



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁRSKA PRÁCA

Matúš Hodoš

Rast grafénu metódou termálnej dekompozície karbidu kremíku pre aplikácie v biofyzike

Fyzikálny ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Kunc, PhD

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2019

Prehlasujem že som túto bakalársku prácu vypracoval samostatne a výhradne s použitím citovaných prameňov, literatúry a ďalších odborných zdrojov.

V Prahe dňa

Matúš Hodoš

Ďakujem RNDr. Janovi Kuncovi, Ph.D. vedúcemu mojej bakalárskej práce a doc. RNDr. Dane Gáškovéj, CSc. konzultantke mojej bakalárskej práce za pomoc, rady, trpezlivosť a ochotu v laboratóriu a takisto aj pri písaní práce.

Název práce: Rast grafénu metódou termálnej dekompozície karbidu kremíku pre aplikácie v biofyzike

Autor: Matúš Hodoš

Katedra (Ústav): Fyzikálny ústav UK

Vedoucí bakalárske práce: RNDr. Jan Kunc, PhD, Fyzikálny Ústav UK

Abstrakt: Táto bakalárska práca sa bude zaoberať prípravou a charakterizáciou grafénu z práškoveho substrátu SiC v rôznych podmienkach. V úvode práce budú stručne popísané vlastnosti grafénu. Ďalej predstavíme tri metódy prípravy grafénu, s dôrazom na metódu termálnej dekompozície SiC. Následne budú popísané metódy charakterizácie, ktoré sme použili. V experimentálnej časti budú popísané tri sady grafénových vzoriek, pripravené metódou termálnej dekompozície SiC, každá má premenlivý jeden z faktorov: teplota, čas a okolitá atmosféra. Pripravené vzorky budú následne použité v experimente na kvasinkách. Bude študovaný vplyv grafénu pripraveného v rôznych podmienkach na membránový potenciál a prípadné využitie v biofyzike.

Kľúčová slova: grafén, termálna dekompozícia, karbid kremíku, biofyzika

Title: Growth graphene by thermal decomposition of silicon carbide for application in biophysics

Author: Matúš Hodoš

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Jan Kunc, PhD, Institute of Physics of Charles University

Abstract: This bachelor thesis is focused on growth and characterization of graphene from SiC powder at different conditions. In the introduction graphene properties are briefly described. Afterwards three methods of graphene growth are discussed, with particular emphasis on thermal decomposition of SiC. Further, the characterization methods which were used by us are explained. In experimental part, three sets of graphene samples prepared by thermal decomposition of SiC will be described, each will differ in one of the factors: temperature, time and ambient atmosphere. Growth samples will be subsequently used in an experiment on yeast. The effect of graphene prepared at different conditions on membrane potential will be determined for possible application in biophysics.

Keywords: graphene, thermal decomposition, silicon carbide, biophysics

Obsah

Úvod	2
1 Grafén a jeho vlastnosti	3
1.1 Vlastnosti grafénu	3
1.1.1 Štruktúrne vlastnosti	3
1.1.2 Mechanické a tepelné vlastnosti	3
1.1.3 Elektronické a optické vlastnosti	4
1.2 Kryštálová štruktúra	4
1.3 Pásova štruktúra	5
2 Metódy prípravy grafénu	7
2.1 Mikromechanická exfoliácia	7
2.2 Depozícia z plynnej fázy	8
2.3 Termálna dekompozícia karbidu kremíku	8
2.3.1 SiC ako substrát	9
2.3.2 Faktory vplývajúce na proces grafitizácie	10
3 Metódy charakterizácie grafénu	13
3.1 Ramanova spektroskopia	13
3.1.1 Grafén a jeho spektrum	13
3.1.2 SiC substrát	15
3.2 Mikroskopia atomárnych síl	15
3.3 Spektrofluorometria	16
3.3.1 Membránový potenciál	17
3.3.2 Použitá sonda	17
3.3.3 Meranie membránového potenciálu	17
3.3.4 Použité kvasinky	18
4 Experimentálna časť	19
4.1 Príprava grafénu	19
4.2 Charakterizácia grafénu	20
4.3 Vplyv grafénu na kvasinky	24
Záver	27
Zoznam použitej literatúry	28

Úvod

Táto práca by mala podávať základné informácie o graféne, metódach jeho prípravy a charakterizácie. Stručne popíšeme jeho vlastnosti (štruktúrne, mechanické, elektronické...), kryštálovú a pásovú štruktúru, ktorá je zodpovedná za veľa jeho vynikajúcich vlastností. Predstavíme si metódu, ktorou bol grafén prvýkrát izolovaný a s ňou ešte dve ďalšie, ktoré majú väčší potenciál pre priemyselnú produkciu v súčasnosti. Teoretickú časť zakončíme metódami charakterizácie, kde predstavíme metódy, ktoré boli použité. Dve z nich, a to ramanova spektroskopia a mikroskopia atomárnych síl, slúžia k popisu grafénu hlavne po stránke štruktúry. Posledná metóda, spektrofotometria, nám podáva informáciu o vplyve grafénu na membránový potenciál kvasiniek. V prvej časti experimentálnej časti tejto práce sa budeme zaoberať prípravou a charakterizáciou grafénu pripraveného v rôznych podmienkach.

Grafén ako materiál má veľa vynikajúcich vlastností (tepelné, mechanické, elektrické, optické atď.), ale táto práca by mala podať informáciu u graféne s potencionálnym využitím v biofyzike. V súčasnosti sa grafén využíva v biosenzoroch[1], mikroelektrodach na meranie neurálnej aktivity[2], ale napríklad aj ako prostriedok pre podávanie liečiv[3]. My ale budeme venovať pozornosť na vplyv grafénu na membránový potenciál kvasiniek. Predovšetkým nás bude zaujímať aký vplyv má grafén na isté, špecifické transportné proteíny, MDR pumpy (z angl. multi drug resistance). Tieto pumpy odstraňujú z buniek celé spektrum rôznych liečiv, a tým spôsobujú efekt mnohonásobnej liekovej rezistencie - MDR. MDR pumpy sa nachádzajú vo všetkých bunkách, vrátane ľudských, a teda predstavujú hlavný problém pri liečení kvasinkových a bakteriálnych infekcií alebo aj rakoviny. Takže v druhej polovici experimentálnej časti budeme skúmať grafén ako potencionálny inhibítor MDR púmp a jeho vplyv na živé bunky, kvasinky.

1. Grafén a jeho vlastnosti

Uhlík, jeden z najrozšírenejších prvkov na Zemi, môže existovať v niekoľkých hybridizovaných stavoch sp , sp^2 a sp^3 . Môže vytvárať vysoký počet zlúčenín od jednoduchých molekúl až po dlhé polymérne reťazce. Najrozšírenejšie a historicky najznámejšie formy uhlíka sú diamant a grafit. Napriek tomu, že grafit a diamant sú tvorené čisto uhlíkovými atómami, majú úplne rozdielne vlastnosti. Diamant, najtvrdší prírodný materiál, je priehľadný a elektrický izolát. Na rozdiel od diamantu je grafit tmavý, mäkký a dobrý vodič. Takisto nájdeme rozdiely v ich štruktúre. Diamant je zložený z sp^3 hybridizovaných uhlíkových atómov v tetraédrickom usporiadaní, grafit z sp^2 hybridizovaných uhlíkových atómov v hexagonálnom usporiadaní. V prípade diamantu, teda tetraedrického usporiadania sa štyri valenčné elektróny uhlíku podielajú na štyroch kovalentných väzbách v hexagonálnom usporiadaní, grafit, sú prítomné len tri väzby a štvrtý elektrón sa stáva vodivostným.

Grafit ako materiál s hexagonálnou štruktúrou sa skladá z atómových rovín, každá atómová rovina je zložená z pravidelných šesťuholníkov s atómami uhlíku vo vrchoch. Uhlíkové atómy v jednej rovine sú viazané silnou kovalentnou väzbou. Napriek tomu je väzba medzi uhlíkovými atómami susediacich atómových rovín len slabá van der Waalsova. Jednu takúto rovinu vedci na konci 20. storočia pomenovali grafén. Definícia grafénu sa ale nepoužíva len v prípade jednej atomárnej roviny. V súčasnosti sa grafénom označuje súvislá vrstva menej ako desiatich uhlíkových rovín[4].

Podobných materiálov vytvorených z päť, šesť či sedem atómových uhlíkových kruhov poznáme už niekoľko. Väčšinou sa charakterizujú pomocou ich dimenzie. 0-D objekty sa nazývajú fullerény. Najznámejší z tejto skupiny je fulléren C_{60} no študované boli aj ďalšie[5]. Potom 1-D objekty, tiež snáme ako nanotrúbky alebo nanovlákná. Tieto štruktúry sa dajú pripraviť stočením, pokrútením alebo iným deformovaním jednej grafénovej vrstvy ktorej sa dnes hovorí aj 2-D uhlík.

1.1 Vlastnosti grafénu

1.1.1 Štruktúrne vlastnosti

Ako už bolo spomenuté vyššie, grafén je materiál tvorený čisto uhlíkovými atómami s hexagonálnou štruktúrou. Každý uhlíkový atóm vytvára tri σ -väzby so svojimi najbližšími susedmi. P orbitál je nasmerovaný kolmo na mriežku. Jednotlivé p orbitály sa prekrývajú a vytvárajú tak π -väzbu. Priemerná vzdialenosť atómov je 0,142 nm a vzdialenosť medzi rovinami je približne 0,35 nm.

1.1.2 Mechanické a tepelné vlastnosti

Už od objavu grafénu sa jeho mechanickým vlastnostiam venovalo veľa pozornosti, keďže bol veľmi odolný, vydržal vysoký tlak a zároveň bol flexibilný. V roku 2008, štyri roky po prvej úspešnej izolácii grafénu[6], skupina pod vedením C. Lee publikovala článok, v ktorom popisujú vlastnosti jednovrstvého grafénu[7]. Ich zistenia, pre jednovrstvý grafén, ukazujú napätie v ťahu $\sigma = 130$ GPa, Youn-

gov modul pružnosti $E = 1 \text{ TPa}$ a zlomenie grafénu nastalo pri tlaku 42 Pa . Čo je v súlade s predpovedanými hodnotami[8].

Rovnako zaujímavé vlastnosti má grafén aj v tepelnej oblasti. Opäť v roku 2008 skupina z Univerzity v Kalifornii publikovala článok o veľmi dobrej tepelnej vodivosti jednovrstvého grafénu ktorá sa pohybovala v rozmedzí od $\lambda = 4.84 \times 10^3 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ do $\lambda = 5.30 \times 10^3 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$, čo z grafénu robí jeden z najlepších vodičov tepla[9]. Pre porovnanie striebro $\lambda \approx 400 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$, meď $\lambda \approx 380 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ a prírodný diamant $\lambda = 1000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ [10].

1.1.3 Elektronické a optické vlastnosti

Za elektrické a optické vlastnosti grafénu je zodpovedná π -väzba. K interakciám grafénu s elektromagnetickým žiarením prispievajú dva faktory. A to dvojdimenzionálny pohyb elektrónov a pásová štruktúra tohoto materiálu. Pásová štruktúra grafénu je veľmi jednoduchá a síce nemá zakázaný pás. No napriek tomu odozva na elektromagnetické žiarenie je netriviálna. Pre rozsah frekvencií vo vidieľnom svetle je absorpcia svetla grafénom približne 2.3%[11] a prejavuje lineárne chovanie s narastajúcim počtom grafénových vrstiev[12].

1.2 Kryštálová štruktúra

Uhlíkové atómy v graféne sú, ako vieme, sp^2 hybridizované. Každý z nich vytvára 3 σ -väzby, ktoré všetky ležia v jednej rovine čo vedie na rovinnú vrstvu s hexagonálnou symetriou. Primitívnu bunku vrstvy s takouto symetriou je kosoštvorec ktorý obsahuje dva neekvivalentné atómy. Tieto dva typy atómov teda vytvárajú vlastné trojuholníkové podmreže A, B , posunuté o mriežový parameter $a = 0,142 \text{ nm}$. Vektory primitívnej bunky:

$$\begin{aligned}\vec{a}_1 &= \frac{a}{2}(3, \sqrt{3}) \\ \vec{a}_2 &= \frac{a}{2}(3, -\sqrt{3})\end{aligned}$$

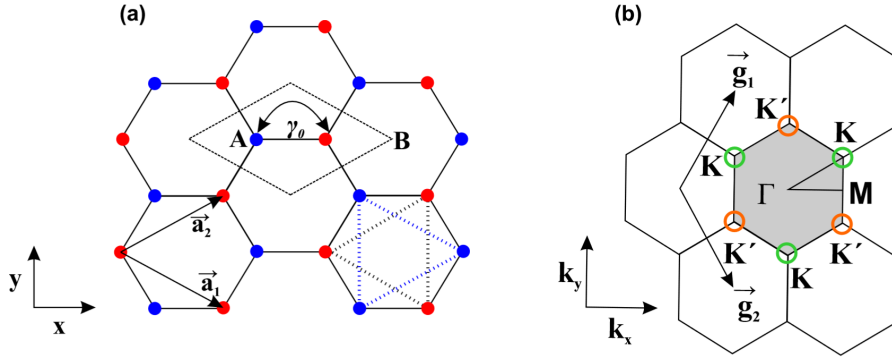
Reciproká mrieža má rovnakú symetriu ako mrieža v reálnom priestore. Vektory reciprokej bunky vieme spočítať pomocou vzťahu ako: $\vec{g}_1 = \frac{2\pi\vec{a}_1}{\vec{a}_1 \times \vec{a}_2}$ a $\vec{g}_2 = \frac{2\pi\vec{a}_2}{\vec{a}_1 \times \vec{a}_2}$ pričom $\vec{a}_1 \times \vec{a}_2 = V_{ele}$ je plocha primitívnej bunky. Teda vektory reciprokej bunky sú:

$$\begin{aligned}\vec{g}_1 &= \frac{2\pi}{3a}(1, \sqrt{3}) \\ \vec{g}_2 &= \frac{2\pi}{3a}(1, -\sqrt{3})\end{aligned}$$

Pričom platí známi vzťah $\vec{a}_i \cdot \vec{g}_j = 2\pi\delta_{ij}$. Pomocou vektorov reciprokej bunky vieme zostaviť prvú Brillouinovú zónu. V nej vyznačíme štyri význačné body Γ, K, K', M . Im prislúchajúce polohové vektory sú:

$$\begin{aligned}\vec{\Gamma} &= (0, 0) \\ \vec{K} &= \frac{2\pi}{3a}(1, \frac{\sqrt{3}}{3}) \\ \vec{K'} &= \frac{2\pi}{3a}(1, -\frac{\sqrt{3}}{3}) \\ \vec{M} &= \frac{2\pi}{3a}(1, 0)\end{aligned}$$

Dôležitosť týchto bodov spočíva v ich umiestení v reciprokom priestore. Bod Γ je v počiatku prvej Brillouinovej zóny, bod M je v strede hrany prvej Brillouinovej zóny a teda v polovici spojnice medzi bodmi K a K' . Body K a K' sú dva neekvivalentné body mrieže v reciprokom priestore, to znamená, že sa z jedného nedostanem do druhého pomocou translácie za použitia len vektorov reciprokej mrieže. Bodom K a K' sa tiež hovorí Diracove body.



Obrázok č.1: a) Kryštalová mrieža grafénu. Elementárna bunka grafénu je vyznačená čiarkovane(čierna), trojuholníkové podmreže A, B sú vyznačené ako čiarkované trojuholníky. γ_0 je energia potrebná k preskoku medzi najbližšími uhlíkovými atómami. b) Reciproká mrieža a význačné body grafénu. Prvá Brillouinová zóna je vyfarbená šedo. Prevzaté z [13]

1.3 Pásova štruktúra

Na to, aby sme vedeli popísať chovanie elektrónov v graféne potrebujeme poznať disperznú reláciu $E(\vec{k})$, teda závislosť energie elektrónov na vlnovom vektore. Túto závislosť budeme hľadať v prvej Brillouinovej zóne a presnejšie v oblasti medzi bodmi Γ , M a K . Tomuto problému sa venoval P. Wallace v roku 1947[14], ktorý využil tzv. tesnoväzbovú aproximáciu.

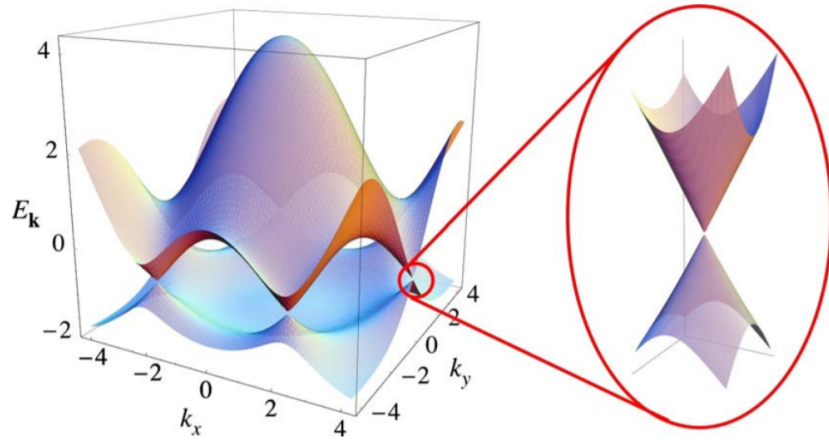
Ako vieme, v graféne sú uhlíkové atómy hybridizované, teda majú štyri valenčné elektróny, ktoré sú schopné tvoriť väzby. Z týchto štyroch valenčných elektrónov sa tri podielajú na kovalentných, σ väzbách so susednými atómami uhlíku a nachádzajú sa v sp^2 orbitáli. Štvrtý valenčný elektrón sa nachádza v $2p_z$ orbitáli, ktorý je kolmý na atómovú rovinu a tvorí π -väzbu, ktorá ako bolo vyššie spomenuté je hlavným faktorom v elektrónovej štruktúre grafénu.

Aproximácia ktorú uvažoval P. Wallace berie v úvahu len interakciu s najbližšími susedmi, teda atómi z podmreží A a B. V tejto aproximácii bude disperzná relácia mať tvar

$$E_{\pm}(\vec{k}) = \pm\gamma_0 \cdot (1 + 4 \cos^2 \frac{\sqrt{3}k_y a}{2} + 4 \cos \frac{\sqrt{3}k_y a}{2} \cos \frac{3k_x a}{2})^{1/2}$$

kde $\gamma_0 \approx 2.7\text{eV}$ je energia potrebná k preskoku medzi najbližšími atómami. Znamienko $+$ prislúcha energiám väzbovému π -páso a znamienko $-$ prislúcha antiväzbovému π^* -páso. Ak do tohoto vzťahu dosadíme polohy bodov Γ , M a K dostaneme energie E pre tieto body v danej aproximácii:

$$\begin{aligned} E_{\pm}(\vec{\Gamma}) &= \pm 3\gamma_0 \\ E_{\pm}(\vec{M}) &= \pm \gamma_0 \\ E_{\pm}(\vec{K}) &= 0 \end{aligned}$$



Obrázok č.2: Elektronová štruktúra grafénu. Na pravo vidíme priblíženie miesta dotyku väzbového(dolný) a antiväzbového(horný) pásu. Prevzaté z [13].

Z obrázku č.2 vidíme, že väzbový a antiväzbový pás grafénu sa dotýkajú v šiestich bodoch, K a K' , prvej Brillouinovej zóny. Kvôli tomuto dotyku sa grafénu hovorí aj polovodič s nulovou šírkou zakázaného pásu (angl. zero-gap semiconductor). Ak by sme disperznú reláciu $E(\vec{k})$ chceli popísať v blízkosti Diracových bodov K a K' , teda $\vec{k} = \vec{K} + \delta\vec{k}$ môžeme ju vyjadriť v tvare:

$$E_{\pm}(\vec{k}) = \pm v_f \hbar |\delta\vec{k}|$$

kde $|\vec{K}| \gg |\delta\vec{k}|$ a v_f je Fermiho rýchlosť daná vzťahom

$$v_f = \frac{3\gamma_0 a}{2\hbar} \approx 10^6 \text{ m s}^{-1}$$

Za povšimnutie stojí fakt že disperzná relácia $E(\vec{k})$ je v okolí Diracových bodov K a K' lineárna funkcia vlnového vektoru. Dôsledkom tohoto zistenia je fakt, že voľné nosiče náboja v graféne sa správajú ako nehmotné Diracove fermiony s fermiho rýchlosťou v_f definovanou vyššie.

2. Metódy prípravy grafénu

Dlho si vedci mysleli, že je nemožné aby jedna grafénová rovina exisovala izolovane. Už v rokoch 1930 - 1940, Peierls[15],[16] a Landau[17] teoreticky predpovedali termodynamickú nestabilitu 2D kryštálov. Z ich úvah vyplynulo, že pri teplote $T = 0$ môže existovať ľubovoľne veľký 2D kryštál. A pri teplote $T \neq 0$ výchyľky spôsobené teplotnými fluktuáciami rastú do nekonečna s rastúcou veľkosťou systému. Táto závislosť má ale logaritmické chovanie, takže teoreticky by veľkosť systému, pre ktorý sú fluktuácie malé, mohla byť pomerne veľká.

Napriek negatívnym predpovediam o nestabilite grafénu bol tento materiál niekoľkokrát skúmaný [18],[19],[20]. Nakoniec bol v roku 2004 bol zverejnený článok popisujúci úspešnú izoláciu jednej grafénovej vrstvy[6]. Autory článku A. Geim a K. Novoselov boli v roku 2010 ocenení Nobelovou cenou za ich prácu na graféne.

Už od prvého úspešného pripravenia grafénovej vrstvy sa rýchlo zvyšoval záujem o tento materiál keďže mal dobré predpoklady na využitie v elektrotechnike a materialových aplikáciách. Stále tu bol ale problém ako pripraviť kvalitnú grafénovú vrstvu s nami požadovanými parametrami. Zo začiatku bola príprava zameraná na kvalitné vrstvy menších rozmerov, kvôli detailnému preskúmaniu vlastností grafénových monovrstiev a dvojvrstiev. No v posledných rokoch je výskum skôr zameraný na prípravu grafénových vrstiev väčších rozmerov a následnú priemyselnú produkciu.

Ak by sme teda chceli pripraviť grafénovú vrstvu máme niekoľko smerov, ktorými sa vydať. Môžeme začať s prírodným monokryštálom grafitu a z neho mechanicky alebo chemicky pripraviť grafénové vrstvy, teda hovoríme o mechanickej alebo chemickej exfoliácii. Ďalšie metódy sú založené na vytváraní jednotlivých grafénových vrstiev buď termálnou dekompozíciou substrátu bohatého na uhlík, alebo naparovaním uhlíkových atómov na substrát. V tomto prípade hovoríme o epitaxnom raste. Ďalej existuje niekoľko modifikovaných metód, napríklad exfoliácia v rozotkoch, ktoré z nich vychádzajú. V nasledujúcich kapitolách si predstavíme základné metódy prípravy grafénových mono, multivrstiev z oboch týchto kategórií.

2.1 Mikromechanická exfoliácia

Metóda mikromechanickej exfoliácie, inak nazývaná metóda mikromechanického štiepenia, dostala pomenovanie, pod ktorým je známa a to metóda lepiacej pásky. Onedlho bude zrejmé prečo je toto pomenovanie tak výstižné. Táto metóda bola v minulosti pravdepodobne najvyužívanejšia a to zo zrejmých dôvodov. Je jednoduchá, efektívna a nevyžaduje žiadne špeciálne vybavenie, len trochu lepiacej pásky, grafit a substrát, na ktorý chceme grafén naniesť.

Samotná metóda exfoliácie, ako názov napovedá, spočíva v nalepení lepiacej pásky na monokryštál grafitu a následnom odlepení. Na povrchu lepiacej pásky zostane zbytkové množstvo grafitu, čo sú vlastne grafénové multivrstvy, v lepšom prípade monovrstvy. Opakovaním tohoto postupu si vieme pripraviť potrebný počet vzoriek, ktoré stačí preniesť na požadovaný substrát a ďalej skúmať.

Táto metóda poskytovala dobré možnosti ako pripraviť kvalitné grafénové

vrstvy s hrúbkou do 10 atómových rovín a šírkou od $10\text{ }\mu\text{m}$ do $100\text{ }\mu\text{m}$. Dokonca sa týmto spôsobom A. Geimovy podarilo pripraviť grafénovú monovrstvu širokú $10\text{ }\mu\text{m}$, na ktorej pomocou elektronickej litografie pripravil elektrické kontakty[6].

Ďalší úspech tejto metódy nastal v roku 2006, kedy sa podarilo monovrstvu grafénu odstrániť zo substrátu a zavesiť[21]. Týmto experimentom sa podarilo definitívne vyvrátiť predpovede o termodynamickej nestabilite 2D kryštálových sústav. Oba tieto objavy vyvolali veľký záujem o štúdium optických a elektrických vlastností grafénu.

2.2 Depozícia z plynnej fázy

Metóda depozície z plynnej fázy - CVD (z angl. Chemical Vapor Deposition) je efektívny a účinný spôsob prípravy epitaxných grafénových vrstiev. Už viac než 50 rokov je známe, že metóda CVD pri použití plynov uhľohodíkov a niklovom substráte vedie na vytvorenie grafitových vrstiev[22]. Pri tejto metóde grafénová vrstva syntetizuje na povrchu substrátu, najčastejšie sa jedná o kovovú fóliu, ktorá je vystavená prúdeniu uhľohodíkového plynu pri nízkych tlakoch a vysokých teplotách. Následne je kovová fólia z grafénu odstránená napríklad odleptaním a grafénová vrstva môže byť nanosená na žiadaný substrát. Potom je dobré ešte odstrániť zvyšky leptadla ponorením do vody.

Výber kovu, ktorý bude použitý pri príprave ovplyvňuje kvalitu grafénu. Najčastejšie používaná je meďená fólia[23], no boli a sú používané aj iné kovy ako napríklad nikel[24], kobalt[25], alebo aj platina[26], irídium[27] a paládium[28]. No nie len výber kovu hrá úlohu v kvalite pripravenej grafénovej vrstvy. Preto sa pred použitím daná kovová fólia zvyčajne nechá vyžehať vo vodíkovej atmosfére alebo v atmosfére zmesi vodíku a argónu pri teplotách $T \approx 800^\circ\text{C}$.

Samotný prenos grafénu z kovovej fólie na nami zvolený substrát väčšinou zahŕňa ponáranie do rozpúšťadla a následnú manipuláciu. Tento proces ale znehodnocuje grafénové vrstvy ktoré sme pripravili. Najčastejšie dochádza k tvorbe tzv. vrások, trhaniu, pokrúteniu alebo iným štrukturálnym defektom. Na minimalizáciu takto vzniknutých defektov sa používa polymérny film, ktorý je nanosený na grafénovú vrstvu ešte pred odleptaním kovovej fólie a spevňuje ju počas prenosu medzi kovovou fóliou a zvoleným substrátom. Najčastejšie sa používa polymetylmetakrylát (PMMA) alebo polydimetylsiloxán (PDMS). Výhodou PMMA je že po odleptaní kovovej fólie a následnom vysušení ide jednoducho odstrániť acetónom.

Metóda CVD je teda veľmi užitočná pri príprave vysoko kvalitných grafénových vrstiev s dobre definovanou štruktúrou na väčších plochách, čo dokazuje úspešne pripravený 50 cm dlhý a 5 cm široký monokryštál[29]. Veľkou výhodou je takisto fakt, že rast grafénovej vrstvy sa takmer zastaví po jednej atómovej rovine. Nevýhodou tejto metódy je znečistenie grafénu prípravkami, ktoré sme použili pri jeho izolácii z kovovej fólie.

2.3 Termálna dekompozícia karbidu kremíku

Metóda termálnej dekompozície karbidu kremíku (SiC) je druhá z metód epitaxného rastu grafénových vrstiev. Spočíva v desorpcii kremíkových atómov z

povrchu SiC pri teplotách $T \approx 1450^\circ\text{C}$ a následnom preusporiadaní zvyšných uhlíkových atómov do epitaxnej grafénovej vrstvy.

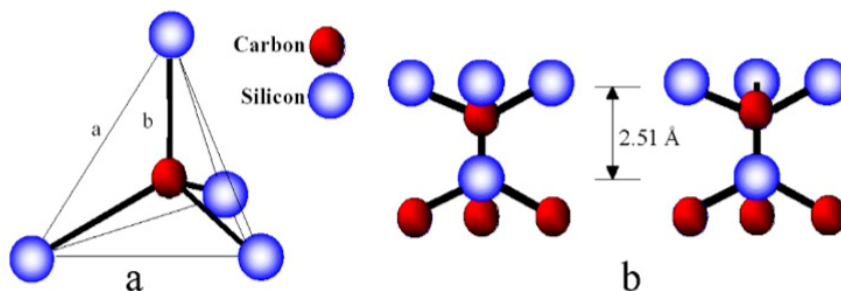
Pomocou tejto metódy sme schopný pripraviť grafénové vrstvy vysokej kvality s rozmermi $0,1 - 1\ \mu\text{m}$. Najväčšou výhodou tejto metódy je ale skutočnosť, že pripravenú grafénovú vrstvu nemusíme prenášať na iný substrát.

Tento proces však môže ovplyvniť niekoľko faktorov a to: orientácia, a štruktúra monokryštálu SiC, trvanie a teplota vypekania, atmosféra v ktorej proces prebiehal. Tieto faktory budú detailnejšie diskutované v nasledujúcich kapitolách.

2.3.1 SiC ako substrát

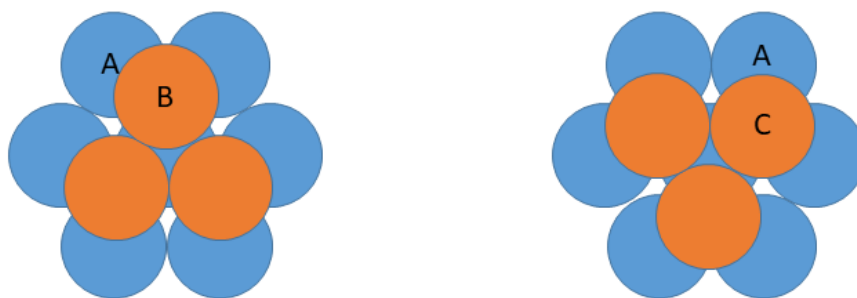
SiC je polovodič, ktorého šírka zakázaného pásu sa pohybuje v rozmedzí od 2,3 eV do 3,3 eV, má vynikajúce materiálové vlastnosti, ako je napríklad vysoká tepelná vodivosť a chemická stálosť, teda môže byť použitý pri vysokých teplotách a v prostredí so silným žiarením. Tieto vlastnosti viedli k použitiu SiC v aplikáciách vysokoteplotných, vysokonapäťových a vysokofrekvenčných zariadení. Od prvej syntézy v roku 1824[30] sa viedli len malé a nesystematické štúdie na laboratórnej úrovni. V roku 1892 bola predstavená syntéza SiC prášku[31] a až v roku 1893 sa začala prvá priemyselná produkcia tohoto materiálu[32].

Karbid kremíku je polovodičová zlúčenina prvkov zo skupiny IV, ktoré sú viazané prevažne kovalentnou väzbou. Kryštalografická štruktúra pozostáva z tesne naukladaných dvojvrstiev kremíkových a uhlíkových atómov. Elementárna bunka má tvar pravidelného štvorstenu, ktorý je tvorený buď konformáciou SiC_4 alebo CSi_4 , pričom štyri rovnaké atómy sú vo vrcholoch a neekvivalentný atóm je v ťažisku štvorstenu. Vzdialenosť medzi najbližšími atómami rovnakého typu je približne 3,08 Å, vzdialenosť medzi atómami rôzneho typu je približne 1,89 Å a vzdialenosť medzi rovnakými atómovými rovinami je približne 2,51 Å[33].



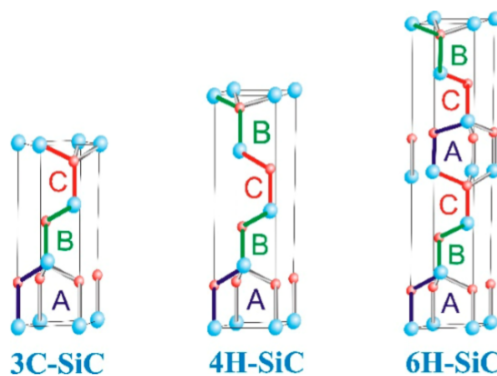
Obrázok č.3: a) Elementárna bunka SiC, $a=3,08\ \text{\AA}$, $b=1,89\ \text{\AA}$. b) Dve možné konfigurácie natočenia elementárnych buniek. Prevzaté z [34].

Ako na obrázku č.3 vidíme jednotlivé elementárne bunky sú previazané pomocou rohových atómov a teda je možné ich orientovať dvomi spôsobmi, ktoré sa líšia rotáciou druhej elementárnej bunky o 60° . Táto možnosť rotácie atómových Si-C dvojvrstiev spolu s posunom spôsobuje, že máme niekoľko možností naukladania Si-C dvojvrstiev v smere posuvu. Týmto rôznym možnostiam naukladania sa hovorí polytypy.



Obrázok č.4: Dve možnosti ukladania atómov v tesnom hexagonálnom usporiadaní.

Na obrázku č.4 vidíme dva možné spôsoby uloženia atómov v hexagonálnej bunke. Ak budeme uvažovať situáciu s fixnou rovinou atómov A, môžeme ďalšie atómy uložiť v zmysle B alebo C. V súčasnosti je známych viac než 200 rôznych usporiadaní atómových dvojvrstiev v SiC a na ich popis sa používa Ramsdellova notácia[35]. Číslo v názve odpovedá počtu Si-C dvojvrstiev, po ktorých sa motív opakuje a písmeno značí, na akú kryštalografickú štruktúru daný spôsob ukladania dvojvrstiev vedie, C-kubická a H-hexagonálna. Najčastejšie sa používajú polytypy 3C-SiC (ABCABC...), 4H-SiC (ABCBABCB...) a 6H-SiC (ABCACBABCACB...) a ich spôsoby ukladania vidíme na obrázku č.5. V tomto zmysle majú monokryštály SiC na koncoch tohoto ukladacieho procesu dvojvrstiev Si-C čisto kremíkové alebo čisto uhlíkové atómy. Týmto stranám sa hovorí Si- respektíve C-strana, alebo spoločne tzv. polárne strany.

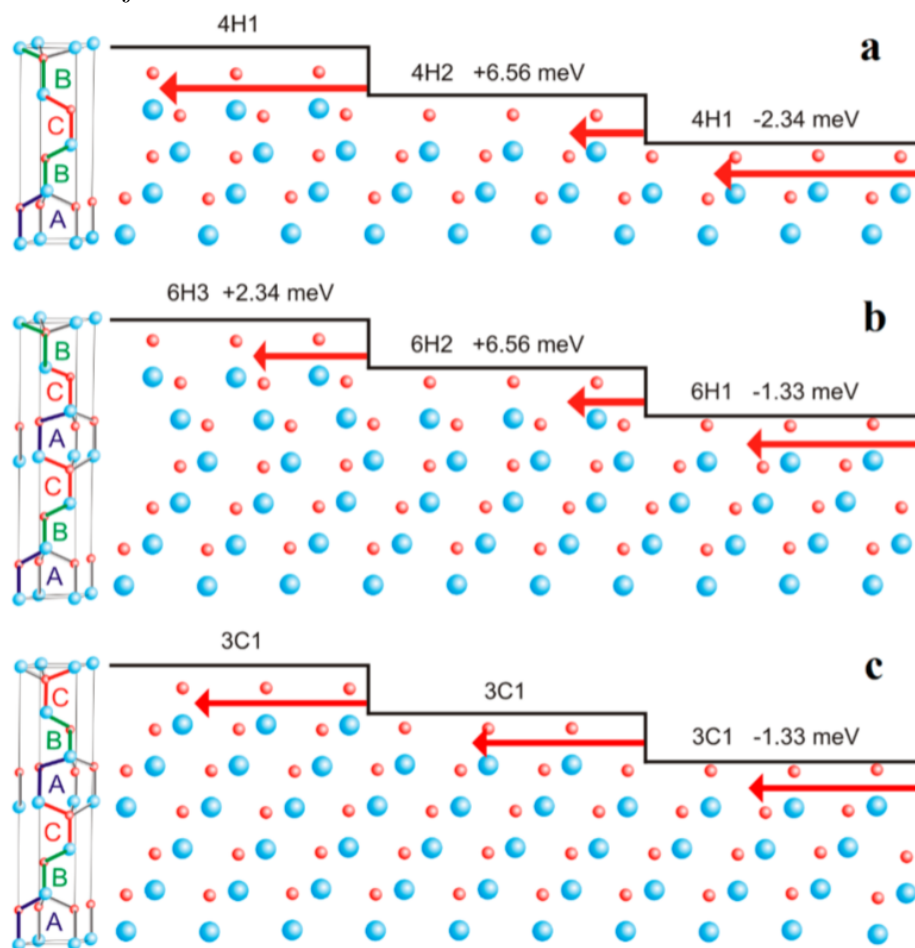


Obrázok č.5: Rôzne spôsoby naukladania dvojvrstiev pre polytypy SiC. Prevzaté z [34].

2.3.2 Faktory vplývajúce na proces grafitizácie

Mechanizmus rastu grafénovej vrstvy je pre obe polárne strany je rovnaký. Pri vysokých teplotách totiž kremíkové atómy sublimujú rýchlejšie ako atómy uhlíku, kvôli vyššiemu tlaku ich pár. Prebytočné uhlíkové atómy následne na povrchu vytvárajú grafénovú vrstvu. Napriek tomu je spôsob a rýchlosť vytvárania grafénu na polárnych stranách rôzna. Tieto rozdiely sú zodpovedné za grafén rôznych vlastností pripravených na polárnych stranách[36]. Rýchlosť rozkladu Si-C

dvojvrstvy priamo súvisí s energiou potrebnou na jej rozloženie. Keďže rôzne polytypy SiC sa líšia v energií potrebnej k rozkladu Si-C dvojvrstiev ako vidíme na obrázku č.6, kde sú šípkami schematicky znázornené rýchlosti rozkladu pre jednotlivé dvojvrstvi.



Obrázok č.6: Schematicky znázornené energie potrebné k rozkladu a rýchlosti rozkladu pre jednotlivé dvojvrstvy SiC a) 4H-SiC, b) 6H-SiC, c) 3C-SiC. Prevzaté z [34].

Tento proces si popíšeme na polytype 4H-SiC. Atómy kremíku a uhlíku sú slabšie viazané v blízkosti hrán dvojvrstiev, preto atómy kremíku desorbujú rýchlejšie v týchto miestach. Na obrázku č.6 môžeme vidieť dve rôzne energie rozkladu dvojvrstiev 4H1 (-2,34 meV) a 4H2 (6,56 meV)[37]. Z toho môžeme usúdiť že rozklad dvojvrstvy 4H1 bude prebiehať rýchlejšie ako v prípade dvojvrstvy 4H2 a po čase ju "dobehne". Následne bude rozklad pokračovať súčasne na oboch Si-C dvojvrstvách. Navyše na vytvorenie súvislej grafénovej vrstvy sú potrebné aspoň tri Si-C dvojvrstvy, takže grafén sa začne tvoriť až po "dobehnutí" dvojvrstiev.

Podmienky okolia takisto ovplyvňujú proces tvorby grafénu na oboch polárnych stranách SiC. Napríklad, ak by sme chceli pripraviť grafénovú vrstvu na Si strane vo vysokom vákuu dostaneme grafénové vrstvy nízkej kvality a malých rozmerov[38]. Taktiež sa zistilo, že na prípravu homogénnejších grafénových vrstiev je výhodnejšie použiť kratšie časy a vyššie teploty než dlhšie časy a nižšie teploty[39,40]. Ale pri používaní vysokých teplôt bude vyššia aj kinetická energia uhlíkových a kremíkových atómov, takže preusporiadanie atómov na povrchu

bude jednoduchšie. Aby sme ale zabránili úplnej alebo nekontrolovanej grafitizácií musíme byť schopný kontrolovať tlak kremíkových pár.

Prvá z metód, ktoré to umožňujú vyvinul W. A. de Heer. Princíp spočíval v kontrolovaní sublimácie čiastočným uzavretím do grafitového valčeka, ktorý mohol udržať konečný tlak vytvorený sublimáciou kremíka z povrchu[41]. Táto metóda poskytuje možnosť pripraviť vysoko kvalitné, rovnomerné grafénové vrstvy na oboch polárnych stranách 4H-SiC a 6H-SiC. Ďalšia metóda tohto charakteru bola vyvinutá v roku 2008 skupinou pod vedením R. Yakimovy[42]. Táto metóda spočíva na vysokoteplotnej sublimácii ($T \approx 2000^\circ\text{C}$) v argónovej atmosfére pri tlaku jednej atmosféry. Výsledkom sú väčšie monovrstvy grafénu ($\approx 2 \times 2\text{cm}$) a dobrá kontrola nad ich hrúbkou.

Ako bolo naznačené vyššie pre tvorbu grafénu na SiC je dôležitá aj orientácia samotného substrátu SiC. Najväčšou výhodou prípravy grafénu na Si-strane je možnosť jednoduchšej kontroly nad hrúbkou, teda nad počtom vrstiev, pripraveného grafénu. Proces môže byť ešte vylepšený optimalizovaním teploty a použitím argónovej atmosféry. Grafén sa na Si-strane vytvára postupným rozkladom Si-C dvojvrstiev, čiže začína na hranách ktoré sa postupne rozkladajú a rozklad sa posúva. Tento proces zanecháva povrch takmer čisto uhlíkových atómov ktoré sa viažu až nakoniec vytvoria grafénu podobnú štruktúru, ktorej sa hovorí nultá vrstva (angl. buffer layer). Táto vrstva ale nemá vlastnosti ako grafén, keďže približne 30% uhlíkových atómov je sp^3 hybridizovaných a sú viazané s kremíkovými atómami na rozhraní. Po sfornovaní nulte vrstvy sa rozklad Si-C dvojvrstiev odohráva pod ňou, čo môže viesť na vytvorenie novej uhlíkovej vrstvy. Táto nultá vrstva sa ale dá previesť na grafénovú vrstvu žíhaním vo vodíkovej atmosfére pri teplote $550 - 1000^\circ\text{C}$.

Napriek tomu na C-strane je proces vytvárania grafénu rýchlejší. Nedochádza k tvorbe nulte vrstvy, kvôli čomu je pripravený grafén menej viazaný k rozhraniu. Zároveň pre grafénovú multivrstvu pripravenú na C-strane platí, že atómové roviny sú voči sebe náhodne orientované, preto niesú elektronicky viazané a efektívne sa daná multivrstva chová ako monovrstva grafénu. Na C-strane prebieha vytváranie grafénu skôr v zmysle ostrovčekov než vrstva po vrstve ako to je na Si-strane.

3. Metódy charakterizácie grafénu

V predchádzajúcej kapitole sme sa zoznámili s niektorými metódami prípravy grafénu a v tejto si popíšeme niekoľko metód ako grafén charakterizovať. Mali by sme teda byť schopný popísať rozmery, počet vrstiev a defekty pripraveného grafénu. Grafén je ale materiál atómovej hrúbky takže tieto metódy musia byť schopné pracovať so vzorkami na tejto úrovni.

3.1 Ramanova spektroskopia

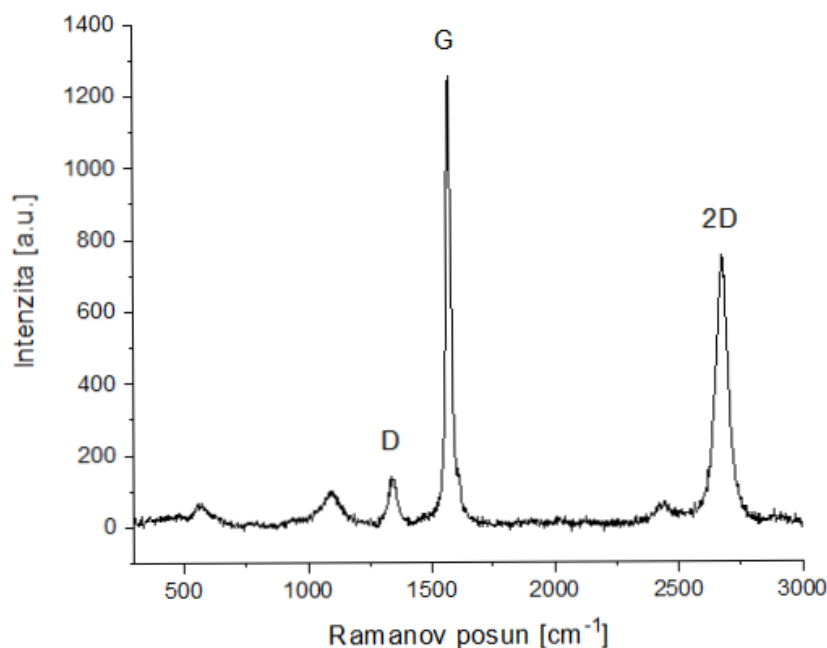
Ramanova spektroskopia je nedeštruktívna a jednoduchá technika, ktorou sme schopný získať informácie o štruktúrnych vlastnostiach, defektoch a počte vrstiev. Ide o jednu z najčastejšie využívaných techník pre charakterizáciu uhlíkových materiálov. Táto technika je založená na Ramanovom rozptyle, teda na neelastickom rozptyle fotónov skúmanou látkou.

Fotóny sú generované laserom, čím je zaručená rovnaká vlnová dĺžka dopadajúceho svetla. Pri dopade na látku sa väčšina z nich rozptýli elasticky, dochádza k takzvanému Rayleighov rozptylu. Malá časť približne 1 z 10 miliónov sa rozptýli neelasticky, čiže sa zmení ich energia. Daný fotón je virtuálne pohltý látkou a dostane sa tak do excitovaného stavu. V priebehu tohoto virtuálneho procesu dochádza k interakcií elektrónu s vibračnými alebo rotačnými stavmi v atómoch a v prípade pevnej látky dochádza k interakcií s vibračným stavom kryštálovej mreže a teda zmenou jeho energie. Elektrón následne deexcituje za prítomnosti vyžiarenia fotónu o danej pozmenenej energii. Na základe zmeny energie vieme zistiť zmenu frekvencie, ak sa frekvencia znížila hovoríme o takzvanom Stokesovom posune v prípade zvýšenia frekvencie o takzvanom anti-Stokesovom posune.

Samotná charakterizácia skúmaného materiálu je pomerne jednoduchá, keďže každý materiál má charakteristické energetické hladiny s ktorými môže excitovaný elektrón interagovať. V súčasnosti už existujú databázy ramanových spektier rôznych materiálov, čím sa charakterizácia alebo prípadná identifikácia stáva stále jednoduchšia.

3.1.1 Grafén a jeho spektrum

Ramanove spektrum grafénu sa vyznačuje tromi hlavnými D,G a 2D (niekedy označovaný tiež G') píkmi ako vidíme na obrázku č.7. Pripravený grafén môžeme charakterizovať na základe polohy, šírky a intenzity týchto pík.



Obrázok č.7: Spektrum grafénu

D pík sa vyskytuje v oblasti $\approx 1350 \text{ cm}^{-1}$. Jeho poloha sa mierne mení v závislosti na metóde prípravy grafénu. Prítomnosť D píku vypovedá o existencii defektov v graféne, čím väčšia intenzita tým viac prítomných defektov.

Pre G pík je charakteristická oblasť výskytu medzi 1580 až 1590 cm^{-1} a má tvar jednej Lorentzovej krivky s pološírkou (FWHM) $\approx 15 \text{ cm}^{-1}$ pre epitaxne pripravený grafén. Jeho poloha a šírka sú nezávislé na počte vrstiev, ale silne závislé na mechanickom napätí a dopantoch. So zvyšujúcim sa napätím v graféne sa poloha G píku posúva k vyšším frekvenciám. Efekt dopantov je menší no nie zanedbateľný. Poloha sa posúva k vyšším frekvenciám so zvyšujúcim počtom elektrónov a k nižším frekvenciám so zvyšujúcim počtom dier.

2D pík vykazuje podobnú závislosť na mechanickom napätí a dopantoch ako G pík. Pre zvyšujúce napätie sa posúva do vyšších frekvencií. Závislosť posunu má opačnú tendenciu, teda pre dopovanie elektrónami sa posúva k nižším frekvenciám a k vyšším frekvenciám pre dopovanie dierami. Hlavný efekt ktorý ovplyvňuje polohu a šírku 2D píku je ale počet grafénových vrstiev a spôsob ich naskladania, podobne ako pre polytypy SiC. Pozícia 2D píku sa pohybuje od 2670 do 2740 cm^{-1} . V súčasnosti je ale známe, že 2D pík centrováný približne na 2740 cm^{-1} a pološírkou menšou než 40 cm^{-1} prislúcha monovrstve grafénu. Ak by bola pološírka píku centrovaného na rovnakej pozícii $45\text{--}60 \text{ cm}^{-1}$ jedná sa skôr o grafénovú dvojvrstvu. So zvyšujúcim počtom vrstiev sa 2D pík rozdelí na niekoľko píkov a pološírka 2D píku zväčšuje, v spektre ale pozorujeme jeden široký pík. Napríklad 2D píky centrované približne na 2730 cm^{-1} ktoré sa dajú nafiť štyrmi Lorentzovými krivkami prislúchajú grafénovej dvojvrstve[43]. Napriek tomu sa pre grafén pripravený na C-strane SiC pološírka 2D píku s počtom vrstiev nemení, ale mení sa jeho intenzita a spektrum je veľmi podobné ako spektrum grafénovej monovrstvy[44].

3.1.2 SiC substrát

Ramanove spektrum epitaxného grafénu na SiC má ešte ďalšie píky okrem vyššie uvedených. Tieto píky vznikajú dôsledkom interakcie dopadajúcich fotónov s fonónovými módmami SiC substrátu a vyskytujú sa medzi 1450 až 1750 cm^{-1} . Tieto píky sa ale prekrývajú s grafénovým G píkom a tým sa zhoršuje presnosť analýzy tohoto píku. Ak chceme správne analyzovať a charakterizovať pripravený grafén musíme najskôr odstrániť príspevok v spektre od SiC substrátu. Následne môžeme analyzovať dané spektrum a parametre píkov nám podajú dostatočnú informáciu o pripravenom graféne.

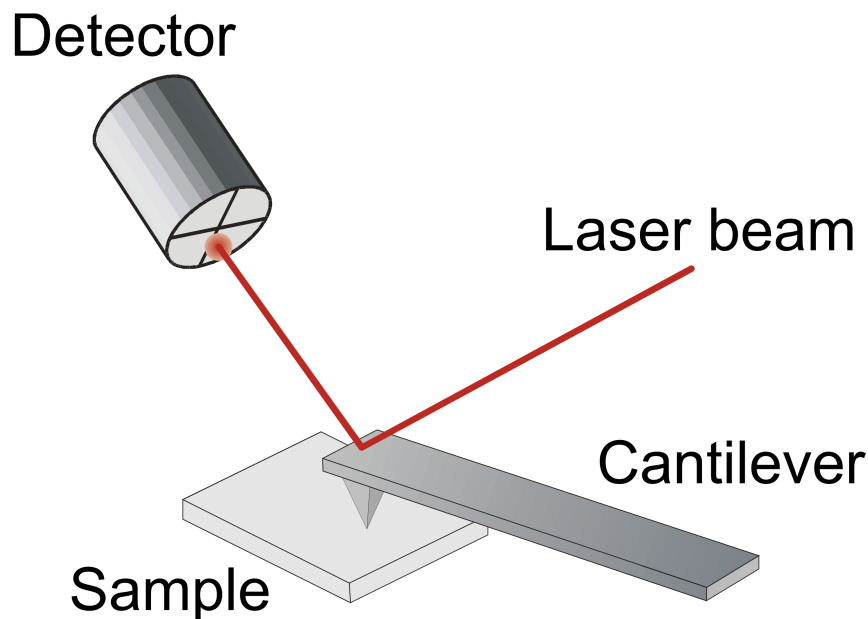
Už ale vieme, že pri epitaxnom raste grafénu na Si-strane vzniká grafénu podobná uhlíková štruktúra, ktorá je kovalentne viazaná s niektorými kremíkovými atómami, takzvaná nultá vrstva. Táto vrstva prispieva do Ramanovho spektra ďalšími dvoma širokými črtami s polohou približne na 1355 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} . Odstránením príspevku od SiC substrátu sa nám tieto črty nepodarí úplne odstrániť. Určitá časť z nich v spektre ostane no tento pozostatok nám už ale nebráni v správnom analyzovaní podstatných pík.

Ak je ale grafén pripravovaný epitaxne na C-strane, kde nevzniká nultá vrstva, sú interakcie a väzby so substrátom slabšie a takmer zanedbateľné. Teda vyššie spomenutý problém s analýzou sa neobjaví.

3.2 Mikroskopia atomárnych síl

Ako ďalšiu z techník, ktorú sme použili na charakterizáciu grafénu si predstavíme mikroskopiu atomárnych síl - AFM (z angl. Atomic Force Microscopy). Táto technika sa používa hlavne k trojrozmernému zobrazovaniu povrchov. Narozdiel od skenovacej tunelovej mikroskopie ktorá je schopná pracovať len s vodivými materiálmi, sme pomocou AFM schopný zobrazovať povrch vodivého aj nevodivého materiálu a to vo vákuu, vzduchu či kvapaline.

Princíp, na ktorom je táto technika založená je veľmi jednoduchý. Meriame silové pôsobenie interakcie medzi hrotom a povrchom skúmanej vzorky. Na obrázku č.8 môžeme vidieť schému AFM. Ostrý hrot je umiestnený na voľnom konci ramena (angl. cantilever). Na voľný koniec ramena dopadá laserový lúč, následne sa odráža a dopadá na fotodetektor. Ak budeme hrotom pohybovať po skúmanom povrchu, bude hrot kopírovať nerovnosti povrchu s čím sa bude meniť uhol pod ktorým sa laserový lúč odráža. Odrazený lúč sa bude pohybovať po ploche fotodetektoru, a tým sme schopný vytvoriť trojrozmerný obraz povrchu skúmanej vzorky. AFM je schopné pracovať v dvoch základných módoch ktoré stručne popíšeme.



Obrázok č.8: Schéma AFM

Ak by sme zvolili meranie v kontaktnom móde, bude sa hrot pohybovať takmer po povrchu vzorky. V tomto móde sa prejavajú hlavne odpudivé sily medzi atómami hrotu a povrchu vzorky. Je výhodné používať ramená s malou tuhosťou aby sme boli schopní registrovať čo najmenšie výchylky a nepoškodili si pri tom vzorku.

Druhá možnosť je takzvaný bezkontaktný mód, kde hrot je umiestnený niekoľko nanometrov nad povrchom. Následne je rameno rozkmitané, načastejšie pomocou piezokryštálu, na svojej rezonančnej frekvencii s amplitúdou kmitov niekoľko nanometrov. Van der Waalsove sily alebo iné sily dlhého dosahu sú schopné tento kmitavý pohyb ovplyvniť. Zaznamenávaním tohoto vplyvu vieme vytvoriť obraz povrchu.

3.3 Spektrofluorometria

Jedná sa o neinvazívnu metódu, ktorou môžeme charakterizovať transportné procesy nastávajúce na membránach kvasiniek pomocou fluorescencie nami pridanej sondy na základe zmien membránového potenciálu. Hlavným nástrojom tejto metódy je spektrofotometer, teda prístroj ktorý je schopný merať fluorescenčné spektrá. Pozostáva zo zdroja svetla, v našom prípade xenónová výbojka z ktorej paprsok dopadá na excitačný monochromátor a ďalej sa šíri excitačnou štrbinou do komory so vzorkou.

Spektrofotometer môže fungovať v niekoľkých módoch. Je s ním možné merať emisné spektrum pri konštatnej excitačnej vlnovej dĺžke. Tento spôsob merania budeme používať ni pri našom experimente. Potom je možné merať intenzitu emisie na danej konštatnej vlnovej dĺžke pri premennej excitačnej vlnovej dĺžke. V tomto prípade sa jedná o excitačné spektrum. Ďalšou možnosťou je merať synchronný sken, kedy je rozdiel emisnej a excitačnej vlnovej dĺžky konštatný.

3.3.1 Membránový potenciál

Všetky živé bunky sú od okolitého prostredia oddelené plazmatickou membránou. Touto membránou prenikajú živiny do vnútra bunky a produkty metabolismu z bunky odchádzajú. Plazmatická membrána udržiava gradienty koncentrácií malých anorganických iónov (K^+ , Na^+ , Cl^-) na základe čoho existuje membránový potenciál, teda rozdiel elektrických potenciálov na vnútornej a vonkajšej strane membrány. Udržiavanie gradientu koncentrácií slúži hlavne k zaisteniu osmotickej rovnováhy buniek, ale zároveň poháňa transport živín do bunky a poháňa ďalšie bunkové procesy. Za vznikom iónových gradientov a teda aj membránového potenciálu sú elektrogénne iónové pumpy. Výslednú hodnotu membránového potenciálu neurčujú elektrogénne pumpy, ale selektívne iónové kanály na ktorých množstve a parametroch závisia elektrické vlastnosti bunkových membrán. Tieto kanály nastavujú konečnú, ustálenú hodnotu membránového potenciálu pomocou ustálenej hodnoty iónových prúdov, ktoré sa snažia vyrušiť iónové gradienty a dosiahnuť rovnovážny stav[45].

3.3.2 Použitá sonda

V našom experimente sme použili pomalú fluorescenčnú sondu diS-C₃(3) s maximom absorpcie nastávajúcim pre vlnovú dĺžku $\lambda_a = 556$ nm a maximum emisie pre vlnovú dĺžku $\lambda_e = 588$ nm. Väzbou sondy v bunke sa jej fluorescenčné emisné maximum posunie približne o 10 nm v porovnaní s voľnou sondou $\lambda_{max} = 569$ nm[46].

Jedná sa o iodidovú soľ, ktorá vo voľnom prostredí disociuje a stáva sa aktívnou, kladne nabitou sondou. Vďaka postranným hydrofóbnym reťazcom je schopná ľahko prechádzať membránou do bunky. Po pridaní tejto sondy do média dochádza ku zhromažďovaniu sondy vo vnútri bunky. Tento proces je ovplyvňovaný gradientom koncentrácie a membránovým potenciálom. Vieme, že membránový potenciál je na vnútornej strane membrány záporný. Celkovú silu, ktorá spôsobuje transport sondy označujeme elektrochemický gradient. Sonda bude do bunky prenikať do doby kým sa nevyrovnajú elektrochemické potenciály vnútri a mimo bunky. Toto premiestňovanie sondy trvá niekoľko sekúnd až desiatky minút. V bunkách s vysokým membránovým potenciálom sa hromadí veľké množstvo sondy, naopak nižšia akumulácia vypovedá o depolarizácii membrány. Tento proces akumulácie sondy v bunkách sledujeme pomocou zmien intenzity fluorescence.

3.3.3 Meranie membránového potenciálu

Pomocou tejto metódy sme schopný v reálnom čase sledovať zmeny membránového potenciálu kvasinkových buniek. Využívajú sa pri tom spektrálne vlastnosti sondy diS-C₃(3). Maximálna intenzita emisie fluorescence I_{max} a vlnová dĺžka tohoto maxima λ_{max} sa menia v závislosti na zmene membránového potenciálu[37]. Parameter λ_{max} je menej ovplyvňovaný väzbou sondy na steny kyvety než I_{max} . Rovnováha medzi voľnou a viazanou sondou vo vnútri buniek nastáva veľmi rýchlo, takže poloha λ_{max} je priamo umerná prenikaniu sondy do buniek. Na základe časového priebehu λ_{max} teda vieme sledovať časový priebeh prenikania sondy do buniek[38]. Zmeny vo veľkosti membránového potenciálu, ktoré

boli spôsobené nejakým ďalším faktorom, ako napríklad zmena pH, teplotný šok, pridanie ďalšej látky sa prejaví zmenou koncentrácie sondy v bunkách a teda aj zmenou λ_{max} respektíve I_{max} .

Depolarizácia membrány je sprevádzaná znížením koncentrácie sondy v bunke a modrým posunom λ_{max} . Hyperpolarizácia je naopak sprevádzaná zvýšením koncentrácie sondy a červeným posunom. Permeabilizácia buniek je charakteristická červeným posunom, sonda nereaguje na membránový potenciál ale na stratu integrity membrány.

Pomocou tejto membrány bolo napríklad zistené že fluorescenčná odpoveď sondy diS-C₃(3) na membránový potenciál kvasiniek *S.cerevisiae* je rozhodujúcim spôsobom ovplyvnená činnosťou MDR púmp[39].

3.3.4 Použité kvasinky

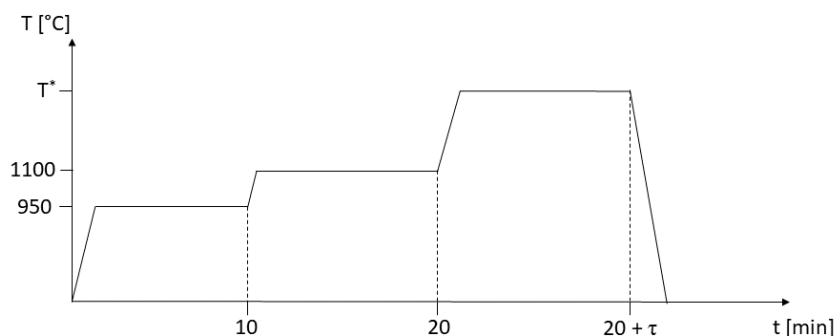
V našom experimente sme použili kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*, presnejšie dva kmene AD/CDR1 a AD/ABC3. Tieto kmeňe boli použité zámerne, keďže kmeň AD/CDR1 ktorý má v membráne zastúpené pumpy CaCdr1 a AD/ABC3, je mutantný kmeň, ktorý má deletované gény pre tvorbu pumpy CaCdr1. Takto zvolenými kmeňmi kvasiniek sme schopný popísať vplyv grafénu na aktiváciu alebo inhibíciu tejto pumpy. Pumpa CaCdr1 je zodpovedná za vytváranie rezistivity kvasinky *Candida albicans*, ktorá je bežne prítomná v tráviacom trakte človeka. Jedná sa o jednu z mála kvasiniek rodu *Candida*, ktorá spôsobuje kandidózu, kvasinkovú infekciu. V prípade pacientov so zníženou imunitou ako HIV pacienti, pacienti po transplantácií, onkologickí pacienti, môže prerásť až v smrteľnú infekciu.

4. Experimentálna časť

V experimentálnej časti tejto práce sme sa venovali príprave grafénu pomocou termálnej dekompozície práškovej formy SiC. Nami pripravené vzorky sme následne charakterizovali pomocou ramanovej spektroskopie a AFM. Nakoniec sme skúmali vplyv grafénu na kvasinky.

4.1 Príprava grafénu

Ako substrát sme použili jemný SiC prášok, ktorý má v porovnaní s monokryštálom SiC niekoľkonásobne väčší povrch, teda výťažok grafénu bude o veľa väčší. Prášok sme opatrne nasypali do grafitového valčeka. Valček sme následne umiestnili do pece, ktorá ako zdroj tepla používala žhaviacu cievku. V priebehu prípravy bola teplota zaznamenávaná infračervenou kamerou, pomocou čoho sa udržiavala požadovaná teplota počas celej doby prípravy. Príprava všetkých vzoriek prebiehala podľa teplotného profilu na obr. č.9. Pričom T^* a τ majú rolu parametrov v dvoch sadách pripravených vzoriek. V poslednej sade vzoriek je parametrom okolitá atmosféra.



Obrázok č.9: Teplotný profil použitý pri príprave grafénových vzoriek

Závislosti podmienok prípravy pre dané parametre môžeme prehľadne vidieť v tabulke č.1. Vzorka P3HBC01 bola pripravovaná v argónovej atmosfére pri tlaku $p \approx 1040 \text{ mbar}$ a prietoku argónu 10 l/hod . Vzorka P3HBC02 bola pripravovaná v statickej atmosfére argónu(90 %) a vodíku(10 %), pri tlaku $p \approx 1050 \text{ mbar}$.

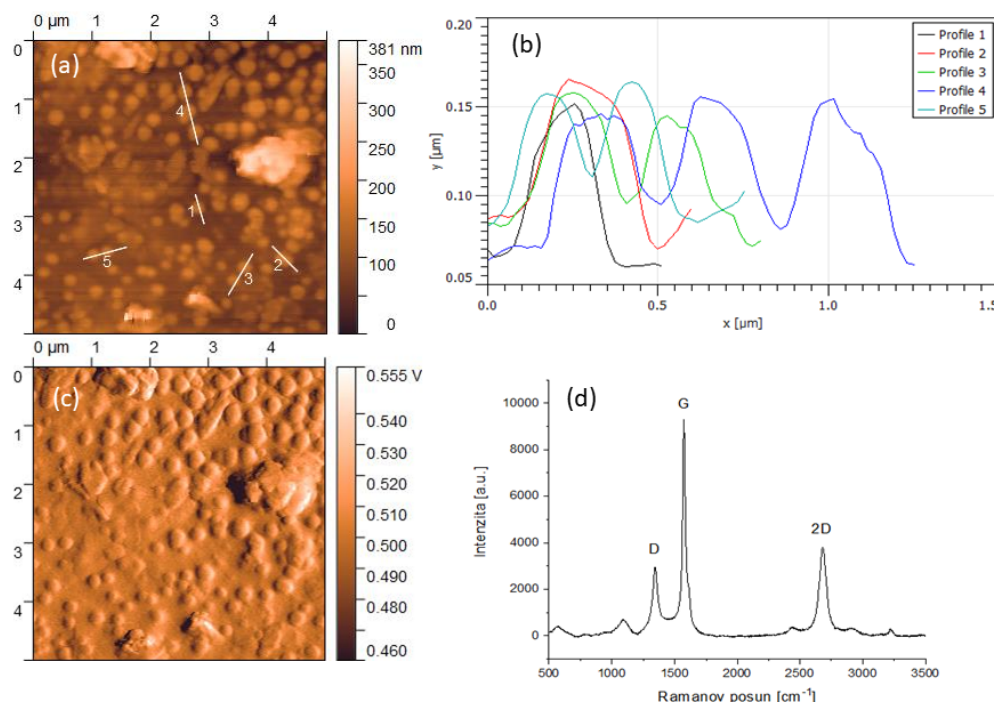
Tabuľka č.1: Podmienky prípravy grafénových vzoriek

Vzorka	T^* [°C]	τ [min]	Okolitá atmosféra
P1HBC01	1800	15	Vysoké vákuum
P1HBC02	1700	15	Vysoké vákuum
P1HBC03	1550	15	Vysoké vákuum
P2HBC01	1700	5	Vysoké vákuum
P2HBC02	1700	1	Vysoké vákuum
P3HBC01	1700	15	Ar
P3HBC02	1700	15	Ar + H

4.2 Charakterizácia grafénu

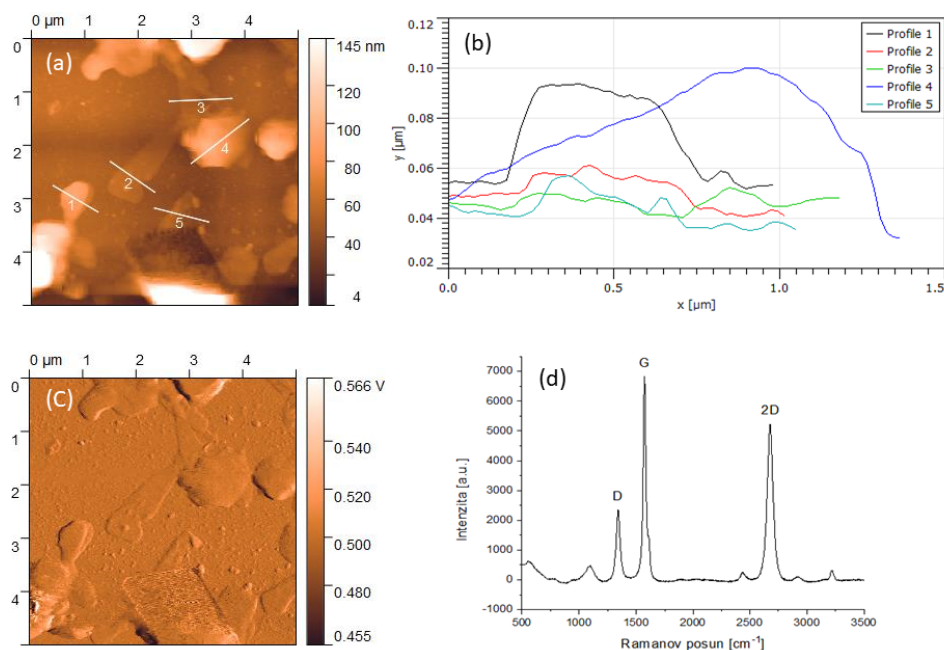
Nami pripravené vzorky sme ďalej charakterizovali metódami popísanými v kapitole 2. Pomocou ramanovej spektroskopie sme namerali spektrum na niekoľkých miestach(4-7) pre každú pripravenú vzorku. Následne sme zmerali topografiu pripravených vzoriek pomocou metódy AFM.

Na nasledujúcich obrázkoch budú vždy pre jednu vzorku zhrnuté výsledky získané pomocou všetkých metód, topografia(a), výškové profily(b) a laterálne sily(c) namerané pomocou AFM, Ramanove spektrum(d).

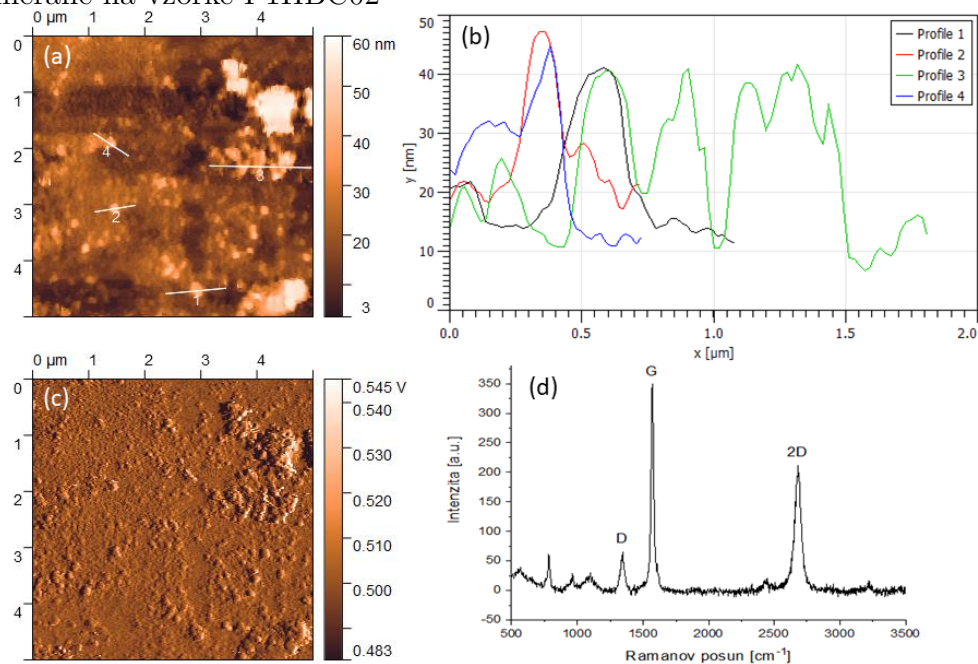


Obrázok č.10: (a) Topografia, (b) výškové profily, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P1HBC01

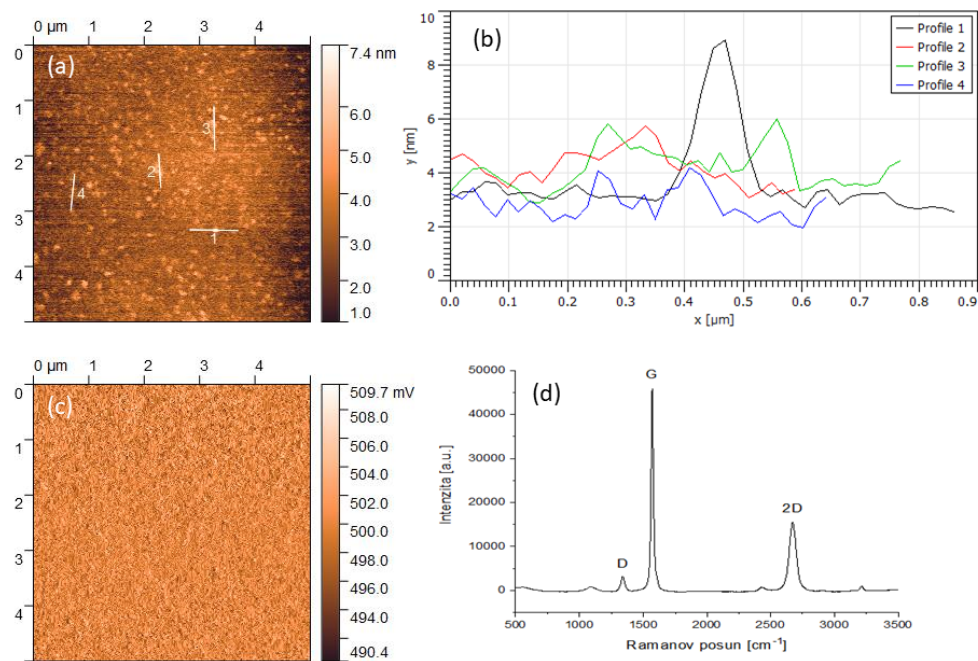
Z analýzy všetkých Ramanových spektier a výsledkov merania AFM môžeme usúdiť, že v prípade vzorky P1HBC01 sme pripravili jedno, dvoj a trojvrstvy grafénu. Pološírka 2D píku ako náš hlavný ukazateľ počtu vrstiev, je pre rôzne miesta 39 cm^{-1} až 74 cm^{-1} . Grafén je ale na povrchu častíc prášku SiC z ktorého sme grafén pripravovali, inak by výškové profily namerané metódou AFM nemali priemernú výšku $\approx 70\text{ nm}$.



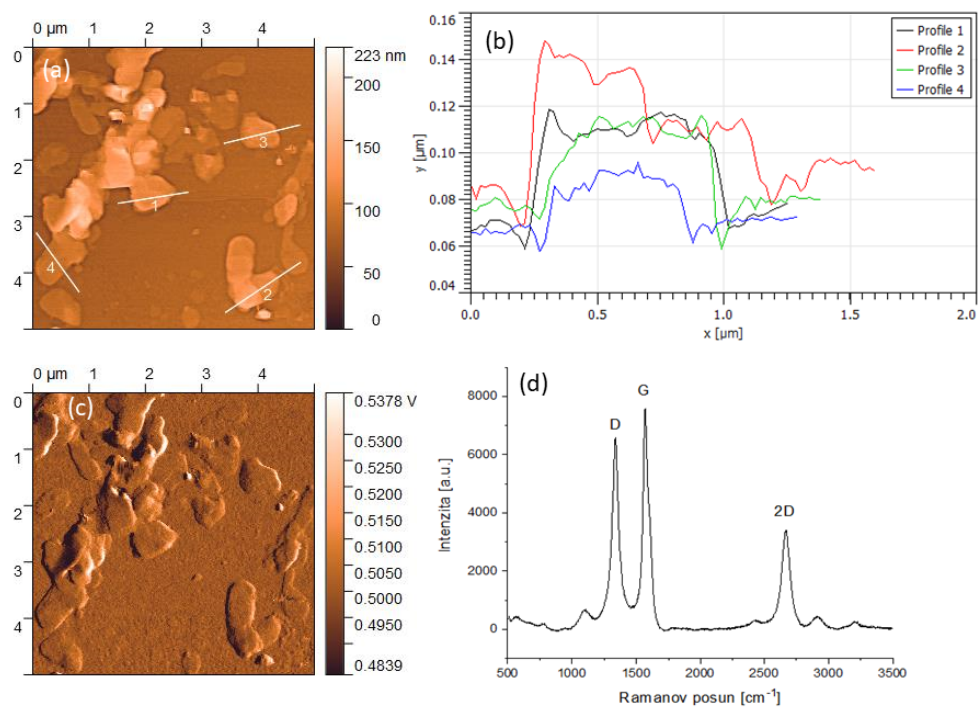
Obrázok č.11: Ramanove spektrum, topografia, výškové profile a laterálne sily namerané na vzorke P1HBC02



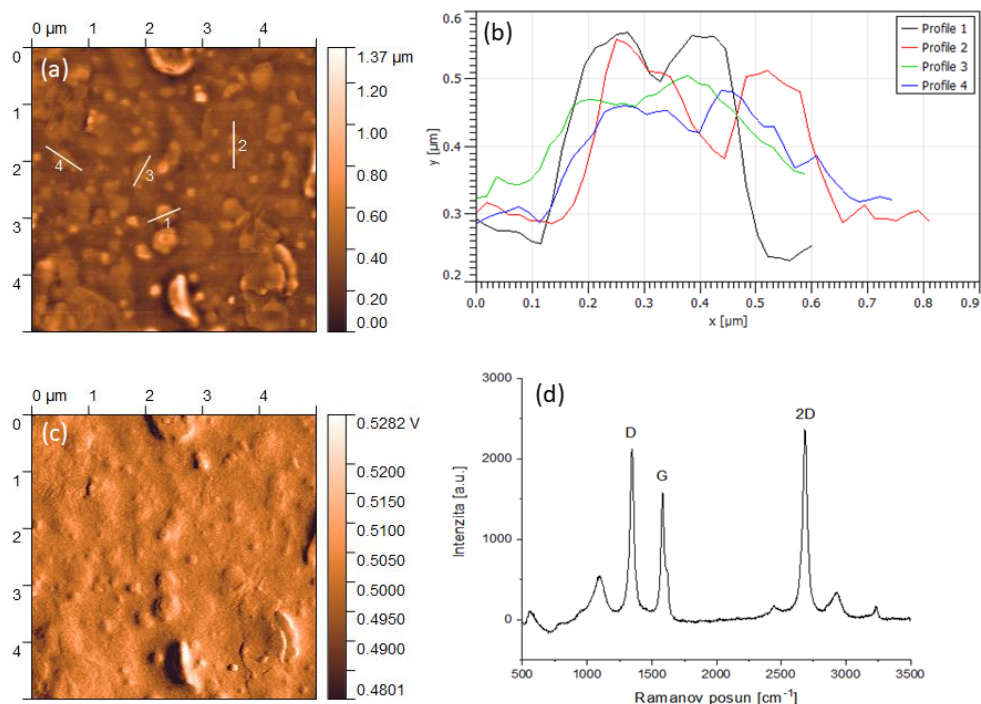
Obrázok č.12: (a) Topografia, (b) výškové profile, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P1HBC03



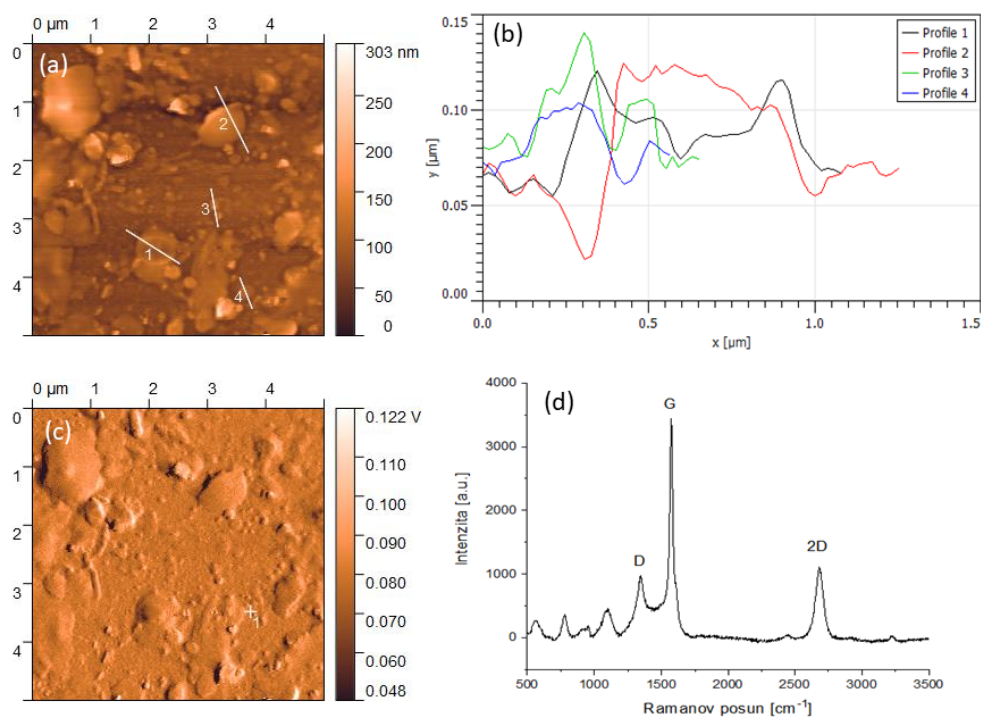
Obrázok č.13: (a) Topografia, (b) výškové profily, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P2HBC01



Obrázok č.14: (a) Topografia, (b) výškové profily, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P2HBC02



Obrázok č.15: (a) Topografia, (b) výškové profily, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P3HBC01

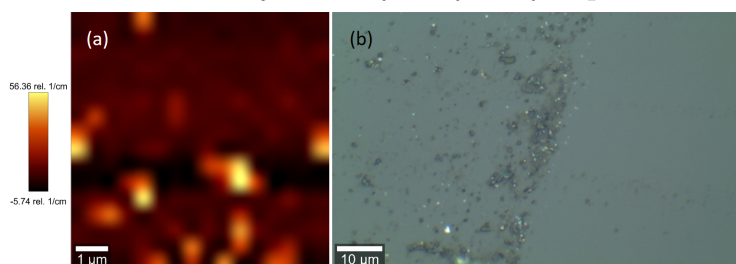


Obrázok č.16: (a) Topografia, (b) výškové profily, (c) laterálne sily a (d) Ramanove spektrum vzorky P3HBC02

Tabuľka č.2: Intervaly pološírok pre všetky pripravené vzorky.

Vzorka	Interval pološírky 2D píku [cm^{-1}]
P1HBC01	39-74
P1HBC02	36-57
P1HBC03	52-72
P2HBC01	27-53
P2HBC02	39-49
P3HBC01	22-56
P3HBC02	20-68

Na základe pološírok 2D píkov z tabuľky č.2 predpokladáme že sa nám podarilo pripraviť zmesi monovrstiev až multivrstiev grafénu pre všetky podmienky prípravy. Takýto výsledok sme očakávali, keďže sme zvolili také podmienky pri ktorých na Si-strane narastie prevažne monovrstva grafénu a teda nanajvýš multivrstva na C-strane SiC. Na ostatných stranách SiC narastie počet vrstiev medzi tými čo narástli na Si-strane a C-strane. Keďže sme ako substrát sme použili práškovú formu SiC pri príprave sa uplatnia všetky tieto efekty Celkovo teda môžeme povedať, že sa nám pre všetky podmienky podarilo pripraviť grafénové monovrstvy až multivrstvy, ktoré sú ale stále na povrchu častíc práškového SiC ako môžeme vidieť na jednotlivých výškových profiloch.



Obrázok č.17: Pre vzorku P1HBC01 (a) mapa pološírky 2D píku, (b) fotka z optického mikroskopu

Ako vidíme na obrázku č.17 (obrázky (a) a (b) majú rôznu mierku) grafén sa nám podarilo pripraviť na väčšine povrchu zrn SiC prášku. Rozsah škály obrázku č.17(a) nám zároveň podáva informáciu o maximálnom počte vrstiev. V týchto miestach vzorky sa nám teda podarilo pripraviť nanajvýš dvojvrstvu grafénu.

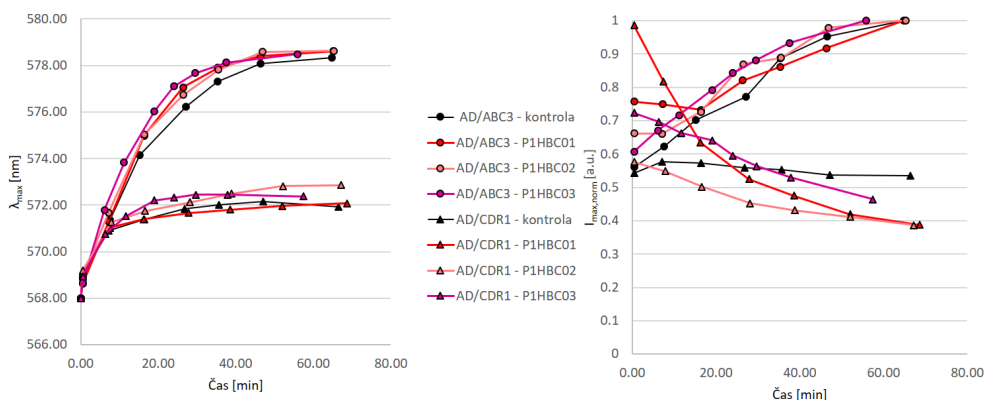
4.3 Vplyv grafénu na kvasinky

Pred samotným experimentom musíme najskôr pripravený grafén odseparovať od reziduálnych častíc SiC prášku. Tento proces pozostáva z niekoľkých krokov, najskôr sme grafén presypali do kyvety, potom sme pridali približne 1 ml destilovanej vody. Takto pripravené vzorky sme ponorili do ultrazvukového kúpeľa na 90 sekúnd. Po ultrazvuku sme použili ešte vortex, prístroj na suspendovanie buniek ktorý celú vzorku pretrasie. Častice grafénu a SiC začnú po odobratí vzorky z vortexu v kyvete sedimentovať. Vrchnú časť roztoku, bez sedimentov, prepipetujeme do ďalšej kyvety a v tomto stave používame pri meraní.

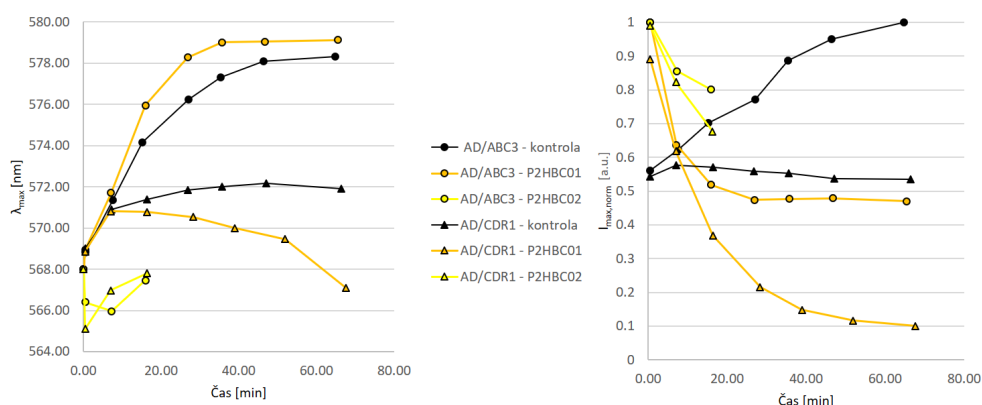
Kvasinky boli kultivované v kvapalnom médiu v trepacom kúpeli kým nedosiahli exponenciálnu fázu rastu. Bunková suspenzia bola potom dvakrát premytá 10 ml destilovanej vody pomocou centrifúgy s 3000 otáčkami za minútu po dobu 2 minút. Z takto pripravených kvasiniek bolo pripravené dostatočné množstvo bunkovej suspenzie v C-P pufrí s OD (angl. optical density - absorbanca) ≈ 11 . Potom bola suspenzia napipetovaná do kyviet s optickou dráhou 1 cm.

Priebeh hromadenia sondy vnútri buniek bol zaznamenávaní spektrofotometrom FluoroMax-4 od výrobcu HORIBA Jobin Yvon, pomocou merania emisných spektier v intervale 560-590 nm s excitačnou vlnovou dĺžkou 535 nm. Na začiatku merania sme ku všetkým vzorkám pridali 6 μ l sondy. Približne o 5 minút neskôr sme k vzorkám pridali 200 μ l grafénového roztoku. Na jednu vzorku grafénu pripadajú dve vzorky kvasiniek, pumpový a bezpumpový kmeň. Vzorky boli udržiavané na pokojovej teplote a po každom meraní boli jemne zamiešané. Emisné spektrá sme merali v pravidelných intervaloch a zaznamenávali sme polohu maxima. Rýchlosť hromadenia sondy v kvasinkách, tzv. farbiaca krivka, je závislosť polohy maxima fluorescence λ_{max} na čase. Aktivita MDR púmp je daná rozdielom farbiacich kriviek pumpových a bezpumpových kmeňov v rovnováhe[46].

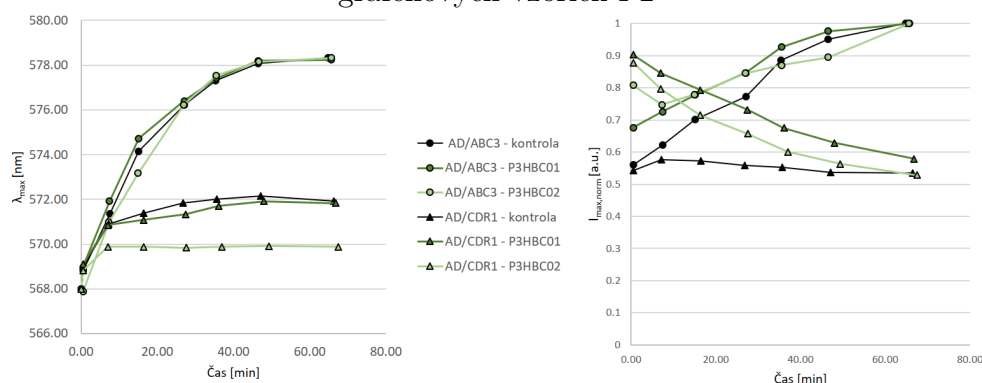
Teda v experimente máme celkovo 16 vzoriek, 8 pre každý kmeň kvasiniek. Kontrolná vzorka, vzorka bez pridaného grafénu poskytuje informáciu o farbení daného kmeňa kvasiniek pre podmienky, v ktorých sa experiment uskutočňuje. Čiže ak by grafén nepôsobil na kvasinky, farbiaca krivka danej vzorky by presne kopírovala farbiacu krivku kontroly. Ďalších 14 vzoriek predstavuje modelové vzorky pre skúmanie jednotlivých grafénových vzoriek, vždy po dvojiciach pumpový a nepumpový kmeň na jeden grafén.



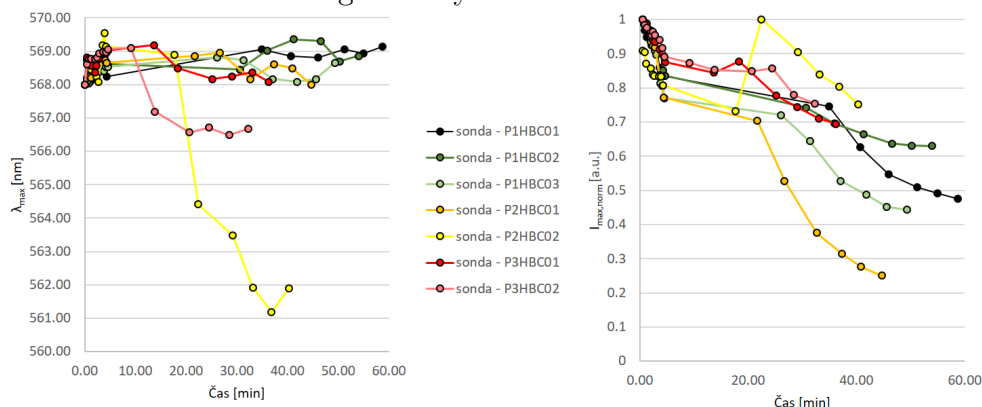
Obrázok č.18: Farbiace krivky(vľavo) a priebehy intenzít(vpravo) pre sadu grafénových vzoriek P1



Obrázok č.19: Farbiace krivky(vľavo) a priebehy intenzít(vpravo) pre sadu grafénových vzoriek P2



Obrázok č.20: Farbiace krivky(vľavo) a priebehy intenzít(vpravo) pre sadu grafénových vzoriek P3



Obrázok č.21: Farbiace krivky(vľavo) a priebehy intenzít(vpravo) pre jednotlivé vzorky grafénu a sondy

Z obrázkov č.18-20 vidíme že membránový potenciál bol ovplyvnený len vzorkou P3HBC02, ktorá spôsobila depolarizáciu buniek. Naopak vzorky grafénu zo sady P2 spôsobili deštrukciu buniek, čo ale bolo zrejme už počas experimentu, preto sme meranie so vzorkou P2HBC02 ani nedokončili. Z priebehu intenzít na obr. č.21 vidíme prudké klesanie intenzity, ktoré bolo spôsobené interakciou sondy a grafénu. Tento pokles intenzity je viditeľný aj na obrázkoch č.18-20 pre pumpový kmeň. Predpokladáme teda, že sonda vo vnútri buniek je pred grafénom chránená no pumpy ju z buniek aktívne vyplavujú. Mimo bunku sonda interaguje s grafénom, stráca schopnosť fluorescence a tým nastáva pokles intenzity.

Záver

V tejto práci sme vypracovali stručný, ale prehľadný teoretický popis grafénu spolu s metódami prípravy a charakterizácie. Hlavným cieľom bola ale príprava grafénu z práškovej formy SiC v rôznych podmienkach a následná charakterizácia jeho vplyvu na živé bunky, v našom prípade kvasinky. Postup prípravy a charakterizácie je detailne popísaný v kapitole 4, ktorá predstavuje samotnú experimentálnu časť tejto bakalárskej práce.

Podarilo sa nám pripraviť 7 vzoriek v rôznych podmienkach, z ktorých len jedna (P3HBC01) viditeľne ovplyvnila membránový potenciál kvasiniek. Dve z pripravených vzoriek majú tendenciu bunky kvasiniek ničiť (sada P2), zvyšné nevykazujú žiadne známky ovplyvňovania membránového potenciálu.

Sada vzoriek P2 navyše vykazuje najhoršiu kvalitu, pomer intenzít D/G píku sa pohybuje v intervale 0,8 až 2,2 a najmenšie množstvo pripraveného grafénu. V niekoľkých miestach sa v spektre vzoriek sady P2 nezobrazil ani jeden z charakteristických grafénových píkov. Z analýzy Ramanových spektier môžeme predpokladať, že tak krátke časy, ako boli použité pri príprave tejto sady vzoriek, nestačia na vytvorenie dostatočného množstva grafénu.

V závislosti na teplote (sada P1) je pripravený grafén vo všetkých prípadoch pomerne vysokej kvality, pomer intenzít D/G píku sa pohybuje v intervale 0,1 až 0,6, nízkym počtom defektov a počet vrstiev sa pohybuje v rozmedzí od monovrstiev po niekoľko jednotiek vrstiev grafénu. Najhoršia vzorka zo sady P1HBC03, bola pripravovaná pri teplote $T = 1550^{\circ}\text{C}$, preto by sme mali pripravovať grafén na vyšších teplotách. V prípade vzorky P1HBC02 sa nám podarilo pripraviť jedno až dvojvrstvy grafénu a pre vzorku P1HBC01 sa nám kvôli vyššej teplote podarilo pripraviť až trojvrstvy grafénu.

Vzorky pripravené v argónovej atmosfére alebo v zmesi vodíku s argónom (sada P3) tiež vykazujú dobrú kvalitu, no nie až tak ako vzorky pripravené vo vákuu, pomer intenzít sa pohybuje v intervale 0,3 až 0,9. V prípade oboch vzoriek sme pripravili zmes jedno a dvojvrstiev grafénu.

Celkovo najlepšie podmienky rastu, pre možné ďalšie aplikácie v biofyzike, vykazuje vzorka P3HBC01, keďže ako jediná mala vplyv na membránový potenciál a neničila bunky kvasiniek. Ďalšie vzorky by sme teda mali pripravovať pri teplotách $\approx 1700^{\circ}\text{C}$ a aspoň po dobu 15 minút. V tomto okamihu je ťažko povedať či rozdielna atmosféra, v ktorej bola vzorka P3HBC01 pripravovaná je zodpovedná za vplyv tejto vzorky na membránový potenciál, v budúcnosti to môže byť predmetom ďalšieho štúdia.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Takao Ono, Yasushi Kanai, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, Kazuhiko Matsumoto. Electrical Biosensing at Physiological Ionic Strength Using Graphene Field-Effect Transistor in Femtoliter Microdroplet. *Nano Letters* 2019, 19 (6) , 4004-4009.
- [2] Melinda Varga, Marco Luniak, Klaus-Jürgen Wolter, "Novel self-folding electrode for neural stimulation and recording", *Electronics and Nanotechnology (ELNANO) 2013 IEEE XXXIII International Scientific Conference*, pp. 237-240, 2013.
- [3] L.Z. Feng, Z.A. Liu Graphene in biomedicine: opportunities and challenges *Nanomedicine*, 6 (2011), pp. 317-324
- [4] Geim, A.K.; Novoselov, K.S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* 2007, 6, 183–191.
- [5] Kroto, H. W., Heath, J. R., O’Brein, S. C., Curl, R. F., and Smalley, R. E. C_{60} :Buckminsterfullerene, *Nature*, 318, pp. 162-163 (1985)
- [6] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva and A. A. Firsov, Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science* 306, 666 (2004).
- [7] Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., Hone, J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science* 321, 385–388 (2008).
- [8] F. Liu, P. Ming and J. Li *Phys. Rev. B* 76 (2007) 064120.
- [9] Balandin, Alexander A.; Ghosh, Suchismita; Bao, Wenzhong; Calizo, Irene; Teweldebrhan, Desalegne; Miao, Feng; Lau, Chun Ning; et al. (2008-02-20). "Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene". *Nano Letters* ASAP. 8 (3): 902–907
- [10] <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Tables/thrcn.html> [18.07.2019]
- [11] Kuzmenko, A. B.; van Heumen, E.; Carbone, F.; van der Marel, D. (2008). "Universal infrared conductance of graphite". *Phys Rev Lett.* 100 (11): 117401.
- [12] Nair R R, Blake P, Grigorenko A N, Novoselov K S, Booth T J, Stauber T, Peres N M R, Geim A K, *Science*, 320(2008)1308
- [13] grafen properties Bouhafs, Ch., STRUCTURAL AND ELECTRONIC PROPERTIES OF GRAPHENE ON 4H- AND 3C-SiC, Linköping studies in science and technology. Dissertations, No. 1793, (2016)
- [14] P. R. Wallace, The Band Theory of Graphite, *Physical Review* 71, 622–634 (1947)
- [15] R. E. Peierls, "Bemerkungen über umwandlungstemperaturen," *Helv. Phys. Acta.* 7, 81–83 (1934).
- [16] R. E. Peierls, "Quelques propriétés typiques des coepees solides," *Ann. Inst. Henri Poincare* 5, 177–222 (1935)
- [17] L. D. Laudau, "Zur theorie der phasenumwandlungen II," *Phys. Z. Sowjetunion* 11, 26–35 (1937)
- [18] Boehm, H. P.; Clauss, A.; Fischer, G.; Hofmann, U. (1962). "Surface Properties of Extremely Thin Graphite Lamellae". *Proceedings of the Fifth Conference on Carbon*. Pergamon Press.
- [19] Oshima, C.; Nagashima, A. (1997). "Ultra-thin epitaxial films of graphite

and hexagonal boron nitride on solid surfaces". *J. Phys.: Condens. Matter.* 9 (1): 1–20.

[20] Gall, N. R.; Rut’Kov, E. V.; Tontegode, A. Ya. (1997). "Two Dimensional Graphite Films on Metals and Their Intercalation". *International Journal of Modern Physics B.* 11 (16): 1865–1911.

[21] J. C. Meyer, A. K. Geim, M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, T. J. Booth and S. Roth, The structure of suspended graphene sheets, *Nature* 446, 60 (2007).

[22] Kim, K. S., Zhao, Y., Jang, H., Lee, S. Y., Kim, J. M., Kim, K. S., Ahn, J.-H., Kim, P., Choi, J.-Y., Hong, B. H. Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature* 457, 706–710 (2009)

[23] Mattevi, C., Kim, H., Chhowalla, M. A review of chemical vapour deposition of graphene on copper. *Journal of Materials Chemistry* 21, 3324–3334 (2011)

[24] Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., Dresselhaus, M. S., Kong, J. Large Area, Few-Layer Graphene Films on Arbitrary Substrates by Chemical Vapor Deposition. *Nano Lett.* 9, 30–35 (2009)

[25] Ago, H., Ito, Y., Mizuta, N., Yoshida, K., Hu, B., Orofeo, C. M., Tsuji, M., Ikeda, K., Mizuno, S. Epitaxial Chemical Vapor Deposition Growth of Single-Layer Graphene over Cobalt Film Crystallized on Sapphire. *ACS Nano* 4, 7407–7414 (2010)

[26] Sun, J., Nam, Y., Lindvall, N., Cole, M. T., Teo, K. B. K., Woo Park, Y., Yurgens, A. Growth mechanism of graphene on platinum: Surface catalysis and carbon segregation. *Appl. Phys. Lett.* 104, 152107 (2014)

[27] Vo-Van, C., Kimouche, A., Reserbat-Plantey, A., Fruchart, O., Bayle-Guillemaud, P., Bendiab, N., Coraux, J. Epitaxial graphene prepared by chemical vapor deposition on single crystal thin iridium films on sapphire. *Appl. Phys. Lett.* 98, 181903 (2011).

[28] Kwon, S.-Y., Ciobanu, C. V., Petrova, V., Shenoy, V. B., Bareno, J., Gambin, V., Petrov, I., Kodambaka, S. Growth of Semiconducting Graphene on Palladium. *Nano Lett.* 9, 3985–3990 (2009)

[29] Xu X, Zhang Z, Dong J, et al. Ultrafast epitaxial growth of metre-sized single-crystal graphene. *Science Bulletin.* 2017;62(15):1074-1080

[30] Berzelius, J.J. Untersuchungen über die Flusspath Faure und deren merkwürdige Verbindungen. *Ann. Phys. Lpz* 1 1824, 1, 169–230. (In German)

[31] Acheson, A.G. England Patent, 17911, 1892

[32] Acheson, A.G. On Carborundum. *Chem. News* 1893, 68, 179

[33] Yazdi, G.R. Growth and Characterization of AlN: From Nano Structures to Bulk Material. Ph.D. Thesis, Linköping University, Linköping, Sweden, 20 August 2008

[34] Yazdi, G.R., Rositsa, Y., Iakimov, T., Epitaxial Graphene on SiC: A Review of Growth and Characterization. *Crystals* 2016, 6, 53 (12 May 2016)

[35] Ramsdell, L.S. Studies on silicon carbide. *Am. Min.* 1947, 32, 64–82

[36] Johansson, L.I.; Virojanadara, C. Properties of epitaxial graphene grown on C-face SiC compared to Si-face. *J. Mater. Res.* 2014, 29, 426–438.

[37] Yazdi, G.R.; Vasiliasukas, R.; Iakimov, T.; Zakharov, A.; Syväjärvi, M.; Yakimova, R. Growth of large area monolayer graphene on 3C-SiC and a comparison with other SiC polytypes. *Carbon* 2013, 57, 477–484

- [38] Teliëps, W.; Bauer, E. An analytical reflection and emission UHV surface electron microscope. *Ultramicroscopy* 1985, 17, 57–65
- [39] Hannon, J.B.; Tromp, R.M. Pit formation during graphene synthesis on SiC(0001): In situ electron microscopy. *Phys. Rev. B* 2008, 77, 241404.
- [40] Hupalo, M.; Conrad, E.H.; Tringides, M.C. Growth mechanism for epitaxial graphene on vicinal 6H-SiC(0001) surfaces: A scanning tunneling microscopy study. *Phys. Rev. B* 2008, 80, 041401
- [41] de Heer, W.A.; Berger, C.; Ruan, M.; Sprinkle, M.; Li, X.; Hu, Y.; Zhang, B.; Hankinson, J.; Conrad, E. Large area and structured epitaxial graphene produced by confinement controlled sublimation of silicon carbide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 16900–16905.
- [42] Yakimova, R.; Virojanadara, C.; Gogova, D.; Syväjärvi, M.; Siche, D.; Larsson, K.; Johansson, L.J. Analysis of the Formation Conditions for Large Area Epitaxial Graphene on SiC Substrates. *Mater. Sci. Forum* 2010, 645–648, 565–568
- [43] J. Röhlrl, M. Hundhausen, K. V. Emtsev, Th. Seyller, R. Graupner, and L. Ley (2008). Raman spectra of epitaxial graphene on SiC(0001), *Applied Physics Letters* 92, 201918
- [44] Camara, N., Tiberj, A., Jouault, B., Caboni, A., Jabakhanji, B., Mestres, N., Godignon, P., Camassel, J. (2010). Current status of self-organized epitaxial graphene ribbons on the C face of 6H–SiC substrates. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 43. 374011. 10.1088/0022-3727/43/37/374011.
- [45] PLÁŠEK, J., a GÁŠKOVÁ, D. Fluorescenční sondy a měření membránového potenciálu. *Československý časopis pro fyziku*, 2006, roč. 56, č. 5, s. 332-339.
- [46] PLÁŠEK, J., and SIGLER, K. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, April 1996, vol. 33, no. 2, p. 101124.
- [47] GÁŠKOVÁ, D., ČADEK, R., CHALOUPKA, R., et al. Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C3(3) fluorescence. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, August 2002, vol. 34, no. 8, p. 931-937.
- [48] GÁŠKOVÁ, D., DECORBY, A., and LEMIRE, BD. DiS-C3(3) monitoring of in vivo mitochondrial membrane potential in *C. elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, March 2007, vol. 354, no. 3, p. 814-819.
- [49] ČADEK, R., CHLÁDKOVÁ, K., SIGLER, K., et al. Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochimica et Biophysica Acta*, October 2004, vol. 1665, no. 1-2, p. 111-117.
- [50] Denksteinová, B., et. al. Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C3(3) fluorescence. *Folia Microbiol.* 1997, Sv. 43, 3, 221-224.