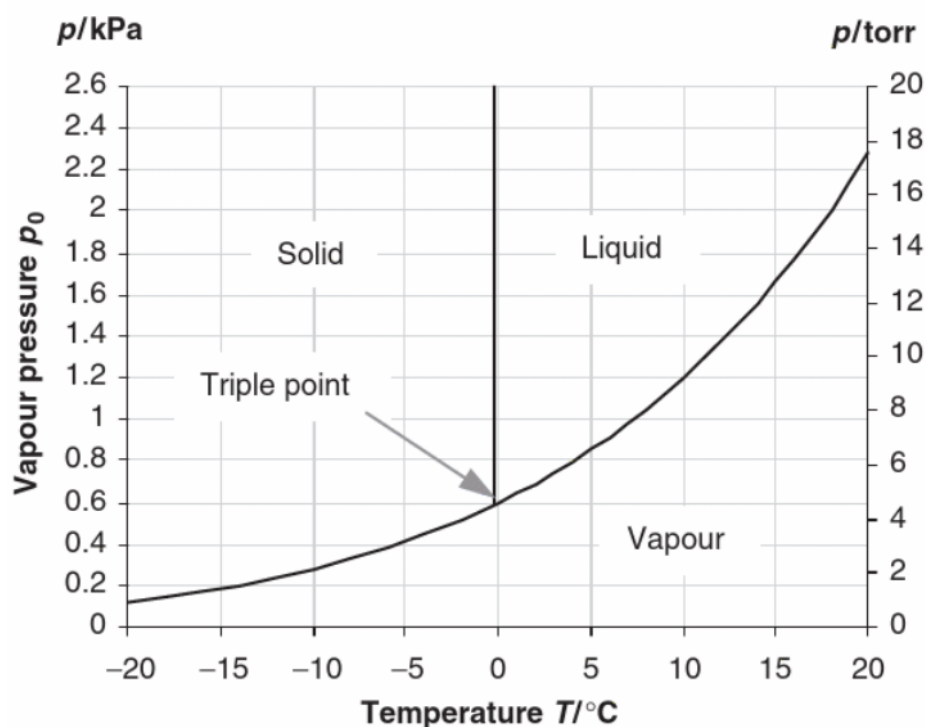


Kuva 5. Kukan terälehti kuvattuna riittävässä kosteudessa (vasen) ja oikealla veden haihtumisesta johtunut lehden kutistuminen ja rakenteen romahtaminen [6]

Nämä ilmiöt on otettava tarkoin huomioon, jotta ei aiheuteta näytteen kuivumista tai turpoamista. Vesipisaroiden kerääntyminen pinnalle piilottaa näyterakenteita ja haittaa kuvantamista. Vaikka haihtuminen vähenee alemmissä lämpötiloissa, on vältettävä näytteen jäätymistä, koska se voi aiheuttaa vaurioita näytteelle vesimolekyylien muuttuessa kiteisiksi. [14, s. 159.] Jäätyminen on erityisen haitallista näytteille, joissa on korkea kosteuspitoisuus (>25 %).

4.1 Kylläisen höyryn paine

Veden olomuotoa paineen ja lämpötilan suhteen voidaan tarkastella kuvassa 6 esitetyn faasikaavion avulla, jossa on kuvattuna puhtaan veden kolme stabiilia olomuotoa rinnakkain (kiinteä, neste ja höyry) ja niiden välillä faasimuutoksia kuvaavat käyrät [14, s. 158]. Käyrien kohdalla vallitsee termodynaaminen tasapaino. Suljetussa näytekammiossa oleva vesi muuttuu olomuotoaan nesteen ja höyryn välillä, kunnes se saavuttaa tasapainotilan, jolloin veden haihtumista ja tiivistymistä tapahtuu yhtä nopeasti. Tasapainotilassa tietyssä lämpötilassa nesteen yläpuolella on tietty määrä höyryä, jota kutsutaan kylläisen höyryn paineeksi (SVP) eli höyrynpaineeksi. [7, s. 81–82.] Kaaviossa esitetyn sublimaatio- ja haihtumiskäyrän pisteillä ilman suhteellinen kosteus on 100 %, joka vähenee, kun painetta lasketaan tai lämpötilaa nostetaan.

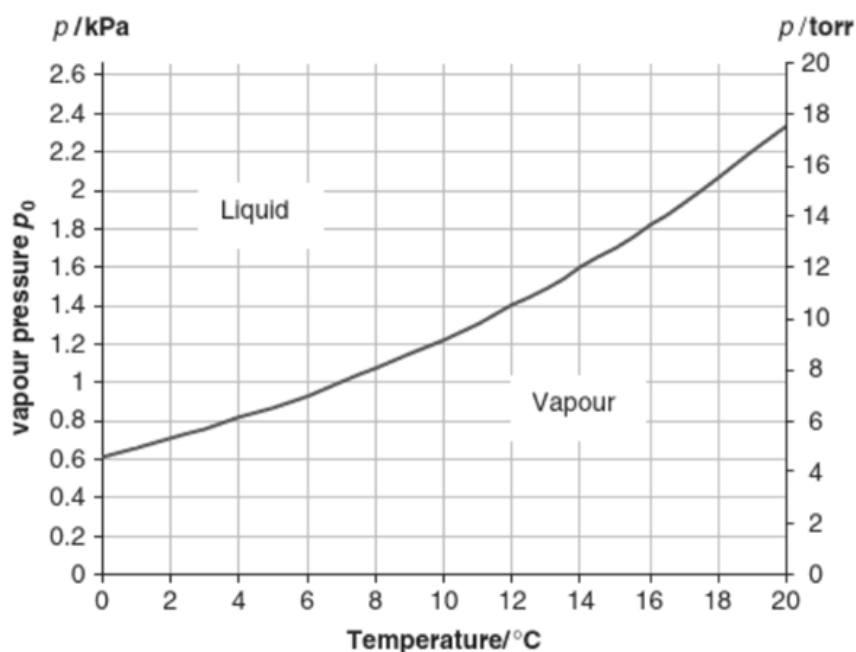


Kuva 6. Puhtaan veden faasikaavio paineen ja lämpötilan funktiona [7, s. 183]

- Kolmoispiste (triple point): Tässä pisteessä esiintyy veden kaikki olo-
muodot.
- Sulamis-/jäätymiskäyrä: Faasisiirtymä nesteen ja kiinteän välillä.

- Sublimaatiokäyrä: Faasisiirtymä kaasun ja kiinteän välillä.
- Haihtumis-/tiivistymiskäyrä: Faasisiirtymä nesteen ja kaasun välillä.

Kuvassa 7 on esitetty veden faasikaavio, jonka käyrä osoittaa veden ja höyryn tasapainotilaa 0 ja 20 °C:n välillä. Kuvaaja on tuotettu kokeellisten arvojen perusteella, jotka nähdään taulukosta 1 sivulla 14.



Kuva 7. Puhtaan veden tasapainotilaa kuvaava käyrä lämpötilan ja paineen funktiona [7, s. 82]

Taulukosta 1 nähdään, että kylläisen höyryn paine riippuu lämpötilasta: kun lämpötila nousee, höyrynpaine kasvaa ja vastaavasti lämpötilan alentuessa, höyrynpaine laskee. 0–25 °C:ssa höyrynpaineen suuruus on noin 600–3 000 Pa.

Taulukko 1. Lämpötilan ja paineen arvoja, jotka vastaavat puhtaan veden kyläistä höyrynpainetta [7, s. 83]

Lämpötila (°C)	Lämpötila (K)	Paine (kPa)	Paine (torr)
0	273	0,611	4,58
1	274	0,657	4,93

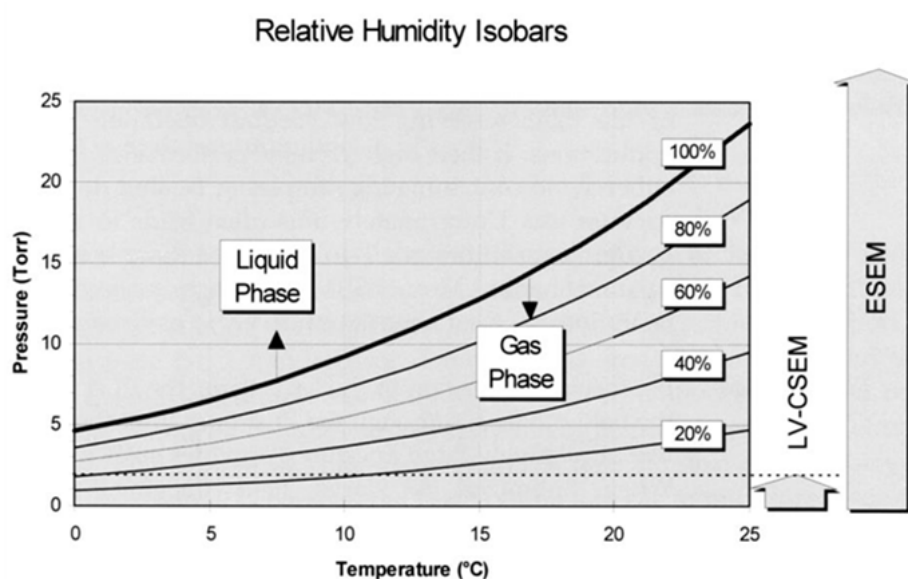
Lämpötila (°C)	Lämpötila (K)	Paine (kPa)	Paine (torr)
2	275	0,706	5,30
3	276	0,758	5,60
4	277	0,814	6,10
5	278	0,873	6,55
6	279	0,935	7,01
7	280	1,002	7,52
8	281	1,073	8,05
9	282	1,148	8,61
10	283	1,228	9,21
11	284	1,313	9,85
12	285	1,403	10,52
13	286	1,498	11,23
14	287	1,599	11,99
15	288	1,706	12,80
16	289	1,819	13,64
17	290	1,938	14,54
18	291	2,064	15,48
19	292	2,198	16,49
20	293	2,339	17,54
21	294	2,489*	18.70**
22	295	2,646*	19.85**
23	296	2,812*	21.09**
24	297	2,986*	22.40**
25	298	3,171*	23.78**

* Perustuu TheEngineeringToolBox-laskurilla tuotettuihin arvoihin [18].

** Perustuu Unit convertes-laskurilla tuotettuihin arvoihin [19].

Kammion paine- ja lämpötilaolosuhteet vaikuttavat niin näytteeseen kuin kuvantamiseenkin. Hyvän resoluution aikaansaamiseksi tarvitaan riittävän alhainen paine <10 torr (n. 1333 Pa), mutta se aiheuttaa veden haihtumista näytteestä huoneenlämpötilassa (25 °C) [16]. Vaikka näytteen jäähdyttäminen alle 0 °C:n hidastaa haihtumista ja mahdollistaa alhaisemman paineen käytön, on näytteen jäädyttämistä kuitenkin vältettävä näytteen vaurioitumisen vuoksi. Tämän vuoksi näytettä on jäähdytettävä suosituslämpötilaan 1–5 °C ja asetettava paine välille 600–800 Pa. [14, s. 159.]

Todellisuudessa kammiossa oleva vesihöyry sisältää puhtaan veden lisäksi vapautuneita kaasuja ja muita epäpuhtauksia, jotka vähentävät vesihöyryn osapainetta. Tämä on otettava huomioon sopivien paine- ja lämpötilaolosuhteiden aikaansaamiseksi, koska vesihöyryn osapaineen laskiessa myös ilman suhteellinen kosteus laskee (kuva 8). Kosteille näytteille optimaalinen ilman kosteus on noin 70–90 %; alle 70 %:n suhteellisessa kosteudessa näyte kuivuu ja yli 90 %:ssa näytteen pinnalle tiivistyy vettä.

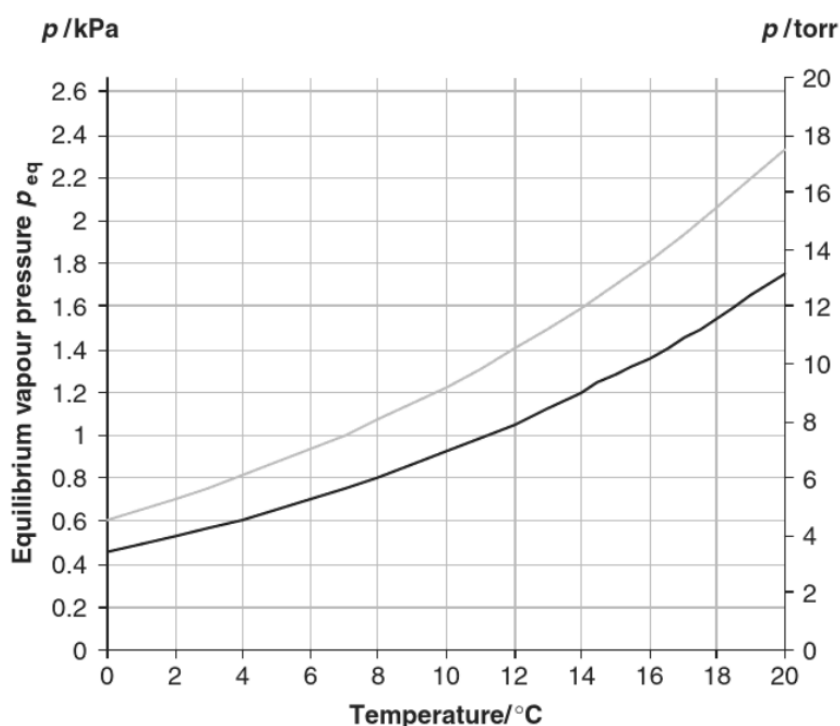


Kuva 8. Ilman suhteellinen kosteus paineen ja lämpötilan funktiona puhtaan veden tasapainokäyrän alapuolella [20]

Suhteellinen kosteus on vesihöyryn osapaine jaettuna lämpötilaa vastaavalla höyrynpaineella. Esimerkiksi lämpötilassa 10 °C veden höyrynpaine on 1,2 kPa (9 torr) ja oletetaan epäpuhtauksien laskevan vesihöyryn osapainetta 50 % eli 600 Pa (4,5 torr). Tällöin suhteellinen ilman kosteus on noin 50 %, mikä aiheuttaisi näytteen kuivumista. Ratkaisu olisi laskea lämpötilaa alle 5 °C:n tai nostaa painetta noin 800 Pa:iin, jolloin saavutetaan näytteelle optimaalinen 75 %:n ilman kosteus.

4.1.1 Epäpuhtauksien vaikutus höyrynpaineeseen

Biologiset näytteet koostuvat puhtaan veden sijaan erilaisista vesifaaseista, ja niillä voi olla ympäristöltä suojaava solukalvo. Vesifaasit sisältävät liuenneita orgaanisia ja epäorgaanisia yhdisteitä, kuten polysakkarideja, proteiineja ja mineraaleja. Nämä epäpuhtaudet ja suojausmekanismit laskevat kammiossa olevaa vesihöyryn osapainetta jopa 50 % puhtaaseen veteen verrattuna. [14, s. 159; 7, s. 83.] Kuvassa 9 on esitetty puhtaan veden höyryn paine (harmaa viiva) sekä näytteen (musta viiva), jonka höyrynpaine vastaa 75 %:a suhteellisesta kosteudesta. Tästä nähdään, että esimerkiksi lämpötilan ollessa 4 °C näytteen sisältämän veden osapaine (n. 600 Pa) on noin 25 % alhaisempi kuin puhtaan veden höyrynpaine (n. 800 Pa).



Kuva 9. Kaavio tasapainohöyrynpaineista lämpötilan funktiona. Näyte, jonka höyrynpaine vastaa 75 %:a suhteellisesta kosteudesta RH (musta viiva) sekä höyrynpaine 100 %:n suhteellisesta kosteudesta (harmaa viiva) [7, s. 86.]

Tämä tarkoittaa sitä, että jos asetetaan lämpötila ja paine puhtaan veden höyrynpaineen mukaan, niin todelliset olosuhteet eivät vastaa näytteen sisältämän

vesifaasin tasapainotilaa. Tästä seuraa nesteen tiivistyminen näytteen pintaan. Ratkaisuna on nostaa lämpötilaa tai alentaa painetta, jotta saavutetaan todellinen tasapainotila.

4.1.2 Epätasapainotila

Näyte voidaan myös altistaa tarkoituksella epätasapainotilaan hallitsemalla lämpötila ja paineolosuhteita, jolloin voidaan tarkastella näytteessä tapahtuvia fysiologisia tai kemiallisia reaktioita. Tällaiset dynaamiset kokeet mahdollistavat esimerkiksi näytteen rakenteellisen muutoksen tutkimisen faasimuutosten seurauksena tai materiaalin hydrofiilisen tai hydrofobisen käyttäytymisen arvioimisen. [7, s. 189; 21, s. 5–6.] SEM mahdollistaa materiaalin kosteuskäyttäytymisen visualisoinnin korkealla resoluutiolla, mikä lisää teollisten prosessien hallintaan vaadittavaa perusymmärrystä materiaalien käyttäytymisestä erilaisissa olosuhteissa. Alle on kerätty muutamia esimerkkejä tällaisista kokeista, joissa olosuhteita muuttamalla on saatu kuvannettua ilmiöitä, joita voidaan hyödyntää esimerkiksi useissa teollisissa prosesseissa ja tutkimussovelluksissa.

Näytettä voidaan kuivattaa tai aiheuttaa nesteen tiivistyminen näyte alustalle kontrolloidusti, jolloin höyrymolekyylien pitoisuus on korkeampi tai alhaisempi kuin termodynaamisen tasapainotilan vaatima [7, s. 189]. Veden haihtuminen tai aineen kyky sitoa vettä itseensä aiheuttaa erilaisia muutoksia materiaalin kokoon, muotoon ja rakenteeseen. Kondensoimalla vettä näytealustalle saadaan tietoa materiaalin hygroskooppisesta käyttäytymisestä. Näiden muutosten ymmärtäminen on tärkeää teollisuudenaloilla, jotta kosteuden hallinta tuotannon ja varastoinnin aikana voidaan optimoida. Monet materiaalit ja aineet vetävät puoleensa vettä suhteellisen kosteuden yläpuolella. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi puuvilla, paperi, selluloosa, muut puutuotteet, sokeri, jauhot, kalsiumoksidi (poltettu kalkki) ja monet kemikaalit, lääkkeet ja lannoitteet. [6.]

Haihduttamalla nestettä on pystytty tutkimaan esimerkiksi kolloidisten seosten uudelleen järjestäytymistä. Varhainen esimerkki kolloidijärjestelmien havainnoinnista oli vesifaasin konsentraation pienentäminen, jolloin kolloidishiukkaset

olivat tarpeeksi lähellä toisiaan, jotta niiden välillä tapahtuvat lyhyen kantaman vetovoimat tulivat esiin. Kolloideja on kaikkialla ympärillä, ja niiden taipumus muodostaa erilaisia rakenteita vaikuttaa esimerkiksi elintarvikkeiden ominaisuuksiin ja maalin kuivumiseen. [7, s. 192–193.]

4.2 Peltier käyttöalue

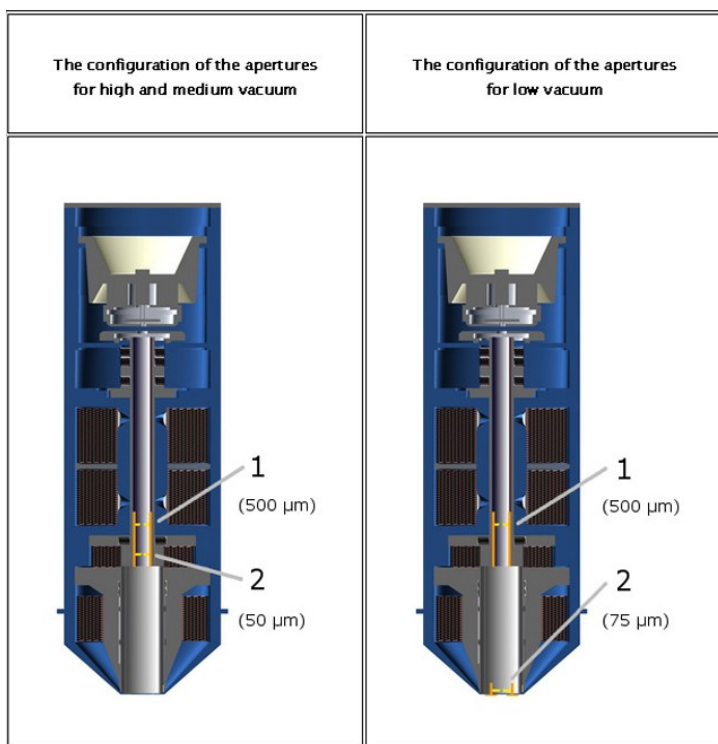
Näytteen sisältämän veden tilaa voidaan muuttaa Tescan SEM-laitteella UniVac-tilassa kammion painetta ja näytteen lämpötilaa säätämällä Peltier jäähdytys/lämmitys alustalla, yhdessä vesihöyryn sisääntulojärjestelmän (Water vapor inlet system) kanssa. Peltier-elementin toiminta perustuu lämpösähköiseen ilmiöön (Peltier effect), jossa virta kulkee piirissä olevien kahden erilaisen johtimen läpi muodostaen lämpötilaeron. Toinen pinta jäähdytetään ja toinen lämmitetään, jolloin pystytään tarkoin säätämään näytteen lämpötilaa sähkövirran avulla. [22, s. 2] Säätämällä painetta ja lämpötilaa kammioon johdettu vesihöyry saadaan asetettua tasapainotilaan (taulukko 2.). Peltier-elementin tyypillinen käyttöalue on $-30\dots+6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Taulukko 2. Lämpötilan ja paineen arvoja, jotka vastaavat puhtaan veden kyläistä höyrynpainetta [14, s. 161]

Lämpötila ($^{\circ}\text{C}$)	Paine (Pa)
-30	38
-25	64
-20	104
-15	165
-10	260
-5	401
0	611
1	657
2	705
3	758

Lämpötila (°C)	Paine (Pa)
4	813
5	872
6	935

Vesihöyrytilaa (Water Vapour Mode) voidaan käyttää vain Medium tai Low Vacuum -tilassa. Medium Vacuum -tilan käyttö mahdollistaa enimmillään 150 Pa:n vesihöyrynpaineen, jolloin lämpötilan säätö rajoittuu noin $-30\dots-15$ °C:seen. Alhaisen paineen vuoksi korkeammassa lämpötiloissa ei saavuteta kyläistä höyrynpainetta. Low Vacuum -tilassa päästään 3–500 Pa:n painealueelle (jopa 2 000 Pa, jos mikroskooppiin on asennettu pyörivä pumppu) [14, s. 159–161]. Low Vacuum -tilan käyttö vaatii mekaanisen apertuurin vaihtamisen (kuva 10).



Kuva 10. Apertuurien sijainti kuvattuna korkean ja keskityhjiön tilassa vasemmalla sekä matalatyhjiön tilassa oikealla [14, s. 151]

Näytteiden tutkiminen vaihtelevan paineen ja lämpötilan avulla lisää mahdollisuuksia erilaisten ei-johtavien näytteiden sekä tavanomaisen korkeatyhjiöolosuhteille herkkien materiaalien tarkasteluun. Vesihöyryn käyttö kuvantamiskäytössä mahdollistaa näytteen tutkimisen ilman käsittelyä, jolloin vältetään käsittelyn aiheuttamat muutokset tai vauriot näytteeseen ja näyte pysyy mahdollisimman alkuperäisessä tilassa. Tästä on hyötyä myös dynaamisissa kokeissa, kun halutaan tarkastella näytteessä tapahtuvia muutoksia olosuhteita vaihtamalla.

Koululla tätä voidaan hyödyntää erilaisten ei-johtavien materiaalien, kuten muovien, elintarvikkeiden ja erilaisten biologisten näytteiden tutkimisessa. Metropolian sisäviljelylaboratorio UrbanFarmLab kasvattaa erilaisia elintarvikkeita tarkoin kontrolloiduissa olosuhteissa. Yksi kokeilu on tehty polymeerien käytöstä ruokasienien kasvatukseen, missä on testattu sienien kykyä hajottaa muovissa oleva hiili ravinnokseen. Tutkimus oli osana Kaikki muovi kiertää -hanketta. Tutkimuksessa käytettiin hajottajasieniä, kuten osterivinokasta, ja niiden kasvualustana käytettiin olkipellettiä, johon oli lisätty eri määriä PA- ja PET-muoveja. SEM-analyysiä varten näytteet kuivattiin ja päällystettiin kullalla. Saadut näytteet analysoitiin valo- sekä elektronimikroskoopilla, ja molemmilla menetelmillä oli havaittavissa mikromuoveja. Muovin hajoamisnopeudet olivat linjassa kirjallisuudessa julkaistujen tutkimustulosten kanssa. [23.]

5 Peltierin asennus ja käyttöönotto

Peltierin asennus ja käyttöönoton testaus tehtiin Metropolian Myyrmäen kampuksen tiloissa olevaan Tescan Vega3 SEM -laitteeseen yhdessä laboratorioinsinöörin kanssa. Käyttöönotto aloitettiin tutustumalla SEM:n valmiina olevaan laitteistoon sekä lisäosana hankittuun Peltier-elementtiin. Laitetoimittajaan oltiin yhteydessä, jotta saatiin varmuus Peltierin sopivuudesta jo olemassa olevan laitteiston kanssa. Haluttiin varmistaa vesihöyryn käytön yhteensopivuus esimerkiksi EDS-detektorin eli alkuaineanalyysointilaitteen kanssa, joka täytyy pitää erittäin kuivana toimiakseen. Elementin mukana tuli valmiit asennusohjeet, minkä lisäksi täytyi varmistaa muut valmiudet, kuten jäähdytysjärjestelmä ja vesihöyrynsisäätölaitteisto, kokoonpanon toimimiseksi.

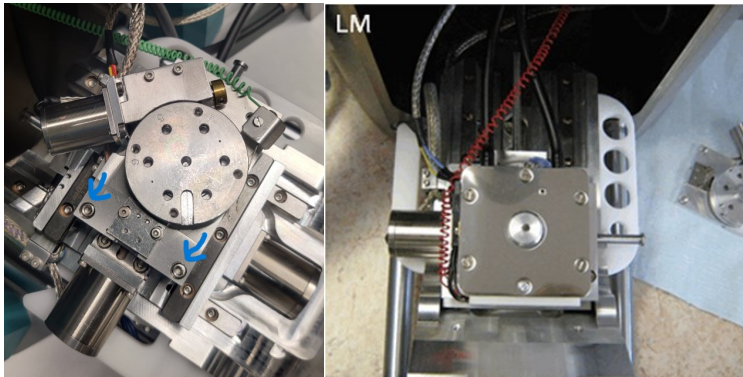
Ennen asennusta laitteisto kytketään päälle, ja kammion alipaine poistetaan VENT-painikkeesta, jotta kammio saadaan auki. Kokoonpanon asennus aloitettiin irrottamalla umpilaippa Peltierin jäähdytysnestepiirin liitännöjää varten. Koulun SEM-laitteessa on LM-kammiotyyppi, joka mahdollistaa elementin liittämisen laitteen oikealla puolella olevaan kammiolaippaan (kuva 11). Kammioliittimen täytyy tulla tarpeeksi ulos aukosta, jotta kiinnitys onnistuu ja metalliset laipat asettuvat kohdilleen.



Kuva 11. Kammioliittimen kiinnitys kammiolaippaan [14, s. 156]

Tämän jälkeen vaihdettiin alkuperäinen näytelava Peltier-elementtiin, joka toimii alustana näytteen pidikkeelle. Alkuperäinen näytelava on kiinteä kokonaisuus, joka irrotetaan manipulaattorin päältä kolmella ruuvilla (kuva 11). Ei ole siis tarpeen irrottaa mitään osia erikseen. Irrotetut osat (alkuperäinen näytelava ja umpilaippa) merkittiin ja laitettiin SEM-laitteen tarvikekaappiin säilytykseen. Seuraavaksi lavan kierto poistettiin käytöstä ohjausohjelmiston asetuksista, jolloin näytelava liikkuu ainoastaan pysty- ja sivuttaissuunnissa. Vaihdettaessa alkuperäinen näytelava Peltieriin on huomioitava, että näytelavan kierto ja kallistus ei ole mahdollista ja näytepidikkeiden paikat rajoittuvat yhteen. Lavaan on kuitenkin mahdollista kiinnittää isompi näytepidike useampaa näytettä varten. Lopuksi

liitettiin absorboidun virran liitin kammion takaosassa olevaan pA-mittarin laip-
paan kiinni.

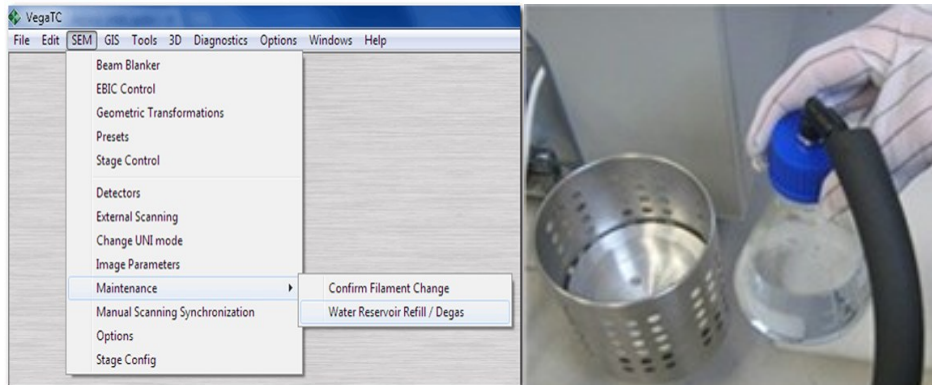


Kuva 12. Alkuperäinen näytelava vasemmalla ja Peltier oikealla [14, s. 157]

Seuraava vaihe oli liittää nestejäähdytysjärjestelmä kammion ulkopuolelle tule-
viin liitäntöihin. Jäähdytysjärjestelmä on mikroskoopin viereen tuleva erillinen
laatikko, joka mahdollistaa Peltier näytelavan lämpötilan säätelyn. Laatikon säili-
öön kaadetaan 1 litra puhdasta tislattua vettä ja kytketään päälle. Lämpötila
asetetaan 10 °C:seen SEM-laitteen ohjainohjelmistosta Stage cooling -paneeli-
list, jolloin järjestelmä aloittaa veden pumppauksen. Laatikko ja sen liitännät on
nostettava samaan tasoon Peltier-elementin kanssa erilliselle pöydälle mikro-
skoopin viereen, jotta piirissä kulkevasta vedestä saadaan ilmakuplat pois. Tar-
kistettiin etteivät liitännät vuoda mistään kohtaa ja liitettiin ulompi sähkökaapeli
Peltierin kammioliittimeen, jolloin Stage Cooling -paneeli aktivoitui.

Vesihöyryn sisääntulojärjestelmä on valmiiksi asennettu SEM-laitteeseen sen
käyttönoton yhteydessä, ja sen ainut käyttäjälle näkyvä osa järjestelmässä on
lasipullo, joka toimii järjestelmän vesihöyryn lähteenä. Pullo on asetettu lämmi-
tettyyn metallikoriin (kuva 13 oikealla), joka sijaitsee edestäpäin katsottuna mik-
roskoopin vasemmalla puolella laitteiston pöytätason alareunassa. Vesihöyryn
sisääntulojärjestelmän aktivoimiseksi täytyi järjestelmään kuuluvaan lasipulloon
kaataa 200 ml puhdasta tislattua vettä ja suorittaa kaasunpoisto. Varmistamalla
kyllästetty vesihöyry pääseminen näytekammiioon on minimoitava ilman läsnä-
olo tyhjiöjärjestelmässä sekä veteen liunneena. Järjestelmä poistaa kaiken

kaasun tyhjiöjärjestelmästä käyttämällä kaasunpoistomenettelyä. Koska vesipullo oli tyhjä, kaasunpoisto täytyi tehdä manuaalisesti ohjainohjelmistosta SEM-valikon kautta (kuva 13).



Kuva 13. Vesisäiliön täyttö/kaasunpoisto SEM-valikon kautta (vasen kuva) sekä vesihöyrynsisäntulojärjestelmän lasipullo oikealla [14, s. 163–164]

Kun järjestelmä saatiin asennettua, niin viimeinen vaihe oli kokeilla kokoonpanon toimivuutta. Jäähdytysjärjestelmä oli kytkettävä uudelleen, koska asennus ja kuvantaminen suoritettiin erillisinä päivinä. Ulompi sähkökaapeli irrotettiin Peltierin kammioliittimestä ja mikroskooppiin pumpattiin alipaine. Jäähdytyslaatikon kytkentä aloittaa automaattisesti ilman pumppauksen nestepiirin letkuista. Kun alipaine saavutettiin, sähkökaapeli voitiin kytkeä takaisin liittimeen, joka aktivoi Stage Cooling/Heating -paneelin käytön ohjelmistossa. Tässä vaiheessa järjestelmä oli valmis näytteen tutkimista varten.

Näytteenä käytettiin kasvin lehteä, joka kiinnitettiin näyteteipillä näytteen pidikkeeseen. Kuvantamiseen käytettiin paineenrajoittimen takia keskityhjiötilaa, jolloin maksimipaine on 150 Pa. Paine asetettiin 150 Pa:iin ja lämpötila -16°C :seen. Kiihdytysjännitteeksi asetettiin 5 kV, joka on suosituksena ei-johtaville näytteille. Tuloksena saatiin kuvaa näytteestä, joka oli lopputavoitteena tässä työssä. Kuvan laatuun ja monipuolisempaan näytteen tarkasteluun voidaan koululla perehtyä jatkossa enemmän tämän asennuksen ja selvitystyön pohjalta.

Kaikki asennukseen tarvittavat ohjeet ovat Tescan Vega3 SEM -manuaalista, ja niistä on muokattu testauksen yhteydessä toimivat ohjeet helpottamaan käyttöä jatkossa.

Käyttöönoton haasteet ja jatkotoimenpiteet

Itse Peltier-näytelavan kiinnitys paikoilleen on melko mutkatonta, mutta on varottava liitäntöjen ja virtapiuhojen vaurioitumista asennuksen aikana. Lisäksi kiinnitykseen tarvittavat osat ovat hyvin pieniä, joten niitä on käsiteltävä varoen. Ennen asennusta kannattaa varmistaa ”expert rights” -käyttäjätunnusten saatuus, koska näytelavan kääntöasetuksia ei pysty muuttamaan ilman niitä. Näytelavoja ei vaihdettu edestakaisin tämän opinnäytetyön aikana, koska asennus suoritettiin monessa vaiheessa ja tarvetta suuremmille näyteanalyysille ei koulun laitteistolla sinä aikana tullut.

Tähänastisen asennuksen myötä järjestelmää voidaan testata Medium Vacuum -tilaa hyödyntäen, koska paine on rajoitettu enimmillään 150 Pa:iin luultavasti painetta rajoittavien apertuurien vuoksi. Tämä tarkoittaa Peltier-näytelavan lämpötilan asettamista vähintään noin -15 °C :seen, jotta saavutetaan kylläinen höyrynpaine näytekammiossa. Ohjeet järjestelmän käyttöön löytyvät liitteestä 2. Jos järjestelmän seuraavaan kokeiluun tulee pitkä väli, niin suositeltava toimenpide on tarkistaa jäähdytysjärjestelmän toimivuus (veden vaihto, ilmakuplien pumpaus ja liitännät) sekä vesihöyryjärjestelmän veden vaihto ja kaasunpoisto.

SEM-laitetta voidaan käyttää normaaliin tapaan ilman jäähdytysominaisuutta ja vesihöyryä järjestelmän asentamisesta huolimatta. Vesihöyry ja kaasut pumpataan automaattisesti ulos järjestelmää sammutettaessa, jolloin optimaalinen kuiva tyhjiö tila on taas saavutettavissa. Ainoa rajoite, jonka näytelava asettaa, on sen kierron rajoitus ja näytepaikkojen väheneminen. Ohjeet Peltier-elementin poistamiseksi löytyvät liitteestä 1.

6 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää pyyhkäisyelektronimikroskoopiin (SEM) asennettavan Peltier Cooling and Heating stage -elementin tuomia mahdollisuuksia näytteiden tutkimisessa. Tarkoituksena oli myös suorittaa laitteen ja siihen vaadittavien toimintojen käyttöönotto, jotta koululla voitaisiin hyödyntää SEM-laitteen lisäominaisuutta jatkossa. Tämän työn tuloksena oli olennaista laatia myös yksinkertaiset ohjeet helpottamaan käyttöä jatkossa.

Tämän työn teoriaosuuden alkuun on tiivistetty SEM-laitteen toimintaperiaatteet, jotka auttavat ymmärtämään yleisimpiä haasteita johtamattomien näytteiden tutkimisessa elektronimikroskoopin tyhjiöolosuhteissa. Tämän jälkeen tarkastellaan näytteiden tutkimista vesihöyryn avulla vaihtelevassa paineessa.

Opinnäytetyön aihe itsessään on hyvin tiivis kokonaisuus, mutta sitä ei voi käsitellä erillään ymmärtämättä SEM-laitteen perustoimintaperiaatteita. Kirjallisuudesta löytyy paljon perustietoa aiheesta, mutta yksityiskohtaisempaa tietoa, uudempiä tekniikoita ja tutkimuksia on saatavilla enimmäkseen englanniksi, mikä teki työstä haastavampaa ja lisäsi kääntämiseen kuluvaan aikaan. Toimeksiannon jälkeen alkoi perehtyminen elektronimikroskopiaan, ja sen tarjoamiin mahdollisuuksiin tutkia erilaisia näytteitä. Haasteena oli myös se, että koululla ei työskentele varsinaista mikroskoopin asiantuntijaa, jonka avulla olisi voinut päästä alkuun käytännön harjoittelemisessa. Lisäksi se olisi voinut helpottaa laitteen käyttöönotossa, koska pelkästään laitteen manuaalia seuraamalla oli vaikeaa määrittää kaikkia huomioon otettavia asioita.

Lopputuloksena koulun SEM-laitteeseen saatiin asennettua Peltier-elementti ja sen käyttöönottoon tarvittavat dokumentit. Näiden ohjeiden avulla voidaan sujuvoittaa laitteen käyttöönottoa ja vaihtamista alkuperäiseen näytelavaan, koska Peltier-näytelava ja jäähdytysjärjestelmä eivät ole kiinteänä osana SEM-laitteen alkuperäistä kokoonpanoa. Työn on tarkoitus olla selkeälukuinen myös sellaisille käyttäjille, joilla ei ole aikaisempaa kokemusta SEM-laitteen käytöstä. Tämä työ toimii perehdytysmateriaalina uusille käyttäjille, mutta sen lisäksi on

suositeltavaa tutustua SEM-laitteen rakenteeseen ja perustoimintaan ennen käyttöä.

Lähteet

- 1 UI-Hamid, A. 2023. Correction to: A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. In: A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. E-kirja. Springer, Cham.
- 2 Lounatmaa, Kari & Rantala, Immo. 1991. Biologinen elektronimikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino.
- 3 Scanning electron microscopy. Verkkoaineisto. Nanoscience. <<https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>>. Luettu 23.10.2024.
- 4 Nanakoudis, Antonis. 2019. SEM: Types of Electrons and the Information They Provide. Verkkoaineisto. <<https://www.thermofisher.com/blog/materials/sem-signal-types-electrons-and-the-information-they-provide/>>. 21.11.2019. Luettu 4.11.2024.
- 5 Näkki, Jonne. 2021. Pyyhkäisyelektronimikroskoopi. Verkkoaineisto. Centria-ammattikorkeakoulun verkkolehti. <<https://centriabulletin.fi/pyyhkaisyelektronimikroskoopi/>>. 1.11.2021. Luettu 13.11.2024
- 6 Investigating fully hydrated samples using ESEM Technology. Verkkoaineisto. ThermoScientific. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/ESEM-hydrated-samples.pdf>>. Luettu 15.11.2024.
- 7 Stokes, Debbie. 2008. Principles and Practice of Variable Pressure / Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM). E-kirja. John Wiley & Sons, Incorporated.
- 8 Charging phenomenon, charging. Verkkoaineisto. Jeol. <<https://www.jeol.com/words/sem-terms/20121024.054158.php#gsc.tab=0>>. Luettu 15.11.2024.
- 9 Näytteen valmistus. 2006. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/naytteen_valmistus_2/2/>. Luettu 8.11.2024.
- 10 Mehdizadeh, Abolfazl; Tahermanesh, Kobra; Chaichian, Shahla; Taghi Jogha-taei, Mohammad; Moradi, Fatemeh; Tavangar, Seyed Mohammad; Sadat Mousavi Najafabadi, Ashraf; Lotfibakhshaiesh, Nasrin; PourBeyranvand, Shah-ram; Fazel Anvari-Yazdi, Abbas & Mehr Abed, Seyedeh. 2014. How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). Vol. 3(2), s. 63-80.

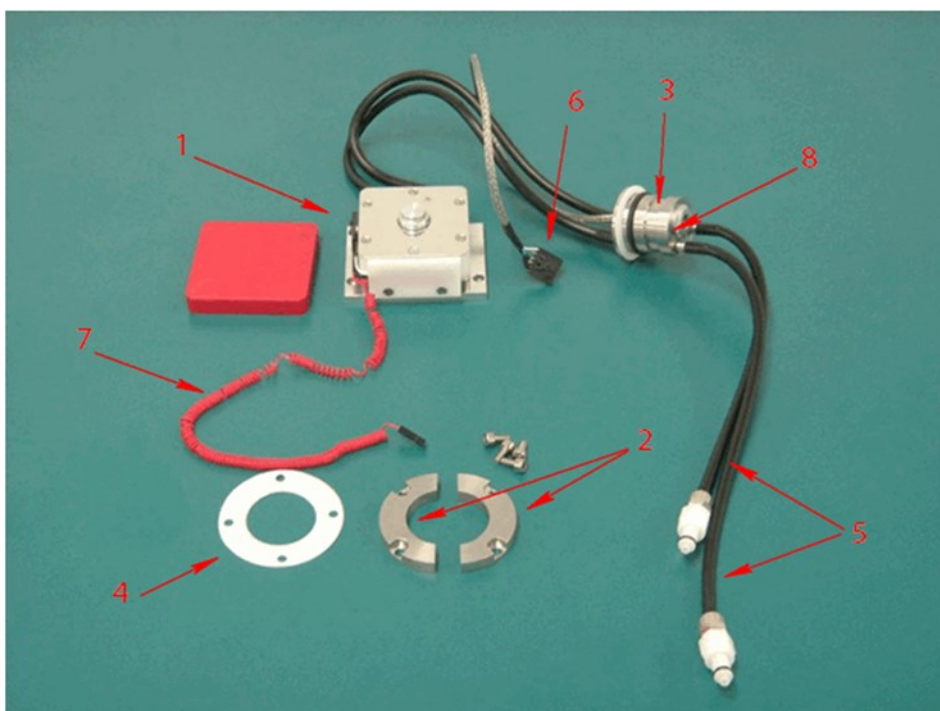
- 11 Lounatmaa, Kari & Rantala, Immo. 1995. Biologisen elektronimikroskopian menetelmät. Helsinki. Yliopistopaino.
- 12 Scanning Electron Microscopy. Verkkoaineisto. Central Microscopy Research Facility. <<https://cmrf.research.uiowa.edu/scanning-electron-microscopy>>. Luettu 11.11.2024.
- 13 Understanding the Significance of Material Outgassing in Vacuum Chambers and Identifying Suitable Materials. Verkkoaineisto. Harold G. Schaevitz Industries. <<https://www.hgsind.com/blog/understanding-significance-material-outgassing-vacuum-chambers-and-identifying-suitable>>. Luettu 11.11.2024.
- 14 Tescan Vega3 SEM manual. 2020. Verkkoaineisto. <https://www.dartmouth.edu/emlab/docs/tescan_vega3_sem_manual.pdf>. Päivitetty 20.9.2015.
- 15 Low-vacuum SEM, Natural SEM, Wet SEM, valuable pressure SEM, VP-SEM, Environmental SEM, ESEM. Verkkoaineisto. Jeol. <<https://www.jeol.com/words/sem-terms/20121024.060658.php#gsc.tab=0>>. Luettu 18.11.2024.
- 16 Donald, Athene M; He, Chaobin; Royall, C.Patrick; Sferrazza, Michele; Stelmashenko, Nadia A & Thiel, Bradley L. 2000. Applications of environmental scanning electron microscopy to colloidal aggregation and film formation. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol. 174, s. 37-53.
- 17 Vega3 manual. 2014. Verkkoaineisto. <https://www.csuc-hico.edu/sem/_assets/documents/vega-manual-2014.pdf>. Luettu 20.11.2024.
- 18 Water saturation pressure vs. temperature. Verkkoaineisto. The Engineering Toolbox. <https://www.engineeringtoolbox.com/water-vapor-saturation-pressure-d_599.html>. Luettu 24.10.2024.
- 19 Convert Kilopascal to Torr. Verkkoaineisto. UnitConverters. <<https://www.unitconverters.net/pressure/kilopascal-to-torr.htm>>. Luettu 24.10.2024.
- 20 Low Vacuum Scanning Electron Microscopy and Microanalysis. Verkkoaineisto. <<https://www.imim.pl/files/SD/Power/Introduction%20to%20Low%20Vacuum%20SEM.pdf>>. Luettu 8.11.2024.
- 21 Banhart, Florian. 2008. In-situ Electron Microscopy At High Resolution. E-kirja. World Scientific Publishing Company.

- 22 Peltier cooling and heating stage user manual. Tescan. Käyttöönottopopas.
- 23 Adhikari, Smarika; Thapamagar, Miriam; Toukoniitty, Esa & Åkerman, Marja-Leena. Hajottavatko koulutetut sienet muovia? Muoviplast 5/2024, s. 14–15.

Peltier-näytelavan asennusohjeet

Sisällys

- Peltier asennus
 - Osaluettelo
 - Vaihe 1: Peltier-näytelavan kiinnitys
 - Vaihe 2: Nestejäähdytysjärjestelmän liittäminen ja täyttö
- Jäähdytysjärjestelmän huolto
- Peltier-näytelavan poistaminen kammiosta
- Vesihöyrynsisäntulojärjestelmän huolto
 - Kaasun poisto
 - Uudelleen täyttö



Osaluettelo

1. Peltier jäähdytys-/lämmitysalusta
2. Kaksi puolilaippaa kammioliittimen kiinnitykseen

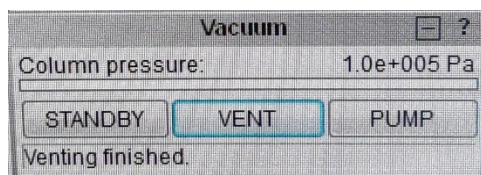
3. Kammioliitin
4. Aluslevy (muoviprikka)
5. Nestejäähdytyspiirin liitännät
6. Peltier-elementin liitin (valmiina kiinni alustan kyljessä)
7. Absorboidun virran liitin
8. Ulomman sähkökaapelin ura

HUOM!

- KÄYTÄ AINA KUMIHANSKOJA, KUN TYÖSKENTELET KAMMION SISÄLLÄ!
- Älä irrota kammion laipan tai lavan letkuja nipoista, koska kaikki liitännät (Peltier-näytelavan, kammion laipan ja letkujen) testataan yhtenä sarjana, jotta vältetään vuodot kammion sisällä.
- VARMISTA, ETTÄ SINULLA ON KÄYTÖSSÄSI "EXPERT RIGHTS" KÄYTTÄJÄTUNNUKSET, JOTTA PYSTYT MUUTTAMAAN NÄYTELAVAN KÄÄNTÄMISASETUKSIA.

ALOITUS

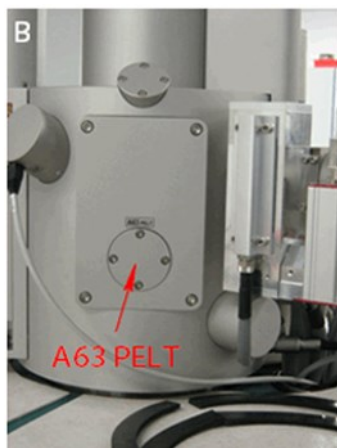
- Käynnistä SEM kääntämällä pääkytkin asentoon ON ja avaa tyypipullo.
- Avaa ohjelmisto ja poista alipaine kammiosta:
 - ➔ Avataksesi näytekammio paina Vacuum paneelin VENT-näppäintä ja odota noin 30 sekuntia kunnes alipaine poistuu. Voit avata näytekammion vetämällä luukun molemmilta puolilta.



Vaihe 1: PELTIER-NÄYTELAVAN KIINNITYS

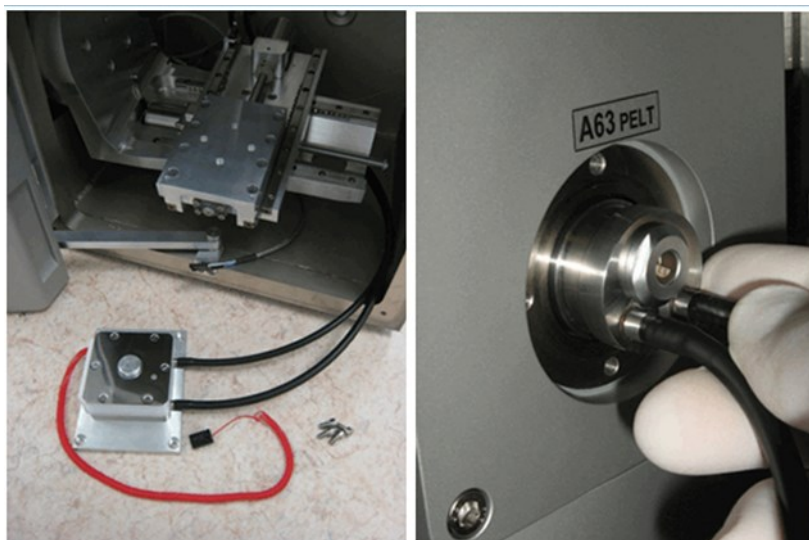
- Irrota umpilaippa kammion tyypin mukaan:

Koulun SEM:ssä on LM-kammio: umpilaippa sijaitsee oikeanpuoleisessa suorakulmiolevyssä (kuva 1)



Kuva 1.

- Aseta kammioliitin (osa 3) kammion sisältä niin että Peltier-näytelava jää kammion sisäpuolelle ja jäähdytysletkut tulevat ulkopuolelle. Kammioliittimen on tultava riittävästi ulos aukosta, jotta kiinnitys onnistuu.



Kuva 2.

- Aseta aluslevy (osa 4) ja kiinnitä kammioliitin kahdella puolilaipalla (osa 2) kuvan 3 mukaisesti.

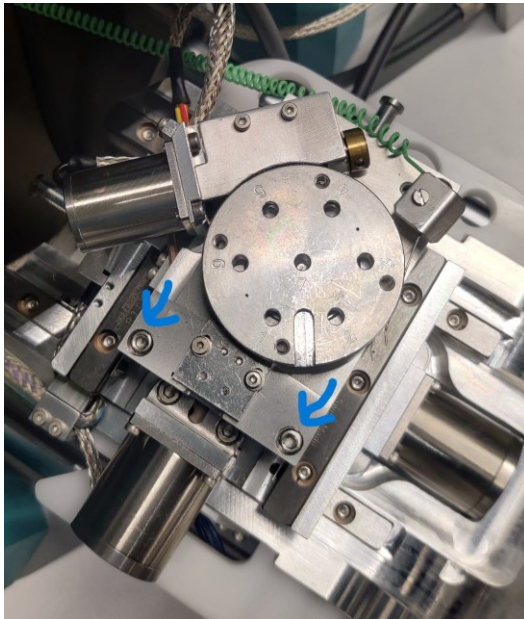


Kuva 3.

Huom! Peltier-näytelavan kammioliitin ja umpilaippa on varustettu O-renkailla. Käytä riittävä määrä SEM-lisävarusteiden tyhjiörasvaa (vacuum grease) O-renkaiden tiivistämiseen, jotta kammion tyhjiö ja pumppausaika paranevat. Käytä vain Tescan-mikroskooppien mukana toimitettua tyhjiörasvaa.

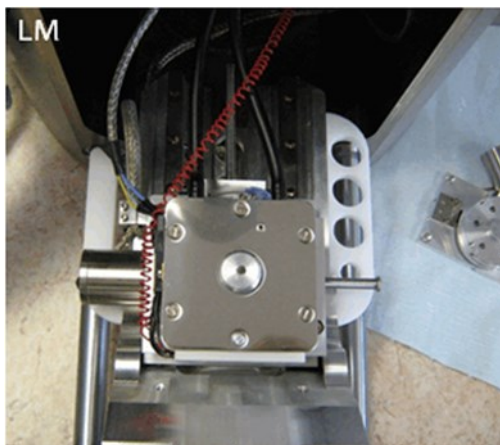
Peltier-tason kiinnittäminen SEM tasoon:

- Irrota näytelava, joka on kiinni kolmella ruuvilla (kuva 4) sekä vihreä virtajohto kammion takaosasta.



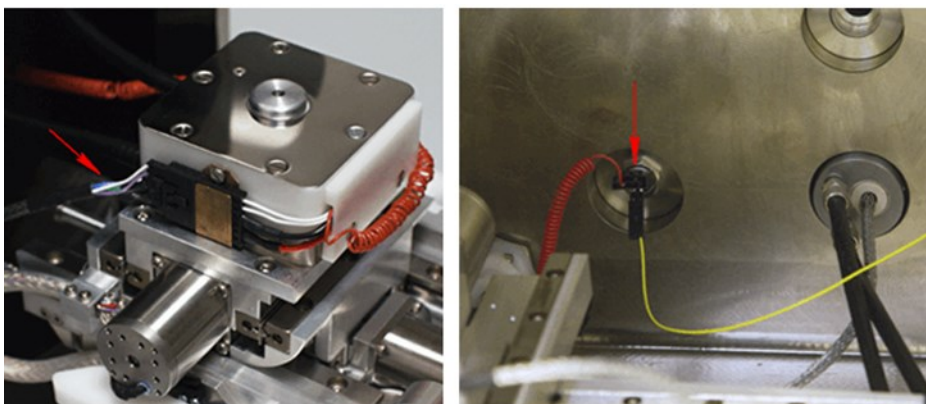
Kuva 4.

- Poista näytelavan kierto käytöstä mikroskoopin ohjausohjelmistossa (user with "expert" rights; menu "Setup", item "Stage config")
- Peltier-näytelava kiinnitetään 3 ruuvilla (LM-kammio) ja sovitinlevyllä manipulaattoriin. Nestejäähdytyspiirin liitännöiden (osa 5) tulee osoittaa taakse päin kuvan 5 mukaisesti.



Kuva 5.

- Kiinnitä punainen virtajohto kammion takaosassa olevaan laippaan, josta irrotettiin edellisen näytelavan vihreä virtajohto (kuva 6). Peltier-liitin (osa 6) on valmiiksi kytketty, sitä ei tarvitse irrottaa.



Kuva 6.

Vaihe 2: NESTEJÄÄHDYTYSJÄRJESTELMÄN LIITTÄMINEN JA TÄYTTÖ

1. Kytke kammion ulkopuolella olevat Peltierin nestejäähdytyspiirin liittimet jäähdytyslaatikon letkuihin. **TÄRKEÄÄ! Älä kytke ulompaa Peltier-sähkökaapelia vielä!**



Kuva 7.

2. Aseta jäähdytyslaatikko lattialle ja täytä se puhtaalla tislatulla vedellä:

Käännä laatikko ylösalaisin ja ruuvaa pohjassa oleva muovi nupikka irti (kuva 8). Sopivan työkalun puuttuessa voit käyttää pienempää kuusiokoloavainta ja esimerkiksi meisseliä apuna (kuva 9). Täytä säiliö noin 1 cm päähän täyttöaukon suulta (n. 1 litra).

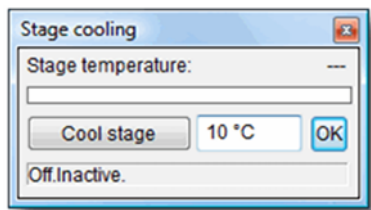


Kuva 8.



Kuva 9.

3. Kytke jäähdytyslaatikon virtajohto pistokkeeseen.
4. Avaa "Stage cooling" paneeli mikroskoopin ohjausohjelmistossa ja aseta lämpötilaksi 10 °C -> paina OK. Jäähdytysjärjestelmä aloittaa veden pump-pauksen (**ULOMPI PELTIER-SÄHKÖKAAPELI ON EDELLEEN IRTI!**)



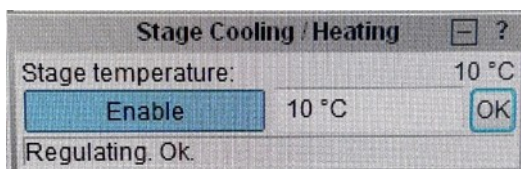
5. Nosta jäähdytyslaatikkoa, jotta vesi pääsee letkuihin ja ilmakuplat poistuvat jäähdytysjärjestelmästä.

TÄRKEÄÄ! On tarpeen varmistaa, että letkujen sisällä ei ole ilmaa. Kierrättävän jäähdytysnesteen on toimittava kunnolla, ennen kuin liität ulomman Peltier-sähköliittimen kammion laippaan.

6. Aseta jäähdytyslaatikko ja jäähdytysnestepiirin letkut mikroskoopin pöydälle suunnilleen samaan tasoon kuin Peltier-näytelava.
7. Tarkista jäähdytyspiiri mahdollisten vuotojen varalta ja aseta alipaine painamalla PUMP-näppäintä Vacuum-paneelista. Tarkista, ettei tyhjiövalmiustilan saavuttamisessa ole ongelmia (tyhjiövalmiuden saavuttaminen voi kestää tavallista pidempään, mutta mikroskoopin tyhjiöjärjestelmän pitäisi pystyä saavuttamaan tyhjiövalmiustila ennen kuin heikko vuotoaikakatkaisuviesti tulee näkyviin.
8. Kytke ulompi Peltier-sähkökaapeli kammion laippaan (kuva 10), niin Stage Cooling -paneeli aktivoituu kuvan 11 mukaisesti (lukee: Regulating. Ok.)



Kuva 10.



Kuva 11.

Tärkeää! Jos jäähdytyspiiriin jää ilmaa, Peltier-näytelava voi ylikuumentua ja vaiheen jäähdytys tai lämmitys pysähtyy (kuva 12.). Tässä tapauksessa on tarpeen odottaa 15 minuuttia, jotta vaihe jäähtyy itsestään. Kun avaat SEM valikosta Diagnostics -> health status näet virheviestin "Peltier: Error! Too high temperature!". On välttämätöntä toistaa Nestejäähdytysjärjestelmän liittäminen -vaiheen toimenpiteet uudestaan (ei vesitäyttöä), jotta ilma poistuu jäähdytyspiiristä. Irrota ulompi Peltier sähkökaapeli ja seuraa ohjeita kohdasta 4. alkaen.



Kuva 12.

JÄÄHDYTYSJÄRJESTELMÄN HUOLTO

Vaihda vesi piirissä kokonaan vuosittain. Mikäli jäähdytyslaatikon säiliössä oleva vesi vaihdetaan vähintään neljä kertaa vuodessa ja Peltier-näytelavaa käytetään säännöllisesti, nestettä ei tarvitse poistaa koko järjestelmästä.

PELTIER NÄYTELAVAN POISTAMINEN KAMMIOSTA

Peltier-näytelava rajoittaa manipulaattorin liikettä ja näytepaikkojen määrää (tason pyöriminen otetaan pois käytöstä, kun Peltier-näytelava on kiinnitetty). Jos halut hyödyntää kaikkia manipulaattorin ominaisuuksia toimi seuraavasti:

1. Irrota Peltier-näytelava ja irrota se absorboidun virran mittausliittimestä (pu-nainen piuha)
2. Irrota jäähdytysnestepiirin liittimet kammion ulkopuolelta ja irrota Peltier-näytelava kammion päinvastaisessa järjestyksessä kuin asentaminen.
3. Kiinnitä alkuperäinen näytelava ja kytke pA-mittarin liitin (vihreä johto)
4. Asenna näytelavan kierto takaisin manipulaattoriin: Ota kierto käyttöön ohjausohjelmistosta ja kalibroi lava -> Expert rights ->Stage Configuration -> Stage Control

Huom! Jäähdytysletkuissa on itsestään sulkeutuvat liittimet, joten irrotettu piiri pysyy ilmattomana.

VESIHÖYRYN SISÄÄNTULOJÄRJESTELMÄN HUOLTO

Vesihöyryn sisääntulojärjestelmän ainoa käyttäjälle näkyvä osa järjestelmässä on lasipullo, joka toimii järjestelmän vesihöyryn lähteenä. Pullo asetetaan lämmitettyyn metallikoriin, joka sijaitsee edestäpäin katsottuna mikroskoopin vasemmalla puolella laitteiston pöytätason alareunassa.

Ennen kuin aloitat Peltierin käytön varmista lasipullossa olevan veden määrä ja laatu. Järjestelmän täyttötoimenpide tulee tehdä, jos tilavuus on alle 50 ml ja/tai jos vedessä on epäpuhtauksia kuten likaa, pölyä, yms. Siirry kohtaan "Uudelleen täyttö" jos tämä on tarpeen. Muutoin siirry kohtaan "Kaasun poisto".

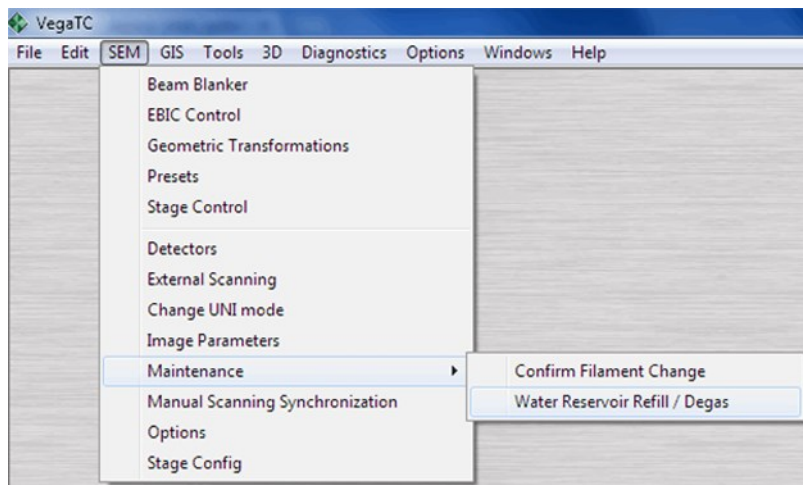
KAASUN POISTO

Suoritettava joka kerta, kun vesihöyryn sisääntulojärjestelmä aktivoidaan. Toimenpide kestää n. 2 minuuttia ja varmistaa, että kyllästetty vesihöyry pääsee kammioon. Sen varmistamiseksi on välttämätöntä minimoida ilman läsnäolo tyhjiöjärjestelmässä sekä veteen liunneena. Järjestelmä poistaa kaiken kaasun tyhjiöjärjestelmästä suorittamalla automaattisen kaasunpoiston, kun vesihöyrynpaine on asetettu ja pumppaus käynnistetään.

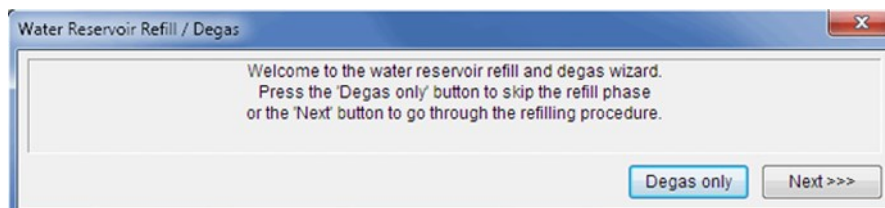
Jos järjestelmää ei käytetä kovin usein tai vesisäiliö avataan, on suositeltavaa tehdä kaasunpoisto manuaalisesti. Toimenpide kestää 5 minuuttia.

Manuaalinen kaasunpoisto:

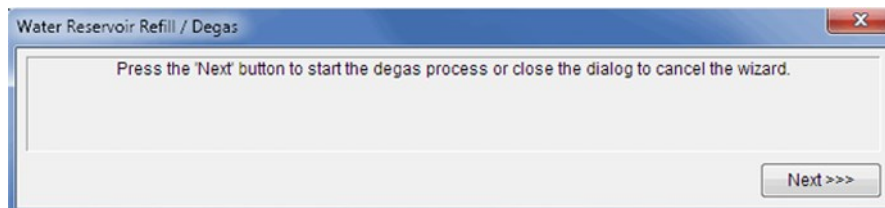
1. Avaa SEM valikosta vesisäiliön täyttö/kaasunpoisto.



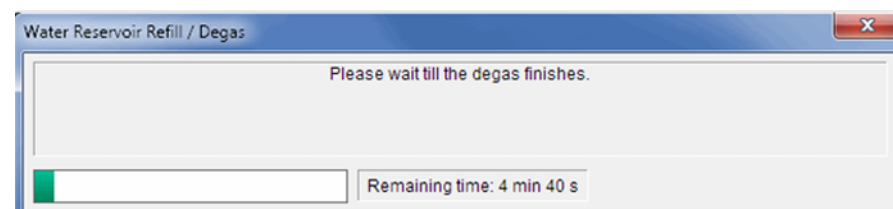
2. Paina **Degas only** -painiketta.



3. Vahvista painamalla **Next** -painiketta.



4. Kaasunpoisto alkaa. Odota kunnes toiminto on suoritettu loppuun (toiminnon pystyy pysäyttämään sulkemalla valintaikkunan).



UUDELLEEN TÄYTTÖ

Ennen kuin aloitat Peltierin käytön varmista lasipullossa olevan veden määrä ja laatu. Järjestelmän täyttötoimenpide tulee tehdä, jos tilavuus on alle 50 ml ja/tai jos vedessä on epäpuhtauksia kuten likaa, pölyä, yms.

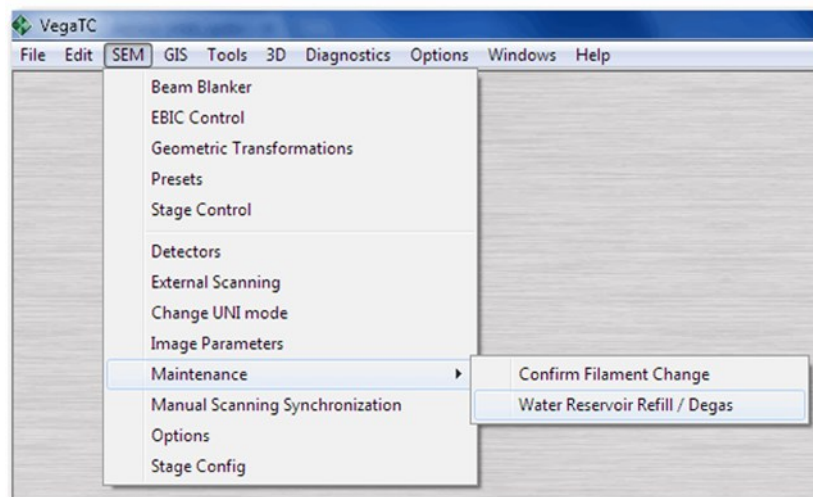
Huomioi veden uudelleen lämmittämisaika, joka on 1–2 tuntia.

Suorita uudelleen täyttö, jos:

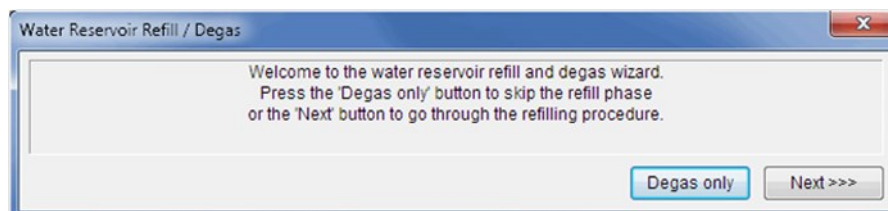
- Lasipullossa on alle 50 ml vettä
- Säiliössä oleva vesi on epäpuhdasta

Molemmissa tapauksissa aloita veden täyttö näin:

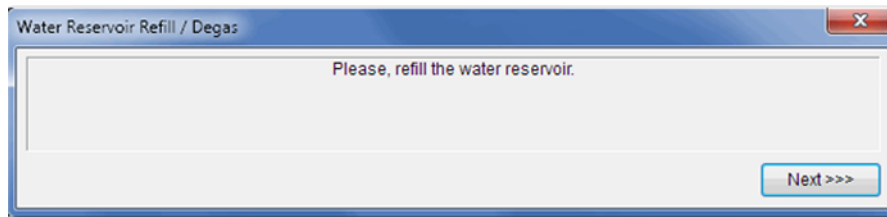
1. Avaa SEM valikosta vesisäiliön täyttö/kaasunpoisto.



2. Paina **Next** -painiketta aloittaaksesi uudelleen täyttö (kuvassa virheellisesti **Degas only** -painike aktivoituna!)



3. Vahvistusikkuna tulee näkyviin. **Älä paina vielä Next -painiketta!**



TÄRKEÄÄ! Älä kytke mitään tyhjiötilaa päälle ennen kuin koko toimenpide on valmis.

4. Poista pullo lämmityskorista ja kierrä korkki irti.



5. Tarkista veden puhtaus. Jos vedessä näkyy pölyhiukkasia tai likaa, tyhjennä pullo ja puhdista se.

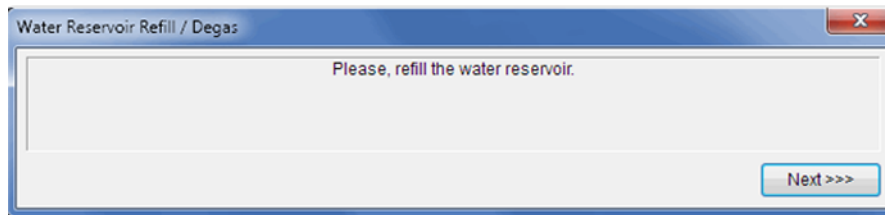
6. Täytä pullo puhtaalla TISLATULLA VEDELLÄ. Älä ylitä 200 ml rajaa.

TÄRKEÄÄ! Pullon täyttö suoraan lämmityskorissa ja/tai sähkölaitteiden lähellä on kielletty.

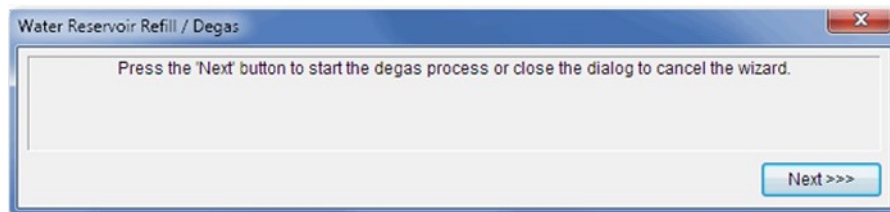


7. Kierrä korkki kiinni ja aseta pullo varovasti takaisin lämmityskoriin.

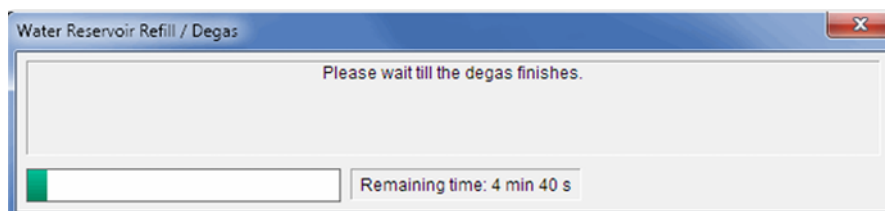
8. Kun täyttö on valmis, paina **Next** -painiketta.



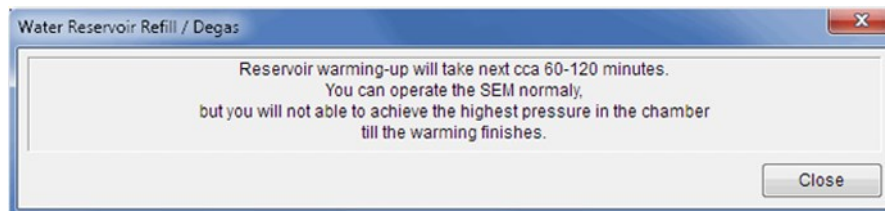
9. Paina **Next** -painiketta vahvistaaksesi kaasunpoisto toimenpide.



10. Kaasunpoisto alkaa. Odota kunnes toiminto on suoritettu loppuun (toiminnon pystyy pysäyttämään sulkemalla valintaikkunan).



11. Kun kaasunpoisto on valmis, näyttöön tulee valintaikkuna.



Tärkeää!

- Veden lämmittäminen optimaaliseen lämpötilaan kestää 1–2 tuntia. Tänä aikana ei ole mahdollista saavuttaa korkeampaa vesihöyrynpainetta kuin n. 1500 Pa. Myös joitain merkittäviä paineenvaihteluita voi esiintyä. Suorita tässä tapauksessa kaasunpoisto uudelleen.
- Jos kaasunpoisto jätettiin väliin tai lyhennettiin veden vaihdon yhteydessä, suorita kaasunpoisto uudelleen. Veteen on todennäköisesti liuenut suuri määrä ilmaa.

- Jos järjestelmästä ei poisteta kaasua riittävästi, mikroskoopissa on määrittelemätön ilman ja vesihöyryn seos jonkin aikaa vesihöyrytilan kytkemisen jälkeen.

Lähde: https://www.dartmouth.edu/emlab/docs/tescan_vega3_sem_manual.pdf

Peltier käyttöohjeet

Ennen kuin aloitat peltierin käytön varmista lasipullossa olevan veden määrä ja laatu. Toimi huolto-ohjeiden mukaan. Ohje löytyy Peltier asennus -oppaasta (liite 1).

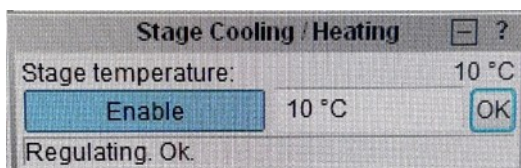
Vesihöyryn sisääntulojärjestelmän ainoa käyttäjälle näkyvä osa järjestelmässä on lasipullo, joka toimii järjestelmän vesihöyryn lähteenä. Pullo asetetaan lämmitettyyn metallikoriin, joka sijaitsee edestäpäin katsottuna mikroskoopin vasemmalla puolella laitteiston pöytätason alareunassa.

Vesihöyry ominaisuus on käytössä ainoastaan Medium- tai Low Vacuum -tilassa. Huomioi maksimi paineen suuruus, kun käytät Medium Vacuum -tilaa (max.150 Pa), varmistaaksesi kylläisen höyrynpaineen saavuttamisen. Low Vacuum -tilan käyttö vaatii apertuurin lisäyksen.

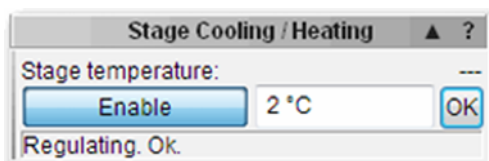
Seuraava menettely kuvaa vesihöyrynsisääntulojärjestelmän toimintaa yhdessä Peltier-näytelavan kanssa tasapainotilan eli kylläisen höyrynpaineen saavuttamiseksi SEM-kammion sisällä. Se soveltuu myös dynaamisten prosessien, kuten faasimuutosten, kiteiden muodostumisen jne. seurantaan.

1. Irrota Peltierin ulompi sähkökaapeli peltierin kammioliittimestä nestejäähdytyspiiriin pumppauksen ajaksi.
2. Kytke jäähdytyslaatikon virtajohto pistokkeeseen ja aseta Stage cooling -paneelista lämpötilaksi 10 °C
3. Aseta alipaine painamalla PUMP-näppäintä Vacuum-paneelista. Tarkista, ettei tyhjiövalmiustilan saavuttamisessa ole ongelmia (tyhjiövalmiuden saavuttaminen voi kestää tavallista pidempään, mutta mikroskoopin tyhjiöjärjestelmän pitäisi pystyä saavuttamaan tyhjiövalmiustila ennen kuin heikko vuotoaikakatkaisuviesti tulee näkyviin.

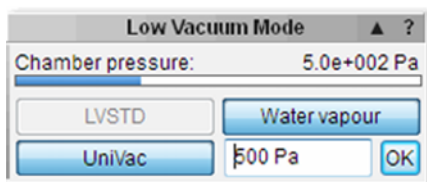
4. Kytke ulompi Peltier-sähkökaapeli kammion laippaan, niin Stage Cooling -paneeli aktivoituu (lukee: Regulating. Ok.)



5. Poista alipaine painamalla VENT-painiketta. Avaa näytekammio ja aseta Peltier-näytelavan lämpötila välille 0–5 °C ja vahvista painamalla OK.



6. Aseta pieni määrä näytettä näytepidikkeeseen ja kiinnitä se ruuvilla Peltier-näytelavaan. Sulje kammio.
7. Jäähdytä näyte. Odota pari minuuttia, kunnes näyte on jäähtynyt haluttuun lämpötilaan.
8. Ota käyttöön keskityhjiötila/matalatyhjiötila painamalla UniVac-painiketta.



9. Ota vesihöyryn tulo käyttöön painamalla Water Vapour -painiketta.
10. Aseta tasapaino-olosuhteet; syötä sopiva paine tekstikenttään ja paina OK.
11. Aloita pumppaus PUMP -painikkeesta. Odota, kunnes paine saavuttaa tavoitteen ja kammion painepalkin ilmaisin muuttuu siniseksi. Järjestelmä suorittaa 2 minuuttia kestävän kaasunpoiston ennen säädön alkua.

12. Säädä näytteen lämpötila Stage Cooling/Heating -välilehden tekstiruudussa. Uuden lämpötilan tulee vastata vesihöyryn painetta tasapainossa taulukon 1. mukaan.

Taulukko 1. Lämpötilan ja paineen arvoja, jotka vastaavat puhtaan veden kyläistä höyrynpainetta.

Lämpötila (°C)	Paine (Pa)
-30	38
-25	64
-20	104
-15	165
-10	260
-5	401
0	611
1	657
2	705
3	758
4	813
5	872
6	935

TÄRKEÄÄ! Vältä suuria poikkeamia tasapainotilassa, kun asetat vesihöyryn painetta ja lämpötila. Edellä mainittujen suositusten rikkominen voi aiheuttaa voimakasta jäätymistä tai veden tiivistymistä, mikä johtaa jäähdytyksen ja/tai paineen säätelyn epäonnistumiseen.

13. Odota tasapainotilan asettumista 2–5 minuuttia. Käytä kammionäkymää (Chamber view) havaitaksesi mahdollisen jään muodostuminen näytelavalla. Jään muodostuessa laske vesihöyryn painetta hieman tai nosta lämpötilaa.
14. Valitse sopiva kiihdytysjännite ja säteen intensiteetti (katso tarkemmat ohjeet SEM ohjeista).

15. Laita kiihdytysjännite päälle painamalla HV painiketta Electron Beam -paneelista. Nyt skannausikkunasta pitäisi näkyä kuvattava näyte.

Huom! Kun työskentelet lähellä tasapainotilaa, voidaan havaita hidasta jään ja veden laskeutumista tai näytteen hidasta kuivumista. Tämä koskee erityisesti biologisia näytteitä, joissa näytteeseen liuenneet orgaaniset ja epäorgaaniset yhdisteet voivat alentaa veden osapainetta jopa 25 %.

Järjestelmän sammutus

1. Aseta vesihöyryn paine alle 150 Pa:iin, mutta mieluiten alle 50 Pa. Kytke lopulta vesihöyrytila pois päältä Water Vapor -napista.
2. Nosta lämpötilaa välille 0–5 °C näytetelineen sulattamiseksi ja odota, kunnes lämpötila saavuttaa halutun arvon (käytä SEM kammionäkymää).
3. Poistu UniVac-tilasta painamalla UNIVAC-nappia.

Lähde: https://www.dartmouth.edu/emlab/docs/tescan_vega3_sem_manual.pdf