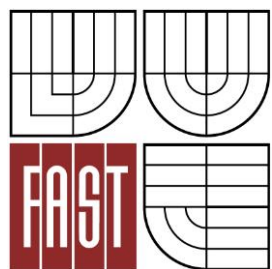




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STAVEBNÍ

ÚSTAV TECHNOLOGIE STAVEBNÍCH HMOT A  
DÍLCŮ

FACULTY OF CIVIL ENGINEERING INSTITUTE OF TECHNOLOGY OF  
BUILDING MATERIALS AND COMPONENTS

## ANALÝZA VLIVU STAVBY DŘEVA NA MIKROSKOPICKÉ ÚROVNI NA PEVNOSTNÍ PARAMETRY

WOOD MICROSTRUCTURE ANALYSIS ONTO THE STRENGTH PARAMETERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

RADOMÍR MARTINEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JAN VANĚREK, Ph.D.

BRNO 2016



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA STAVEBNÍ

<b>Studijní program</b>	B3607 Stavební inženýrství
<b>Typ studijního programu</b>	Bakalářský studijní program s prezenční formou studia
<b>Studijní obor</b>	3607R020 Stavebně materiálové inženýrství
<b>Pracoviště</b>	Ústav technologie stavebních hmot a dílců

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

<b>Student</b>	Radomír Martinek
<b>Název</b>	Analýza vlivu stavby dřeva na mikroskopické úrovni na pevnostní parametry
<b>Vedoucí bakalářské práce</b>	doc. Ing. Jan Vaněrek, Ph.D.
<b>Datum zadání bakalářské práce</b>	30. 11. 2015
<b>Datum odevzdání bakalářské práce</b>	27. 5. 2016

V Brně dne 30. 11. 2015

.....  
prof. Ing. Rostislav Drochytka, CSc., MBA  
Vedoucí ústavu

.....  
prof. Ing. Rostislav Drochytka, CSc., MBA  
Děkan Fakulty stavební VUT

## Podklady a literatura

- Fengel, D., & Wegener, G. (2003). Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. München: Kessel Verlag.
- Monteroa, C., Claira, B., Almérasa, T., Leeb, A., Gril, J. Relationship between wood elastic strain under bending and cellulose crystal strain. Composites Science and Technology 72 (2012), 175-181
- Deng, Q., Li, S., Chen, Y. Mechanical properties and failure mechanism of wood cell wall layers. Computational Materials Science 62 (2012), 221-226
- Jin, K., Qin, Z., Buehler, M.J. Molecular deformation mechanisms of the wood cell wall material. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 42 (2015), 198-206
- Donaldson, L. Microfibril Angle: Measurement, Variation and Relationships – A Review. IAWA Journal 29 (4), 2008, 345-386

## Zásady pro vypracování

Dominantním nositelem tuhostních parametrů dřeva v axiální ose tracheid a libriformních vláken je úhel odklonu mikrofibril celulózy (MFA). Hodnoty MFA stejně jako hodnoty objemové hmotnosti vykazují silnou závislost na modulu pružnosti v podélném směru, stejně tak na hodnotách sesychání. Tyto závislosti jsou popsány zejména pro vrstvu S2 buněčné stěny, menší pozornost je pak zaměřena na MFA ve zbývajících vrstvách, které nemají jednotnou orientaci. Z toho důvodu bude bakalářská práce zahrnovat veškeré metody měření hodnot MFA celulózy pro dřeviny. Dále bude popsán způsob stanovení tuhostních parametrů pomocí nanoindentace. Z vědeckých článků bude provedena rešerše dosažených závislostí tuhostních parametrů nanoindentace na hodnotách MOE. V rámci dílčího experimentu bude přistoupeno k měření hodnot MFA, stanovení mikroskopických a fyzikálních parametrů dřeva, na základě kterých bude provedena statistická analýza pro zjištění případných závislostí.

## Struktura bakalářské/diplomové práce

VŠKP vypracujte a rozčleňte podle dále uvedené struktury:

1. Textová část VŠKP zpracovaná podle Směrnice rektora "Úprava, odevzdávání, zveřejňování a uchování vysokoškolských kvalifikačních prací" a Směrnice děkana "Úprava, odevzdávání, zveřejňování a uchování vysokoškolských kvalifikačních prací na FAST VUT" (povinná součást VŠKP).
2. Přílohy textové části VŠKP zpracované podle Směrnice rektora "Úprava, odevzdávání, zveřejňování a uchování vysokoškolských kvalifikačních prací" a Směrnice děkana "Úprava, odevzdávání, zveřejňování a uchování vysokoškolských kvalifikačních prací na FAST VUT" (nepovinná součást VŠKP v případě, že přílohy nejsou součástí textové části VŠKP, ale textovou část doplňují).

.....

doc. Ing. Jan Vaněrek, Ph.D.  
Vedoucí bakalářské práce

## **Abstrakt**

Tato práce se zaměřuje na bližší zkoumání mikrostruktury dřeva a vztahu mezi mikroskopickými a mechanickými vlastnostmi dřeva. Hlavním bodem praktické části je měření úhlu mikrofibril (MFA) v S2 vrstvě buněčné stěny. Tato vrstva zaujímá více než 80 % celkové tloušťky buněčné stěny, a tak má největší vliv na mechanické vlastnosti dřevní buňky. Hodnoty MFA stejně jako hodnoty objemové hmotnosti vykazují silnou závislost na modulu pružnosti v podélném směru, stejně tak na hodnotách sesychání. Teoretická část zahrnuje metody měření MFA, variace MFA, vlastnosti dřeva odvíjející se od MFA a také stanovení mechanických vlastností buněčné stěny dřeva pomocí nanoindentace.

## **Abstract**

This work focuses on a closer examination of the microstructure of wood and the relationship between microscopic and mechanical properties of wood. The main point of the practical part of this study is a measurement of microfibril angle (MFA) in the S2 layer of a wood cell wall. This layer occupies more than 80 % of the total thickness of the cell wall and thus has the greatest influence on the mechanical properties of the wood cells. MFA values as well as values of bulk density show a strong dependence on the modulus of elasticity in the longitudinal direction, as well as on the values of shrinkage. The theoretical part involves methods for measuring MFA, variations of MFA, wood properties evolving from the MFA and also mechanical properties of wood cell walls measured by nanoindentation.

## **Klíčová slova**

Úhel mikrofibril, buněčná stěna, polarizační mikroskopie, nanoindentace

## **Key words**

Microfibril angle, wood cell wall, polarized light microscopy, nanoindentation

### **Bibliografická citace**

Radomír Martinek *Analýza vlivu stavby dřeva na mikroskopické úrovni na pevnostní parametry*. Brno, 2016, 57 stran, nejsou přílohy. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební, Ústav technologie stavebních hmot a dílců. Vedoucí práce doc.Ing. Jan Vaněrek, Ph.D.

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že předložená bakalářská práce je původní a zpracoval jsem ji samostatně.

Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem ve své práci neporušil autorská práva (ve smyslu Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

V Brně dne 25. května 2016

.....

podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu práce, panu doc. Ing. Janu Vaněrkovi, Ph.D., za odborné vedení, připomínky, rady a ochotnou spolupráci při vzniku této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat panu Mgr. Dušanovi Hemzalovi, Ph.D. za pomoc při vykonávání praktické části.

## **OBSAH:**

1. Úvod .....	10
2. Struktura dřeva .....	11
2.1. Mikroskopická struktura .....	11
2.2. Sub-mikroskopická struktura .....	16
2.3. Měření MFA .....	17
3. Způsoby měření MFA .....	18
3.1. Použití mikroskopických technik.....	18
3.1.1. Polarizace.....	18
3.1.2. Přímé zobrazování za pomoci fyzikálních nebo chemických metod .....	21
3.2. Použití rentgenové difrakce nebo blízké infračervené oblasti spektroskopie.....	23
3.2.1. Rentgenová difrakce .....	23
3.2.2. Infračervená spektroskopie.....	24
4. Variace MFA .....	25
4.1. V rámci jednoho stromu .....	25
4.2. Variace MFA mezi stromy .....	25
4.3. Vlivem prostředí – reakční dřevo .....	25
4.4. Vztah mezi MFA a rozměrem buňky .....	26
5. Vliv MFA na vlastnosti dřeva .....	26
5.1. Hustota .....	26
5.2. Tuhost dřeva .....	27
5.3. Smrštění .....	27
6. Stanovení tuhostních parametrů pomocí nanoindentace .....	27
6.1. Závislosti mechanických vlastností zjištěné nanoindentací.....	30
7. Polarizační mikroskopie .....	32
8. Cíl práce.....	35
9. Metodika práce .....	36
9.1. Výběr vzorku .....	36
9.2. Stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken dle ČSN 49 0110 .....	36
9.2.1. Princip.....	36
9.2.2. Zkušební postup.....	36
9.3. Stanovení šířky letokruhu a podílu letního dřeva .....	36
9.3.1. Postup měření .....	36



9.4.	Tloušťka buněčné stěny .....	37
9.4.1.	Příprava vzorku .....	37
9.4.2.	Postup měření .....	37
9.5.	Stanovení úhlu mikrofibril.....	38
9.5.1.	Příprava vzorku .....	38
9.5.2.	Měření MFA.....	40
10.	Výsledky zkoušek a jejich vyhodnocení .....	41
10.1.	Stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken dle ČSN 49 0110 .....	41
10.2.	Stanovení šířky letokruhu a podílu letního dřeva.....	41
10.3.	Tloušťka buněčné stěny .....	42
10.4.	Stanovení úhlu mikrofibril .....	44
11.	Závěr.....	45
12.	Bibliografie.....	47
	SEZNAM GRAFŮ .....	54
	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	55
	SEZNAM TABULEK .....	57

## 1. Úvod

Dřevo, díky své široké dostupnosti, hraje významnou roli jako stavební materiál už nespočet let. Protože dřevo vykazuje výborné mechanické vlastnosti, jeho použití ve stavebnictví je velmi široké. Při pohledu na příčný řez dřevem můžeme dobře vidět letokruhy, které jsou výsledkem rozdílných rychlostí růstu při různých obdobích. Pokud se podíváme na strukturu blíže, snadno zjistíme, že dřevo není materiál celistvý, ale skládá se z buněk, které jsou složeny z dutého otvoru obklopeného buněčnou stěnou. Díky této struktuře je dřevo lehký materiál s vynikajícími vlastnostmi. Dřevní buňka je kompozitní materiál kombinující tuhé a měkké komponenty. Studie ukázaly, že se dřevní buňka skládá z několika vrstev. Tyto vrstvy tvoří určitý vláknitý kompozit s tuhými celulóзовými vlákny uloženými v měkké matrici celulózy a ligninu [1]. Jedna z těchto vrstev - prostřední vrstva sekundární buněčné stěny, tvoří více než 80 % celkové tloušťky buněčné stěny. Výjimečným rysem této vrstvy je, že tuhá vlákna celulózy jsou mezi sebou paralelně uspořádána a vytváří úhel (MFA) spolu s podélnou osou buňky. Protože podélný směr je hlavním nositelem pevností ve dřevě, mechanické vlastnosti dřeva úzce souvisí s vlastnostmi buňky v tomto směru. Protože MFA vyjadřuje, jak blízko jsou tuhé mikrofibrily vyrovnány s tímto podélným směrem, je MFA tedy klíčovou hodnotou k určení mechanických vlastností dřevní buňky. Malá hodnota MFA značí, že jsou mikrofibrily více vyrovnány v podélném směru buňky, a tím pádem bude materiál tužší.

## 2. Struktura dřeva

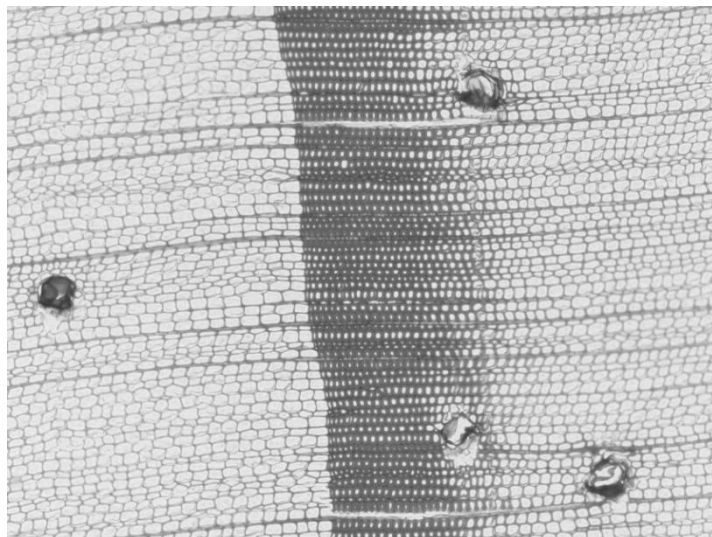
### 2.1. Mikroskopická struktura

Mikrostruktura se liší u listnatých a jehličnatých dřevin.

U jehličnanů tvoří mikrostrukturu:

- podélná vlákna
- pryskyřičné kanálky
- dřeňové paprsky
- dvojtečky

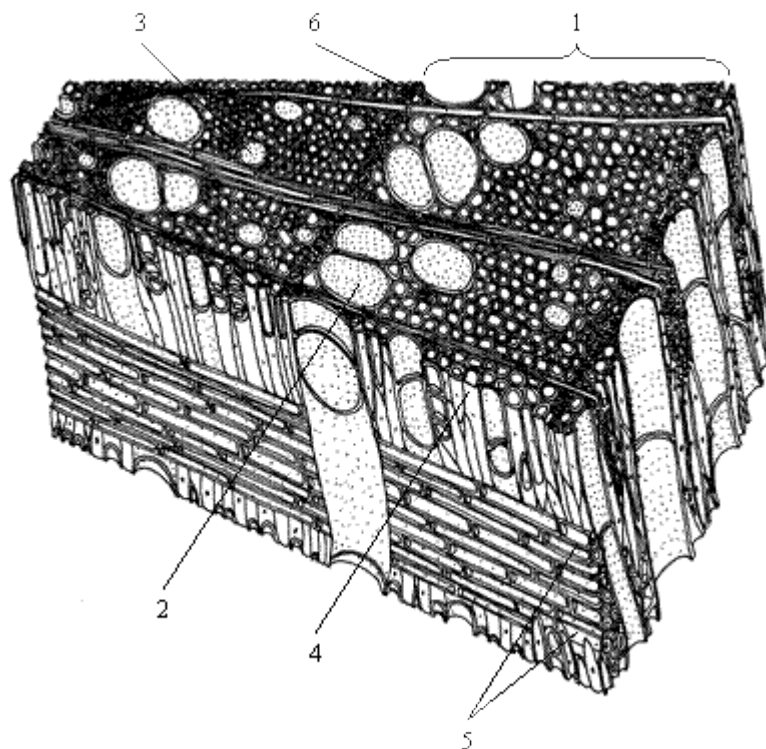
U jarního dřeva pozorujeme tenké buněčné stěny a větší průměr buněk, zatímco u letního dřeva jsou buněčné stěny silnější a průměr buněk je menší. Přechod mezi jarním a letním dřevem může být výrazný (náhlý) (Obr. 1) nebo pozvolný.



**Obrázek 1.** Příčný řez Borovice lesní. Výrazný přechod mezi jarním a letním dřevem a dobře viditelné pryskyřičné kanálky. (Zvětšeno 40 x)

Listnaté dřeviny mají na rozdíl od jehličnanů složitější stavbu (Obr. 2). Nachází se u nich vícero druhů buněk:

- tracheje (cévy)
- tracheidy (cévice)
- libriformní buňky (dřevní vlákna)
- parenchymatické buňky

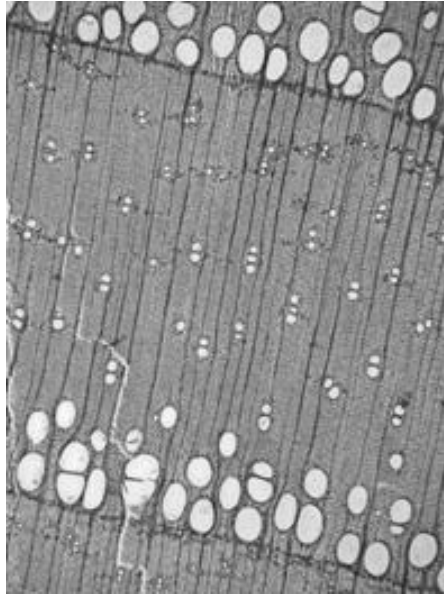


**Obrázek 2.** Znázornění stavby listnatého dřeva (Požgaj, Chovanec a kol., 1997): 1 – letokruh, 2 – jarní céva, 3 – letní céva, 4 – librifórní vlákno, 5 – dřeňový paprsek, 6 – podélný parenchym

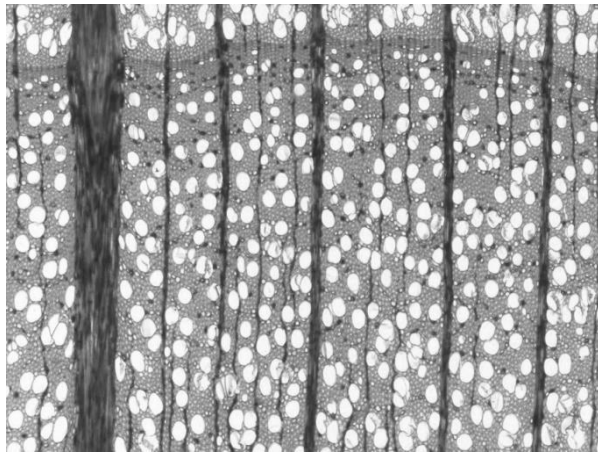
Kruhovitě pórovité dřeviny mají v jarním dřevě velké cévy, v letním dřevě jsou tyto elementy podstatně menší (Obr. 3).

Dřeviny, které vykazují přibližně stejnou velikost cévních elementů, nazýváme dřeviny s roztrošenou pórovitou strukturou (Obr. 4).

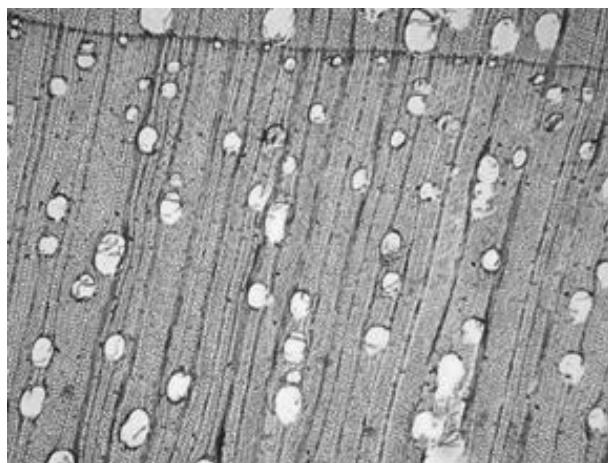
Velikost cévních elementů se může měnit postupně z jarního dřeva do letního dřeva. Takové dřeviny nazýváme dřeviny s polo-kruhovitě pórovitou strukturou. Typickým příkladem je ořech. Větší cévy jsou v jarním dřevě a menší cévy jsou ve dřevě letním (Obr. 5).



**Obrázek 3.** Kruhovitě pórovitá struktura dřeva. Příčný řez jasanovým dřevem. (Zvětšení 40 x)



**Obrázek 4.** Roztroušená pórovitá struktura. Příčný řez bukového dřeva. (Zvětšení 40 x)



**Obrázek 5.** Polo-kruhovitě pórovitá struktura dřeva. Příčný řez ořechovým dřevem.

(Zvětšení 40 x)

**Tabulka 1.** Procentuální zastoupení elementů ve dřevě jehličnanů.

Dřevní elementy	Průměrný objem v %
Tracheidy	91,0
Dřeňové paprsky	7,0
Parenchym	1,5
Pryskyřičné kanálky	0,4

**Tabulka 2.** Procentuální zastoupení elementů u listnatých dřevin.

Dřevní elementy	Průměrný objem v %
Tracheje a tracheidy	20,0
Dřevní vlákna	49,0
Dřeňové paprsky	18,0
Dřevní parenchym	13,0

Parenchymatické buňky – vyživovací, případně vodivé elementy, jsou tenkostěnné, dokonale uzavřené, málo protáhlé a jejich stěny jsou opatřeny hojnými tečkami. Tyto buňky zůstávají dlouho živé, obsahují protoplasmu a často ještě různé zásobní látky (škrob, olej). U jehličnatých dřevin v nich bývá pryskyřice, u listnatých dřevin třísloviny, v živém dřevě slouží k látkové výměně a jsou v nich ukládány zásobní látky.

Sklerenchymatické buňky – jsou to vyztužovací elementy. Stěny buňky jsou tlusté, lumen je úzký. Buňky jsou dlouze vláknité a zašpičatělé, do sebe se navzájem zaklíňují. Jsou prázdné a záhy odumírají. Jejich dutiny jsou vyplněny vzduchem. Sklerenchymatické vláknité elementy, které jsou ve dřevní části a jsou podobné lýkovým vláknům, označujeme jako libriformní (dřevní) vlákna. Jejich hlavní úkol je dodávat dřevu pevnost a vyztužovat je. Jsou vždy zdřevnatělé a značně tlusté.

Cévy – jsou to protáhlé, odumřelé prázdné buňky se stěnami zdřevnatělými a značně ztloustlými stěnami. Ve dřevě vodí vodu a v ní rozpuštěné anorganické živiny.

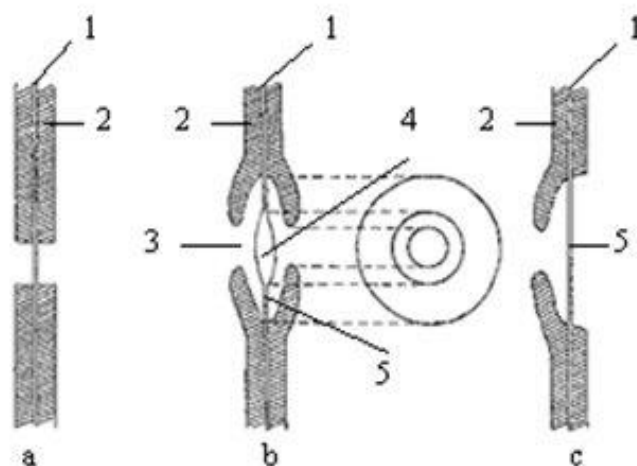
- Tracheje – jsou to buňky na obou koncích otevřené, spojující se v dlouhé rourky. Každou jednotlivou buňku nazýváme tracheálním článkem. Tracheje vznikají z buněk původně uzavřených, ale časem po odumření z nich vymizí plasmatický obsah, rozpouštějí se příčné přehrádky a všechny buňky splynou v jednu dlouhou rourku. Takto vzniklé otvory v příčných přehrádkách nazýváme perforace.

- a) jednoduchá perforace – zmizí-li přehrádka úplně a zůstane-li z ní na vnitřní straně cévy jen kruhovitý prstenec.
- b) hromadná perforace – zmizí-li přehrádka jen částečně a v určitých místech, takže z ní zůstávají jen úzké, příčné pruhy. Hromadná perforace je buď žebříčkovitá (mřížkovitá, schodovitá, žebrovitá) nebo síťová podle soustavy příček mezi perforacemi.
- Tracheidy - neboli cévice, jsou na rozdíl od trachejí vždy uzavřené. Svou funkcí a stavbou souhlasí zcela s trachejemi – vodí vodu a v ní rozpuštěné živiny. Jejich stěny jsou dokonale zdřevnatělé a bývají nejčastěji vyztužené šroubovicemi, nebo jsou stejnosměrně ztloustlé a pak mají na stěnách různé tečky nebo dvojtečky. Nedosahují takové délky jako tracheje a podle toho rozeznáváme:
- Céovitě, tzv. krátké tracheidy – jsou v blízkosti trachejí. Mají slabě ztloustlé blány, poměrně široký lumen a velmi četné a velké ztenčeniny s jasně zřetelným dvůrkem.
  - Vláknité tracheidy – jsou značně protáhlé, úzké, konce mají dlouze zašpičatělé a tvarem připomínají libriformní vlákna. Jsou tlustostěnné a mají úzký lumen. Jejich blány mají četné ztenčeniny se štěrbinovitými kanálky a úzkým dvůrkem.

Dřeňové prysky – tvoří různě mohutná seskupení parenchymatických buněk, orientovaných kolmo na podélnou osu kmene. Zabezpečují horizontální pohyb zejména organických látek a vody. Funkce je vodivá a zásobní.

Pryskyřičné kanálky – pryskyřičné kanálky tvoří buňky, které shromažďují a vylučují pryskyřici. Dělíme je na vertikální (podélné) a horizontální (příčné).

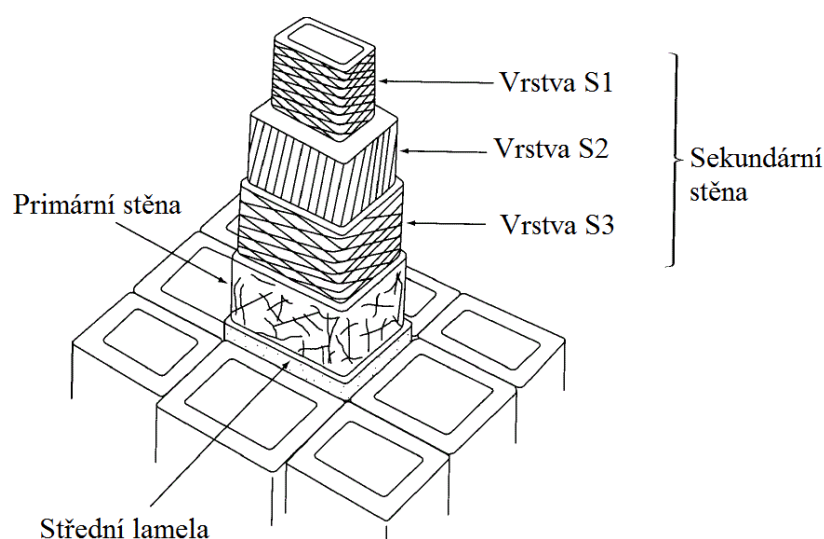
Dvojtečka - mezi buňkami dřeva existují mezibuněčná propojení, která zabezpečují transport vody a živin. Tato propojení se nazývají ztenčeniny (Obrázek č. 6) a představují neztloustlá místa v buněčné stěně, ve kterých se nacházejí submikroskopické póry. V místě ztenčeniny není vyvinutá sekundární buněčná stěna a fibrily jsou v místě ztenčenin odkloněné od pravidelného směru. Rozlišujeme dva druhy ztenčenin: jednoduché ztenčeniny – tečky a dvůrkaté ztenčeniny – dvojtečky.



Obrázek 6. Schématické znázornění různých typů ztenčenin (Šlezingerová, Gandelová 1994): a – tečka, b – dvojtečka, c – poloviční dvojtečka, 1 – střední lamela a primární buněčná stěna, 2 – sekundární buněčná stěna, 3 – porus, 4 – torus, 5 - margo

## 2.2. Sub-mikroskopická struktura

Stěny buněk dřeva se skládají z primární a sekundární vrstvy. Sekundární stěna je tvořena ze tří vrstev, S1, S2 a S3. Vrstva S1 leží nejbliže střední lamele, zatímco vrstva S3 leží nejbliže lumenu buňky (Obr. 7). Buněčnou stěnu tvoří tři základní látky, to jsou celulóza, hemicelulózy a lignin [2]. Celulóza je v buněčné stěně uložena ve formě mikrofibril [3] [4]. Ze tří vrstev sekundární stěny je vrstva S2 nejsilnější, a tím pádem nejdůležitější [5]. Haygreen a Bowyer (1996) uvádějí, že z důvodu daleko větší tloušťky vrstvy S2, oproti vrstvám S1 a S3, má tato vrstva největší vliv na to, jak se buňka chová.



Obrázek 7. Diagram znázorňující jednotlivé vrstvy buněčné stěny. Dále můžeme vidět orientaci mikrofibril jednotlivých vrstev typické tracheidy.



Mikrofibrily jsou strukturální jednotky rostlinných buněčných stěn. Každá mikrofibrila je tvořena svazkem řetězců celulózy a je obklopena nízkou molekulovou hmotností hemicelulóz [5]. Hemicelulózy působí jako spojovací prostředek, který mikrofibrily spojuje k sobě [3]. Svazky řetězců celulózy jsou obecně uspořádány podélně s ohledem na osu mikrofibrily, ale probíhají k sobě v částích paralelně. Tyto části se nazývají krystalické oblasti. Molekuly v těchto oblastech jsou k sobě navzájem velmi silně připojeny vodíkovými vazbami. Krystalické oblasti jsou následovány amorfními oblastmi, kde nemají molekuly celulózy určené uspořádání. Přechod z krystalické oblasti na amorfní je postupný. Přibližně dvě třetiny celulózy jsou v buněčné celulóze ve formě krystalické, jedna třetina je pak ve formě amorfní [5]. Tloušťka mikrofibril ve vrstvě S2 je různá, od 1  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$  [6]. Úhel, který svírají mikrofibrily s osou buněčné stěny se nazývá úhel mikrofibril (*micro fibril angle* – MFA). Mikrofibrily jsou zastoupeny v každé vrstvě buněčné stěny [2].

### 2.3. Měření MFA

Úhel mikrofibril MFA je asi nejjednodušší proměnná měřitelná v ultrastruktuře buněčných stěn dřeva, a zcela určitě jediná proměnná, která byla měřena ve velkém měřítku. Protože je celulóza krystalická, MFA vrstvy S2 může být měřen pomocí rentgenové difrakce. U jehličnanů jsou úhly mikrofibril velké v mladém dřevě, v dřevě vyzrálém zase malé. MFA je větší v patě stromu v závislosti na počtu letokruhů, po výšce stromu klesá, ke konci stromu opět trochu vzrůstá. U listnatých dřevin je to podobné, ale s menšími změnami po délce stromu a s menším úhlem mikrofibril u mladého dřeva. MFA je pozoruhodně dědičné, ale je také významně ovlivněno prostředím, jak je vidět zvýšením v tlakovém dřevu nebo sníženou hodnotou u tahového dřeva. Jednotlivé přilehlé tracheidy mohou ukázat mírné rozdíly v úhlu mikrofibril, který může být závislý na jejich délce, ale ne na průměru lumenu nebo na tloušťce buněčné stěny. Zatímco byl kladen velký důraz na MFA vrstvy S2, která dominuje axiálním tuhostem, bylo věnováno málo pozornosti vrstvám S1 a S3, které mají vliv na odolnost proti zborcení a další postranní vlastnosti. Takové měření bylo ale limitováno velkými obtížemi při měření úhlů mikrofibril u těchto vrstev. MFA, v porovnání s obyčejnou hustotou, ukazuje silnou vazbu s podélným modulem pružnosti a s podélným smršťováním, což jsou hlavní důvody pro další studii v tomto uspořádání buněčných stěn jehličnanů. U listnatých dřevin je MFA zajímavější ve vztahu k růstu napětí a smršťování [7].

Způsoby měření MFA jsou dvojího typu:

- a) měření jednotlivých tracheid a vláken **s použitím mikroskopu**,
- b) měření velkého množství vzorků dřeva za použití **rentgenové difrakce** nebo blízké **infračervené oblasti spektroskopie (NIR)**.

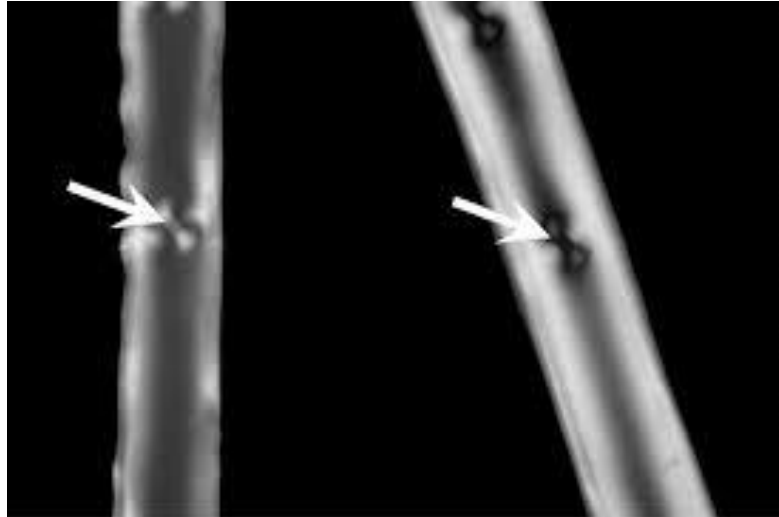
### **3. Způsoby měření MFA**

#### **3.1. Použití mikroskopických technik**

Mikroskopické techniky - techniky na bázi použití mikroskopu jsou rozděleny na ty, které se spoléhají na optické vlastnosti krystalické celulózy, s použitím variací polarizovaného světla [8] [9] [10] [11] [12], a na ty, které přímo nebo nepřímo vizualizují orientaci samotných mikrofibril. Takové metody zahrnují srážení jódem [13] [14] a ostatní biologické, chemické a nebo fyzikální metody [15] [16], dále konfokální odrazová mikroskopie [17], fluorescenční mikroskopie [18], mikro-Ramanova spektroskopie [19], rastrovací elektronová mikroskopie [20] a transmisní elektronová mikroskopie [21] [22] [23] [24] [25] [26]. Některé z těchto technik jsou vhodnější pro kvantitativní analýzu, zatímco jiné slouží k jednoduchému zobrazování [7].

##### **3.1.1. Polarizace**

Jedny z prvních technik pro posuzování orientace mikrofibril byly založeny na různých formách mikroskopie polarizovaným světlem. Vzhledem k tomu, že je celulóza částečně krystalická, a mikrofibrily v každé sekundární vrstvě buněčné stěny jsou vysoce vyrovnány [27], tenká vrstva dřeva je dvojlomná při pohledu mezi dvěma zkříženými polarizačními filtry. Z hlediska průřezu, tento typ mikroskopie může být použit k identifikaci tří sekundárních vrstev buněčné stěny, které mají při různých orientacích průřezu různý jas. Bohužel, tento postup nelze použít pro snadné měření MFA v příčném řezu [28], avšak v podélných úsecích, kde je vrstva dostatečně tenká, aby obsahovala pouze jednu buněčnou stěnu. Zde je možné měřit MFA jako vážený průměr celé sekundární vrstvy [8] [10]. Účinek příčně orientovaných vrstev S1 a S3 je na podílu celé stěny vlákna obecně malý, ale mění se s celkovou tloušťkou buněčné stěny. Tato technika jednoduše zahrnuje otáčení tracheid nebo vláken vzhledem k dlouhé ose vlákna, dokud jasná buněčná stěna neztmavne, takzvaná poloha maximální extinkce (MEP)(Obr. 8).



**Obrázek 8.** Fotka tracheid z polarizačního mikroskopu Borovice montereyké, která ukazuje způsob měření polohy maximálního útlumu (extinkce) světla. Otvor ve dvojtečce umožňuje pozorování jedné buněčné stěny skrze dvojtečku. Tracheida je otáčena ve směru náklonu otvoru dvojtečky (do leva), dokud se stěna buňky viditelná skrze dvojtečku neztmaví do černa. V tomto případě je úhel MFA roven  $18^\circ$  [7].

Obvykle je nutné určit správný směr otáčení (po směru hodinových ručiček nebo proti), aby se zamezilo měření doplňkového úhlu, buď pomocí kompenzátoru, nebo pozorováním okolních děr. Rozdíl mezi osou vlákna a MEP je průměrný MFA, který přibližně odpovídá MFA vrstvy S2, protože S1 a S3 jsou ve srovnání s vrstvou S2 relativně tenké.

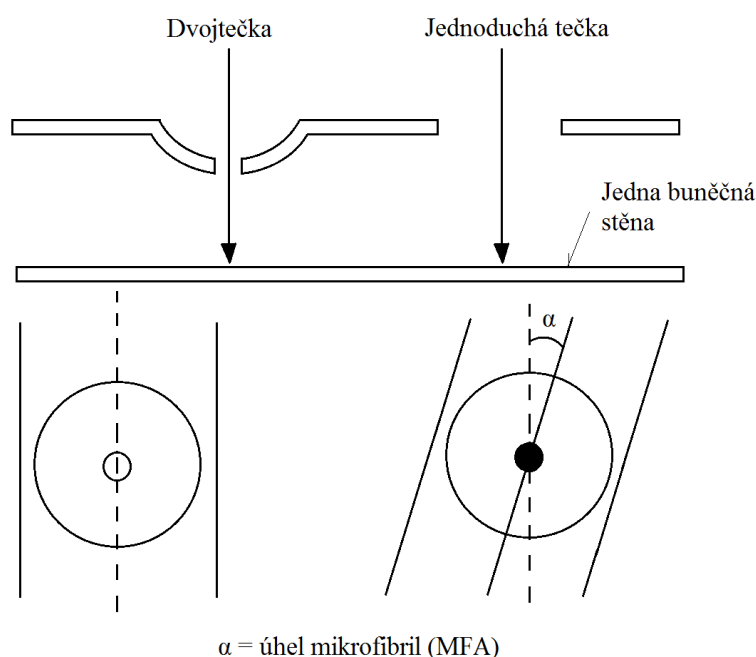
Při měření MFA pomocí polarizace je důležité, aby polarizované světlo procházelo pouze jednou buněčnou stěnou dřevního vlákna, protože druhá strana buněčné stěny by měření zkreslovala. K řešení se přistoupilo různými metodami, které se v průběhu času zjednodušovaly a zdokonalovaly. Metoda Manwillera (1966) [29] používá Sénarmontův kompenzátor pro měření dvojlomnosti na příčných řezech dřevního vlákna. Přestože je tato metoda zdlouhavá, její výhodou je možnost měření úhlu mikrofibril v každé vrstvě buněčné stěny. Metoda Page (1969) [9] zahrnuje impregnaci lumenu rtutí a následné měření reflektance. Rtuť působí jako zrcadlo, tím pádem je měřena pouze jedna tloušťka buněčné stěny. Metoda Laneyho (1981) [11] zahrnuje podélné řezání vlákna, a to opět pro možnost pozorování skrze jednu buněčnou stěnu maximální útlum (extinkci) polarizovaného světla, vzhledem k ose vlákna. Kvůli složité přípravě ale tento postup nelze uplatnit v průmyslu. Kromě toho, protože jsou vlákna v polovině řezána, jejich vlastnosti se mohou od neporušených vláken lišit. Jak Pageova tak Laneyho metoda podléhá chybě

v podobě měření sekundárních vrstev S1 a S3, jak popisují El-Hosseiny a Page (1973) [10].

Cockrellova metoda (1974) [30] zahrnuje měření orientace otvorů dvojteček v tracheidách letního dřeva, což více méně odpovídá úhlu mikro fibril v sekundární vrstvě buněčné stěny S2.

Technika Senfta a Bendtsena (1985) [14] je modifikací Baileyho techniky [13]. Vysušené vzorky nařezané mikrotomem jsou namočený v jodo-draselném roztoku a kyselině dusičné, k dosažení vytvoření krystalů v buněčné stěně tracheid. Krystaly jsou seřazeny v převládajícím směru mikro fibril a mohou být jednoduše pozorovány a měřeny.

Metoda, kterou popsal Donaldson [12], spočívá ve využití dvojteček ve struktuře buněčné stěny. Membrána dvojtečky se odstraní macerací a díky tomu, můžeme nahlédnout skrz otvor dvojtečky na jedinou buněčnou stěnu (obr. 9). Tato metoda byla využita pro stanovení MFA v praktické části této bakalářské práce.



**Obrázek 9.** Obrázek ilustrující techniku použitou k měření úhlu mikro fibril, kdy se na jedinou buněčnou stěnu díváme skrz dvojtečku nebo jednoduchou tečku [12].

Nová metoda, která nepotřebuje jako vzorek jednu buněčnou stěnu, je konfokální bifuorescenční mikroskopie [31] [32] [33]. Tato technika používá přirozenou polarizaci některých fluorescenčních barviv, jako jsou *congo červená* nebo *calcofluor*. Když jsou

navázány na molekuly celulózy, v kombinaci s optickou rozdělovací schopností konfokální mikroskopie, lze provádět měření MEP v rámci S2 vrstvy jednoduše tím, že se na tento prostor soustředí. Vysoké rozlišení čočky je dostatečné pro vyloučení vrstev S1 a S3, pokud je tloušťka buněčné stěny menší než 1  $\mu\text{m}$ . Nevýhodou této metody je nutnost relativně pomalého získávání elektronického obrazu v řadě orientací, kde je MEP vypočtena z grafu jasů oproti orientaci. Vzhledem k tomu, že konfokální zobrazování obvykle vyžaduje elektronický detektor světla a průměrování signálu, je tento postup relativně pomalý, i když jde najednou měřit více vláken v pozorovacím poli. Pro zautomatizované měření buněčných vláken bylo dále použito k charakterizování MFA zobrazovací elipsometrie [34] [35]. Tato metoda není závislá na orientaci vláken a měří spektrální přenosovou funkci vlákna, která může být použita k měření MFA pomocí optického systému založeného na polarizační mikroskopii a spektroskopii. Tato metoda navíc nevyžaduje pro měření jedinou buněčnou stěnu, což z ní dělá ideální měřicí techniku pro komerční využití bez jakýchkoli speciálních příprav vzorků [7].

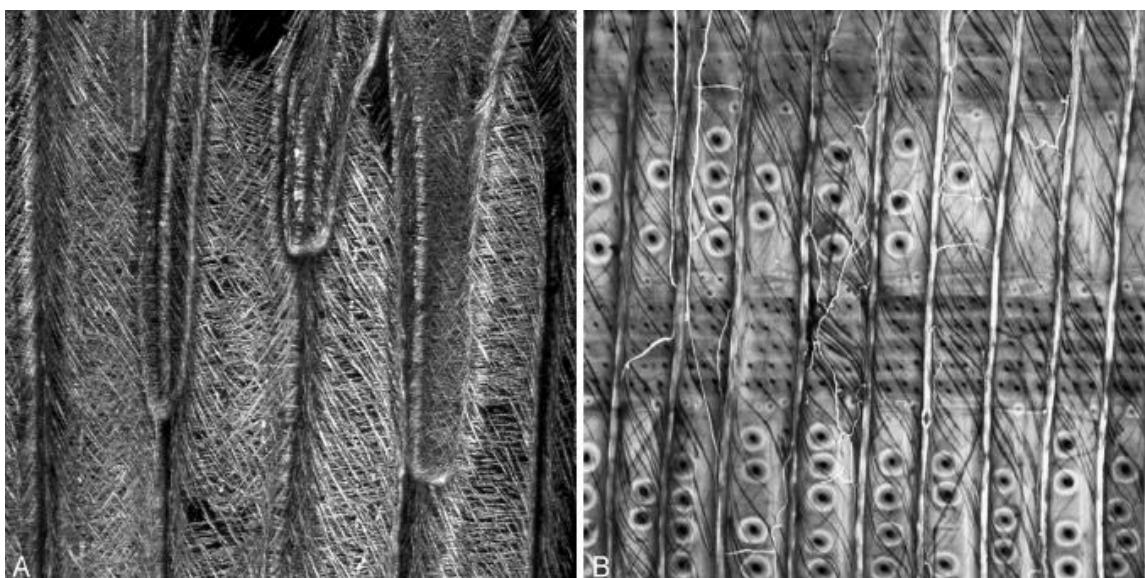
Poslední dobou byl rozšířen přístup jedné buněčné stěny až k jedné buněčné vrstvě uříznutím daleko tenčí vrstvy dřeva za použití ultramikrotomu [36]. Toto je jediná metoda, která umožňuje kvantitativní měření jednotlivých buněčných vrstev včetně vrstev S1 a S3 jednotlivých tracheid.

### **3.1.2. Přímé zobrazování za pomoci fyzikálních nebo chemických metod**

Je relativně snadné přímo zobrazit orientaci mikrofibril na plochách buněčné stěny, a to zejména v případě, že je povrch vytvořen prasknutím, protože to odhaluje „vlákno“ buněčné stěny [17]. K určení MFA není nezbytně nutné vidět přímo jednotlivé mikrofibrily, protože prasklina vytvoří hrubou strukturu povrchu, vytvořenou seskupením mikrofibril nebo lamel, které lze pozorovat ve světlém poli světelného mikroskopu. Vzhledem k tomu, že je poloha prasknuté buněčné stěny nepředvídatelná, může být nezbytné hledání vhodné oblasti, kde jsou odhaleny vrstvy S1 nebo S2. Často je výhodná zlomenina plochy mezi vrstvou S1 a S2 [37]. Nicméně u lomových ploch je odhalení struktury vrstvy S3 daleko méně pravděpodobné. Mikroskopie osvětleného povrchu ale vždy nemusí odhalit jasnou představu o textuře mikrofibril, a to z důvodu husté matrice ve vrstvě S3. Marts [18] používá fluorescenční mikroskopii dělených radiálních ploch k měření MFA vizualizací trhlin na povrchu dřeva. Použitím dřevních vláken, Crosby a Mark [28] použili ultrafialové (UV) záření v kombinaci s fázovým kontrastním

mikroskopem k pozorování mikrotrhlin ve stěně vlákna. V tomto případě pomohlo UV záření k lepšímu rozlišení, ačkoli přesná povaha mikrotrhlin nebyla stanovena. Fázová kontrastní mikroskopie s bílým osvětlením byla rovněž použita pro měření MFA v buněčných vláknech pomocí vizualizace textury mikrofibril [38].

Větší přesnost měření vyžaduje detailnější obraz a techniky jako je konfokální odrazová mikroskopie [17] (obr. 10) nebo elektronová mikroskopie [22], zejména nízkonapěťová rastrovací elektronová mikroskopie (FESEM). Některé výzkumy zkoumaly buněčnou stěnu během růstu, a to před nebo během dřevnatění, a v těchto případech mohly být textury mikrofibril jasně pozorovány a měřeny [39].



**Obrázek 10.** – A: Fotka z konfokální reflektance jódem obarvené Borovice montereyské, ukazující orientaci mikrofibril tracheidy ve vrstvě S1 a S2. Zorné pole 160 x 160  $\mu\text{m}$ . – B: Fotka mírně zetlelého modřínu ukazující orientaci mikrofibril. Zorné pole 500 x 500  $\mu\text{m}$  [7].

Srážení jódem bylo použito k vizualizaci orientace mikrofibril s použitím světelné mikroskopie [13] [14] nebo konfokální mikroskopie [17]. Tato technika se opírá o srážení krystalů jódu v rámci buněčné stěny. Původně se předpokládalo, že krystaly jódu byly uloženy ve velmi malých prasklinách uvnitř buněčné stěny, které byly vyvolané sušením [13] [14]. Nicméně novější studie ukázaly, že krystaly jódu vytvářejí uvnitř buněčné stěny dutiny tím, že stlačují okolní materiál buněčné stěny. Tyto dutiny se mohou objevit v oblastech větší poréznosti uvnitř buněčné stěny, jako je například rozhraní vrstev S1 a S2 [17]. Ačkoli je to užitečné, při srážení jódem musíme mít na paměti některé výhrady. Ne všechny vzorky dřeva reagují stejně dobře, takže krystaly jódu mohou být v buňce

nerovnoměrně rozmístěny, nebo pouze v určitých buňkách, nebo nemusí být přítomny vůbec [7].

Srážení jódem vyžaduje koncentrované kyseliny dusičné, které mohou poškodit drahé světelné zařízení mikroskopu. Krystaly jódu rychle sublimují, takže účinek může zmizet dříve, než může být měření vůbec dokončeno. V modifikaci přímé vizualizace krystalů jódu je místo toho možné vytvářet obrazy dutin vytvořených krystaly za použití konfokální odrazové mikroskopie [17]. Samotné krystaly se snadno odstraní promytím v etanolu. Má to výhodu odstranění těkavých/korozivních chemikálií ze vzorku a zlepšení detailu orientace mikrofibril.

Mechanická fibrilace za použití ultrazvukového zpracování, buď samostatně nebo v kombinaci s chemickým ošetřením, byla taktéž použita k vizualizaci MFA s použitím světelné mikroskopie. Ukázalo se, že *červené kongo* zlepšuje ultrazvukovou fibrilaci buněčných stěn. Nicméně, takový postup může vyvolat jednodušší kontrolu ve větším průměru tracheid s vysokým MFA, což může vést k ovlivnění výsledku. Wang (2001) za použití řady jehličnatých a listnatých dřevin zjistil, že postup s kobaltem a solí mědi zvyšuje fibrilaci působením ultrazvuku, a tím usnadňuje měření MFA ve vyzrálém dřevě [7].

Jak je známo, orientace ohraničených dvojteček je často v závislosti na orientaci, mikrofibril, takže je lze využít k měření MFA. Zkoumáno je především vyzrálé dřevo, protože dvojtečky jsou protáhlé, a tak se snáze měří jejich orientace. Nicméně to může ovlivnit výsledek, protože vyzrálé dřevo má MFA nižší než dřevo mladé.

## **3.2. Použití rentgenové difrakce nebo blízké infračervené oblasti spektroskopie**

### **3.2.1. Rentgenová difrakce**

Možná nejpopulárnější metodou pro měření MFA je v dnešní době rentgenová difrakce [40] [41] [42] [43]. Automatizované zařízení, které je schopné skenování přírůstku buničiny s vysokým prostorovým rozlišením, bylo pro tuto techniku vyrobeno [44]. Několik postupů je schopných interpretovat difrakce z radiálního nebo tangenciálního povrchu dřeva [45]. Způsob navržený Meylanem [46] nicméně vyžaduje oproti jiným metodám kalibraci, zatímco metoda navržená Evansem [43] je v přímém vztahu s MFA, ale s nevýhodou, že přesnost je malá u velmi vysokých úhlů, vzhledem k poměrně slabému difrakčnímu signálu z mladého dřeva [47]. Variační metoda navržená Evansem byla

navržena pro automatizované měření MFA vrstvy S2 za pomoci rentgenové difraktometrie za použití zařízení SilviScan [43] [44] [7](obr. 11).



**Obrázek 11.** Přístroj Silviscan3, použitý k měření MFA pomocí rentgenové difrakce [7].

### 3.2.2. Infračervená spektroskopie

Ke stanovení MFA může být použita blízká oblast infračervené spektroskopie (NIR) skenováním povrchu dřeva na radiální podélné ploše dílčích jader pomocí technik mnohorozměrného modelování [48] [49]. Predikční algoritmus, který využívá různé nenadefinované rysy infračerveného spektra k určení MFA, zahrnuje kompoziční informace o celulóze, ligninu a hemicelulóze. V predikčním vztahu byla dále vyšetřována důležitost hustoty dřeva. Schimleck a Evans [50] zkoumali Borovici montereyskou, kde byla silná korelace mezi hustotou a MFA. Nicméně následující studie, využívající blahovičnick (*Eucalyptus nitens*), kde byla korelace mezi hustotou a MFA špatná, úspěšně předpověděly MFA, čímž naznačili, že korelace s hustotou není důležitá. Přesto že u těchto vzorků byla předpověď méně přesná, bylo to přičítáno úzkému rozmezí hodnot MFA [7].

Pozdější studie [51] za použití borovice potvrdila, že přesná předpověď MFA je možná i přes malou rozmanitost hustoty, s hodnotami  $R^2 = 0,93$  za použití 6 predikčních faktorů. Tato studie nicméně prokázala, že predikce je špatná u hustoty nižší než  $500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  a zlepšuje se s hustotou vyšší [51]. Predikce MFA ve vzorcích s velkými úhly MFA a malou hustotou (juvenilní dřevo) je problematická, protože data z rentgenové difrakce použité ke kalibraci jsou u vysokých úhlů mikrofibril méně přesná.



## 4. Variace MFA

### 4.1. V rámci jednoho stromu

U jehličnanů je rozdílný úhel mikro fibril od dřevě ke kůře, přičemž nejvyšší hodnoty MFA se nacházejí v prvních pěti letokruzích od dřevě v patě stromu [52] [53]. Úhel mikro fibril je vysoký v patě stromu a v dolní části kmene se snižuje po výšce kmene. Nad výškou 7 metrů je přibližně konstantní, ale opět se zvyšuje ke konci kmene [54] [55].

V minulosti už proběhlo několik systematických srovnávání MFA mezi kmenem, větvemi a kořeny. U kořene borovice černé Matsumura a Butterfield [56] zjistili, že vysoké hodnoty MFA byly u 2-3 letokruhu od středu kořene v porovnání s 10-15 letokruhem u kmene. Fukunaga a spol. [57] zkoumali možnost předpovídání úhlu mikro fibril u zralého dřeva kmene z měření u kořene. Po délce i průměru kořene byla zjištěna malá odchylka, a bylo tak možné úhel mikro fibril zralého dřeva kmene předvídat z úhlu mikro fibril kořene. Nicméně u juvenilního dřeva byla korelace menší [7].

U listnatých stromů je obecně méně dat v oblasti měření úhlu MFA, většina měření proběhla u blahovičníků. U druhu *Eucalyptus nitens* se MFA snižuje s výškou stromu, kdy minima dosáhne ve 30-50% výšky, odkud se směrem ke koruně zase zvyšuje [58]. MFA klesá ve směru od dřevě ke kůře, ale na rozdíl od jehličnanů, úhly jsou u dřevě mnohem nižší, většinou 15-20°. U měření 25 stromů *Eucalyptus nitens* bylo dosaženo průměrných hodnot MFA u dřevě 20° a u kůry 14° a to u 15 let starých stromů [7].

### 4.2. Variace MFA mezi stromy

V řadě studií byla pozorována významná odchylka v různorodosti MFA mezi jednotlivými stromy. Rozdíly mezi stromy jsou obecně více patrné u juvenilního dřeva. U jehličnanů budou okolní stromy vykazovat širokou škálu MFA v juvenilním dřevě. Avšak po 15 letech růstu mají stromy porovnatelně nízkou hodnotu MFA [59]. U listnatých dřevin jsou také rozdílné MFA mezi jednotlivými stromy. Asi nejvíce pozoruhodný rozdíl v porovnávání mezi stromy je, že MFA u dřevě kmene je jen o trochu větší než u kůry u 15 let starého *Eucalyptus nitens* [58].

### 4.3. Vlivem prostředí – reakční dřevo

Tlakové dřevo má obecně vyšší MFA než dřevo protilehlé [60], ale u mírně tlakového dřeva, juvenilního tlakového dřeva a u někdy dokonce u zralého silně tlakového dřeva může být MFA stejné nebo velmi podobné jako příslušné dřevo na příslušné protilehlé

straně v rámci jednotlivých letokruhů [61]. V mírně tlakovém dřevě, může být MFA v průměru o 5° vyšší než u protilehlého dřeva, zatímco u silně tlakového dřeva je MFA průměrně vyšší o 8° než u dřeva protilehlého, což bylo stanoveno na Borovici montereyské. Největší pozorovaný rozdíl mezi tlakovým a protilehlým dřevem byl 17° [62].

#### 4.4. Vztah mezi MFA a rozměrem buňky

Již delší dobu je známo, že úhel mikrofibril je v závislosti na délce tracheidy [28]. Nicméně není úplně jasné, zdali jsou tyto parametry kauzálně propojeny, nebo jestli je jejich kovariace pouze náhodná. Wellwood [63] zjistil vyšší korelaci mezi MFA a délkou tracheidy v letním dřevě (-0,67) než u dřeva jarního (-0,35). U *Douglasky tisolisté* Jurburghs [64] ovšem zjistil pouze malou korelaci mezi délkou tracheidy a MFA u *Borovice Elliottii*.

Bylo jen málo studií, které se zabývaly vztahem mezi MFA a tloušťkou buněčné stěny nebo velikostí lumenu, a co je důležitější, porovnávání vztahů u jednotlivých tracheid. U různých druhů borovic Hillet [65] našel vztah mezi tloušťkou stěny tracheidy a MFA. V další studii stanovil tloušťku buněčné stěny jako nejlepší prediktor MFA ( $R^2 = 80\%$ ) mezi dalšími 8 proměnnými jako například stáří stromu, vzdálenost od dřeně, šířka letokruhu, podíl letního dřeva, délka tracheidy a šířka tracheidy a šířka/délka tracheidy. Nicméně všechny tyto proměnné byly významnými prediktory úhlu mikrofibril [7].

### 5. Vliv MFA na vlastnosti dřeva

Úhel mikrofibril (MFA) vrstvy S2 buněčné stěny, je znám jako hlavní determinant mechanických vlastností dřeva, včetně modulu pružnosti (*modulus of elasticity* – MOE) a anizotropního smrštění (podélné a tangenciální) [66]. Watson a Dadswell [67] uvedli, že úhel mikrofibril má významný vliv i na vlastnosti papíru.

#### 5.1. Hustota

MFA vykazuje s hustotou proměnlivý vztah. V některých případech jsou MFA a hustota dřeva v korelaci, v jiných případech zase nejsou [58] [33] [48]. Korelace mezi hustotou a MFA může být vyšší u menšího počtu po sobě jdoucích letokruhů, ale je zajímavé, že tato závislost neplatí mezi stromy navzájem [58].

Je tedy pravděpodobné, že jakýkoli vztah mezi těmito vlastnostmi je tedy čistě náhodný. Nicméně podíl juvenilního a podíl letního dřeva mohou v některých případech hrát roli, protože jsou ve vztahu jak s hustotou, tak s MFA.

## 5.2. Tuhost dřeva

Tuhost dřeva vyplývá z jeho obsahu celulózy a z jejího rozložení v buněčné stěně [68]. Walker a Butterfield [69] uvádějí, že úhel mikrofibril má velký vliv na tuhost dřeva. V souladu s tím, Walker a Cave [68] oznámili, že jediná fyzikální charakteristika dřeva, schopná ovlivnit velké změny v tuhosti dřeva, je úhel celulózových mikrofibril ve vrstvě S2 buněčné stěny. Meylan a Probine [46] také uvádějí, že MFA vrstvy S2 je hlavním ukazatelem kvality dřeva, přičemž jeho hustota je až druhotná.

V experimentu, který provedl Preston [24], bylo pozorováno šesti-násobné zvětšení tuhosti v jarním dřevě smrku sitka, při snížení úhlu mikrofibril z počátečních  $40^\circ$  na  $10^\circ$ . V návaznosti na to pozorovali Walker a Butterfield [69] pěti-násobný nárůst tuhosti u jarního dřeva borovice montereyské, při snížení úhlu mikrofibril ze  $40^\circ$  na  $10^\circ$ .

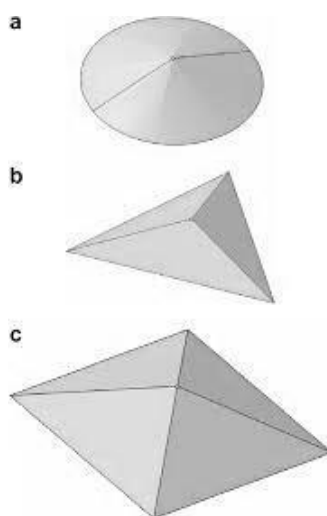
## 5.3. Smrštění

Pro popsání smršťování dřeva, a to hlavně anizotropního smršťování, byly vytvořeny různé modely. Mezi nejpopulárnější patří hypotéza tzv. „vyztužené matice“ navržená Barbrem a Meylanem [70]. MFA je jeden z dominantních parametrů, které mají vliv na anizotropní smršťování. Například u tlakového dřeva se se zvýšeným MFA ukazuje odpovídající zvýšení podélného smrštění [61]. Předpokládá se, že smrštění nastává v matici buněčné stěny pod mezí nasycení vláken, tedy tuhé mikrofibrily jsou kolmo ke smršťování matrice, a jejich orientace tedy přispívá k anizotropnímu smršťování. Buněčné stěny s velmi nízkým MFA mají tendenci k většímu tangenciálnímu smrštění, zatímco buněčné stěny s vysokým MFA mají tendenci k většímu podélnému smrštění. Samotné mikrofibrily se mohou v podélném směru mírně smrstit v důsledku ztráty vody z nekrystalických oblastí, což způsobuje nelinearitu v procesu smrštění [71] [7].

## 6. Stanovení tuhostních parametrů pomocí nanoindentace

Nanoindentace je technika, která určuje mechanické vlastnosti materiálu na submikroskopickém měřítku. Postup zahrnuje pronikání indentoru do zkoušeného vzorku, kdy je měřena hloubka penetrace a zatěžovací síla, z čehož lze následně vypočítat tuhost a tvrdost indentovaného místa. Mezi typické materiály indentoru patří diamant, wolfram,

karbid a safír. Běžně používané tvary indentorů jsou: pyramidální se čtvercovou základnou (Vickers), pyramidální s trojúhelníkovou základnou (Berchovich) a kuželovitý (obr. 12). Hrot indentoru může dosahovat 200 nm v průměru (v případě kuželovitého indentoru) a hloubka penetrace může být až 200 nm, což je rozměrově ve stejném řádu jako tloušťka buněčné stěny. Tím pádem je měření lokálních mechanických vlastností buněčné stěny nanoindentací možné. Přesněji řečeno, test je zaměřen na mechanické vlastnosti vrstvy S2 buněčné stěny, která tvoří asi 80% celkové tloušťky buněčné stěny, čímž se nejvýznamněji podílí na mechanických vlastnostech dřeva [72].



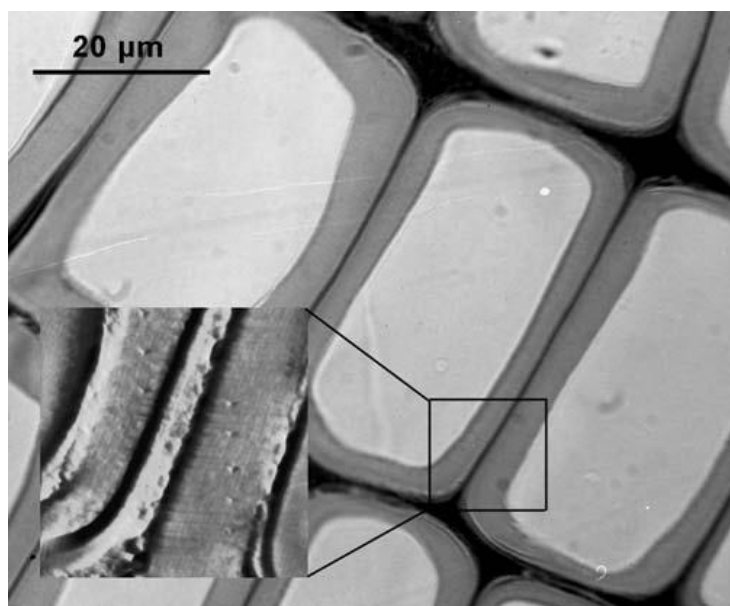
**Obrázek 12.** Geometrie indentorů: (a) kuželovitý; (b) Berchovichův; (c) Vickersův .

Při měření jsou suché vzorky (o tloušťce asi 200  $\mu\text{m}$ ) uloženy do epoxidové pryskyřice namontovány na kovové desky, které jsou magneticky přichyceny na podstavec indentačního zařízení, kde následně probíhá kvazi-statické indentační měření. Špička indentoru je zatěžována silou 250  $\mu\text{N}$ , při rychlosti zatěžování 100  $\mu\text{N/s}$ . Po dobu 15 s probíhá konstantní zatížení a následuje odlehčování rychlostí 100  $\mu\text{m/s}$ . Na obrázku ze světelného mikroskopu (obr. 13) jsou viditelné dřevní buňky s vytlačenými místy po nanoindentaci. Ze zatěžovací křivky, zaznamenané během nanoindentace (obr. 14), jsou odečteny parametry: maximální zatížení ( $P_{\text{max}}$ ), hloubka při maximálním zatížení ( $h$ ) a počáteční sklon odlehčovací křivky ( $S$ ). V souladu s postupem zavedeným Olivierem a Pharrrem [73], který je založen na úvahách podle Doernera a Nixe [74], je určena styčná plocha  $A$  při  $P_{\text{max}}$  a tvrdost je získána podílem  $P_{\text{max}}$  a této plochy  $A$ . Analýza zatěžovací křivky pokračuje stanovením redukovaného modulu pružnosti (Vztah 1).

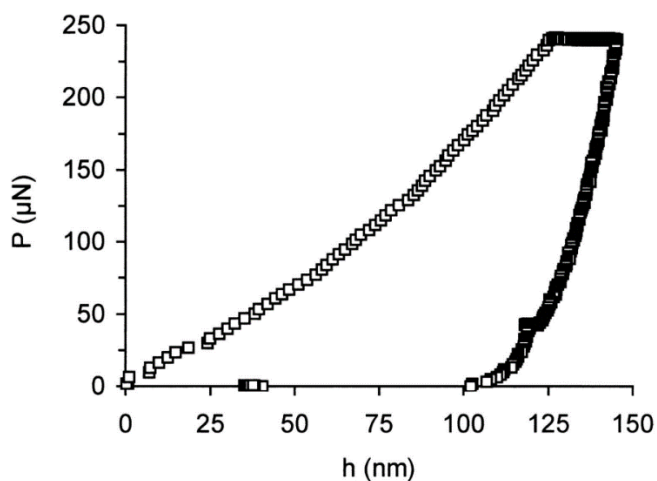
$$E_r = \frac{1}{2} \sqrt{\pi} \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (1)$$

Zde je  $E_r$  nazýván jako redukovaný modul pružnosti, neboť je třeba brát v úvahu shodu indentoru ve vztahu, kde jsou  $E$  modul pružnosti a  $\nu$  Poissonův koeficient vzorku, a  $E_0$  a  $\nu_0$  jsou ty samé vlastnosti indentoru. U měkkých materiálů jako je dřevo, je rozdíl mezi  $E$  a  $E_r$  zanedbatelně malý, takže není nutná korelace dle vztahu 2.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_0^2}{E_0} \quad (2)$$



**Obrázek 13.** UV mikroskopický snímek pořízený při 280 nm tlustém příčném řezu smrku. Vložený snímek ukazuje rozhraní dvou buněk a střední lamely po nanoindentaci [75].



**Obrázek 14.** Indentační křivka zobrazující detekci změny hloubky vtisku na nárůstu zatížení [75].

### 6.1. Závislosti mechanických vlastností zjištěné nanoindentací

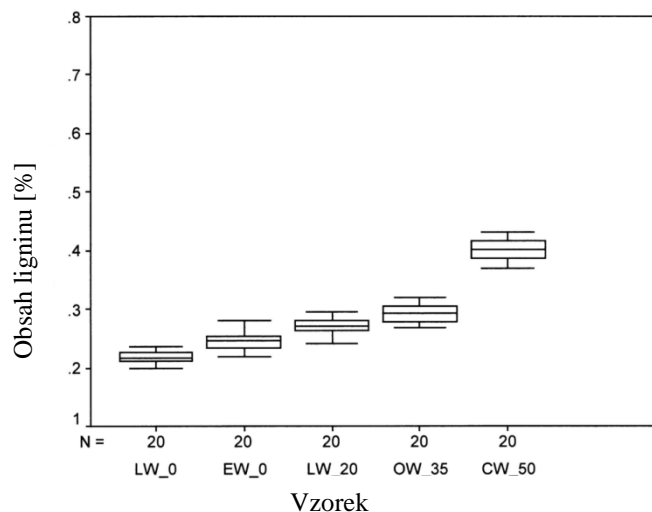
Pro náš účel je výhodné se podívat na výzkum provedený v roce 2004. S cílem prošetření dřeva v co nejširším spektru strukturální variability, byly vybrány vzorky *Smrku ztepilého*, sestávající z letního i jarního dřeva, dále také ze dřeva tlakového a tahového. Ve srovnání s letním dřevem, jarní dřevo *Smrku* je složeno z buněk s širšími rozměry, ale tenčí buněčnou stěnou a kratší délkou buňky. Tlakové dřevo a dřevo tahové najdeme u náhlých kmenů jehličnanů a větví, z nichž první se vyznačuje vysokým obsahem ligninu a vysokým MFA.

Pro měření bylo vyhodnocováno 20 vzorků [75]. Před nanoindentací se u jednotlivých vzorků změřil obsah ligninu a MFA. Jak můžeme vidět v tabulce 3, u vzorků byla velká variabilita. Průměrná hodnota MFA se pohybovala od 0° do 50°.

**Tabulka 3.** Výsledky měření MFA zjištěné rentgenovou difrakcí.

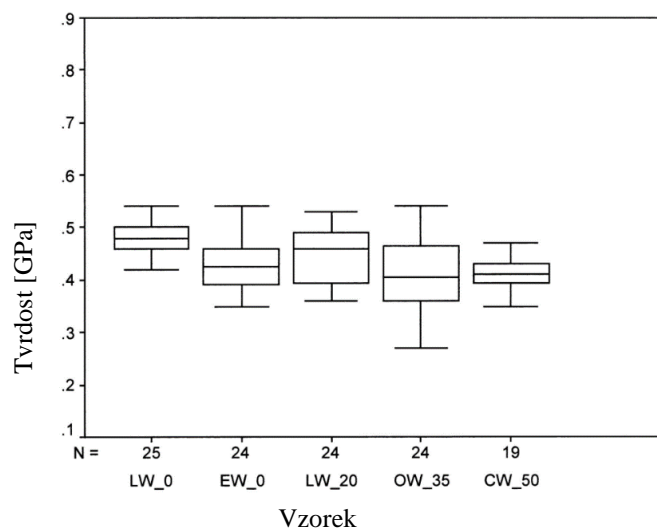
Popis vzorku	Průměrný MFA [°]	Označení vzorku
Jarní dřevo z kmene smrku	0	EW_0
Letní dřevo z kmene smrku	0	LW_0
Letní dřevo z kmene smrku	20	LW_20
Tahové dřevo z větve smrku	35	OW_35
Tlakové dřevo z větve smrku	50	CW_50

Dále byla provedena chemická analýza obsahu ligninu ve vrstvě S2 buněčné stěny a jeho průměrná hodnota je znázorněna v grafu 1. Skupiny vykazují statisticky významný rozdíl v obsahu ligninu, kdy nejnižší obsah ligninu byl pozorován u vzorku LW\_0 (letní dřevo s MFA = 0°), nejvyšší obsah ligninu pak u vzorku CW\_50 (tlakové dřevo s MFA = 50°) s téměř dvojnásobnou hodnotou. Graf 1 ukazuje tendenci růstu obsahu ligninu se zvyšujícím se MFA, s lineárním korelačním koeficientem 0,93.



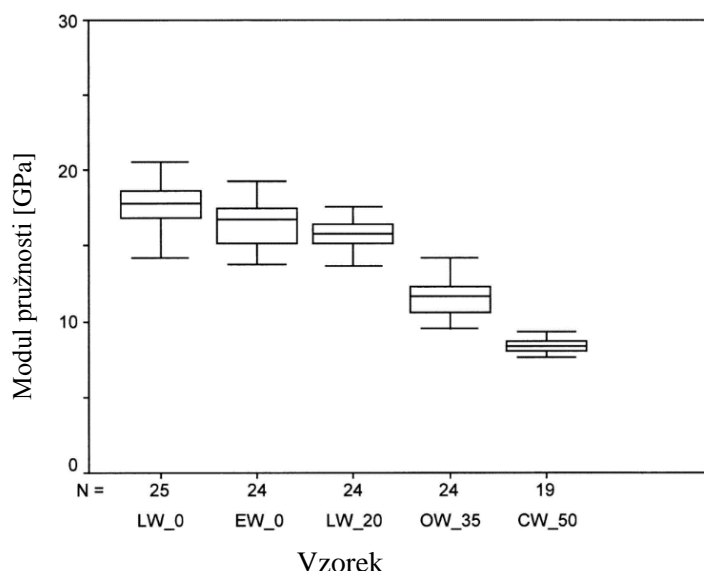
**Graf 1.** Obsah ligninu ve vrstvě S2 buněčné stěny pěti zkoumaných vzorků [75].

Průměrné hodnoty tvrdosti jsou vyobrazeny v grafu 2. Ačkoli je z grafu patrný mírný nárůst tvrdosti se snižující se hodnotou MFA ve vrstvě S2 buněčné stěny, nebyl v tomto případě nalezen žádný statisticky významný rozdíl ve tvrdosti mezi jednotlivými vzorky.



**Graf 2.** Tvrdost zjištěná nanoindentací [75].

Naproti tomu, modul pružnosti vrstvy S2 buněčné stěny zjištěný nanoindentací, ukazuje jasný trend snižování tuhosti se zvyšující se hodnotou MFA (graf 3). Při úhlu mikrofibřil 50° (CW\_50) je modul pružnosti pouze poloviční oproti vzorku LW\_0, který má téměř nulový odklon mikrofibřil. Pokles modulu pružnosti se zvyšující se hodnotou MFA není lineární, ale probíhá po křivce [75].



**Graf 3.** Modul pružnosti zjištěný nanoindentací [75].

## 7. Polarizační mikroskopie

K měření MFA byla v této práci použita metoda polarizovaného světla. Pro pochopení způsobu měření je nezbytné stanovit, na jakém principu tato metoda funguje.

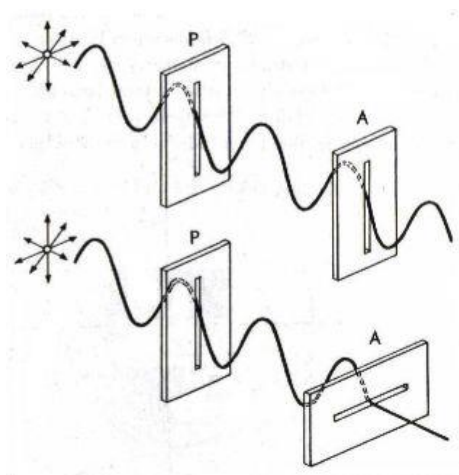
Polarizační mikroskop je zařízení, které slouží ke zviditelnění vzorků, vykazujících dvojlom. K tomuto zviditelnění se využívá skutečnosti, že dvojlomné vzorky obecně produkují elipticky polarizované světlo. Celková struktura zařízení zahrnuje oproti běžnému mikroskopu navíc dva polarizátory, mezi kterými je vzorek umístěn.

Polarizační mikroskop může pracovat s libovolným nastavením zmíněných dvou polarizátorů, které pro přehlednost nesou (po řadě podél cesty světla) označení polarizátor (P) a analyzátor (A), přestože se může jednat o dva identické kusy. Jsou-li roviny těchto polarizátorů k sobě kolmé (polarizátory jsou zkřížené)(obr. 15), je zorné pole mikroskopu temné. Jednolomné látky (voda, cytoplazma, buněčné jádro aj.) zůstávají při zkřížených filtrech tmavé, nejsou tedy zobrazeny. Naproti tomu dvojlomné látky (krystaly, celulózy, buněčné stěny aj.) mění rovinu kmitu procházejícího světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na temném pozadí (obr. 16). Každý polarizovaný paprsek vycházející z polarizátoru se rozkládá při průchodu dvojlomným objektem na dva paprsky, jejichž kmitové roviny jsou k sobě kolmé: jeden kmitá kolmo k rovině analyzátoru a dál tedy neprojde, druhý rovnoběžně s ní. Jen tento druhý paprsek analyzátor propouští, a proto se dvojlomný objekt zobrazuje v temném poli světla, příp. barevně při použití bílého (složeného) světla vlivem interference. Paprsky se tedy rozkládají dvakrát, takže do

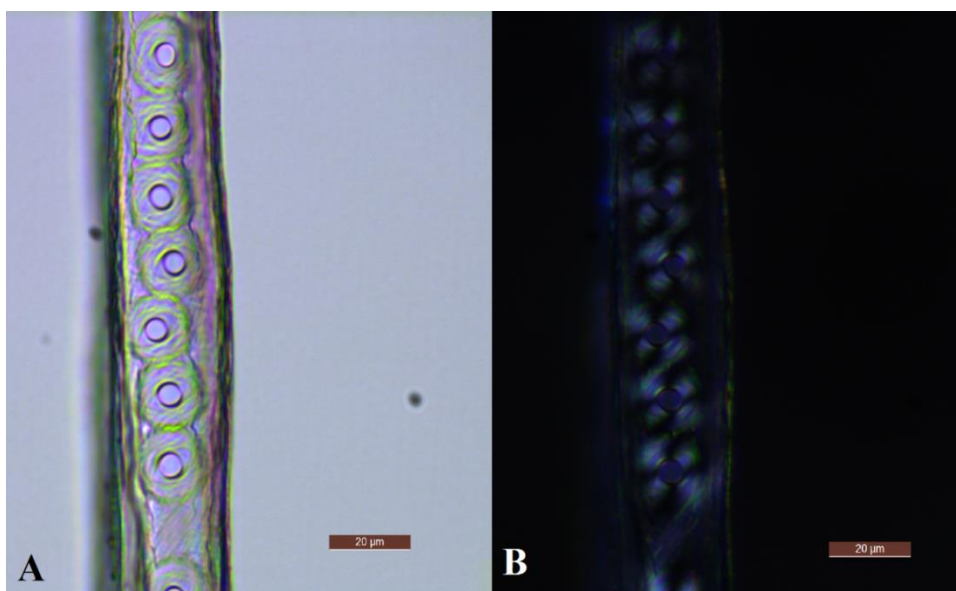


oka se dostane jen čtvrtina původního světelného toku. Proto se užívá silný světelný zdroj a pracuje se v zatemněné místnosti. Otáčením dvojlomného objektu (preparátu) nebo polarizátoru o 360 úhlových stupňů se objekt v zorném poli mikroskopu čtyřikrát rozsvítí a zhasne podle toho, jaký úhel svírá rovina kmitu paprsků vystupujících z objektu k rovině analyzátoru.

Metoda se užívá pro zobrazení lineárně uspořádaných a krystalických buněčných struktur, např. tonofibril, krystalických inkluzí, keratinových a celulózových struktur, výbrusů kostí apod. [76]



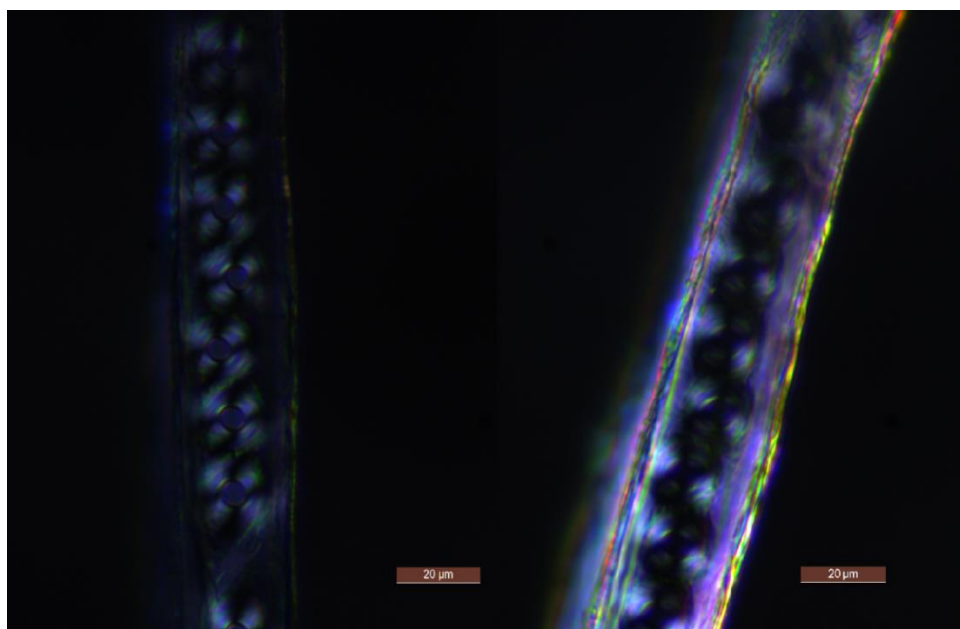
**Obrázek 15.** Model polarizátoru a analyzátoru. Ve druhém případě, kdy jsou poláry ve zkřížené poloze, analyzátor žádné světlo nepropouští.



**Obrázek 16.** A: Fotka tracheidy v procházejícím světle mikroskopu. B: Fotka tracheidy v polarizovaném světle při zkřížených polárech. (Zvětšení 500x, R. Martinek)

Při měření MFA pak pozorujeme skrze dvojtečku jedinou buněčnou stěnu. Pokud máme vlákno ve svislé poloze, jeví se buněčná stěna, viditelná skrze dvojtečku, jako světlé

místo. Pokud budeme tracheidou otáčet, dostaneme se do polohy, kdy bude směr mikrofibril v buněčné stěně rovnoběžný se směrem polarizovaného světla. Toto světlo se tedy nijak nepozmění a analyzátozem, který je nastavený kolmo k polarizátoru, žádné světlo neprojde. Otvor ve dvojtečce se bude jevit jako tmavý (obr. 17).



**Obrázek 17.** Tracheida s dvojtečkami pozorovaná v polarizovaném světle. Ve svislé poloze tracheidy je otvor dvojtečky světlý, při pootočení o úhel  $\alpha$ , který je roven MFA, nastává bod maximální extinkce (MEP), což se projeví ztmavnutím otvoru dvojtečky (R. Martinek).

## 8. Cíl práce

Hlavním bodem praktické části je měření úhlu mikrofibril (MFA) v S2 vrstvě buněčné stěny. Tato vrstva zaujímá více než 80 % celkové tloušťky buněčné stěny, a tak má největší vliv na mechanické vlastnosti dřevní buňky.

Cílem práce je rovněž důkladné popsání metodiky měření MFA pomocí polarizace. Ačkoli je tato metoda známá již od 80. let, naším záměrem je ověření, jak velkou vypovídající hodnotu tato metoda vykazuje. V našich laboratorních podmínkách bude provedena optimalizace postupu stanovení MFA dřeva pomocí polarizace. Tato metoda může být v budoucím výzkumu využita jako metoda srovnávací k dalším možným metodám, které se měřením MFA zabývají. Komparace výsledků obou metod pak přispěje k exaktnějšímu určení MFA sledovaného vzorku dřeva.

Práce je tedy zaměřena na zkoumání mikrostruktury a sub-mikrostruktury dřeva. Zkoumáme a ověřujeme vliv MFA na fyzikální parametry dřeva, konkrétně na pevnost v tlaku ve směru vláken. Dále je měřena průměrná tloušťka letokruhů a tloušťka buněčné stěny jak letního tak jarního dřeva, přičemž i tyto parametry budou následně porovnány se zjištěnými mechanickými vlastnostmi, příp. hodnotou MFA.

## **9. Metodika práce**

V praktické části této práce bylo vyhodnocováno smrkové dřevo (*Picea abies*). Vzorky dřeva byly vybrány náhodně, aby byl rozptýl naměřených hodnot co možná největší, proto dřevo pocházelo z různých stromů. Nejprve byla na 7 vzorcích stanovena pevnost v tlaku ve směru vláken, dále šířka letokruhů a podíl letního dřeva, tloušťka buněčné stěny a nakonec úhel mikrofibril pomocí polarizace. Vyhodnocení spočívalo ve stanovení vlivu MFA na jednotlivé vlastnosti.

### **9.1. Výběr vzorku**

Jako vzorky byly vybrány hranoly smrkového dřeva o velikosti 20 x 20 x 30 mm. Vzorky byly dlouhodobě uloženy v prostředí se stálou teplotou a vlhkostí, aby se zamezil vliv vlhkosti vzorku na jednotlivé zkoušky.

### **9.2. Stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken dle ČSN 49 0110**

#### **9.2.1. Princip**

Principem zkoušky je zatěžování zkušební tělesa a následný odečet maximálního zatížení při jeho porušení v tlaku.

#### **9.2.2. Zkušební postup**

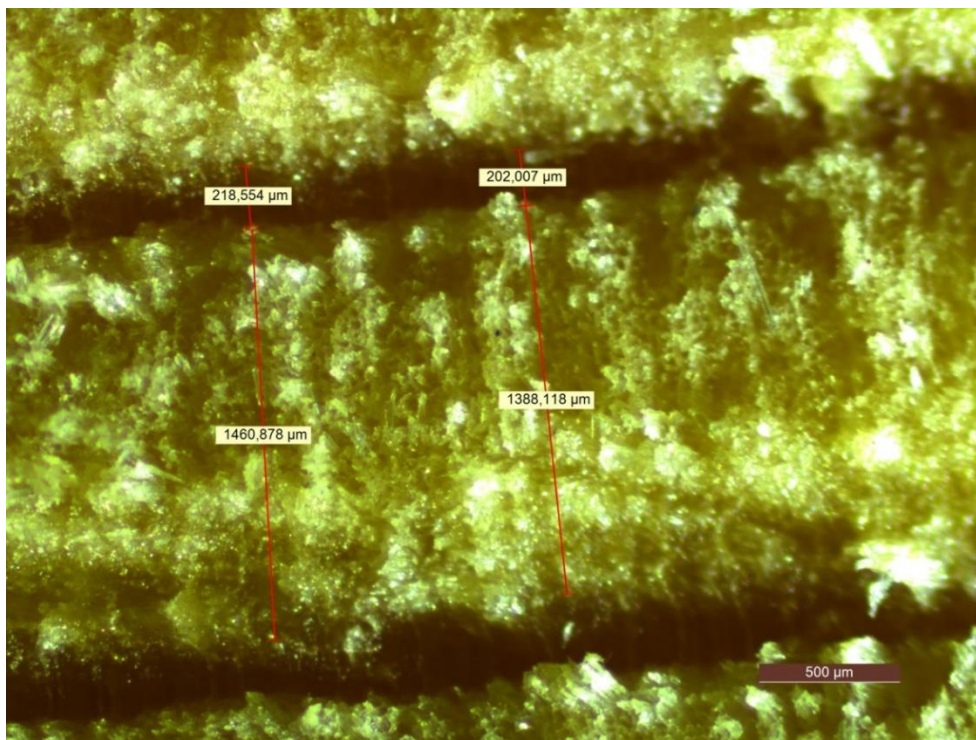
Zkušební tělesa mají tvar pravouhlého hranolu se základnou 20 × 20 mm a délkou ve směru vláken 30 mm. V polovině výšky zkušební tělesa se změří rozměry průřezu s přesností 0,1 mm. Zkušební těleso se vloží do lisu a rovnoměrně se zatěžuje. Přesný popis v příslušné normě [78].

### **9.3. Stanovení šířky letokruhu a podílu letního dřeva**

#### **9.3.1. Postup měření**

Z každého vzorku byl na cirkulační pile uříznut asi 5 mm tlustý příčný řez. Tento řez se položil na sklíčko a vložil do světelného mikroskopu. K měření byl použit mikroskop Leica MD 4000 M LED spolu s příslušným softwarem, který díky kameře na mikroskopu umožňuje zobrazit zorné pole přímo na monitoru. Pořízený snímek si přeneseme do analyzační části programu. Zde si můžeme kolmo na letokruhy proložit přímkou a následně provádět přímo měření pomocí kalibrovaného softwaru. (Obr. 19). Nejprve měříme šířku celého letokruhu a následně šířku letního a jarního dřeva.

Pro stanovení průměrné šířky letokruhů a podílu letního dřeva bylo vyšetřováno 6 letokruhů na každém vzorku.



**Obrázek 18.** Měření podílu letního dřeva ve vzorku pomocí mikroskopu Leica a příslušného softwaru. (zvětšení 25 x)

## 9.4. Tloušťka buněčné stěny

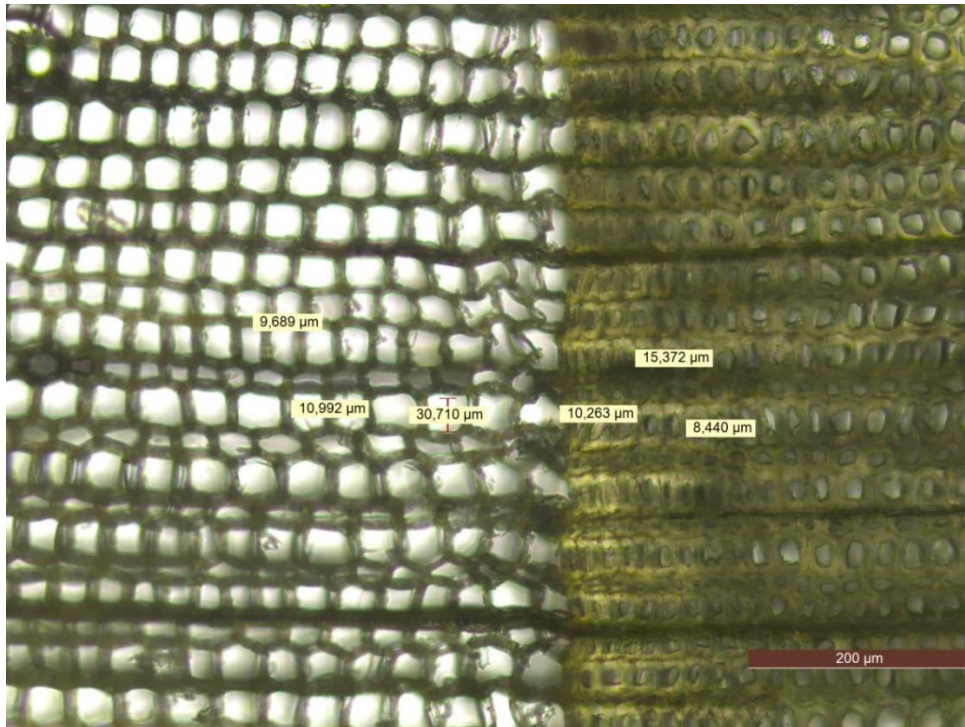
### 9.4.1. Příprava vzorku

Tloušťka buněčné stěny se stanovovala na velmi tenkých příčných řezech jednotlivých vzorků. Vzorky byly nejdříve umístěny na 30 minut do vroucí vody kvůli změknutí, poté byly nařezány žiletkou velmi tenké příčné řezy. Ty se umístily na sklíčka mikroskopu, zakáplí destilovanou vodou a přikryly krycím sklíčkem.

### 9.4.2. Postup měření

Skličko se vzorkem se umístí do mikroskopu. Opět byl použit výše zmiňovaný mikroskop Leica s příslušným softwarem. Díky vyfocení snímku kamerou a následným měřením tloušťky buněčné stěny pomocí analyzačního procesu programu, je postup velmi snadný (Obr. 20).

Při vyhodnocování průměrné tloušťky buněčné stěny bylo měření provedeno na 10 místech příčného řezu jak u letního, tak u jarního dřeva.



**Obrázek 19.** Přechod jarního a letního dřeva u *Smrku*. Znázornění měření tloušťky buněčné stěny. (zvětšení 50 x)

## 9.5. Stanovení úhlu mikrofibril

### 9.5.1. Příprava vzorku

Příprava vhodného vzorku pro měření pomocí polarizace je poměrně časově i technicky náročná. Nejprve je vhodné si vzorek umístit na 30 min do vroucí vody kvůli jeho změknutí. Poté se vzorek lehce osušil a následovalo podélné řezání vzorku žiletkou. Řez je nutné provést co nejtenčí a především rovnoběžný se směrem vláken.

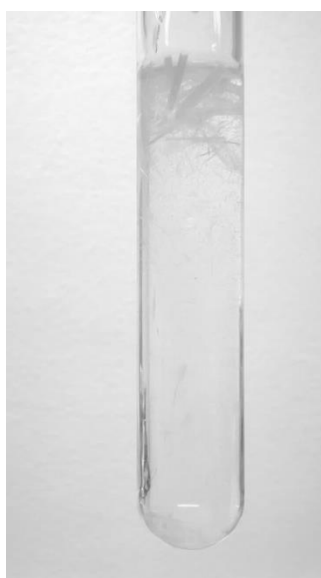
Následuje příprava maceračního roztoku. Ten se skládá z peroxidu vodíku a kyseliny octové v poměru 1:1. Roztok si připravíme do zkumavek nebo lahvíček a jednotlivé nařezané vzorky do nich umístíme (obr. 21). Takto nachystané vzorky zahříváme po dobu 12 hodin na 60 °C. V našem případě se pro udržení stálé teploty osvědčila sušárna, nicméně je nutné lahvičky zašpuntovat, jinak hrozí odpaření maceračního roztoku. Tímto způsobem se vzorky delignifikují, což usnadní oddělení jednotlivých vláken (obr. 22).



**Obrázek 20.** Vzorky umístěné v maceračním roztoku.

Po 12 hodinách jsou vlákna opláchnuta destilovanou vodou kvůli odstranění macerace. Pipetou nabereme několik tracheid i s roztokem a pipetu vyprázdníme do nachystané destilované vody. Tento postup ještě jednou opakujeme pro důsledné vypláchnutí. Pipetou poté opět nabereme tracheidu spolu s destilovanou vodou a umístíme jej na podložní sklíčko. Přebytečnou vodu zase zpětně pipetou odsajeme. Vzorek nepříkryjeme krycím sklíčkem, ale necháme vlákno vyschnout. Voda by mohla polarizační měření negativně ovlivnit.

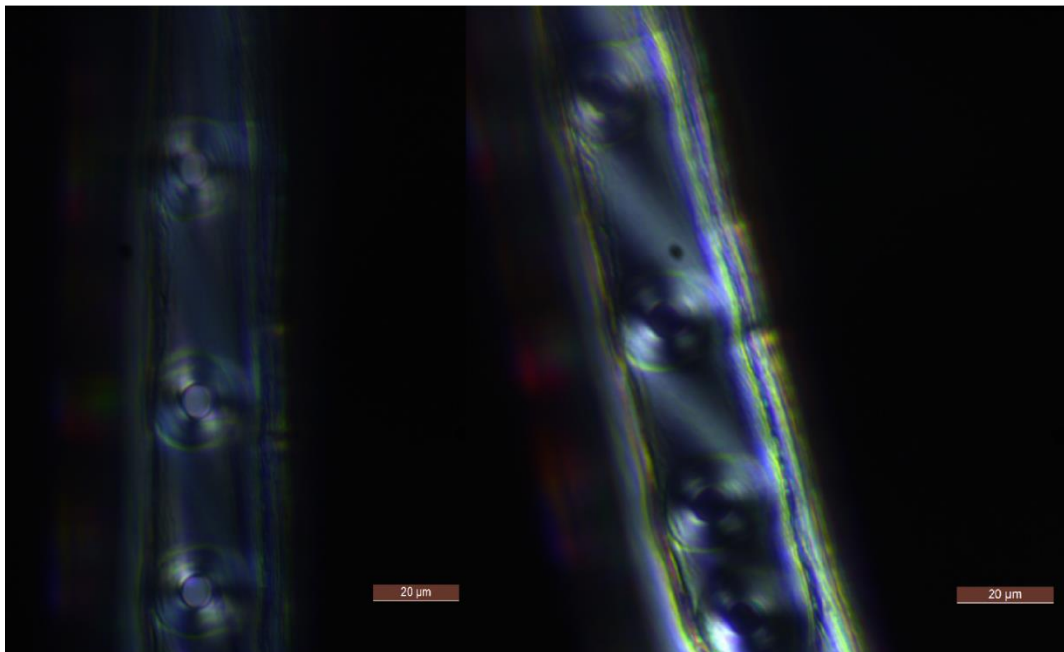
Z každého ze sedmi vzorků byly pro měření MFA vybrány 3 tracheidy z podélných řezů a to dva na protilehlých krajích a jeden uprostřed vzorku.



**Obrázek 21.** Delignifikovaný vzorek dřeva po 12 hodinách v macerátu. Jednotlivé tracheidy jsou viditelné pouhým okem.

### 9.5.2. Měření MFA

Skříčko se vzorkem umístíme do polarizačního mikroskopu. V našem případě do mikroskopu Leica. Při procházejícím světle najdeme tracheidu a identifikujeme dvojtečky. Poté nastavíme polarizační filtry do zkřížené polohy. Okolí je tmavé, ale tracheida se jeví světlá. Tracheidu si pootočíme do svislé polohy. Úhel mikrofibril se pozoruje skrze dvojtečku v buněčné stěně vlákna. Začneme otáčet podložkou mikroskopu a sledujeme, kdy se otvor dvojtečky dostane do maximální exktinkce (MEP)(obr. 23), neboli maximálního útlumu světla. V této pozici odečteme úhel na stupnici otočné podložky mikroskopu. Rozdíl mezi osou vlákna a MEP je průměrný MFA, který přibližně odpovídá MFA vrstvy S2, protože S1 a S3 jsou ve srovnání s vrstvou S2 relativně tenké, takže nemají významný efekt na měření sklonu mikrofibril vrstvy S2.



**Obrázek 22.** Měření MFA – v tomto případě je úhel mikrofibril  $16^\circ$ . (Zvětšení 500 x)



## 10. Výsledky zkoušek a jejich vyhodnocení

V praktické části této práce bylo přistoupeno k měření pevnosti smrkového dřeva ve směru vláken, následné měření tloušťky letokruhů, podílu letního dřeva a tloušťky buněčné stěny jak u letního, tak u jarního dřeva vzorků.

### 10.1. Stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken dle ČSN 99 0110

Na sedmi vzorcích byla provedena zkouška pevnosti v tlaku ve směru vláken. Pevnosti nabývaly hodnot od 46,5 MPa do 64,0 MPa (tab. 4). Vzorky byly dlouhodobě uloženy v prostředí se stálou teplotou a vlhkostí. Jejich vlhkost se pohybovala mezi 9,1 % až 9,3 %.

**Tabulka 4.** Naměřené hodnoty pro stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken.

Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7
Pevnost v tlaku ve směru vláken [MPa]	55,0	60,0	47,0	64,0	46,5	64,0	61,5

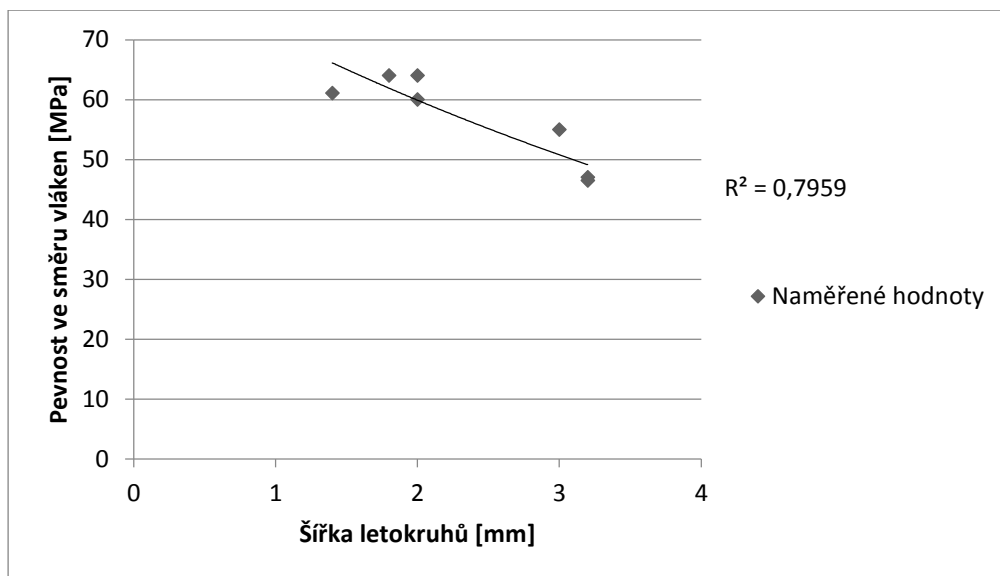
### 10.2. Stanovení šířky letokruhu a podílu letního dřeva

Jak můžeme vidět v tabulce 5, průměrná šířka letokruhu se u vzorků poměrně hodně lišila. Nejmenší průměrná šířka byla naměřena 1,4 mm, největší pak 3,2 mm, což je více než dvojnásobná hodnota. Podíl letního dřeva nabýval hodnot od 21,1 % do 43,7 %.

**Tabulka 5.** Naměřené hodnoty šířky letokruhů a podíly letního dřeva.

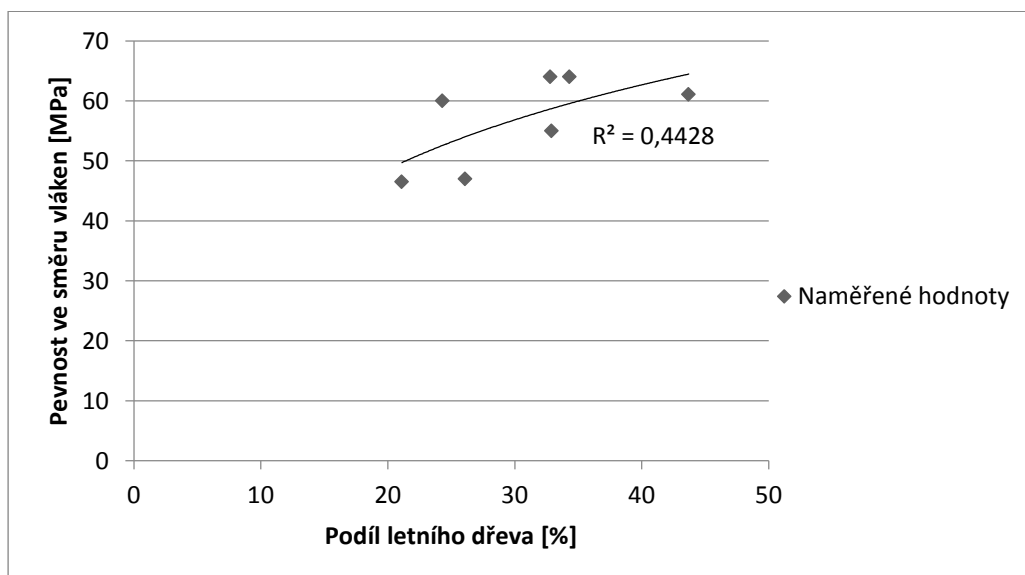
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7
Průměrná šířka letokruhu [mm]	3,0	2,0	3,2	2,1	3,2	1,8	1,4
Podíl letního dřeva [%]	32,9	24,3	26,1	34,3	21,1	32,8	43,7

První pozorovanou závislostí byla pevnost dřeva ve směru vláken s tloušťkou letokruhů (graf 4). Zde můžeme pozorovat jistou závislost – s větší šířkou letokruhů klesá pevnost. Závislost má korelační koeficient roven 0,7959. Při největší průměrné šířce letokruhu 3,2 mm byla pevnost nejnižší (46,5 MPa), zatímco při průměrné tloušťce letokruhu 1,4 mm byla pevnost o více jak 14 MPa vyšší (61,1 MPa).



**Graf 4.** Závislost pevnosti ve směru vláken na šířce letokruhů.

Očekávali jsme, že na pevnost dřeva bude mít významný vliv podíl letního dřeva. Ovšem u malého počtu vzorků jsme příliš velké závislosti těchto dvou proměnných nedosáhli (graf 5). Podíl letního dřeva se pohyboval v rozmezí 21,1 % až 43,7 %. Nejmenší pevnosti byly zaznamenány u vzorků s nižším podílem letního dřeva, nicméně korelační koeficient ( $R^2 = 0,4428$ ) silnou závislost neukázal.



**Graf 5.** Závislost pevnosti ve směru vláken na podílu letního dřeva.

### 10.3. Tloušťka buněčné stěny

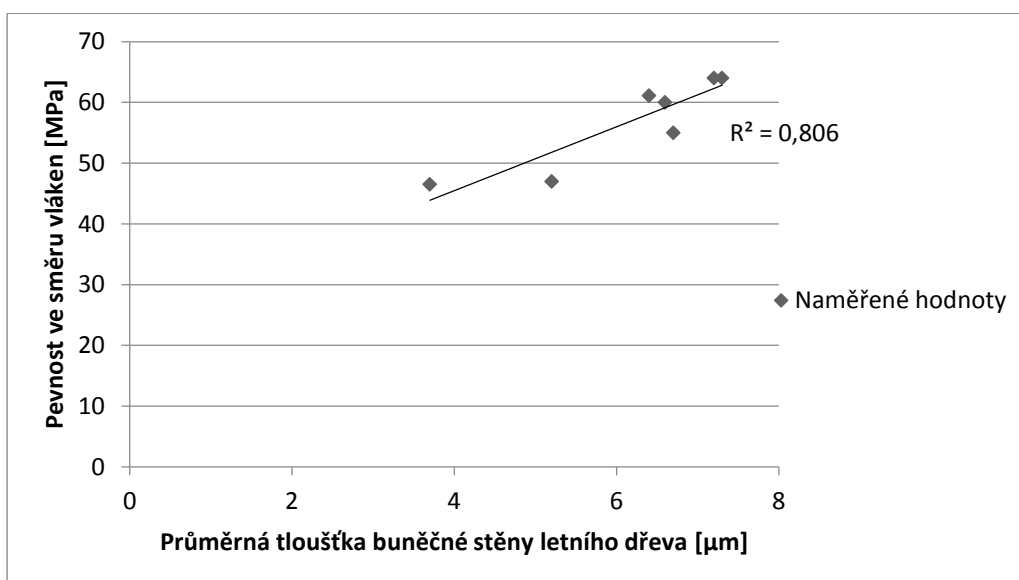
Průměrná tloušťka buněčné stěny jednotlivých vzorků letního dřeva byla v rozmezí 3,7  $\mu\text{m}$  až 7,3  $\mu\text{m}$ . U jarního dřeva nabývala hodnot od 2,9  $\mu\text{m}$  do 5,3  $\mu\text{m}$ . Můžeme vidět,

že průměrná tloušťka buněčné stěny všech vzorků je vyšší u letního dřeva (6,3  $\mu\text{m}$ ) než u dřeva jarního (4,1  $\mu\text{m}$ ). Buňky letního dřeva mají navíc ve srovnání s jarním dřevem menší lumen (obr. 20), takže se letní dřevo významněji podílí na celkových pevnostech.

**Tabulka 6.** Naměřené průměrné hodnoty tloušťky buněčné stěny.

Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7
Průměrná tloušťka buněčné stěny letního dřeva [ $\mu\text{m}$ ]	6,7	6,6	5,2	7,2	3,7	7,3	6,4
Průměrná tloušťka buněčné stěny jarního dřeva [ $\mu\text{m}$ ]	5,3	4,1	4,2	4,1	2,9	4,5	3,7

Jak můžeme pozorovat v grafu 6, průměrná tloušťka buněčné stěny letního dřeva významně ovlivňuje pevnost dřeva ve směru vláken. Tato lineární korelace má koeficient 0,806. Při tloušťce buněčné stěny 3,7  $\mu\text{m}$  byla pevnost nejnižší (46,5 MPa), naopak nejvyšší pevnost jsme naměřili u vzorku s téměř dvojnásobnou průměrnou tloušťkou buněčné stěny letního dřeva (7,3  $\mu\text{m}$ ). Při stanovení závislosti tloušťky buněčné stěny u dřeva jarního s pevností dřeva ve směru vláken nebyla nalezena téměř žádná závislost ( $R^2 = 0,138$ ).



**Graf 6.** Závislost tloušťky buněčné stěny na pevnosti ve směru vláken.

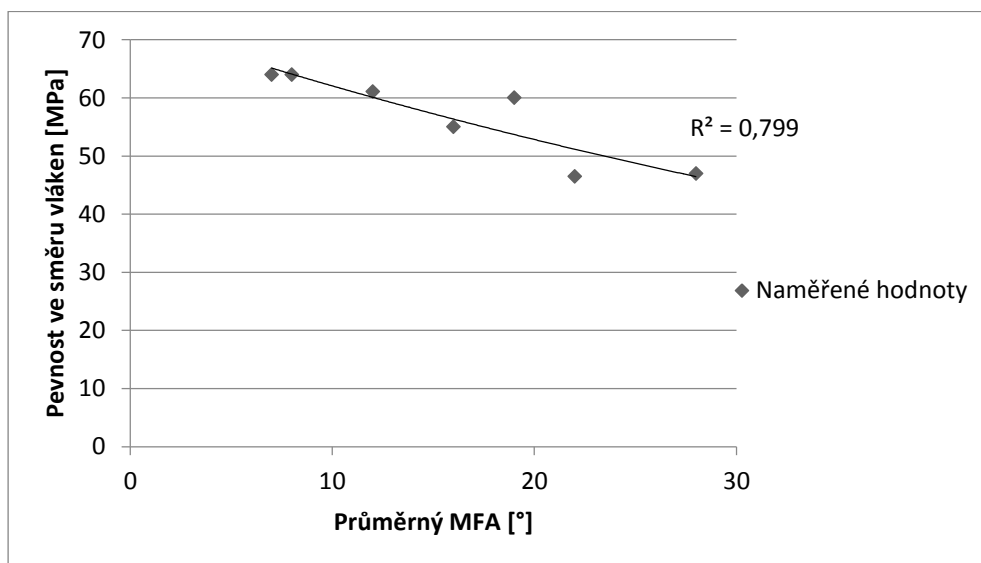
#### 10.4. Stanovení úhlu mikrofibril

Pomocí polarizační mikroskopie byly zjištěny úhly mikrofibril u jednotlivých vzorků. Podle očekávání byl rozptyl hodnot poměrně široký. Hodnoty MFA byly naměřeny v rozmezí od 5° do 49°.

**Tabulka 7.** Naměřené hodnoty MFA.

Vzorek č.	MFA [°]			Průměrný MFA [°]
1	14	25	8	16
2	20	12	24	19
3	49	18	16	28
4	5	9	7	7
5	17	19	30	22
6	6	9	8	8
7	5	16	15	12

Hlavní porovnávanou závislostí této práce je vztah MFA k pevnosti smrkového dřeva ve směru vláken. Jak můžeme vidět v grafu 7, se zvyšující se hodnotou MFA pevnost dřeva klesá. Tento trend má korelační koeficient  $R^2 = 0,799$ , což ukazuje poměrně silnou závislost. Vzorek s průměrným MFA = 7° vykazuje pevnost o 17 MPa větší, než vzorek s průměrným MFA = 28°. Tuto závislost jsme očekávali, při vyšším počtu vzorků by bylo pravděpodobně dosaženo ještě vyššího korelačního koeficientu.



**Graf 7.** Závislost pevnosti ve směru vláken na úhlu mikrofibril.

## 11. Závěr

Cílem této práce bylo bližší poznání mikrostruktury a sub-mikrostruktury dřeva. Hlavním bodem bylo měření úhlu mikrofibril v sekundární vrstvě buněčné stěny. Tato vrstva zaujímá více než 80 % celkové tloušťky buněčné stěny, a má tedy největší vliv na mechanické vlastnosti dřevní buňky.

V teoretické části práce byly z vědeckých rešerší popsány metody, jimiž lze stanovovat úhel mikrofibril ve vrstvě S2 buněčné stěny. Z rešerší vyplynulo, že každá z těchto metod má jinou vypovídající hodnotu. Z tohoto zjištění vyplývá, že by pro exaktní určení MFA bylo vhodné ověřit zjištěné hodnoty provedením minimálně dvou různých měřících metod a provést komparaci dosažených dat. Pro účely bakalářské práce byla vybrána jedna ze základních metod měření MFA, metoda polarizace. U této metody se provedla podrobná analýza dosažených výsledků z vědeckých prací a byl důkladně rozebrán způsob měření MFA touto metodou. Polarizační metoda pak byla využita pro stanovení MFA v praktické části práce. Dále byla v teoretické části popsána metoda nanoindentace, která je vhodná ke zjišťování tuhostních parametrů materiálů na velmi malém měřítku, tzn. že ji lze využít při stanovení tuhostních parametrů buněčné stěny.

Praktická část této práce byla věnována měření MFA smrkového dřeva pomocí polarizace. Pro zjištění případných závislostí na hodnotě MFA byly na sedmi vzorcích nejprve stanoveny pevnosti v tlaku ve směru vláken. Ty se pohybovaly od 46,5 MPa do 64,0 MPa. Poté bylo přistoupeno k měření mikroskopických parametrů dřeva, jako jsou tloušťka letokruhů, podíl letního dřeva a tloušťka buněčné stěny jak jarního tak letního dřeva. Dále byly u každého vzorku provedeny tři měření MFA v sekundární stěně pomocí polarizovaného světla. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 5 do 49°. Výsledná hodnota MFA vzorku je průměrem těchto třech měření. Silná závislost ( $R^2 = 0,799$ ) byla zjištěna u vlivu MFA na pevnosti ve směru vláken. Se zvyšující se hodnotou MFA pevnost klesá. Při průměrné hodnotě MFA = 7° byla naměřena nejvyšší pevnost (64 MPa). Se zvýšenou hodnotou MFA (22°) klesla výsledná pevnost o 27 % (46,5 MPa). Další výrazná závislost ( $R^2 = 0,7959$ ) byla zjištěna u vlivu tloušťky letokruhů na pevnost dřeva, s menší tloušťkou letokruhu pevnost roste. Rovněž tloušťka buněčné stěny letního dřeva vykazala významnou závislost s korelačním koeficientem  $R^2 = 0,806$  na pevnosti v tlaku ve směru vláken smrkového dřeva. S větší tloušťkou buněčné stěny letního dřeva pevnost vykazala nárůst.

Touto prací jsme si ověřili, že jsme v našich laboratorních podmínkách schopni měřit MFA s dobrou vypovídající hodnotou. Přestože je tato metoda poměrně časově náročná, její výsledky jsou velmi přínosné při vyhodnocování pevnostních závislostí na této důležité proměnné. Při dalším výzkumu bude vhodné porovnat měření MFA polarizací s jinými metodami měření, například s rentgenovou diffrakcí.

## 12. Bibliografie

1. **BURGERT, I.** Exploring the micromechanical design of plant cell walls. . *American Journal of Botany*. 2006, Sv. 93(10), 1391-1401.
2. **Butterfield B, Meylan B.** *Three-dimensional structure of wood: an ultrastructural approach*. New York : Chapman and Hall, 1980. ISBN 0412163209.
3. **BOWYER, Jim L, Rubin SHMULSKY a John G HAYGREEN.** *Forest products and wood science: an introduction*. Ames, Iowa : Blackwell, 1996. ISBN 0813820367.
4. **WALKER, J.C.F.** *Primary Wood Processing Principles and practice*. Dordrecht : autor neznámý, 2006. ISBN 9781402043932.
5. **Tsoumis, G.** *Science and technology of wood - structure, properties, utilization*. [IAWA JOURNAL] New York : Van Nostrand Reinhold, 1992. ISSN 0928-1541.
6. **Bruce J. Zobel, Jackson B. Jett.** *Genetics of Wood Production*. Berlin : Springer Berlin Heidelberg, 1995. ISBN 9783642795145.
7. **Donaldson L.A.** Microfibril Angle: Measurement, Variation and Relationships – A Review. *IAWA*. 2008, Sv. 29 (4), 2008: 345–386.
8. **D., Preston R.** Organization of the cell wall of the conifer tracheids. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.198/rstb.1934.0017>. [Online] 12. December 1934. ISSN 0962-8436.
9. **H., Page D.** A method for determining the fibrillar angle in wood tracheids. *J. Microscopy* . 1969, Sv. 90: 137-143.
10. **H., El-Hosseiny F. and Page D.** The measurement of fibril angle of wood fibres using polarised light. *Wood and Fibre* . 1973, Sv. 5: 208–214.
11. **Lawrenc, Leney.** A technique for measuring fibril angle using polarised light. *Wood Fibre* . January 1981, Sv. 13:13-16.
12. **A., Donaldston L.** The use of pit apertures as windows to measure microfibril angle in chemical pulp fibres. *Wood Fibre Scientific*. 1991, 23:290-295.
13. **Bailey, I.W. & M.R. Vestal.** *The orientation of cellulose in the secondary wall of tracheary cells*. *J. Arnold Arbor*. 18: 185–195. 1937.
14. **Senft, J.F. & B.A. Bendtsen.** Measuring microfibrillar angles using light microscopy. *Wood Fibre Sci.* . 1985, Sv. 17: 564–567.
15. **L., Huang C.** Revealing fibril angle in wood sections by ultrasonic treatment. *Wood Fibre Sci.* . 1995, Sv. 27:49-54.
16. **A., Anagnost.** Utilisation of soft-rot cavity orientation for the determination of microfibril angle. Part 1. *Wood Fibre Sci.* 2000, Sv. 32: 81–87.

17. **Donaldson, L.A. & A. Frankland.** Ultrastructure of iodine treated wood. *Holzforschung* . 2004, Sv. 58: 219–225.
18. **O., Marts R.** Fluorescence microscopy for measuring fibril angles in pine tracheids. *Stain Technology* . 1995, Sv. 30:243-248.
19. **Pleasants, S., W.J. Batchelor & I.H. Parker.** Measuring the fibril angle of bleached fibres using micro-Raman spectroscopy. *Appita J.* . 1998, Sv. 51: 373–376.
20. **Meylan, B.A. & B.G. Butterfield.** Helical orientation of the microfibrils in tracheids, fibres and vessels. *Wood Sci. Technol.* . 1978, Sv. 12: 219–222.
21. **Wardrop, A.B. & R.D. Preston.** Organisation of the cell walls of tracheids and wood fibres. *Nature* . 1947, Sv. 160: 911–913.
22. **Hodge, A.J. & A.B. Wardrop.** An electron microscopic investigation of the cell wall organisation of conifer tracheids and conifer cambium. *Aust. J. Sci. Res.* . 1950, Sv. B 3: 265–269.
23. **Frei, E., R.D. Preston & G.W. Ripley.** The fine structure of conifer tracheids. VI. Electron microscope investigations of sections. *J. Exp. Bot.* 1957, Sv. 8: 139–146.
24. **Preston, R.D.** *Interdisciplinary approaches to wood structure.* In *W.A. Côté (ed.), Cellular ultrastructure of woody plants: 1–31.* Syracuse University Press. 1965.
25. **Dunning, C.E.** Cell wall morphology of longleaf pine latewood. *Wood Sci.* . 1968, Sv. 1: 65–76.
26. **Donaldson, L.A. & P. Xu.** Microfibril orientation across the secondary cell wall of radiata pine tracheids. *Trees* . 2005, Sv. 19: 644–653.
27. **Müller, M., C. Czihak, G. Vogl, P. Fratzl, H. Schober & C. Riekell.** Direct observation of microfibril arrangement in a single native cellulose fibre by microbeam small-angle X-ray scattering. *Macromolecules* . 1998, Sv. 31: 3953–3957.
28. **Crosby, C.M., C. DeZeeuw & R. Marton.** Fibrillar angle variation in red pine determined by senarmont compensation. *Wood Sci. Technol.* 1972, Sv. 6: 185–195.
29. **G. Manwiller F.** Sinarmont compensation for determining fibril angles of cell wall layers. *For. Prod. Journal.* 1966, Sv. 16(10):26-30.
30. **R.A., Cockrell.** Comparison of latewood pits, fibril orientation and shrinkage of normal and compression wood of giant sequoia. *Wood Sci. Technol.* 6:58. *Wood Science Technol.* 1974, Sv. 6:58.
31. **Verbelen, J.P. & D. Stickens.** In vivo determination of fibril orientation in plant cell walls with polarization CSLM. *J. Microscopy* . 1995, Sv. 177: 16.



32. **Jang, H.F.** Measurement of fibril angle in wood fibres with polarization confocal microscopy. *J. Pulp & Paper Sci.* . 1998, Sv. 24: 224–230.
33. **Bergander, A., J. Brändström, G. Daniel & L. Salmén.** Fibril angle variability in earlywood of Norway spruce using soft rot cavities and polarisation confocal microscopy. *Journal Wood Science.* 2002, Sv. 48: 255–263.
34. **Ye, C. & O. Sundström.** Determination of S2 fibril angle and fibre wall thickness by microscopic transmission ellipsometry. *Tappi* . 1998, Sv. 80: 181–190.
35. **Ye, C. a, b.** Measurement of the microfibril angle and path difference of intact pulp fibres by spectroscopic imaging ellipsometer. *Nordic Pulp & Paper Res. J.* . 2006, Sv. 21: 520–526.
36. **Donaldson, L.A. & P. Xu.** Microfibril orientation across the secondary cell wall of radiata pine tracheids. *Trees* . 2005, Sv. 19: 644–653.
37. **Donaldson, L.A.** Cell wall fracture properties in relation to lignin distribution and cell dimensions. *Wood Sci. Technol.* 1995, Sv. 29: 51–63.
38. **Peter, G.F., D.M. Benton & K. Bennett.** simple direct method for measurement of microfibril angle in single fibres using differential interference contrast microscopy. *J. Pulp Paper Sci.* . 2003, Sv. 29: 274–280.
39. **Abe, H., J. Ohtani & K. Fukazawa.** FE-SEM observations on the microfibrillar orientation in the secondary wall of tracheids. *IAWA Bull. n.s.* . 1991, Sv. 12: 431–438.
40. **Cave, I.D.** Theory of X-ray measurement of microfibril angle in wood. *For. Prod. Journal.* 1996, Sv. 16:37–42.
41. —. Theory of X-ray measurement of microfibril angle in wood. *Wood Sci. Technol.* 1997, Sv. 31: 143–152.
42. **Boyd, J.D. 1977b.** Interpretation of X-ray diffractograms of wood for assessments of microfibril angles in fibre cell walls. *Wood Sci. Technol.* . 1997, Sv. 11: 93–114.
43. **Evans, R.** A variance approach to the X-ray diffractometric estimation of microfibril angle in wood. *Appita Journal* . 1999, Sv. 52: 283–294.
44. **Evans, R., M. Hughes & D. Menz.** Microfibril angle variation by scanning X-ray diffractometry. *Appita Journal.* 1999, Sv. 52: 363–367.
45. **Cave, I.D.** The anisotropic elasticity of the plant cell wall. *Wood Sci. Technol.* . 1968, Sv. 2: 268-278.
46. **Meylan, B.A. and M.C. Probine.** Microfibril angle as a parameter in timber quality assessment. *Forest Products Journal.* 1969, Sv. 19(4): 30-34.

47. **Cave, I.D. & W. Robinson.** *Measuring microfibril angle distribution in the cell wall by means of X-ray diffraction.* In: B.G. Butterfield (ed.), *Microfibril angle in wood: 94–107.* University of Canterbury, Christchurch, New Zealand. 1998.
48. **Schimleck, L.R., R. Evans, & J. Ilic.** Application of near infrared spectroscopy to a diverse range of species demonstrating wide density and stiffness variation. *IAWA.* 2001, Sv. 22 (4), 415-429.
49. **Schimleck, L.R. & R. Evans.** Estimation of microfibril angle of increment cores by near infrared spectroscopy. *IAWA.* 2002, Sv. 23 (3), 225-234.
50. **Schimleck, L.R., R. Evans, J. Ilic & A.C. Matheson.** Estimation of wood stiffness of increment cores by near-infrared spectroscopy. *Can. J. For. Res.* 2002, Sv. 32: 129–135.
51. **Schimleck, L.R., P.D. Kube, C.A. Raymond, A.J. Michell & J. French.** Estimation of whole-tree kraft pulp yield of Eucalyptus nitens using near infrared spectra collected from increment cores. *Canadian Journal of Forest Research.* 2005, Sv. 35 (12), 2797-2805.
52. **Phillips, E.W.J.** The inclination of fibrils in the cell wall and its relation to the compression of timber. *Empire Forestry.* 1941, 20: 74–78.
53. **Preston, R.D.** The fine structure of the walls of the conifer tracheids. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1948, Sv. III, 2: 370–383.
54. **DONALDSON, L.A.** *Variation in microfibril.* [New Zealand Journal of Forestry] Rotorua, New Zealand : New Zealand Forest Research Institute, 1993.
55. **Hirakawa, Y. & Y. Fujisawa.** The S2 microfibril angle variations in the vertical direction of latewood tracheids in sugi (*Cryptomeria japonica*) trees. *Journal of the Japan Wood Research Society.* 1996, Sv. 42(2): 107-114.
56. **Matsumura, J. & B.G. Butterfield.** Microfibril angles in the root wood of *Pinus radiata* and *Pinus nigra*. *IAWA.* 2001, 22: 57–62.
57. **Fukunaga, D., J. Matsumura & K. Oda.** Microfibril angles in the S2 layer of tracheids in root and stem wood of *Chamaecyparis obtusa*. Prediction of microfibril angle of mature wood in the stem from root wood. *Mokuzai Gakkaishi.* 2005, 51: 141–145.
58. **Evans, R., S. Stringer & R.P. Kibblewhite.** Variation of microfibril angle, density and fibre orientation in twenty-nine *Eucalyptus nitens* trees. *Appita.* 53: 450–457, 2000.
59. **A., Donaldson L.** Within- and between-tree variation in microfibril angle in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science.* 1992, Sv. 22: 77–86.
60. **Wardrop, A.B. & H.E. Dadswell.** The nature of reaction wood. II. The cell wall organisation of compression wood tracheids. *Australian journal of biological sciences.* 1950, Sv. 3(1):1-13.

61. **Harris, J.M.** Shrinkage and density of radiata pine compression wood in relation to its anatomy and mode of formation. *New Zealand Journal Forest Service*. 1977, Sv. 7: 91–106.
62. **Donaldson, L.A., J.C. Grace & G. Downes.** Within tree variation in anatomical properties of compression wood in radiata pine. *IAWA*. 2004, Sv. 25: 253–271.
63. **R.W, Wellwood.** Tensile testing of small wood samples. *Pulp & Paper Magazine*. 1962, Sv. 63:61–67.
64. **K.A., Jurburgs.** Determining fibre length, fibrillar angle and springwood-summerwood ratio in slash pine. *Forest Science*. 1963, Sv. 9: 181–187.
65. **H., Hiller C.** Correlation of fibril angle with wall thickness of tracheids in summerwood of slash and loblolly pine. *Tappi Journal*. 1964, Sv. 47: 125–128.
66. **DONALDSON, L. A.** *Effect of Physiological Age and Site on Microfibril Angle in Pinus Radiata*. [Journal] místo neznámé : IAWA, 1996. ISSN 0928-1541.
67. **Watson, A.J. & H.E. Dadswell.** Influence of fibre morphology on paper properties. *Appita J*. 1964, Sv. 17: 151–156.
68. **CAVE, I.D. and J.C.F. Walker.** Stiffness of wood in fast-grown plantation softwoods: the influence of microfibril angle. *Forest Product Journal*. 1994, Sv. 44 (5), 43-48.
69. **Walker, J.C.F. & B.G. Butterfield.** The importance of microfibril angle for the processing industries. *New Zealand Forestry*. 1996, Sv. 1995: 35–40.
70. **Barber, N.F. & B.A. Meylan.** The anisotropic shrinkage of wood – A theoretical model. *Holzforschung*. 1964, Sv. 18: 145–156.
71. **Abe, K. & H. Yamamoto.** Mechanical interaction between cellulose microfibril and matrix substance in wood cell wall determined by X-ray diffraction. *Wood Science*. 2006, Sv. 51: 334–338.
72. **W.T.Y. Tze a, \*, S. Wang a, T.G. Rials a, G.M. Pharr b,c, S.S. Kelley a,d.** *Nanoindentation of wood cell walls: Continuous stiffness and hardness measurements*. místo neznámé : Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2007. 10.1016/j.compositesa.2006.06.018.
73. **W.C. Oliver, G.M. Pharr: J. Mater.** An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*. 1992, 7(06), 1564-1583 [cit. 2016-05-19].
74. **DOERNER, M.F. a W.D. NIX.** A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments. *Journal of Materials Research*. 1986, 1(04), 601-609 [cit. 2016-05-19].

75. GINDL, W., H.S. GUPTA, T. SCHÖBERL, H.C. LICHTENEGGER a P. FRATZL. *Mechanical properties of spruce wood cell walls by nanoindentation*. místo neznámé : Applied Physics, 2004. 10.1007/s00339-004-2864-y.

76. D., Hemzal. Polarizační mikroskopie. [Online]  
<http://www.physics.muni.cz/~hemzal/vyuka/vyuka.shtm>.

77. J., Cousin W. Measurement of mean microfibril angles of wood tracheids. *Wood Sci. Technol.* 1972, Sv. 6: 58.

78. Drevo. Medza pevnosti v tlaku v smere vláknien. Praha : Vydavatelství Úřadu pro normalizaci a měření, 1980

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

S1, S2, S3	sekundární vrstvy buněčné stěny
MFA	úhel mikrofibril
NIR	blízká oblast infračervené spektroskopie
MEP	poloha maximálního útlumu (extinkce) světla
UV	ultrafialové záření
FESEM	nízkonapěťová rastrovací elektronová mikroskopie
$R^2$	korelační koeficient
MOE	modul pružnosti

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Obsah ligninu ve vrstvě S2 buněčné stěny pěti zkoumaných vzorků [75].....	31
Graf 2. Tvrdost zjištěná nanoindentací [75].....	31
Graf 3. Modul pružnosti zjištěný nanoindentací [75].....	32
Graf 4. Závislost pevnosti ve směru vláken na šířce letokruhů.....	42
Graf 5. Závislost pevnosti ve směru vláken na podílu letního dřeva.....	42
Graf 6. Závislost tloušťky buněčné stěny na pevnosti ve směru vláken.....	43
Graf 7. Závislost pevnosti ve směru vláken na úhlu mikrofibril.....	44

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Příčný řez Borovice lesní. Výrazný přechod mezi jarním a letním dřevem a dobře viditelné pryskyřičné kanálky. (Zvětšeno 40 x) .....	11
Obrázek 2. Znázornění stavby listnatého dřeva (Požgaj, Chovanec a kol., 1997): 1 – letokruh, 2 – jarní céva, 3 – letní céva, 4 – lífbriformní vlákno, 5 – dřevový paprsek, 6 – podélný parenchym.....	12
Obrázek 3. Kruhovitě pórovitá struktura dřeva. Příčný řez jasanovým dřevem. (Zvětšení 40 x).....	13
Obrázek 4. Roztroušená pórovitá struktura. Příčný řez bukového dřeva. (Zvětšení 40 x)..	13
Obrázek 5. Polo-kruhovitě pórovitá struktura dřeva. Příčný řez ořechovým dřevem. ....	13
Obrázek 6. Schématické znázornění různých typů ztenčenin (Šlezingerová, Gandelová 1994): a – tečka, b – dvojtečka, c – poloviční dvojtečka, 1 – střední lamela a primární buněčná stěna, 2 – sekundární buněčná stěna, 3 – porus, 4 – torus, 5 - margo .....	16
Obrázek 7. Diagram znázorňující jednotlivé vrstvy buněčné stěny. Dále můžeme vidět orientaci mikrofibril jednotlivých vrstev typické tracheidy. ....	16
Obrázek 8. Fotka tracheid z polarizačního mikroskopu Borovice montereyské, která ukazuje způsob měření polohy maximálního útlumu (extinkce) světla. Otvor ve dvojtečce umožňuje pozorování jedné buněčné stěny skrze dvojtečku. Tracheida je otáčena ve směru náklonu otvoru dvojtečky (do leva), dokud se stěna buňky viditelná skrze dvojtečku neztmaví do černa. V tomto případě je úhel MFA roven $18^\circ$ [7].....	19
Obrázek 9. Obrázek ilustrující techniku použitou k měření úhlu mikrofibril, kdy se na jedinou buněčnou stěnu díváme skrz dvojtečku nebo jednoduchou tečku [12]. ....	20
Obrázek 10. – A: Fotka z konfokální reflektance jódem obarvené Borovice montereyské, ukazující orientaci mikrofibril tracheidy ve vrstvě S1 a S2. Zorné pole $160 \times 160 \mu\text{m}$ . – B: Fotka mírně zetlelého modřínu ukazující orientaci mikrofibril. Zorné pole $500 \times 500 \mu\text{m}$ [7]. ....	22
Obrázek 11. Příklad přístroje Silviscan3, použitý k měření MFA pomocí rentgenové difrakce [7].	24
Obrázek 12. Geometrie indentorů: (a) kuželovitý; (b) Berchovichův; (c) Vickersův .....	28
Obrázek 13. UV mikroskopický snímek pořízený při 280 nm tlustým příčným řezu smrku. Vložený snímek ukazuje rozhraní dvou buněčných stěn a střední lamely po nanoindentaci [75]. ....	29
Obrázek 14. Indentační křivka zobrazující detekci změny hloubky vtisku na nárůstu zatížení [75]. ....	29

Obrázek 15. Model polarizátoru a analyzátoru. Ve druhém případě, kdy jsou poláry ve zkřížené poloze, analyzátor žádné světlo nepropouští.....	33
Obrázek 16. A: Fotka tracheidy v procházejícím světle mikroskopu. B: Fotka tracheidy v polarizovaném světle při zkřížených polárech. (Zvětšení 500x, R. Martinek).....	33
Obrázek 17. Tracheida s dvojtečkami pozorovaná v polarizovaném světle. Ve svislé poloze tracheidy je otvor dvojtečky světlý, při pootočení o úhel $\alpha$ , který je roven MFA, nastává bod maximální extinkce (MEP), což se projeví ztmavnutím otvoru dvojtečky (R. Martinek). .....	34
Obrázek 18. Měření podílu letního dřeva ve vzorku pomocí mikroskopu Leica a příslušného softwaru. (zvětšení 25 x) .....	37
Obrázek 19. Přejít jarního a letního dřeva u <i>Smrku</i> . Znárodnění měření tloušťky buněčné stěny. (zvětšení 50 x) .....	38
Obrázek 20. Vzorky umístěné v maceračním roztoku. ....	39
Obrázek 21. Delignifikovaný vzorek dřeva po 12 hodinách v macerátu. Jednotlivé tracheidy jsou viditelné pouhým okem.....	39
Obrázek 22. Měření MFA – v tomto případě je úhel mikrofibril 16 °. (Zvětšení 500 x)....	40



## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Procentuální zastoupení elementů ve dřevě jehličnanů .....	14
Tabulka 2. Procentuální zastoupení elementů u listnatých dřevin. ....	14
Tabulka 3. Výsledky měření MFA zjištěné rentgenovou difrakcí. ....	30
Tabulka 4. Naměřené hodnoty pro stanovení pevnosti v tlaku ve směru vláken. ....	41
Tabulka 5. Naměřené hodnoty šířky letokruhů a podíly letního dřeva. ....	41
Tabulka 6. Naměřené průměrné hodnoty tloušťky buněčné stěny. ....	43
Tabulka 7. Naměřené hodnoty MFA. ....	44