

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra zpracování dřeva a biomateriálů



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Hledání kritického napětí pro pozorování nepovrstvených
vzorků dřeva v elektronové mikroskopii**

Diplomová práce

Bc. Kristýna Těhníková

doc. Ing. Monika Sarvašová Kvietková, PhD.

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Kristýna Těhníková

Dřevařské inženýrství

Název práce

Hledání kritického napětí pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva v elektronové mikroskopii

Název anglicky

Finding the voltage for the observation of wood samples with no conductive surface layer in electron microscopy

Cíle práce

Cílem diplomové práce je nalezení, nastavení napětí v elektronovém mikroskopu umožňující pozorování vzorků dřeva bez použití aplikace vodivé vrstvy. Diplomová práce bude zahrnovat vlastní zjištění napětí u jednotlivých vzorků a pořízení snímků pozorovaných vzorků dřeva.

Metodika

Charakteristika pozorování vzorků dřeva v elektronové mikroskopii. Postup přípravy nepovrstvených vzorků dřeva pro pozorování v elektronovém mikroskopu. Porovnání nalezeného napětí mezi různými druhy dřev a vlivu směru pozorování s ohledem na anatomii dřeva.

Časový harmonogram zpracování závěrečné práce bude probíhat v základních a metodologicky odlišných etapách:

- 1/ červenec – srpen 2023: literární rešerše – analýza literatury s přehledem dosavadních poznatků o řešeném problému a vymezení základních pojmů, které budou používány v práci,
- 2/ září – říjen 2023: příprava vzorků, uskutečněné měření,
- 3/ listopad – prosinec 2023: vyhodnocení měření,
- 4/ leden – březen 2024: dokončení závěrečné práce,
- 5/ duben 2024: odevzdání závěrečné práce.

Doporučený rozsah práce

45 – 55 stránek

Klíčová slova

elektronová mikroskopie, dřevina, napětí, vzorek, směr pozorování

Doporučené zdroje informací

BOZOLLA, J. J. a RUSSELL, L. D. Electron Microscopy. Carbondale, Illinois: Jones and Bartlett Publishers. 1999. 670 s., ISBN 0-7637-0192-0.

KVIETKOVÁ, M. Obrábění dřeva. CARTER Praha. 2015. 295 s., ISBN 978-80-213-2604-0.

MEYER, Ernst, Hans Josef HUG a Roland BENNEWITZ. Scanning probe microscopy: the lab on a tip. Berlin: Springer, 2004. Advanced texts in physics. 210 s., ISBN 3-540-43180-2.

ŠLEZINGEROVÁ, J. a GANDELOVÁ, L. Stavba dřeva. Brno: Vysoká škola zemědělská. 1994. 188 s., ISBN 80-7157-137-7.

WILLIAMS, D. B. a CARTER, C. Transmission electron microscopy: A textbook for materials science. New York: Springer. 2008. 780 s., ISBN 978-038-7765-006.

ZEIDLER, A. a BORŮVKA, V., Stavba a vlastnosti dřeva exotických dřevin. Praha: Česká zemědělská univerzita. 2019. 108 s., ISBN 978-80-213-2992-8.

ZEIDLER, A. a BORŮVKA, V., Stavba a vlastnosti dřeva hospodářsky významných dřevin: podklady pro cvičení. Praha: Česká zemědělská univerzita. 2016. 89 s., ISBN 978-80-213-2674-3.

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FLD

Vedoucí práce

doc. Ing. Monika Sarvašová Kvietková, PhD.

Garantující pracoviště

Katedra zpracování dřeva a biomateriálů

Elektronicky schváleno dne 9. 5. 2023

doc. Ing. Roman Fojtík, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 7. 2023

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 29. 08. 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Hledání kritického napětí pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva v elektronové mikroskopii vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila, a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 18.03.2024

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. Ing. Monice Sarvašové Kvietkové, PhD. za cenné rady při zpracování a finalizování této práce.

Druhé poděkování patří mé rodině – mému manželovi a dětem, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Třetí poděkování patří jednateři společnosti Crytur, který mi umožnil použít elektronové mikroskopy pro pozorování a vypracování této práce.

A nakonec bych ráda poděkovala všem, kteří se na této práci podíleli formou rad a poskytováním cenných informací – Petr Wandrol (TFS), Filip Mika (UPT), Marie Vancová a František Kitzberger (PARU), kolegové oddělení elektronové mikroskopie (CRYTUR) a další.

Hledání kritického napětí pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva v elektronové mikroskopii

Abstrakt

Náplní práce bylo nalézt takové napětí a nastavení elektronového mikroskopu, aby bylo možné pozorovat nevodivé vzorky dřeva bez další úpravy. Touto úpravou se myslí standardní vodivé povrstvení např. zlatem. Po nalezení vyhovujícího nastavení mikroskopu byly s daným nastavením pořízeny snímky jednotlivých vzorků dřeva. Prvním úkolem bylo zjistit a popsat přípravu vzorků vhodných pro pozorování v elektronovém mikroskopu a druhým porovnání zjištěného napětí v závislosti na dřevině a případně i směru pozorování.

Metoda přípravy vzorků spočívala v jejich vymanipulování za pomoci obráběcích nástrojů na hranolky o daných rozměrech, z kterých následně byly odebírány vzorky pro vlastní pozorování. Nejvýhodnějším výsledkem pro tuto práci bylo, aby vzorky jednotlivých dřevin byly rozměrově unifikované. Pro odebírání vzorků musely být polotovary plastifikovány a následně jejich povrch upraven pomocí mikrotomu. Tím byla získána hladká plocha vzorku pro pozorování.

Vlastní hledání kritického napětí bylo prováděno za pomoci elektronového mikroskopu ThermoFisher Scientific model Quattro. Principem bylo nastavení pevných parametrů jako rozlišení, pracovní vzdálenost, skenovací čas a hledání správného napětí při pozorování zobrazení dřeviny na monitoru. Úkolem bylo najít nastavení, při kterém byl obraz bez deformačních artefaktů způsobených nabíjením preparátu.

Hlavních cílů se podařilo dosáhnout. Byla nalezena rozpětí, při kterých lze dané vzorky pozorovat bez opatření vodivé vrstvy. Při zjištěných napětích byly pořízeny snímky jednotlivých dřevin, které byly následně kolorovány za pomoci programu MIB – Microscopy Image Browser a jsou součástí obrazové přílohy.

Přínosem této práce je s ohledem na výběr dřevin a zjištěné výsledky, že nepovrstvené vzorky pozorovat lze a podle výsledků se dá i pozorování v praxi urychlit, protože všechny dřeviny měly potřebné napětí v rozsahu 1 kV – 1,6 kV. Zároveň lze využít i zjištění, že optimální pro takové pozorování je použití detektoru sekundárních elektronů, protože i při použití relativně nízkých napětí získáme dostatečně silný signál pro pozorování. Naproti tomu při potřebě využití detektoru zpětně odražených elektronů, je výhodnější použít vzorky povrstvené, aby bylo možné pozorovat za vyšších napětí pro získání dostatečného signálu pro tento detektor.

Klíčová slova: elektronová mikroskopie, dřevina, napětí, vzorek, směr pozorování

Finding the voltage for the observation of wood samples with no conductive surface layer in electron microscopy

Summary

The work aims to find the voltage and setting of an electron microscope to observe non-conductive wood samples without further modification. Standard conductive coating, such as gold, is considered a further modification. Once a suitable microscope setting is found, images of individual wood samples will be taken with that setting. The initial goal is to determine and describe the preparation of samples suitable for observation in an electron microscope, followed by comparing the observed voltage depending on the type of wood and possibly the direction of observation.

Preparing the samples involves manipulating them using cutting tools into specified dimensions, from which samples were taken for observation. The ideal outcome for this work is for the individual wood samples to be unified in size. To obtain samples, it is necessary to plasticize the wood and then modify the surface using a microtome, resulting in an ideal sample surface for observation.

The search for critical voltage was conducted using the ThermoFisher Scientific model Quattro electron microscope. The principle was to set fixed parameters such as resolution, working distance, and scan time and find the correct voltage for observing the wood sample on the monitor without deformation artifacts caused by specimen charging.

The main goals were achieved. Ranges were found at which the samples could be observed without the need for a conductive layer, and images of individual woods were taken at the identified voltages, which were subsequently colorized using the MIB - Microscopy Image Browser program and are part of the image attachment.

The contribution of this work, based on the wood selection and the results, is that non-coated samples can be observed, and based on the results, practical observation can be accelerated as all woods had the necessary tensions in the range of 1 kV - 1.6 kV. It was also discovered that a secondary electron detector is ideal for such observations, as it provides a strong signal even at relatively low voltages. Conversely, when using a backscattered electron detector, it is advantageous to use coated samples to allow for higher voltages to acquire a sufficient signal for this detector.

Keywords: electron microscopy, woody plant, voltage, sample, direction of observation

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Cíl práce	11
3 Literární rešerše	12
3.1 Elektronová mikroskopie	12
3.1.1 Elektronový mikroskop.....	13
3.1.2 Vady elektronového mikroskopu.....	14
3.1.3 Základní charakteristika elektronových mikroskopů.....	15
3.1.4 Vzorky pro elektronovou mikroskopii.....	27
3.1.5 Nabíjení nevodivých vzorků	29
3.1.6 Vybrané vzorky pro DP	32
3.1.6.1 Akát	32
3.1.6.2 Dub	32
3.1.6.3 Jasan	33
3.1.6.4 Javor	33
3.1.6.5 Smrk	34
3.1.6.6 Thermowood – smrk.....	34
3.1.6.7 Ipe	35
3.1.6.8 Merbau.....	35
3.1.6.9 Massaranduba	36
3.1.6.10 Garapa.....	36
4 Metodika	38
4.1 Příprava samotných vzorků	38
4.1.1 Příprava polotovarů pro finální vzorky do SEM	38
4.1.2 Sušení polotovarů pro finální vzorky do SEM	39
4.1.3 Příprava finálních vzorků pro SEM	40
4.1.4 Shrnutí postupu přípravy vzorků	47
4.2 Práce s elektronovým mikroskopem	48
4.2.1 Příprava vzorků/mikroskopu pro pozorování	48
4.2.2 Pozorování vzorků v SEM.....	49
4.2.3 Hledání pozorovacího napětí/energie v SEM	52
4.2.4 Vyhodnocování získaných snímků	57
4.2.5 Kolorování získaných snímků jednotlivých vzorků	58
5 Výsledky	59
5.1.1 Zjištěné pozorovací napětí	59

5.1.2	Pořízení snímků pozorovaných vzorků.....	60
5.1.3	Porovnání zjištěných napětí	60
5.1.3.1	Porovnání z hlediska dřeviny	61
5.1.3.2	Porovnání z hlediska hustoty	61
5.1.3.3	Porovnání z hlediska směru pozorování	62
5.1.3.4	Porovnání z hlediska podobnosti struktury anatomické stavby	63
5.1.3.5	Porovnání z hlediska množství a složení extraktivních látek	64
6	Diskuze	66
6.1	Příprava vzorků	66
6.2	Zjišťování napětí a vyhodnocování snímků.....	67
6.3	Porovnání nepovrstvených a povrstvených vzorků dřeva	68
7	Závěr.....	71
7.1	Shrnutí výsledků.....	71
7.2	Přínos práce	71
7.3	Návrhy pokračování práce	72
8	Literatura.....	73
9	Samostatné přílohy	77

1 Úvod

Základem pozorování vzorků v elektronové mikroskopii je v optimálním případě pozorování vodivého vzorku, jehož náboj je odváděn, a proto se obraz nenabíjí a je možné pozorovat, co je potřeba. V případě pozorování nevodivých vzorků se jde zpravidla nejjednodušší cestou a tou je povrstvení takového vzorku vodivou vrstvou. Tato vrstva je tenká pouze několik nanometrů, elektrony skrz tuto vrstvu projdou, a téměř neovlivní obraz původního vzorku. Způsobí to ovšem větší objem práce na přípravu vzorku a nakonec také financí pro pořízení dalšího potřebného vybavení. Je potřeba zakoupit aparaturu pro nanášení vrstev. Také tento krok navíc znamená prodloužení času, než se s takovým vzorkem dostaneme k samotnému pozorování v mikroskopu.

Z těchto důvodů je tato práce zaměřena na hledání způsobu, jak pozorovat typicky nevodivé vzorky, a to z různých druhů dřev. Vzorky budou pozorovány s ohledem na anatomii dřeva rovnoběžně s vlákny a kolmo na vlákna a následně budou jednotlivé výsledky mezi sebou porovnány, zdali závisí na druhu dřeva a směru pozorování.

Vzorky pro elektronovou mikroskopii mají svá specifika, proto součástí této práce bude i příprava vzorku. Výsledkem této práce by mělo být nastavení mikroskopu pro pozorování vzorků dřeva obecně, nebo s ohledem na druh a směr pozorování a také příprava vhodného vzorku nejjednodušší, nejrychlejší a nejlevnější cestou.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo naleznout kritické napětí, což je urychlovací napětí, při kterém získají elektrony takovou energii, že se vzorek nebude nabíjet, a která způsobí, že půjde pozorovat nevodivý vzorek dřeva v elektronovém mikroskopu bez nanesené vodivé vrstvy. Součástí práce bylo pořízení obrázků z elektronového mikroskopu se zjištěným nastavením.

Aby bylo možné provést toto pozorování, bylo třeba připravit správný vzorek, proto jedním z dílčích cílů byla příprava vzorků dřeva pro elektronový mikroskop. Elektronový mikroskop pro pozorování potřebuje vzorky se specifickými vlastnostmi. Práce obsahuje postup, jak takové vzorky připravit, aby pozorování ve vakuu nezneškodilo samotný vzorek a zároveň, aby vzorek nezničil používané zařízení. Dalším z cílů bylo zjistit, zda se nalezené pozorovací napětí liší s ohledem na jednotlivé druhy dřeva. Byly porovnány druhy listnaté i jehličnaté, tradiční i exotické. Poslední součástí výsledků je porovnání, zdali se nalezené napětí liší v případě pozorování vzorku po vláknech a kolmo na vlákna.

3 Literární rešerše

Tato práce se zabývá hledáním kritického napětí pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva v elektronovém mikroskopu. Je proto velmi vhodné nejprve blíže popsat, jakým způsobem pracuje elektronový mikroskop a k jakému pozorování je vhodný. Další důležitou informací bude, jaké vzorky jsou pro elektronovou mikroskopii vhodné a jak je připravit.

3.1 Elektronová mikroskopie

Elektronový mikroskop, který je často uváděn jako typický příklad inovace 20. století, nevznikl náhle. Byl to výsledek postupného skládání poznatků mnoha vědců v kombinaci s technologickým rozvojem. Základem pro jeho vznik byl popis elektronu J.J. Thomsonem v roce 1897, který vyplýval ze studia elektrických výbojů v Geisslerově trubici známé již v 19. století. Klíčovým milníkem bylo zjištění Luisa de Broglie v roce 1925 o vlnové povaze rychle letících částic, což potvrdily experimenty s elektronovou difrakcí Davissona, Germera, Thompsona a Reida v roce 1927. Důležitým přínosem byly také práce H. Busche z roku 1926, které představily analogii mezi ohybem elektronového paprsku magnetickými poli a světla skleněnou čočkou (Nebesářová, 2001).

Možnost vytvoření transmisního elektronového mikroskopu (TEM) se zrodila v týmu Knolla a Rusky na Technické vysoké škole v Berlíně kolem roku 1928. První prototyp byl sestaven na počátku 30. let a v roce 1932 byly prezentovány první snímky a popis elektromagnetické čočky. Firma Siemens a Halske zahájila komerční produkci těchto mikroskopů v roce 1939 s garancí rozlišení 10 nm. Za přínos elektronového mikroskopu byl Ruska oceněn Nobelovou cenou v roce 1986, kdy již byly tyto přístroje běžnou součástí laboratoří (Šubrtová, 2012).

Vývoj skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) byl komplikovanější. M. von Ardenne v roce 1938 teoreticky i prakticky popsal princip rastrování, který byl využit v SEM. První SEM sestrojil Zworikyn, vynálezce fotonásobiče, který využil pro detekci sekundárních elektronů. Ve Velké Británii se konstrukcí SEM zabýval tým vedený C.W.Oatleyem, jehož výsledky vedly ke komerční produkci firmy Cambridge Scientific Instruments v roce 1965.

Vrchol technologického pokroku reprezentuje 3 MV transmisní elektronový mikroskop, který umožnil člověku poprvé spatřit atom. Dva takové přístroje byly postaveny v Japonsku a USA na konci 80. let (Nebesářová, 2001).

V Československu vznikla v 60. letech výzkumná skupina v Ústavu přístrojové techniky v Brně, která se zabývala vývojem elektronových mikroskopů. Ve vedení této skupiny byl

V. Drahoš a A. Delong. Výsledkem byla série mikroskopů Tesla BS. Po privatizaci Tesly se v Brně vyrábějí mikroskopy pro firmu Philips a v Delong Instruments a Tescan se kromě elektronových mikroskopů vyrábí i příslušenství k mikroskopům a další přístroje, jako třeba spektroskopy. Výrobu a vývoj SEM dnes vedou společnosti jako JEOL, LEO, Hitachi, TFS a Zeiss, a o jejich nejnovějších produktech lze najít informace na jejich internetových stránkách (Mamoňová, 2018).

V biologii hrají elektronové mikroskopy klíčovou roli od samého počátku vývoje TEM. Bylo zřejmé, že vzorky musí být extrémně tenké a zbavené vody kvůli malé penetrační schopnosti elektronů a vysokému vakuu v mikroskopu. První pozorované biologické objekty zahrnovaly vlákna bavlny, krevní buňky, bakterie, chitinové schránky hmyzu a rostlinný materiál. Příprava vzorků se nejprve prováděla pomocí ultramikrotomů, které byly vylepšeny v 50. letech, kdy se změnila konstrukce přístroje a bylo možné s ultratenkými řezy snadněji manipulovat. Další výzkum se zaměřil na fixační a zalévací metody pro zobrazení ultrastruktury biologických objektů v co nejuvěrnějším stavu (Bozzola a Russell, 1999).

3.1.1 Elektronový mikroskop

Asi se nyní nabízí otázka: Proč právě elektronový mikroskop? Odpověď je vlastně velmi jednoduchá. Protože lidstvo je velmi zvědavé a chce zkoumat podstatu věcí. Každé zařízení určené ke zlepšení vizuálního vnímání malých objektů se vyznačuje klíčovou charakteristikou, kterou je rozlišovací schopnost. Tato schopnost definuje minimální vzdálenost mezi dvěma sousedními body, které lze zařízením rozpoznat jako dvě samostatné entity. Podle literárních zdrojů dokáže lidské oko za optimálních světelných podmínek na vzdálenost 25 cm rozlišit dva body vzdálené od sebe minimálně 0,2 mm (Němeček, 2017).

V 16. století byl vynalezen optický mikroskop, který umožnil člověku prozkoumat mikroskopické detaily, a jeho rozlišovací schopnost se postupně zvyšovala až na úroveň 0,25 μm . Důvod, proč nebylo možné dále proniknout do ještě menších rozměrů mikrosvětla prostřednictvím zdokonalení optického mikroskopu a čoček, odhalil Ernest Abbe na konci 19. století. Abbe identifikoval vztah určující rozlišovací schopnost objektivu světelného mikroskopu, vycházející z fenoménu Airyho kruhů, které vznikají při difrakci světla na okraji čočky, při pozorování bodového zdroje světla. Místo ostrého bodu se tedy vytváří řada kruhů. Pokud jsou dva světelné body dostatečně blízko, můžeme je rozlišit jako separátní až do okamžiku, kdy se střed jednoho obrazu kryje s prvním minimem druhého obrazu, což odpovídá zhruba 19% snížení intenzity světla. Vzdálenost mezi středy těchto obrazů pak odpovídá rozlišovací schopnosti, kterou lze určit pomocí Abbeho vzorce (1) (Nebesářová, 2001).

$$R. S. = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha_0} \quad (1)$$

λ - je vlnová délka použitého světla

n - je index lomu prostředí před objektivem

α_0 - je úhlová apertura objektivu

Optický mikroskop umožňuje rozlišení okolo 300 nm. Proto bylo třeba najít způsob, jak získat rozlišení větší, což umožnily právě elektrony díky jejich kratší vlnové délce, než má viditelné světlo. Cílem v mikroskopii jako takové je zvětšování vzorku za účelem získání dalších informací. Ne pouze zvětšení viditelného, ale zvětšení za účelem zviditelnění dalších informací. Takové zvětšení se nazývá zvětšením užitečným, v opačném případě se zvětšení nazývá prázdné. Obecně se užitečné zvětšení pohybuje u jednotlivých přístrojů následovně:

Světelné mikroskopy 550x

Skenovací elektronové mikroskopy 10 000x

Transmisní elektronové mikroskopy 1 000 000x.

Z toho také vyplývá, jaké nejlépe použít zařízení pro pozorování vzorků (Reichl a Všetická, 2006).

Základem elektronového mikroskopu jsou elektrony. Elektron má záporný náboj a velmi malou hmotnost. Díky zápornému náboji elektronů je možné je urychlovat pomocí elektrického napětí U a tím získat kinetickou energii podle rovnice (2) (Nebesářová, 2001):

$$eU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

m - hmotnost elektronu ($9,109 \times 10^{-31}$ kg)

e - náboj elektronu ($1,602 \times 10^{-19}$ C)

U - urychlovací napětí (V)

v - rychlost elektronu

3.1.2 Vady elektronového mikroskopu

Optické nedokonalosti elektronových mikroskopů mají přímý dopad na jejich rozlišovací schopnost. Tyto nedostatky, známé jako aberace, se dělí do tří hlavních kategorií:

1. Sférická aberace je způsobena nedokonalostí čoček. Záření neprochází čočkou rovnoměrně, ale místo toho se soustřeďuje do různých bodů v závislosti na tom, jak daleko od středu čočky záření prochází. To vede k tomu, že místo ostrého bodu se v obraze zobrazí rozmazaný kotouč. Sférická aberace narůstá s třetí mocninou poloviční úhlové apertury a lze ji částečně kompenzovat použitím clony a silného magnetického pole (Vencelides, 2019).

2. Chromatická aberace nastává, když elektrony mají na začátku různé rychlosti (analogicky k různým vlnovým délkám světla u optických mikroskopů), což má za následek nejasné zobrazení ve formě kroužku místo bodu. Tato aberace je závislá na urychlovacím napětí a mění se s každou jeho změnou. Může také vzniknout při ztrátě rychlosti elektronů při interakci s pozorovaným vzorkem. Pro zmenšení této aberace je možné snížit koherenci svazku a zvýšit jeho monochromaticnost (DeLong a Drahoš, 1958).

3. Osový astigmatismus je výsledkem asymetrie v magnetickém poli a přítomnosti nečistot, což vede k různým ohniskovým bodům pro elektronové paprsky. K jeho korekci se používají stigmátory, které jsou zvláštní magnetická pole určeného směru. V případě skenovacích elektronových mikroskopů (SEM) se korekce astigmatismu provádí pravidelně, někdy i několikrát denně (DeLong a Drahoš, 1958).

3.1.3 Základní charakteristika elektronových mikroskopů

Jak již bylo zmíněno výše, existují dva základní typy elektronových mikroskopů transmisní a skenovací. Oba mikroskopy potřebují zdroj elektronů a vakuum ve vnitřním prostoru, aby nedocházelo k náhodným srážkám elektronů s molekulami vzduchu, které by změnily jejich směr a energii. Dále jsou oba mikroskopy vybaveny detektory pro detekování elektronů po interakci se vzorkem.

První je TEM neboli transmisní elektronový mikroskop. Slouží pro zobrazení vnitřní struktury vzorku pomocí detekce prošlých elektronů. Pro jeho provoz je nutné velmi vysoké urychlovací napětí od 100-400 kV. Typický vzorek pro TEM je tloušťky pouze několik desítek nanometrů a umožňuje pozorování při velmi velkém zvětšení a s velkým rozlišením. Základem transmisního elektronového mikroskopu je zdroj elektronů, který vytváří primární elektrony. Tyto elektrony jsou pomocí konstrukce zdroje zformovány do svazku. Tyto elektrony mají téměř stejnou kinetickou energii dle rovnice (2), následně jsou urychlovány pomocí anody, která současně usměrňuje trajektorii letících elektronů. Elektromagnetické čočky drží elektrony na správné trajektorii a zároveň je zacilují tak, aby při průchodu vzorkem vytvořily stopu s co nejmenším průměrem. Následně jsou elektrony průchodem projekčních čoček usměrňovány

tak, aby jich většina dopadla na detektor. Následně je pomocí počítače vytvořen obraz snímaného vzorku (Williams a Carter, 2008).

Druhým typem elektronového mikroskopu je SEM neboli skenovací elektronový mikroskop. Slouží pro zobrazení povrchu vzorku pomocí sekundárních elektronů (SE) a zpětně odražených elektronů (BSE). V mikroskopu se používají výrazně nižší urychlovací napětí než v TEM, tady se pohybují pouze 0,1 – 30 kV. Vzorek může být velký i několik cm, ale u velkých vzorků je pozorována pouze jejich část. Jeho velkou výhodou je velká hloubka ostrosti, díky které lze na 2D fotografiích pozorovat i jistou 3D informaci. Stejně jako v případě transmisního mikroskopu zde máme zdroj elektronů, které jsou díky kladnému náboji anody urychlovány a díky její konstrukci je formována jejich trajektorie. Následně je elektronový svazek usměrňován pomocí elektromagnetických čoček, aby dopadl na minimální plochu vzorku (Mohammed a Abdullah, 2018). Dále bude více rozepsán SEM, který bude využit pro pozorování v této práci.

Každý elektronový mikroskop má 7 hlavních částí. Patří mezi ně: vakuový systém, zdroj elektronového svazku, manipulace s elektronovým svazkem, interakce svazku, detekce, zpracování signálu, zobrazení a záznam. Všechny tyto části musí fungovat společně, aby bylo možné získat snímky vzorku dostatečné kvality, zvětšení, hloubky ostrosti, rozlišení, kontrastu a jasu (Dunlap a Adaskaveg, 1997).

Následuje stručný popis každé z uvedených částí:

1. Vakuový systém (obr. 1). Vakuum v elektronovém mikroskopu je naprosto zásadní stav pro práci s elektronovým svazkem. Díky vakuu ve vnitřním prostoru je zamezeno náhodným srážkám elektronů s molekulami vzduchu, které by změnily jejich směr a energii.
2. Zdroj elektronů (obr. 2). Tento systém se nachází v horní části mikroskopu a je zodpovědný za generování primárních elektronů tvořících elektronový svazek.
3. Systém manipulace s elektronovým svazkem (obr. 3). Tento systém se skládá z elektromagnetických čoček umístěných v tubusu mikroskopu. Tato část usměrňuje velikost, tvar a směr elektronového svazku po celou jeho cestu až na povrch vzorku.
4. Systém interakce vzorku a elektronového svazku (obr. 4). Tento systém zahrnuje interakci elektronového svazku se vzorkem a typy signálů, které lze detekovat.
5. Detekční systém (obr. 5). Tento systém se může skládat z několika různých detektorů, z nichž každý je citlivý na různé energie / emise částic, které se vyskytují ve vzorku.
6. Systém zpracování signálu je elektronický systém, který zpracovává signál generovaný detektory a umožňuje další elektronickou manipulaci s obrázkem.

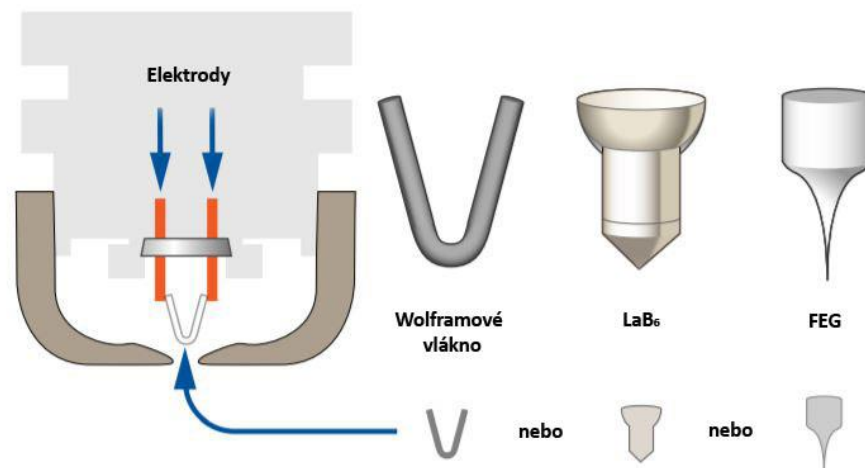
7. Zobrazovací a záznamový systém (obr. 6) je v dnešní době zastoupen počítačem, který umožňuje vizualizaci elektronického signálu a umožňuje uložení snímků.

Ad 1. Klíčové je prostředí uvnitř tubusu elektronového mikroskopu. Bez dostatečného vakua nelze generovat a kontrolovat elektronový svazek. Pokud je přítomen kyslík nebo jiné molekuly, životnost vlákna zdroje elektronů se dramaticky zkrátí. Dalším úskalím je, že molekuly plynu v tubusu budou fungovat jako vzorky a když budou tyto molekuly zasaženy primárními elektrony, paprsek se rozptýlí a nebude možné kontrolovat jeho trajektorii až ke vzorku umístěném v komoře. Proto je zásadní řízení a správná funkčnost vakuového systému. Při výměně vzorků při otevřené komoře musí být paprsek vypnut a vlákno zdroje elektronů izolováno od atmosféry tlakovými ventily. Vakuum je získáno odstraněním co největšího množství molekul plynu z tubusu a komory. Čím je vakuum větší, tím méně molekul plynu je přítomno. Atmosférický tlak na hladině moře se rovná 760 milimetrů rtuti. Tlak 1 milimetru rtuti se nazývá Torr. Vakuum v SEM musí být pod 10^{-4} Torr, aby byla zajištěna jeho funkčnost. Spousta mikroskopů však pracuje při vakuu 10^{-6} Torr nebo vyšším. Čím vyšší vakuum (čím nižší tlak), tím lépe bude mikroskop fungovat (Dunlap a Adaskaveg, 1997).



Obrázek 1 - Vakuová vývěva

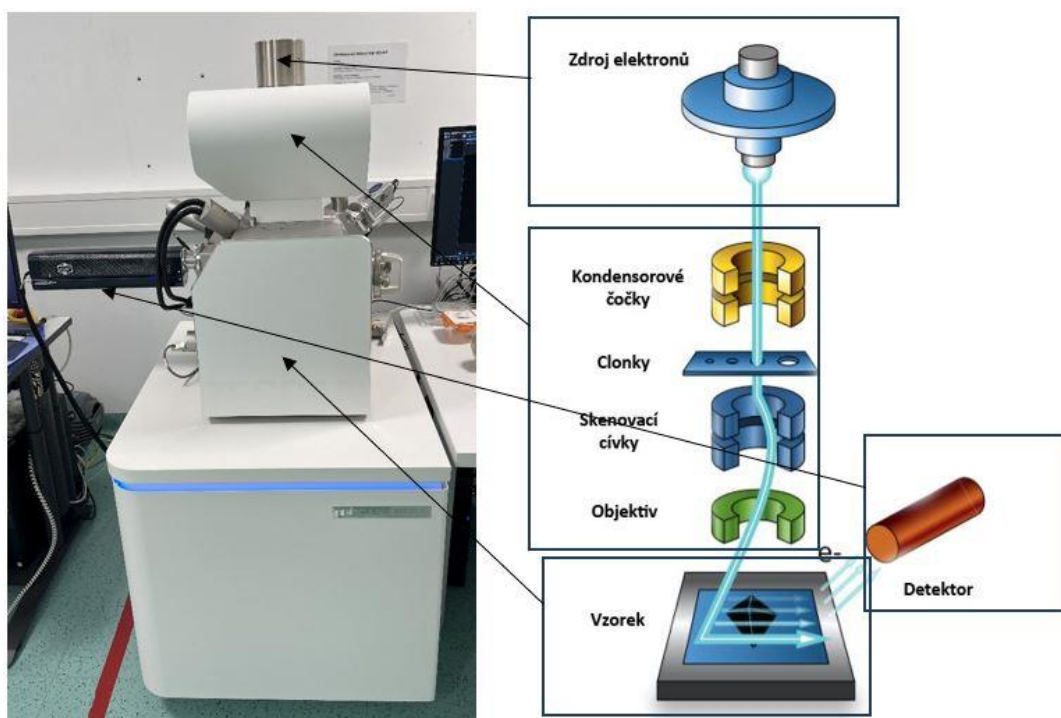
Ad 2. Zdroj elektronů se používá buď termoemisní nebo autoemisní. Nejčastěji používaný termoemisní zdroj je ve formě katody se žhaveným wolframovým vláknem. Toto vlákno je voleno z důvodu příznivých vlastností jako je vysoký bod tání (3653 K) nebo nízké hodnotě vakua (10^{-4} Torr), které je nutné pro jeho provoz. Jeho nevýhodou je poměrně krátká životnost cca 1-2 měsíce. Konstrukce nejběžnějšího zdroje elektronů je na obrázku 2. Skládá se z katody, jejíž částí je wolframové vlákno ve tvaru písmene V. Tato katoda je umístěna ve Wehneltově válci a pod Wehneltovým válcem je umístěna anoda. Na výsledný paprsek má vliv spousta okolností, ať už geometrie samotného vlákna, jeho středové umístění vůči otvoru ve Wehneltově válci, ale i vzdálenost vlákna od válce a spousta dalších faktorů. Elektronů se začínají emitovat při ohřátí drátku na teplotu 2800 K. Cílem je, aby elektrony získaly takovou energii, že budou schopné překonat síly, které je drží v jádrech wolframu. Následně jsou elektrony urychleny anodou a zformovány otvorem ve Wehneltově válci. Dále pokračují na své cestě ke vzorku skrz elektromagnetické čočky a cívky, které paprsek formují a usměřují. Dalším termoemisním zdrojem elektronů může být katoda z LaB_6 (hexaborid lantanu), která ale potřebuje pro svůj provoz vyšší hodnotu vakua (10^{-6} Torr). Jeho výhodou je mnohem delší životnost cca 1rok. Mezi autoemisní zdroje patří FEG, což je studené wolframové vlákno vyleptané do velmi ostrého hrotu, nebo Shottkyho katoda, kde je k nosnému vlákně z wolframu přivařeno orientované monokrystalické vlákno s hrotem. Potřebné vakuum pro tyto autoemisní zdroje se pohybuje mezi 10^{-8} – 10^{-9} Torr (Hafner, 2007).



Obrázek 2 - Typy zdrojů elektronů, Zdroj: (Anon. [b.r.])

Ad 3. Systém manipulace s elektronový svazkem. Pohyb elektronů může být řízen dvěma způsoby - elektrostatickými poli a elektromagnetickými poli. Zatímco v elektronovém zdroji máme elektrostatické pole, které vzniká umístěním negativního a pozitivního pole blízko sebe,

což je v případě SEMu katoda v podobě wolframového vlákna a anoda umístěná pod Wehneltovým válcem. V ostatních částech SEM řídíme elektrony pomocí elektromagnetických čoček. Většina elektronových mikroskopů používá několik elektromagnetických čoček nad sebou umístěných v tubusu. Každá z těchto čoček má svou nezastupitelnou funkci. Některé nám zmenšují velikost paprsku, některé jsou pro korekci astigmatismu. Astigmatismus je vada, která způsobuje špatnou kvalitu obrazu tím, že elektronový svazek není kruhový, což jednak snižuje rozlišení a jednak nám to způsobuje deformaci sledovaného obrazu. Proto je v tubusu několik čoček, které slouží právě pro korekci astigmatismu. Na konci tubusu je koncová kondensorová čočka. Tato část je velmi důležitá, protože nám pomocí protilehlých magnetických cívek umožňuje skenování vzorku v osách X a Y. Z této poslední části vychází i název skenovacího neboli rastrovacího anebo také řádkovacího mikroskopu. Mikroskop totiž skenuje vzorek v řádcích od levého rohu doprava a pak klesne o jeden řádek dolů. Zvětšení v elektronovém mikroskopu řídíme poměrem velikosti elektronového svazku na rozměr pozorované oblasti vzorku. S menším zvětšením pozorujeme větší oblast vzorku a obráceně s větším zvětšením menší oblast vzorku. Zvětšení sledované oblasti je možné dosáhnout dvěma způsoby, buď pouze pomocí softwaru, kde nastavíme zvětšení, které potřebujeme, nebo pomocí pohybu vzorku v ose Z. Když zmenšíme pracovní vzdálenost, docílíme také vhodného zvětšení. Dalším prvkem k ovládní svazku jsou clonky umístěné v tubusu. Clonky jsou vlastně součástky s různě velkým kruhovým otvorem, skrz který nám svazek prochází. Clonky řídí průchod elektronů bez jakéhokoliv pohybového usměrňování, jako tomu bylo při průchodu elektromagnetickými čočkami. V případě použití clonky s 20 μm otvorem nám projdou elektrony, které se odchýlily od středu paprsku pouze o méně než 10 μm . Ty, které se odchýlily více, jsou zastaveny tělem clonky. Velikost clonky je volena podle záměru pozorování vzorku. Pokud chceme vysoké rozlišení, je správnou volbou clonka s co nejmenším otvorem, pokud naopak cílem není co nejvyšší rozlišení, použijeme clonku větší (Jeol, [b.r.]).



Obrázek 3 - Systém manipulace s elektronovým svazkem, Zdroj: (Anon. [b.r.]) vztahující se ke konstrukci SEM

Ad 4. Primární elektrony generované zdrojem a usměrněné až ke vzorku mohou mít čtyři interakce se vzorkem. Díky jejich zápornému náboji mohou interagovat s elektrony v atomovém obalu atomů prvků samotného vzorku, tak i s jádry těchto atomů. Tyto interakce mohou být pružné a nepružné. Pružné srážky jsou takové, při kterých se mění směr pohybu primárních elektronů, ale zachovává se jejich energie. Tyto pružné srážky vnikají převážně při srážkách primárních elektronů s jádry atomových jader atomů ve vzorku. Nepružné srážky jsou ty, při kterých se mění směr pohybu primárních elektronů a jejich energie postupně klesá, protože je předána dalším elektronům, s kterými PE interagovaly (Wandrol, [b.r.]).

Interakce se vzorkem 1 – STEM znamená, že primární elektrony neinteragovaly s žádným jiným elektronem v atomovém obalu atomů vzorku, proto prošly skrz vzorek, neabsorbovaly se, byly detekovány a přispěly k celkovému obrazu vzorku (Němeček, 2017).

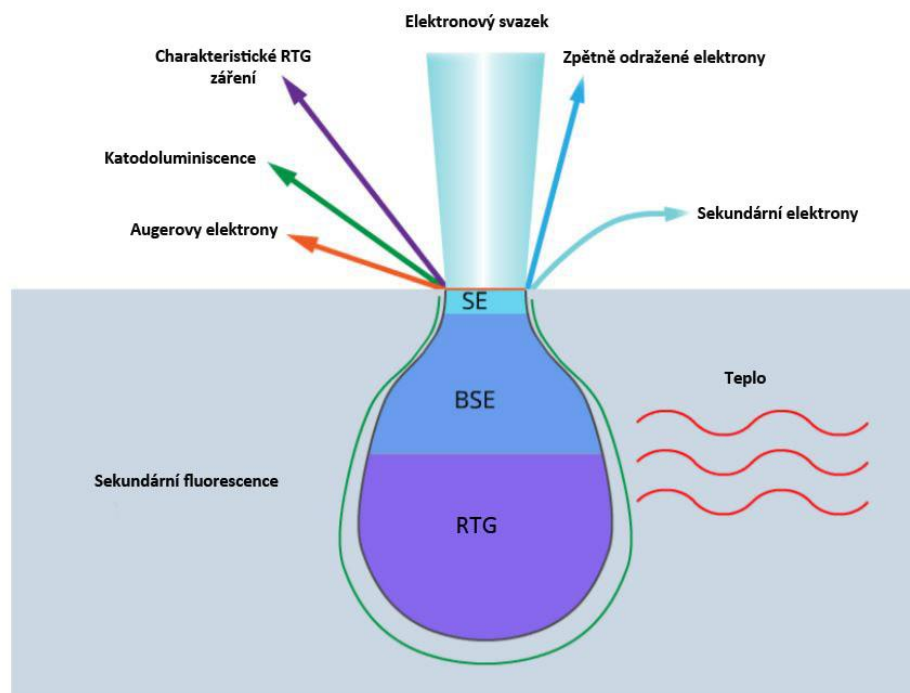
Interakce se vzorkem 2 – BSE znamená, že primární elektrony byly rozptýleny v elektrickém poli dalších elektronů, od kterých byly odpuzovány nebo odraženy od kladného jádra. Tyto elektrony nepřichází téměř o žádnou energii, a proto jsou schopny doletět poměrně daleko od místa svého dopadu na vzorek. Tyto elektrony jsou detekovány pomocí BSE detektorů, které jsou zpravidla umístěny těsně pod objektivem mikroskopu (Němeček, 2017).

Interakce se vzorkem 3 – SE znamená, že primární elektron narazil na elektron atomu vzorku a předal mu část své energie. Tento elektron atomu tak může získat vyšší energetickou

hladinu nebo je zcela uvolněn z atomu. Takto uvolněné elektrony se nazývají sekundární elektrony a detekujeme je pomocí SE detektoru, který díky své katodě odsává sekundární elektrony nad vzorkem. Čím více SE je zachyceno, tím je zobrazený bod světlejší. Díky tomu získáme „topografickou“ mapu vzorku. Sekundární elektrony mohou vzniknout jednak již zmíněnou interakcí primárního elektronu s atomovým obalem, ale také při interakci BSE s atomovým obalem a nakonec i interakcí BSE s vnitřkem komory (Němeček, 2017).

Interakce se vzorkem 4 – EDX znamená, že se po uvolnění elektronu z dané energetické hladiny na dané místo dostal elektron, který byl původně na vyšší energetické hladině a při jeho přesunu do této nižší hladiny došlo k uvolnění charakteristického rentgenového záření, kdy energie fotonu tohoto záření se rovná rozdílu příslušných energetických hladin. Toto záření se detekuje pomocí EDX detektoru, který nám ukazuje prvkovou analýzu složení vzorku. V některých případech jsou uvolněny i Augerovy elektrony. Ty jsou specifické tím, že po jejich uvolnění z atomového obalu zůstává jejich místo neobsazené. Tento elektron získal energii elektronu, který ji odevzdal při přechodu na nižší energetickou hladinu. V elektronovém mikroskopu nám vzniká i katodoluminiscence způsobená nepružnými srážkami. Při nepružné srážce je část energie primárního elektronu předána jinému elektronu, který se díky tomu dostane na vyšší energetickou hladinu. Při přesunu zpět na nižší energetickou hladinu se emituje záření o frekvenci rovné rozdílu energií daných energetických hladin. Tímto způsobem může být emitováno záření ultrafialové, infračervené, ale i viditelné lidským okem (Mohammed a Abdullah, 2018).

Každá z uvedených interakcí nám pomocí detektorů říká o vzorku odlišnou informaci, neboť získané detekované elektrony interagovaly se vzorkem v odlišných hloubkách vzorku. SE neboli sekundární elektrony nám předávají topografické informace, interakce se vzorkem ~100 nm. BSE neboli zpětně odražené elektrony nám signalizují atomová čísla a fázové rozdíly vzorku, interakce se vzorkem ~500 μm. Augerovy elektrony nám říkají o atomovém složení povrchu, interakce se vzorkem ~1 nm. Katodoluminiscence předává informaci o elektronovém stavu vzorku, interakce se vzorkem ~1-5 μm. TEM nám umožňuje získat morfologické informace o vzorku (Němeček, 2017).



Obrázek 4 - Hloubka a prostor interakcí elektronů se vzorkem, Zdroj: (Anon. [b.r.])

Ad 5. Jak bylo uvedeno výše, každý SEM má detekční systém. Tento systém se skládá z jednotlivých detektorů, které jsou na SEM namontované. Ne každý mikroskop má všechny typy detektorů. Každý uživatel si volí při nákupu mikroskopu, jaké detektory ve vybavení mikroskopu bude mít. Také se liší konstrukce jednotlivých detektorů, jak mezi jednotlivými detektory, tak i mezi stejnými typy detektorů v závislosti na výrobci. Detektory mohou být tubusové i komorové, statické, nebo s pohybem umožňující přiblížení detektoru ke vzorku.

SE detektor, je detektor sekundárních elektronů, tento detektor je ve vybavení každého elektronového mikroskopu. Detektor SE přitahuje pomocí mřížky s potenciálem +200 V sekundární elektrony, které po vstupu do ústí detektoru jsou urychleny pomocí 10 kV na scintilátor. Po zasažení scintilátoru vzniká emise fotonů. Tyto fotony pokračují přes světlovod až k fotonásobiči, který znásobí množství každého fotonu a tím zesílí původní signál. Velikost zesílení signálu je řízena regulací napětí. Množství sekundárních elektronů závisí na úhlu dopadu primárních elektronů na vzorek. Při větším úhlu se zvětšuje interakční objem, a to způsobí, že hrany a šikmé povrchy jsou na výsledném obraze světlejší než plocha místa. Díky tomu vzniká dojem 3D zobrazení povrchu vzorku (Dunlap a Adaskaveg, 1997).

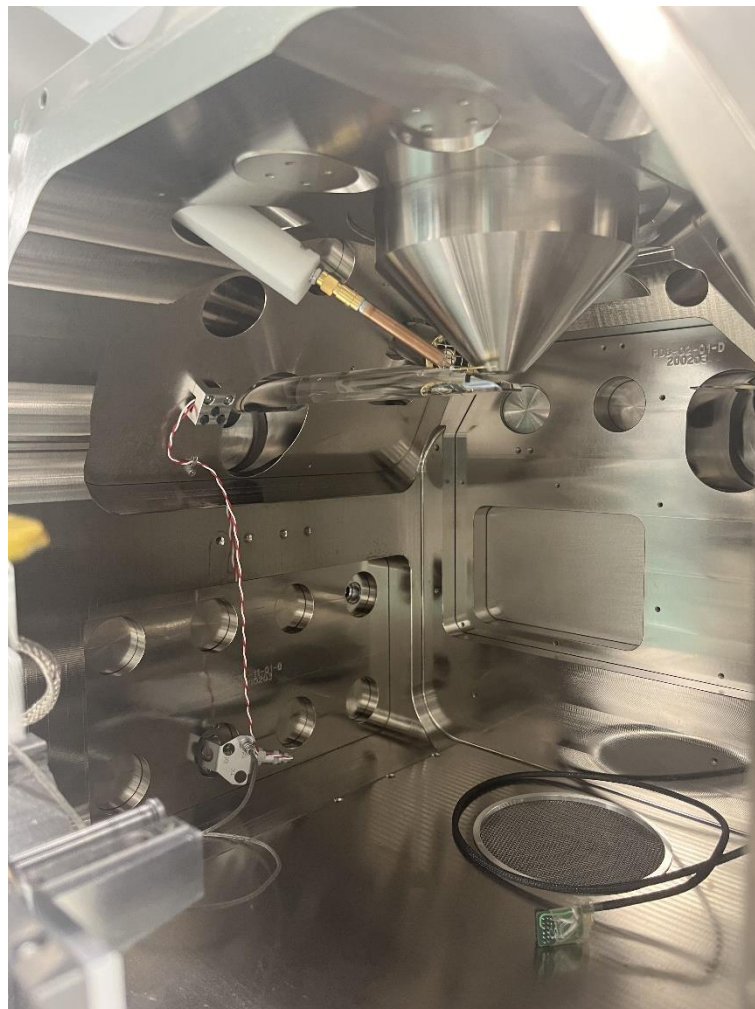
BSE detektor je detektor zpětně odražených elektronů. Jsou to elektrony vznikající při pružných srážkách s atomy vzorku. Tento detektor nám ukazuje materiálový kontrast, který je způsobený tím, že prvky s vyšším atomárním číslem se na výsledném obraze zobrazí jako světlejší než prvky s nižším atomárním číslem.

TE detektor, je detektor prošlých elektronů. Tento detektor se používá v transmisních elektronových mikroskopech a jeho pomocí se získává morfologické složení vzorku.

EDS detektor, je detektor charakteristického RTG záření. Slouží ke zjištění chemického složení vzorků. Výsledkem použití tohoto detektoru je graf s píky, které nám zobrazují spektrum četnosti RTG signálu. Výška píků jednotlivých prvků je úměrná koncentraci daného prvku ve vzorku.

EBSD detektor, je detektor zobrazující difrakci zpětně odražených elektronů. Tento detektor je používán pro krystalografické analýzy, protože díky jeho použití je možno zjistit orientaci krystalové mřížky vzorku.

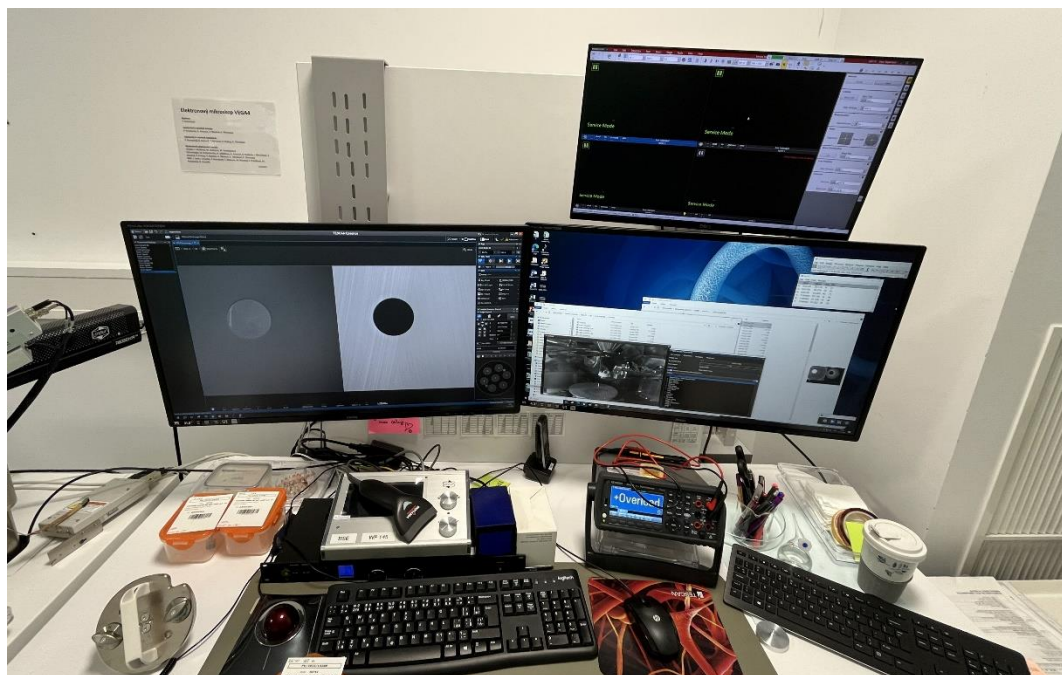
CL detektor – je detektor zachycující katodoluminiscenci, tedy světlo emitované ze vzorku. Toto světlo může být prakticky z celého spektra tedy ultrafialové, viditelné i infračervené.



Obrázek 5 - Detektory v komoře SEM

Ad 6. systém zpracování signálu začíná zesilovačem umístěným v detektoru a končí obrazem, který vidíme na obrazovce. Signál získaný v SEM je přetransformován do pixelů, které nám zobrazují obraz na obrazovce monitoru. Pixely jsou body, které mohou mít barvu od černé po

bílou. Díky přiřazení hodnoty každému pixelu získáme seznam čísel, které nám vytvoří obraz. Obraz prohlédneme na základě jasu a kontrastu. Jas je skutečná hodnota každého pixelu, což znamená, že pixel s hodnotou 70 bude jasnější než jiný s hodnotou 20. Kontrastem je rozdíl mezi dvěma pixely. Pokud budou dva pixely blízko u sebe jeden s hodnotou 30 a druhý s hodnotou 32, kontrast mezi nimi jsou 2 jednotky, což je velmi nízký kontrast, pokud ale budeme mít hodnoty pixelů dál od sebe, třeba 30 a 80, bude kontrast vyšší. Ovládání jasu nebo také úroveň černé řídí jas celkového zobrazení. Toto ovládání vezme každý pixel a přidá nebo odečte nějakou hodnotu. Z toho plyne, že pokud by původní hodnota pixelu byla 5 a ovládání jasu by bylo zvýšeno o čtyři, pak výsledná hodnota bude 9. Ovšem také by to způsobilo, že všechny hraniční pixely vzdálené od limitu o čtyři by získaly všechny stejnou hraniční hodnotu. To znamená, že když je hodnota nad nebo pod viditelným spektrem, dojde k jejímu oříznutí na nejbližší hodnotu, která bude zobrazena. Ovládací prvek kontrastu neboli zesílení nastavuje zesílení detektoru sekundárních nebo zpětně odražených elektronů. Se zvýšeným zesílením se zvyšuje násobení fotonásobičem a zesiluje signál. Důvodem, proč je napětí na fotonásobiči označované jako kontrola kontrastu je, že když máme vedle sebe dva pixely a jeden má hodnotu 5 a druhý 10, je mezi nimi rozdíl pouze 5 jednotek. Pokud ovšem zvýšením kontrastu zvýšíme napětí na fotonásobiči a tím získáme třeba 3x takový násobící faktor, budou nové hodnoty pixelů 15 a 30 a jejich rozdíl tedy bude také 3x vyšší, a tedy lépe rozeznatelný na výsledném obrazu. Úpravy jasu a kontrastu jsou tedy vlastně hlavními ovládacími prvky nastavení zobrazení snímku vzorku a také většinou jedině, které jsou ladění snímku použity. Občas může být pro ladění snímku využito různých přídavných zařízení nebo matematických funkcí pro vyhlazování snímků, dopočítávání bodů, atd. (Wandrol, [b.r.]).



Obrázek 6 - Zobrazovací systém SEM

Ad 7. Zobrazovací systém je složený ze dvou částí - počítače a software na něm nainstalovaném, který nám umožňuje ovládat elektronový mikroskop a zároveň nastavovat parametry obrazu jako je jas, kontrast, rozlišení, zvětšení, hloubku ostrosti, šum a celkově nastavit výslednou kvalitu pořízeného snímku.

Jas, jak již bylo uvedeno dříve, určuje hodnotu každého pixelu, které nám tvoří výsledný obraz. Čím jsou hodnoty jasu vyšší, tím je obraz jasnější.

Kontrast, také uveden dříve, je rozdílem hodnot mezi pixely získaným pomocí zesílení napětí na fotonásobiči (Wandrol, [b.r.]).

Rozlišení je schopnost rozlišit od sebe dva body umístěné vedle sebe. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím rozlišení je bodová velikost paprsku na vzorku. Mezi další faktory patří velikost clonky, pracovní vzdálenost vzorku, napětí, proud a kruhovitost paprsku.

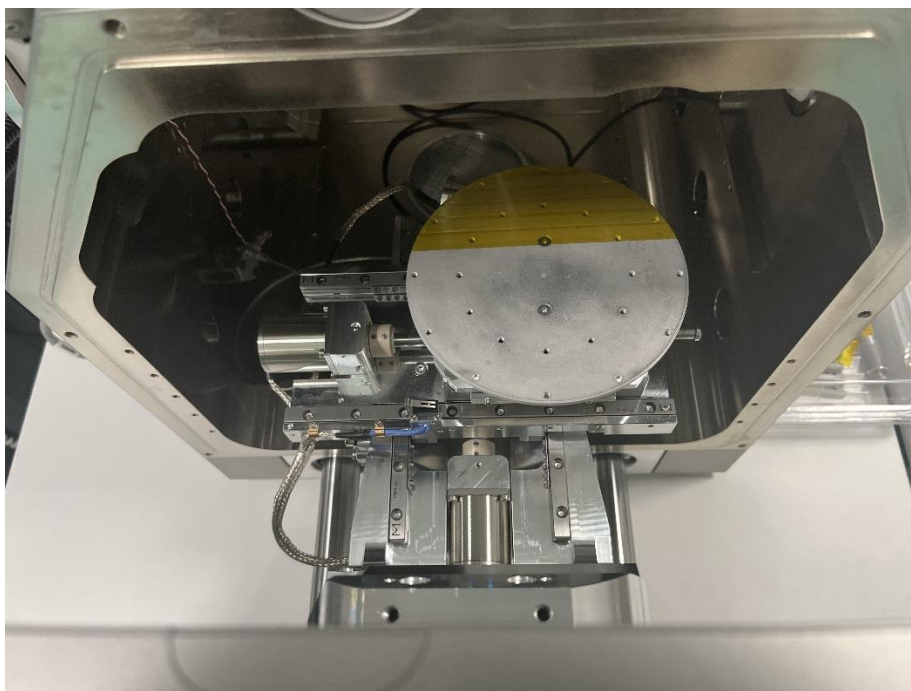
Zvětšení je funkce, která nám ovlivňuje velikost snímané oblasti. Jak bylo uvedeno dříve, velikost je možné ovlivnit pracovní vzdáleností nebo elektromagnetickými čočkami. V SEM je možné pořizovat i obrazy s větším zvětšením, než je schopnost rozlišení. Takovému zvětšení se říká prázdné, protože nám neposkytuje další nové informace o vzorku plynoucí z tohoto zvětšení (Němeček, 2017).

Hloubka ostrosti se nazývá oblast přijatelné ostrosti, která se nachází před a za bodem našeho zaostření. Je to funkce vzdálenosti vzorku a objektivu. Přiblížením vzorku k objektivu pomocí úpravy pracovní vzdálenosti je menší hloubka ostrosti a vyšší rozlišení, naproti tomu čím dále je vzorek od objektivu, tím vyšší bude hloubka ostrosti a nižší rozlišení.

Šum je jas pozorovaný na obraze, který není výsledkem interakce primárních elektronů se vzorkem. Zobrazuje se jako „sníh“ na obraze. Tento stav nastává, když se nám nepříznivě zvětší poměr signálu z elektronického šumu systému a je větší než signál ze vzorku. Jsou dva způsoby, jak tuto situaci řešit, a to zvýšením signálu získaného ze vzorku nebo snížením elektronického šumu. Zvýšení signálu je možné zvětšením clonky, zvýšením předpětí, nebo třeba prodloužením doby skenování. Když je prodloužena doba skenování, zvýší se doba rastrování vzorku a tím se zvýší poměr signálu k šumu. Fotonásobič je jedním z hlavních generátorů elektronického šumu. Čím více napětí, tím vyšší zesílení signálu ale i navýšení šumu. To se nám zobrazí jako zrnitý obraz. Vždy je proto třeba najít kompromis mezi zesílením signálu, délkou skenování a dalšími faktory, aby bylo docíleno co nejlepšího obrazu (Nebesářová, 2001).

Obrázky pořízené pomocí SEM jsou monochromatické, což znamená ve stupních šedi. Je to způsobeno tím, že vlnová délka elektronů je mnohem menší než vlnová délka viditelného světla. Proto veškeré barevné obrázky ze SEM, které nalezneme, jsou obarveny pomocí postprocesingu (Nebesářová, 2001).

Nedílnou součástí elektronového mikroskopu je goniometrický stolek (obr. 7). Nachází se v komoře mikroskopu a může být buď součástí komory, nebo je uchycen ke dveřím mikroskopu, přičemž vyjíždí současně s dveřmi při otevření komory. Stolek slouží k přichycení vzorku, který budeme v mikroskopu pozorovat. Zpravidla jsou na ložné ploše stolku udělané otvory, do kterých se zasunuje čep stubu, což je držák vzorku. Uchycení stubu za čep je velmi vhodné, protože stolek má mnoho možností pohybu. Pohybuje se v osách X, Y, Z, ale je možné ho i naklápět a rotovat. Právě kvůli náklonu je vhodné uchycení stubu za čep, aby nedošlo k jeho pádu na dno komory (Dunlap a Adaskaveg, 1997).



Obrázek 7 - Goniometrický stolek v komoře SEM

3.1.4 Vzorky pro elektronovou mikroskopii

Vzorky pro pozorování v SEM musí splňovat určité parametry, aby bylo možné jejich pozorování a zároveň nám nezničily mikroskop. Vzorky vhodné pro pozorování v mikroskopu by měly být čisté bez cizorodých kontaminací, stabilní ve vakuu, stabilní při ozáření elektronovým svazkem. Také by měly emitovat dostatečný signál a při interakci s primárními elektrony by se neměly nabíjet (Meyer et al., 2004). Z výše uvedeného vyplývá, že vzorky musí být suché, aby nedošlo k jejich zničení v důsledku rychlého odpaření vody díky vakuu a zároveň ke kontaminaci komory odpařenou vodou s dalšími těkavými látkami, případně až ke zničení mikroskopu (Nebesářová, 2001). Všeobecně se vzorky budou dělit na organické a anorganické a ty dále na vodivé a nevodivé. Optimální samozřejmě je, když můžeme pozorovat vzorky v jejich přirozeném stavu s pouze minimálními úpravami, jako je pouze zmenšení rozměru a očištění. To plní většinou vzorky anorganické a vodivé, což jsou vzorky různých kovů. Potom máme vzorky, které sice nejsou samy o sobě vodivé, ale jsou alespoň přirozeně suché. Patří mezi ně například keramika, plasty nebo minerály. Takové vzorky stačí pouze opatřit vodivou vrstvou v tloušťce 10-20 nanometrů a jsou připravené pro pozorování (Nebesářová, 2001). Nejkomplikovanější je příprava biologických vzorků, které přirozeně obsahují vodu (Němec, 1962). Jednou možností je pozorování takového vzorku ve speciálně upraveném elektronovém mikroskopu ESEM, což je environmentální skenovací elektronový mikroskop, ve kterém není nutné pro provoz dosáhnout tak vysokého vakua (Anon. [b.r.]

(Anon. [b.r.]). Další možností pro pozorování ve standardním SEM je pečlivá příprava vzorku, která se skládá z několika kroků. V prvním kroku je odebrání biologického materiálu. Následně je nutné vzorek stabilizovat, aby nedošlo k jeho degradaci nebo tvarovým změnám v důsledku dalších úprav (Panshin a De Zeeuw, 1980). Nejčastěji je používána chemická fixace nebo zmrazení. Zmrazené vzorky mohou být prohlíženy přímo v mikroskopu, pakliže v něm máme příslušné příslušenství, které nám vzorek udrží zmrazený po celou dobu pozorování (Sader et al., 2013). Další možností je lyofilizace, kdy dojde k vysušení vzorku mrazem, aniž by došlo k jeho destrukci. Další druh biologických vzorků je možné pouze vysušit vzduchem, abychom je mohli pozorovat. Nakonec zde máme vzorky, které je potřeba sušit výrazně složitějším způsobem. Je potřeba použít medium s nízkým povrchovým napětím, jako třeba CO₂, a vzorek, který je postupně napouštěn rozpouštědlem se zvyšující se koncentrací. Rozpouštědlem může být etanol, aceton nebo jiná chemikálie. Následně je vzorek vložen do tlakové komory a rozpouštědlo ve vzorku je díky tlaku nahrazeno plynem. Následně dojde ke zvýšení teploty v komoře na teplotu, při které se zkapalněný plyn opět změní ve svou plynnou fázi bez změny objemu, hustoty nebo sil povrchového napětí. Díky tomu dojde k vysušení vzorku bez jakékoliv jeho deformace (Němec, 1962). Následně je vzorek upevněn na stub za pomoci oboustranné vodivé lepicí pásky nebo vodivým lepidlem. Nakonec je vzorek opatřen vodivým povrchem, kterým může být uhlíkový povlak nebo vrstva kovu. Z kovů se nejčastěji používá zlato, platina, nebo slitina platiny a paladia (Mamoňová, 2018).

Nanesení vodivé vrstvy se dá provádět třemi základními způsoby. Prvním z nich je vakuové napařování. Je to metoda, při které se kov zahřeje na teplotu, při které se z něj začínají uvolňovat molekuly, které při dopadu na vzorek o chladnější teplotě kondenzují. Celá tato operace musí probíhat při vysokém vakuu v napařovací komoře. Další důležitou podmínkou je, aby vzorek byl napařován za rotace, aby vodivá vrstva byla rovnoměrná po celém vzorku. Druhý způsob je iontové napařování. Pro tento způsob jsou potřeba ionty plynu, které vznikají při ionizaci plynu. Následně jsou elektrony přitahovány katodou, kde se sráží s kovem použitým pro vznik vodivé vrstvy. Z tohoto kovu ionty vyráží částice, které opět naráží do kovu až následně vznikne mrak částic, které obalí vzorek rovnoměrnou vodivou vrstvou. Třetím způsobem je impregnace. Impregnace je chemická metoda nanesení vrstvy kovu na vzorek. Tato metoda je vhodná v případech, kdy nemáme k dispozici speciální napařovací aparaturu, nebo je vzorek alespoň částečně vodivý. Nejpoužívanějším způsobem je využití reakce kyseliny tanové a osmia, která se označuje jako TAO, nebo schopnosti thiokarbohydrazidu vázat osmium, označení této metody je OTO. A teprve po provedení všech těchto kroků je vzorek připraven pro pozorování (Nebesářová, 2001).

V případě této práce budou použity vzorky dřeva. Dřevo je sice biologický materiál, ale pro jeho přípravu bude stačit jeho řádné vysušení. Dále by bylo vhodné, a pro práci v mikroskopu jednodušší, ho opatřit vodivou vrstvou. Cílem této práce je ale pozorování dřeva právě bez vodivé vrstvy pouze za pomoci nastavení mikroskopu. Proto našim vzorkem bude vysušené čisté dřevo, připevněné na stub pomocí oboustranně lepicí uhlíkové pásky.

3.1.5 Nabíjení nevodivých vzorků

Nabíjení vzorku je jev, který vzniká nahromaděním elektronů ve vzorku a jejich nekontrolovaným výbojem. To může způsobit nežádoucí artefakty v obrazu vzorku. Když je počet dopadajících elektronů vyšší, než počet elektronů unikajících ze vzorku, pak se na povrchu vzorku vytvoří záporný náboj v místě, kde paprsek dopadá na vzorek. Tento jev způsobuje řadu neobvyklých jevů, jako je abnormální kontrast, deformace obrazu nebo posun obrazu. Někdy může náhlý výboj elektronů z nabitě oblasti způsobit světlé zrnění na monitoru. Tyto stavy znemožňují zachytit jednotný obraz vzorku (Chan et al., 1993). Velikost nabíjení závisí na velikosti energie elektronů a na počtu elektronů dopadajících na vzorek. Energie elektronů souvisí s urychlovacím napětím (tj. vysoké kV = vysoká energie), takže snížením urychlovacího napětí můžeme snížit velikost nabíjení. Počet elektronů souvisí s řadou parametrů, ale obecně snížením počtu elektronů, například změnou velikosti clonky, snížením proudu, zúžením paprsku, také můžeme pomoci snížit nabíjení vzorku (Cazaux, 2004).

Cestou pozorování nevodivých vzorků při vysokém vakuu v elektronovém mikroskopu by mohlo být využití kritické energie, při které je množství emitovaných elektronů ze vzorku rovno množství dopadajících primárních elektronů (obr. 8). To způsobí, že se vzorek nebude nabíjet a bude možné provést jeho pozorování (Frank, 2016).

Tato cesta vychází z jednoduchého modelu nabíjení tenké desky na povrchu vzorku, časová konstanta nabíjení ovlivňujícího obraz (3):

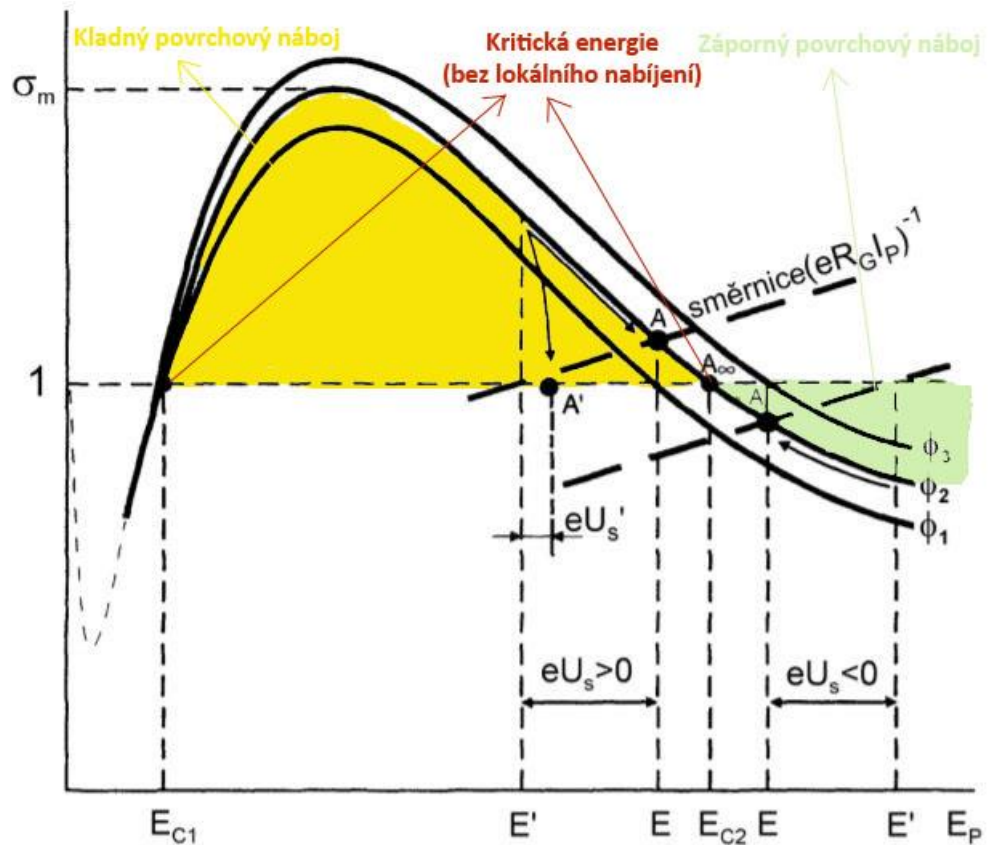
$$\tau_C \cong 2,5 \frac{\varepsilon a E_{C2}}{e I_p (1-\eta)} \quad (3)$$

ε - permitivita vzorku

a - průměr zorného pole

I_p - primární proud

η - výtěžek BSE



Obrázek 8 - Závislost celkového výtěžku elektronů na energii dopadu, Zdroj: (Zobačová a Frank, 2003)

$E > E_{C2}$:

$\sigma < 1$, záporný povrchový náboj a potenciál, posun pracovního bodu do A pro konečnou vodivost, respektive do A_∞ pro nulovou vodivost

$E < E_{C2}$:

$\sigma > 1$, kladný povrchový náboj a potenciál. Pracovní bod A': nabitý povrch přitahuje zpět SE

$E < E_{C1}$:

metastabilní, spontánně buď zrcadlový obraz nebo $\rightarrow A'$

V oblasti mezi E_{C1} a E_{C2} redukované nabíjení, optimum pro $E=E_{C2}$ (Frank, 2016).

Nabíjení vzorků může být řešeno mnoha způsoby. Jeden z přístupů pro TEM je příprava grafenové membrány, na kterou je následně umístěn vzorek. Grafen díky své vysoké vodivosti stáhne náboj ze vzorku, který je následně možné pozorovat při vysokém rozlišení, bez vodivé povrchové vrstvy (Sader et al., 2013).

Při pozorování vzorků škrobu, byly tyto vzorky potaženy vodivou vrstvou ze slitiny zlata s palladiem. Pro pozorování SE detektorem musely být použity nižší urychlovací napětí, aby bylo sníženo nabíjení, to ovšem způsobilo nižší kontrast výsledných obrázků. Zároveň ale

bylo zjištěno, že při pozorování BSE detektorem, obrázky nabíjením ovlivněné nebyly i při vysokých urychlovacích napětích (Kim et al., 2008).

V další práci je řešeno nabíjení vzorku při EDS analýze. Při této analýze se většinou používá povlakování vzorku uhlíkem pro menší ovlivnění prvkové analýzy. V této práci byl proveden pokus na stejném vzorku, kde polovina byla potažena uhlíkovým povlakem a druhá zůstala bez jakékoliv další úpravy. Následná EDS analýza ukázala, že v případě nepovlakované části se v důsledku nabíjení vzorku neukázalo kompletní složení vzorku a některé prvky byly nabíjením kompletně „zastíněny“. Na druhou stranu se ale ukázalo, že pakliže nabíjení nezpůsobuje artefakty v obraze, je ovlivnění EDS analýzy zanedbatelné (Miller, 1991).

Někteří výrobci mikroskopů si uvědomují, že někdy je potřeba pozorovat vzorky v elektronovém mikroskopu bez přidané vodivé vrstvy, a proto, aby předešli nabíjení vzorku, přidali do svých zařízení funkci zpomalení primárního svazku elektronů, která umožňuje pozorovat vzorek při vysokém rozlišení bez artefaktů z nabíjení. (Anon., [b.r.]

V dalším výzkumu bylo zkoumáno pozorování nepovrstvených vzorků v elektronovém mikroskopu právě na základě hledání kritické energie. Byla objevena metoda nalezení kritické energie z velkého množství sebraných dat zaznamenaných grafů závislosti signálu na čase. Každý graf zaznamenává ozařování vzorku od samotného počátku ve dvourozměrné síti bodů rozmístěných po ploše, které ještě nebyly ozářeny. Výsledkem je graf s „nabíjecí křivkou“, která znázorňuje energetickou závislost na čase a signálu vztaženými k asymptotické hodnotě. Tato křivka protíná nulovou hladinu při optimální energii elektronů, což je právě energie, která umožňuje pozorování vzorku bez nabíjení a vzniku artefaktů v obraze. Kritická energie se měří s přesností ± 50 eV, při primární proudu 1 nA a rastrování je prováděno v čase 2 μ s. Výsledkem této práce byl mimo jiné algoritmus, který zajistil automatický sběr dat při hledání kritické energie a pořízení snímků bez artefaktů (Mika et al., 2003). Zároveň bylo upraveno nastavení v tubusu mikroskopu. Metoda je použitelná i na mikroskopu neupraveném a při hledání správného urychlovacího napětí a tím kritické energie ručně, jak bude provedeno v této práci (Frank et al., 2001).

3.1.6 Vybrané vzorky pro DP

Pro tuto práci byly vybrány vzorky dřev našich i exotických, aby bylo možné zjistit, zdali má dřevina vliv na pozorování dřeva v elektronovém mikroskopu. Mezi vybranými vzorky jsou akát, dub, jasan, javor, thermowood, smrk, IPE, merbau, massaranduba, garapa. Do výběru byl vybrán klasický smrk i thermowood pro zjištění, zda má nějaký vliv na pozorování termoúprava smrkového dřeva.

3.1.6.1 Akát

Celým názvem trnovník akát je listnatá dřevina (obr. 9). Je to druh pro naši oblast nepůvodní, pochází ze Severní Ameriky. Jedna z našich nejtvrdějších a nejtěžších dřevin s přirozenou odolností proti abiotickým a biotickým činitelům. Tato dřevina je jádrová, kruhovitě pórovitá. Jádro má žlutozelenou tmavou barvu, běl je naproti tomu velmi úzká. Dřevo akátu při minimálním opracování je ve formě kůlů používáno pro stavbu ohrad, jinak je využíváno jako konstrukční dřevo pro silné namáhání, na výrobu oken, parket atd. Hustota akátu je 761 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2016).



Obrázek 9 - Akát - polotovár pro odběr vzorků

3.1.6.2 Dub

Celým názvem dub letní/zimní je listnatá dřevina (obr. 10). Dřevo dubů rostoucích u nás od sebe nelze rozlišit. Dřevina s výraznými dřevnými paprsky. Díky vysokému obsahu tříslovin má dub charakteristický pach. Při dlouhodobém skladování ve vodě dřevo tmavne až černá. V této barevné varietě je následně prodáváno pod obchodním označením bahenní dub. Dřevina je kruhovitě pórovitá, jádro široké žluto až tmavě hnědé, běl úzká světle hnědá. Dřevo dubu se používá na stavební a konstrukční použití v interiéru i exteriéru nebo pro výrobu nábytku, parket, dýh, sudů. Hustota dubu 702 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2016).



Obrázek 10 - Dub - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.3 Jasan

Celým názvem jasan ztepilý je listnatá dřevina (obr. 11). Jádro jasanu se tvoří až v pozdějším věku a v průmyslu se jasanové dřevo využívá bez jádra. Má charakteristickou rovnovláknennou texturu a jeho zvláštností je vlnitá a květovaná kresba. Dřevina je kruhovitě pórovitá, v případě již vytvořeného jádra je toto jádro tmavě hnědé, běl bílá až světle hnědá, jedná se o dřevo tvrdé a středně těžké. Používá se jako konstrukční dřevo pro silné namáhání a pro výrobu nábytku, dých, parket, ale také pro výrobu sportovních potřeb. Hustota jasanu 702 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2016).



Obrázek 11 - Jasan - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.4 Javor

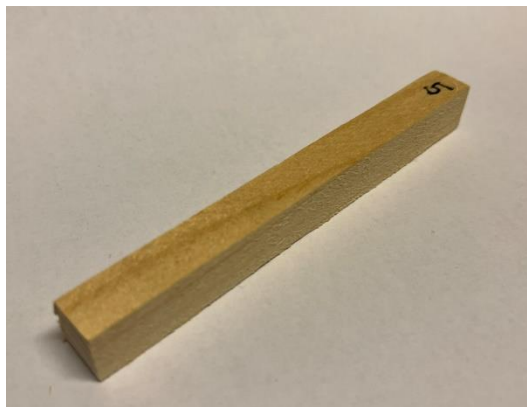
Celým názvem javor klen/mléč je listnatá dřevina (obr. 12). Dřevo u nás rostoucích javorů od sebe nelze rozlišit. Ve dřevě se může vyskytovat nepravé jádro, občas se mohou vyskytnout nazelenalé dřevné skvrny. Dřevo je ceněno pro vlnitou nebo očkovou kresbu. Dřevina je roztroušeně pórovitá bez rozlišitelného jádra, barva je bělavá, nažloutlá nebo narůžovělá a dřevo je lesklé. Opět se jedná o tvrdé a středně těžké dřevo. Používá se na výrobu stolních desek, obkladů, parket, nábytkové dýhy, ale i jako soustružnické a hračkářské dřevo. Hustota javoru 623 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2016).



Obrázek 12 - Javor - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.5 Smrk

Celým názvem smrk ztepilý je jehličnatá dřevina (obr. 13). Jedná se o dřevinu u nás nejvíce zastoupenou. Smrk je charakteristický obsahem vyžralého dřeva a také je hlavním zdrojem rezonančního dříví pro výrobu hudebních nástrojů. Dřevo je bez rozlišitelného jádra, barvy bělavé až nažloutlé, s obsahem pryskyřičných kanálek. Dřevo je měkké a lehké s malou odolností proti abiotickým a biotickým činitelům. Používá se jako stavební a konstrukční dřevo v interiéru i exteriéru - pro kompletní konstrukci budov, podlahová prkna, na výrobu hudebních nástrojů, jako materiál pro výrobu aglomerovaných desek. Hustota 441 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2016).



Obrázek 13 - Smrk - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.6 Thermowood – smrk

Thermowood je mezi vzorky zařazen pro zajímavost (obr. 14). Je samozřejmě známé, že ani dřevo ze stejného stromu, když je odebrané z různých míst, nemusí mít stejné vlastnosti. A v případě vybraných vzorků rozhodně nejde o vzorek smrku a thermowood smrku ze stejného stromu, dokonce ani místa vypěstování. Proto porovnání výsledků při pozorování v elektronovém mikroskopu je takřikajíc moc nevyovídající. Ale mohlo by být zajímavé, jestli dřevo teplotně upravené tak, aby získalo lepší vlastnosti co se odolnosti týče, bude mít hodnoty pro pozorování stejné jako smrk bez jakékoliv úpravy nebo nějakým směrem posunuté.



Obrázek 14 - Thermowood - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.7 Ipe

Dřevina pocházející ze Střední a Jižní Ameriky (obr. 15). Dřevo je velmi tvrdé a velmi odolné. Jedná se o dřevinu jádrovou. Jádru má barvu od světle do tmavozelené se zřetelnými přírůstkovými zónami, běl je úzká rozlišitelná od jádra, žlutá až načervenalá. Používá se na exteriérový nábytek, konstrukce teras, vodní stavby, luky, železniční pražce, krájené dýky, podlahy, parket atd. Hustota 1040 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2019).



Obrázek 15 - Ipe - polotovar pro odběr vzorků

3.1.6.8 Merbau

Dřevina pocházející z Jihovýchodní Asie (obr. 16). Dřevina je jádrová, barva jádra šedohnědá až červenohnědá, běl 5-8 cm široká, světle žlutá, přírůstkové zóny viditelné. Ve dřevě se objevuje střídavá točivost vláken, je na dotyk mastné, bez lesku. Jádru velmi odolné, běl naopak odolná málo. Používá se v interiéru i exteriéru, na krájené dýhy, hudební nástroje, mosty, pražce, parkety, schody, okna atd. Hustota 830 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2019).



Obrázek 16 - Merbau - polotovár pro odběr vzorků

3.1.6.9 Massaranduba

Dřevina pocházející ze Střední a Jižní Ameriky (obr. 17). Pro svůj obsah biologicky aktivních látek může způsobovat podráždění sliznic i pokožky při opracování. Používá se i pro těžbu latexu, který je obsažený v kůře. Jedná se o jádrovou dřevinu, jádro barvy vínové a červenohnědé, běl úzká, odlišitelná od jádra, barvy nažloutlé nebo šedorůžové, přírůstové zóny málo zřetelné. U dřeva se vyskytuje střídavá točivost vláken, je na dotyk mastné a obsahuje pryskyřičné kanálky. Je velmi trvanlivé a odolné proti mořské vodě a hmyzu. Používá se na vodní konstrukce, mosty, lodě, parkety, schodiště, terasy, tága, smyčce, šindele, krájené dýhy a spoustu dalšího. Hustota 1100 kg/m^3 (Zeidler a Borůvka, 2019).



Obrázek 17 - Massaranduba - polotovár pro odběr vzorků

3.1.6.10 Garapa

Dřevina pocházející z Jižní Ameriky (obr. 18). Dřevina je jádrová, jádro barvy žluté s jemnou strukturou, běl také barvy žluté, odlišitelná od jádra (Filho, 1970)]. Vyniká svojí odolností, a proto se používá jako konstrukční dřevo pro výrobu hřidel, venkovních teras, obkladů, plotů atd. Hustota 841 kg/m^3 (Andres et al. 2015).



Obrázek 18 - Garapa - polotovar pro odběr vzorků

4 Metodika

Tato část práce přibližuje postup přípravy vzorku dřeva pro hledání urychlovacího napětí v elektronovém mikroskopu. V druhé fázi je uveden postup samotného pozorování a pořízení snímků. A třetí fáze obsahuje způsob vyhodnocení pořízených snímků.

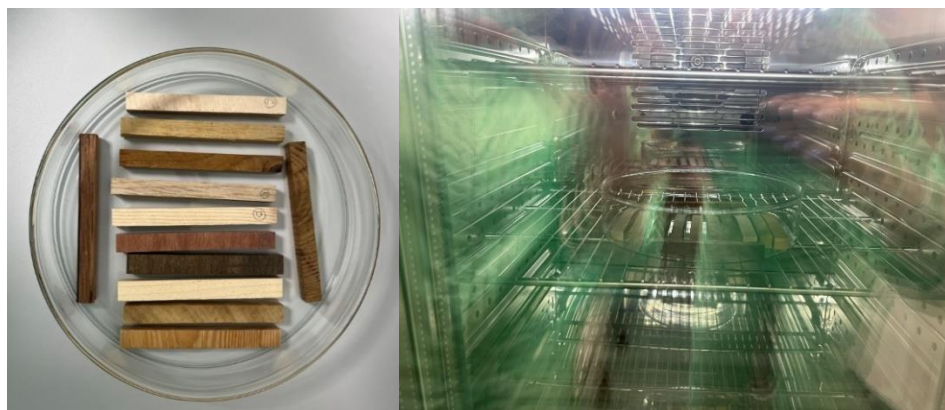
4.1 Příprava samotných vzorků

V literárním přehledu byly uvedeny obecné informace k vybraným dřevinám, které v práci posloužily jako vzorky pro pozorování. Byly vybráni zástupci dřevin našich i exotických, listnatých i jehličnatých, aby v optimálním případě bylo zjištěno, které parametry mají vliv pro nastavení mikroskopu. Samozřejmě nelze výsledky generalizovat, protože je známo, že se vlastnosti dřeva liší v rámci místa růstu, ale i v rámci místa odebrané dřeviny v jednom kmenu.

4.1.1 Příprava polotovarů pro finální vzorky do SEM

Pro tuto práci byly získány vzorky dřevin ze společnosti zabývající se velkoobchodním prodejem dřeva a dřevěných materiálů. Získané dřeviny byly velikosti desek cca 300 mm dlouhých, 120 mm širokých a 18 mm tlustých. Protože pro práci v elektronovém mikroskopu byly potřeba vzorky o velikosti několika milimetrů, byl z každé dřeviny vyříznut hranolek o velikosti cca 10 x 10 x 100 mm (obr. 9-18). Tento hranolek sloužil k odebírání vzorků pro pohled po vláknech a kolmo na vlákna. Cílem bylo získat bezprašné vzorky s neporušenou strukturou stavby dřeva.

S ohledem na uskladnění řeziva ve skladovací hale a jejich povrchovou čistotu byly získané dřeviny nejprve opracovány na tloušťkovací frézce, následně nařezány pomocí pokosové pily a řezné hrany začištěny ručním hoblíkem. Výsledkem této operace byly polotovary pro odběr vzorků jednotlivých druhů dřevin o velikosti cca 10 x 10 x 100 mm s neznámou vlhkostí, které byly následně sušeny a dále upravovány.



Obrázek 19 - Rozložení polotovarů v Petriho misce, umístění do sušárny

4.1.2 Sušení polotovarů pro finální vzorky do SEM

Jak již bylo zmíněno v předchozí části práce, vzorek do elektronového mikroskopu musí být suchý, jinak by díky vakuu došlo k odpaření vody s obsahem extraktivních látek do prostoru komory a tím k jejímu znečištění a také k poškození vzorku v důsledku nejpřímější cesty vody ven ze vzorku. Vzorky byly zváženy, následně umístěny do Petriho misky a vloženy do sušárny nastavené na 103°C (obr. 19) (Klement a Pánek, 2018). Po čtyřech hodinách byly vzorky vyndány a okamžitě zváženy, následně vráceny na další dvě hodiny do sušárny a poté opět převáženy pro kontrolu, zdali se nebude hmotnost stále měnit, což by značilo, že vzorky stále obsahují vodu. V případě vzorků vybraných pro tuto práci se již hmotnost u třetího vážení nelišila od vážení druhého. Z naměřených hmotností byla zjištěna původní vlhkost jednotlivých vzorků podle vzorce (4):

$$w = \frac{M_V}{M_{SD}} * 100 \quad (4)$$

w - vlhkost

M_V – hmotnost vody

M_{SD} – hmotnost úplně suchého dřeva

Materiál pro odběr vzorků byl před získáním pro tuto práci uložen ve stejném prostředí, proto bylo zajímavé zjistit, jak jsou jednotlivé dřeviny hygroskopické, tj. jakou vlhkost měly různé dřeviny uskladněné ve stejné skladovací hale vystavené stejné vlhkosti (tab. 1).

Tabulka 1 - Záznam hodnot při sušení polotovarů, výpočet původní vlhkosti

Číslo vzorku	Vzorek	Váha před sušením[g]	Váha po 4h [g]	Váha po 6h [g]	Hmotnost vody [g]	Původní vlhkost [%]
1	akát	7,910	7,420	7,420	0,490	6,604
2	dub	6,980	6,390	6,390	0,590	9,233
3	javor	7,715	7,035	7,035	0,680	9,666
4	jasan	8,770	8,005	8,005	0,765	9,557
5	smrk	5,015	4,540	4,540	0,475	10,463
6	thermowood	5,050	4,820	4,820	0,230	4,772
7	garapa	8,725	8,015	8,015	0,710	8,858
8	massaranduba	12,210	11,165	11,165	1,045	9,360
9	merbau	8,615	7,915	7,915	0,700	8,844
10	IPE	14,370	13,210	13,210	1,160	8,781

Také byla ze vzorků vypočítána pomocí vzorce (5) jejich hustota pro případné zjištění vlivu na pozorování vzorku v elektronovém mikroskopu (tab. 2).

$$\rho = \frac{m}{V} * 100 \quad (5)$$

m – hmotnost vzorku

V – objem vzorku

Tabulka 2 - Výpočet hustoty jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Vzorek	Rozměr a [cm]	Rozměr b [cm]	Rozměr c [cm]	Objem [cm ³]	Váha po 6h [g]	Hustota [g/cm ³]
1	akát	0,943	1,01	10,123	9,641	7,420	0,770
2	dub	1,064	1,09	10,118	11,734	6,390	0,545
3	javor	1,031	1,072	9,874	10,913	7,035	0,645
4	jasan	1,01	1,078	10,142	11,042	8,005	0,725
5	smrk	1,027	1,197	10,14	12,465	4,540	0,364
6	thermowood	1,051	1,079	9,61	10,898	4,820	0,442
7	garapa	1,073	1,039	9,875	11,009	8,015	0,728
8	massaranduba	1,082	1,029	9,764	10,871	11,165	1,027
9	merbau	1,04	1,019	10,151	10,758	7,915	0,736
10	IPE	1,199	1,041	9,718	12,130	13,210	1,089

4.1.3 Příprava finálních vzorků pro SEM

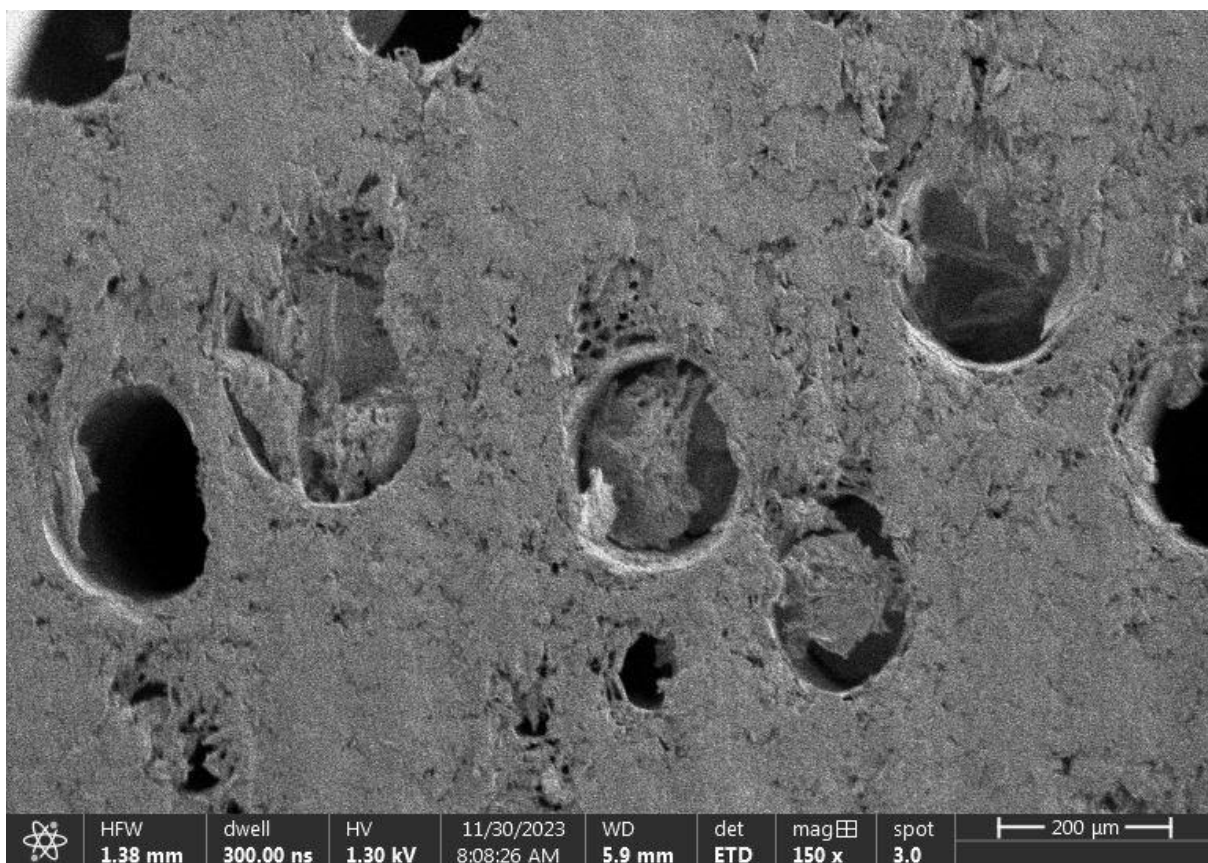
Při přípravě polotovarů vypadaly plochy hranolků po použití kotoučové pily hladké a čisté, proto z nich byly za pomoci stolní pásové pily odříznuty vzorky do SEM o tloušťce cca

1 mm a ploše 4x4 mm. Tyto vzorky byly připevněny stranou opracovanou pásovou pilou na stuby a vloženy do elektronového mikroskopu. Bohužel se ukázalo, že plochy po kotoučové pile z pohledu elektronového mikroskopu vůbec hladké nejsou, struktura není viditelná, protože plochy byly po kotouči vláknité a vlákna ohnutá, případně vetřená do materiálu (obr. 20). Takto zhotovené vzorky byly tedy vyhodnoceny jako nevhodné pro pozorování v elektronovém mikroskopu. Zároveň bylo patrné nabíjení od špiček zvednutých vláken již při nižších napětích. Tyto vzorky byly použity pro prvotní hrubé nalezení rozsahu urychlovacího napětí.



Obrázek 20 - Vzhled povrchu dubu po použití kotoučové pily

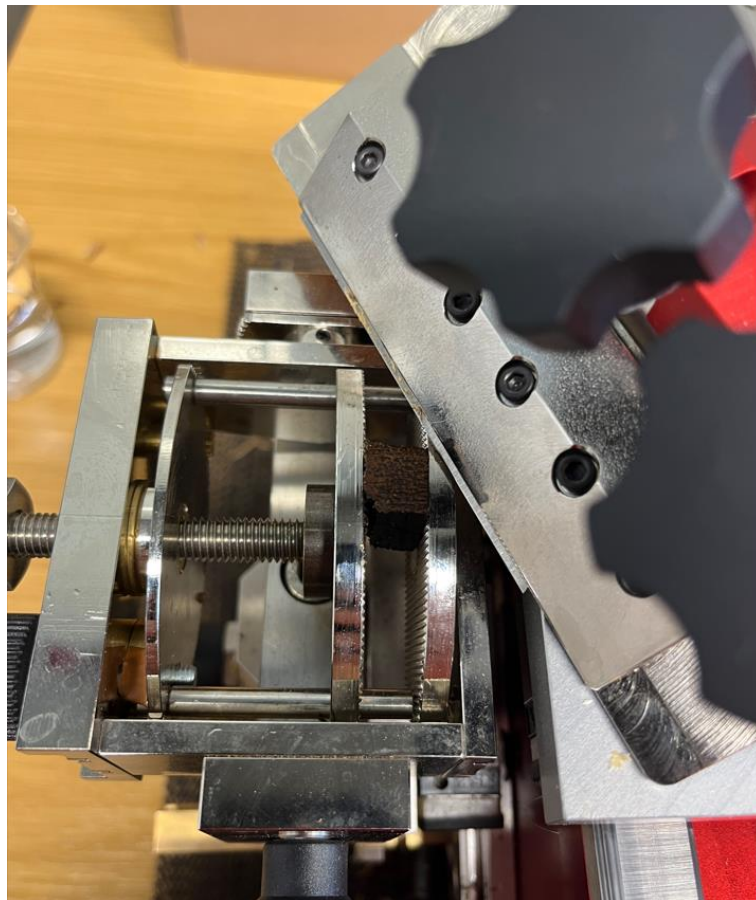
Následně byl udělán pokus přípravy pozorovací plochy za pomoci ruční frézky a vzorek opět odříznut stolní pásovou pilou. Plochy po opracování frézou kontrolou neozbrojeným okem vypadaly hladké a lesklé. Následně byly vzorky nafoceny v optickém mikroskopu, kde u některých dřevin struktura vypadala neporušená, u jiných už se dalo tušit, že ani tato volba přípravy nebyla vhodná, jak se následně opět ukázalo v elektronovém mikroskopu (obr. 21). Proto i tento způsob přípravy byl vyhodnocen jako nevyhovující.



Obrázek 21 - Vzhled povrchu dubu po opracování frézou

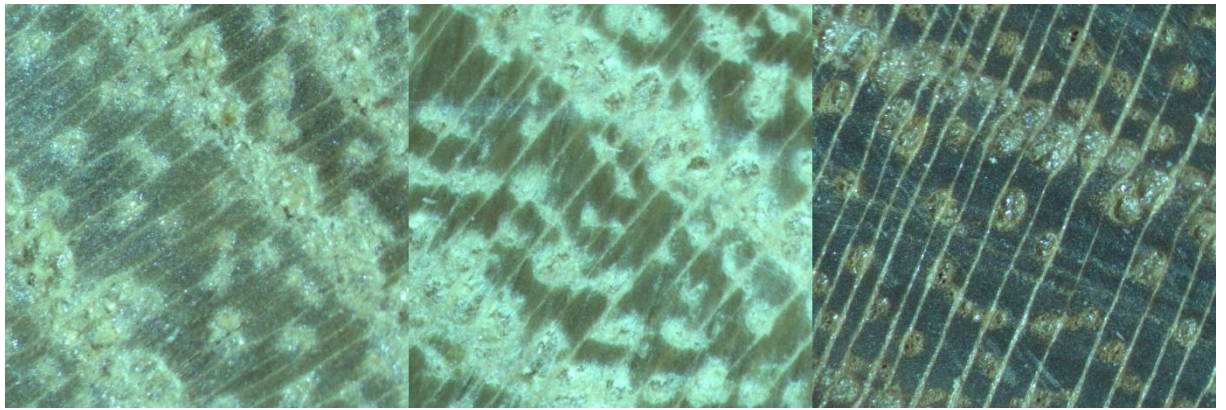
Jako další způsob přípravy byl vybrán na přípravu hladkých ploch vzorků mikrotom. Mikrotom je přístroj, který se používá na řezání velmi tenkých řezů v tloušťce několika mikronů. Bohužel pro mikrotom je potřeba polotovary pro odběr vzorků speciálně připravit. Primárně je určen pro řezání relativně měkkých tkání, což v případě vzorků dřeva není splněno. Proto bylo potřeba vzorky pro mikrotom upravit, a to jejich plastifikací. Změkčení proběhlo u smrku, thermowoodu, jasanu, javoru pouze za pomoci třídenního máčení ve vodě. V případě ostatních dřevin tedy akátu, dubu, massaranduby, ipe, merbau a garapy za pomoci třídenního varu v tlakovém hrnci. Teplota varu při zvýšeném tlaku dosahuje cca 120-130 °C, což z hlediska stavby dřeva a odolností jednotlivých složek vzorek nikterak neovlivní. Kritické teploty degradace jednotlivých složek jsou pro hemicelulózu 200 °C, celulózu 300 °C, lignin 300 °C (Klement a Pánek, 2018). Po plastifikaci polotovarů byly upnuty do mikrotomu kvádry jednotlivých dřevin o rozměrech cca 10x10x10mm (obr. 22) a jejich plochy seříznuty ostrou čepelí. Cílem bylo získat neporušenou hladkou plochu příčného a podélného řezu. To obnášelo cca deset seříznutí od původní plochy, než cílová plocha vzorku měla hladkou plochu v optickém mikroskopu jako vyhovující. Mezi jednotlivými řezy bylo potřeba štětečkem vlhčit řezané plochy. Po přípravě budoucích pozorovacích ploch na mikrotomu bylo potřeba

s ohledem na fakt, že vzorky byly vařeny a máčeny, je šetrně vysušit. Nejprve byly sušeny na vzduchu a následně dosušeny pomocí silikagelu umístěním ve vzduchotěsném boxu s dostatečným objemem silikagelu. Po vysušení bylo potřeba vzorky ztenčit na stejnou tloušťku cca 1 mm. Toto ztenčení bylo docíleno pomocí ruční brusky, kdy vysušený vzorek byl upnut do přípravku s chráněnou „mikrotomovou“ plochou, který zajišťoval při ručním odbroušování stejnou cílovou tloušťku všech vzorků. Takto připravené vzorky byly upevněny odbroušenou plochou pomocí oboustranně lepicí uhlíkové pásky ke stubům (obr. 33) a zkontrolovány na optickém mikroskopu, jestli nedošlo k jejich poškození vlivem sušení a jestli plochy po mikrotomu vypadají hladce bez stojících vláken a kontaminací.

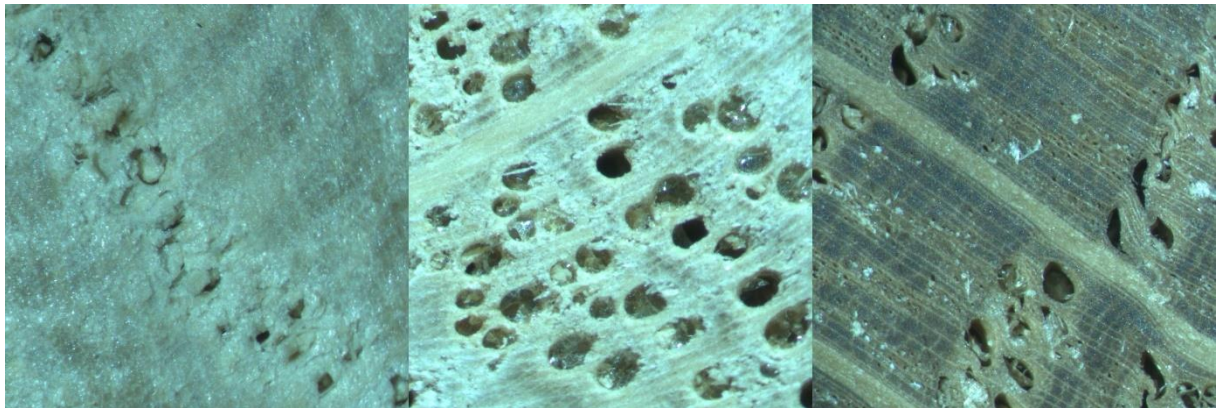


Obrázek 22 - Upnutí polotovaru do mikrotomu

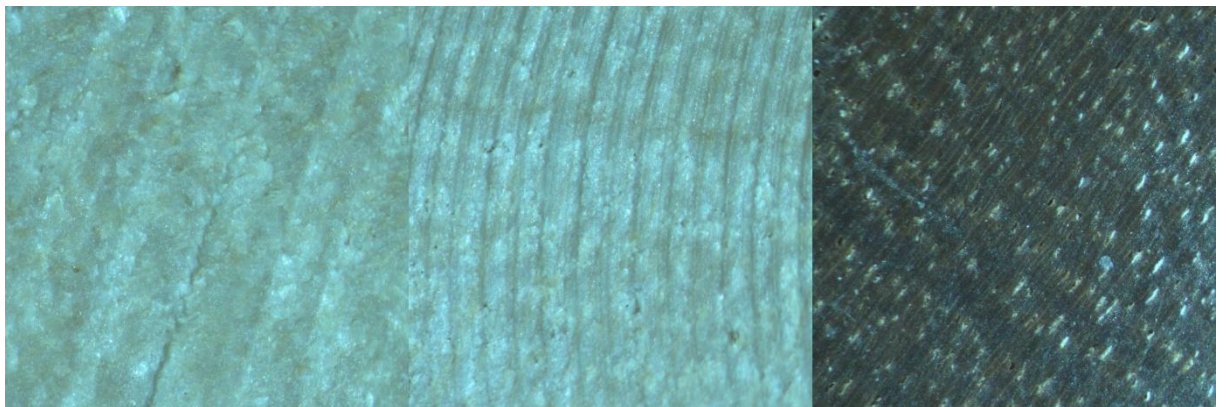
Následuje porovnání povrchů vzorků z optického mikroskopu na 50x zvětšení, vždy na prvním místě povrch po kotoučové pile, na druhém místě povrch po fréze a na třetím povrch po mikrotomu (obr. 23 - 32).



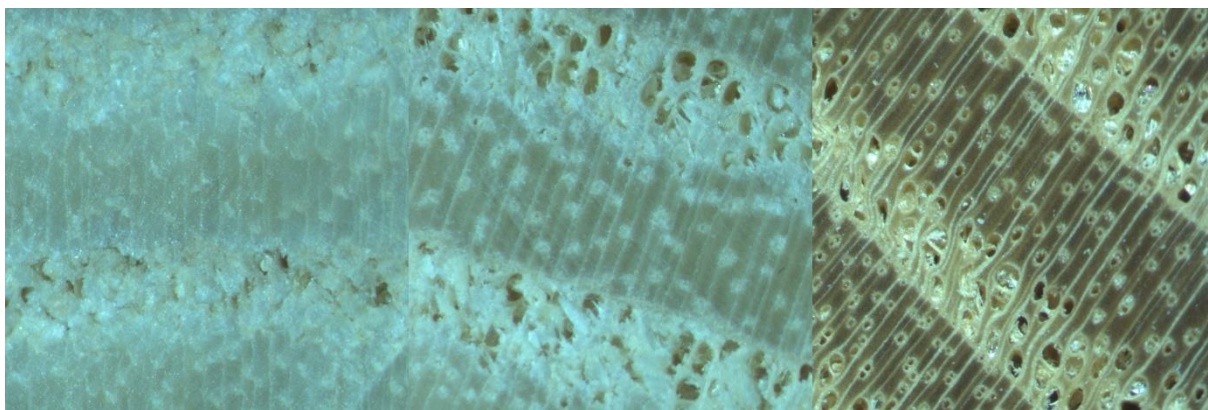
Obrázek 23 - Akát



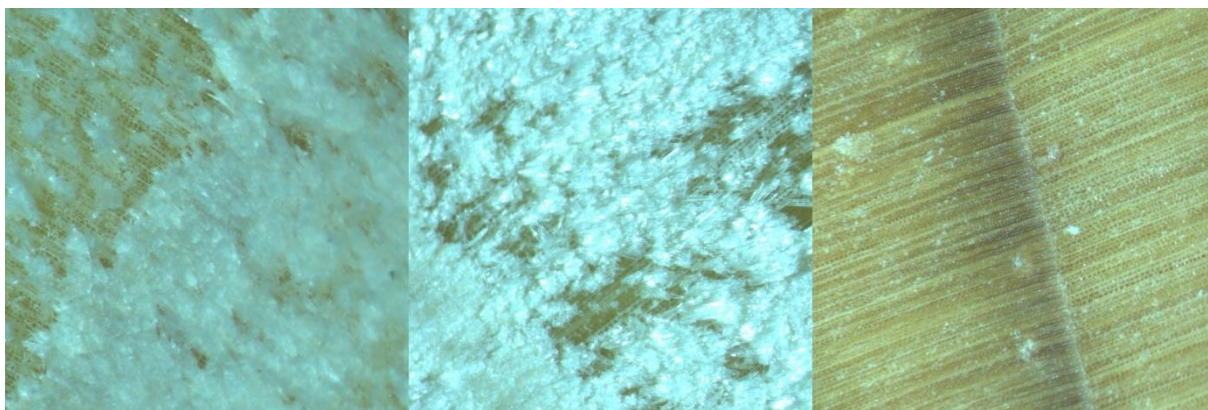
Obrázek 24 - Dub



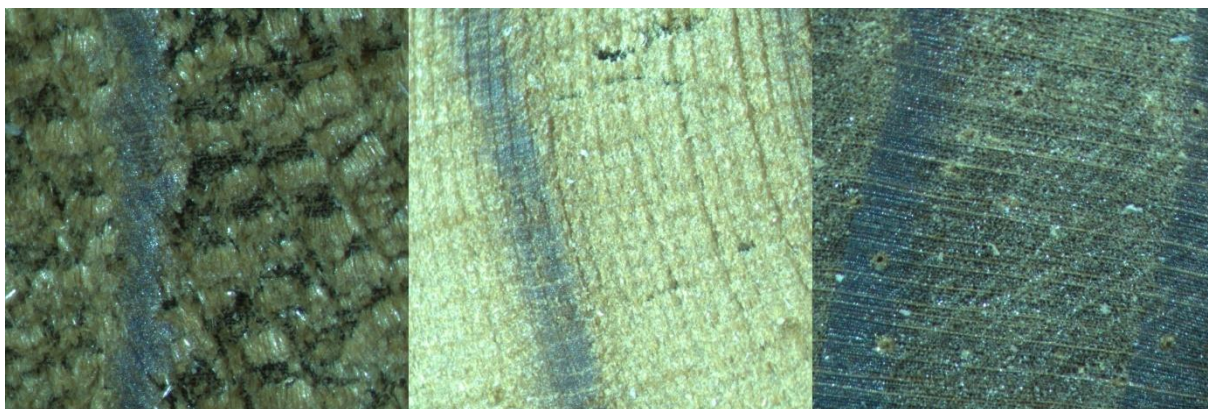
Obrázek 25 - Javor



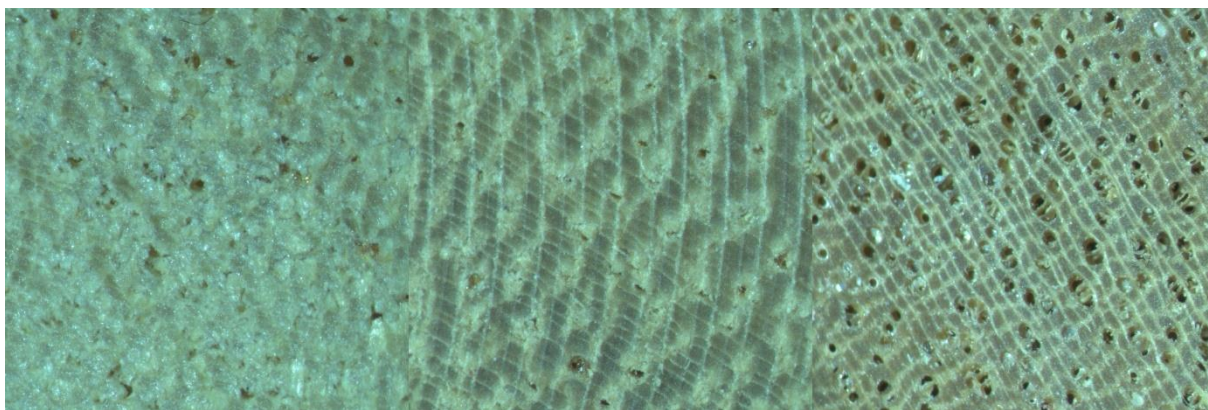
Obrázek 26 - Jasan



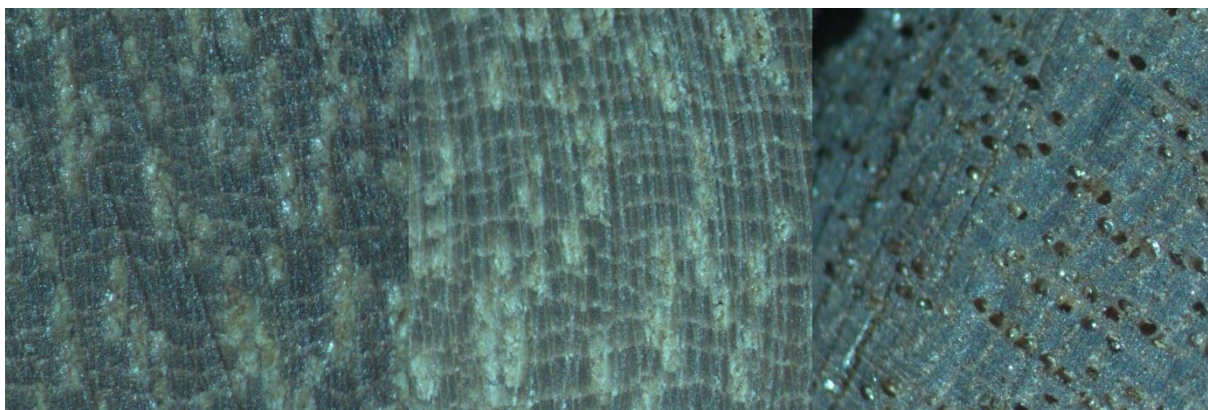
Obrázek 27 - Smrk



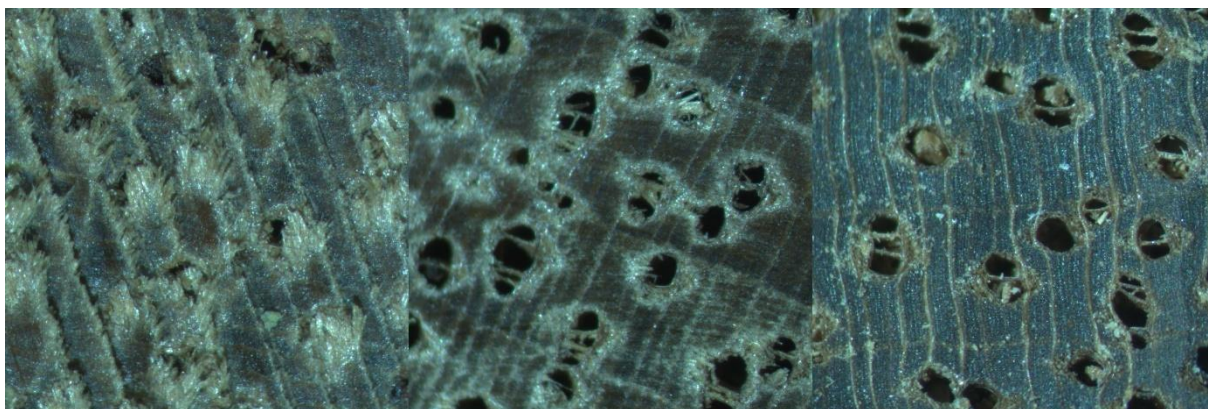
Obrázek 28 - Thermowood



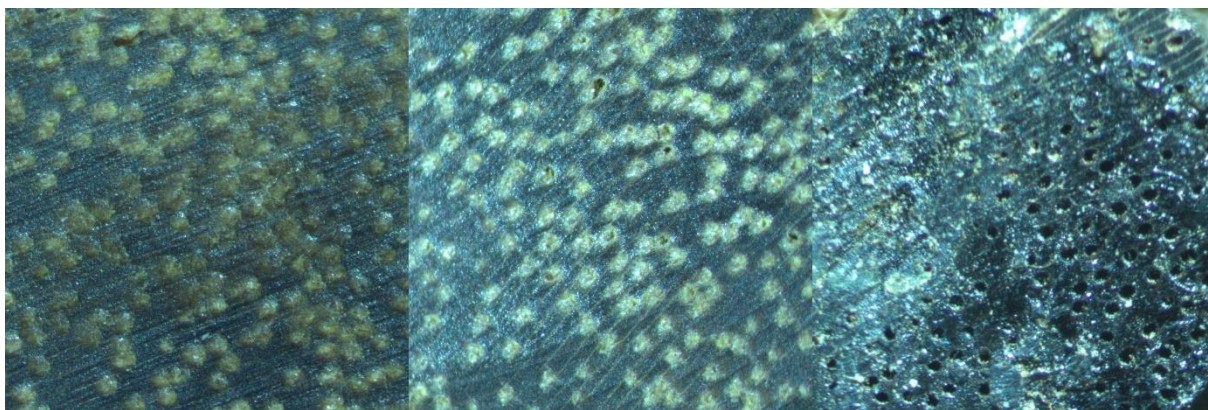
Obrázek 29 - Garapa



Obrázek 30 - Massaranduba



Obrázek 31 - Merbau

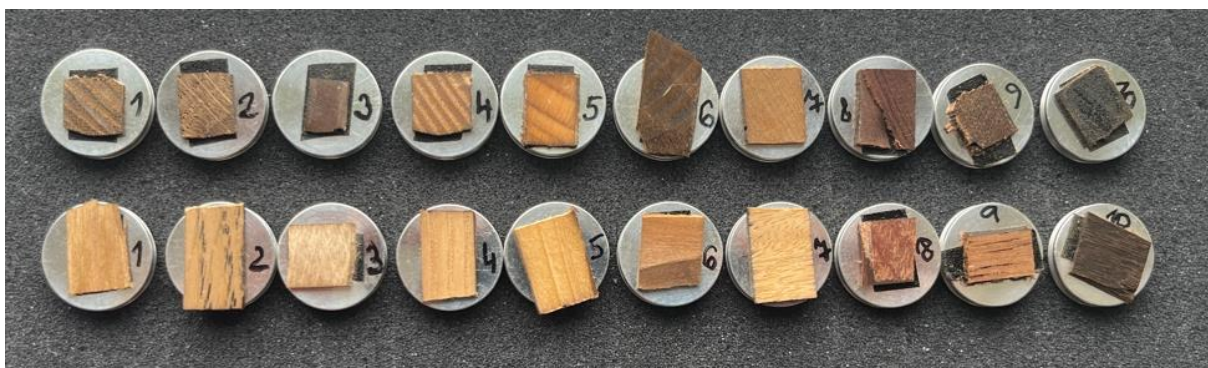


Obrázek 32 – Ipe

4.1.4 Shrnutí postupu přípravy vzorků

Jako nejlepší a nejjednodušší příprava pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva v elektronovém mikroskopu se ukázal postup sestávající z následujících kroků:

1. Příprava polotovarů o rozměrech cca 10x10x100 mm pro konečný odběr vzorků
2. U smrku, termowoodu, jasanu a javoru třídenní máčení ve vodě. Voda byla každý den vyměněna. U ostatních dřevin – dubu, akátu, garapy, merbau, massaranduby a ipe třídenní var v tlakovém hrnci, každý den doplněna voda a var probíhal vždy mezi 8 - 20 h, na noc byl var přerušen, ale vzorky zůstaly umístěny v tlakovém hrnci.
3. Upevnění vzorku do mikrotomu a za vlhčení seřezávané plochy štětcem s vodou seříznutí cca 10 vrstev pomocí ostrého břitvu mikrotomu na vzorcích pro příčný i podélný řez.
4. Pozvolné sušení jednotlivých vzorků v místnosti o 18 °C.
5. Dosušení umístěním vzorků do vzduchotěsného boxu vyplněného silikagelem s detekcí absorbované vlhkosti.
6. Upevnění jednotlivých vzorků pomocí oboustranné uhlíkové pásky ke stubům (obr. 33).



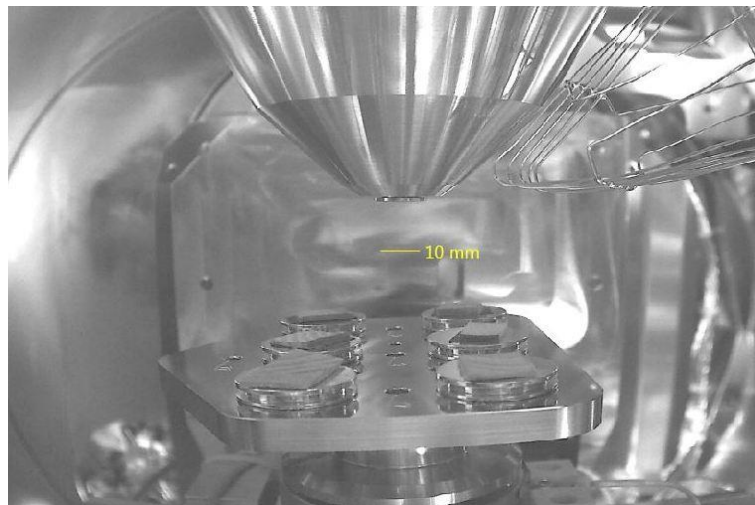
Obrázek 33 - Finální sada vzorků pro pozorování v SEM

4.2 Práce s elektronovým mikroskopem

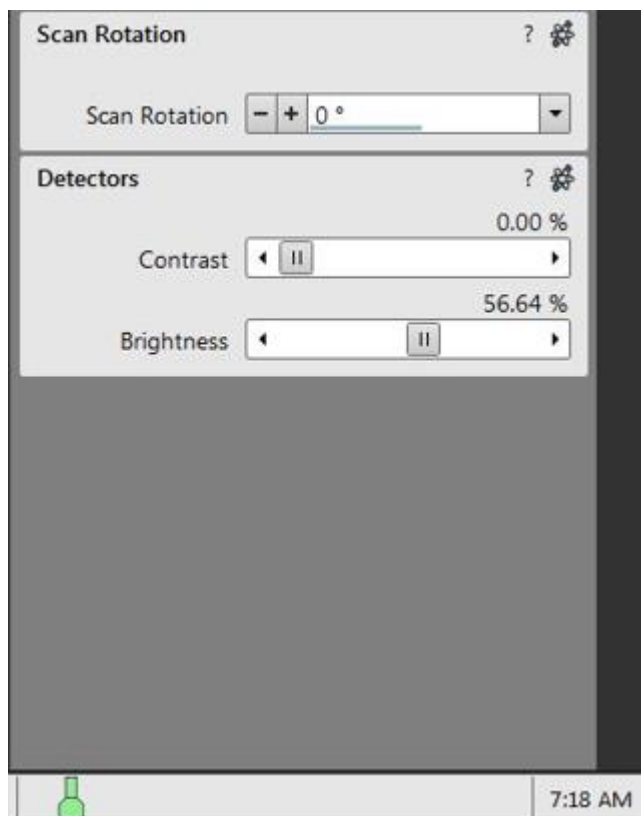
Práce v elektronovém mikroskopu se dá rozdělit na dva oddělené procesy. Prvním je příprava mikroskopu a umístění vzorku do komory a druhým samotné pozorování v mikroskopu.

4.2.1 Příprava vzorků/mikroskopu pro pozorování

Mikroskop je ovládán za pomoci ovládacího rozhraní softwaru k mikroskopu. Nejprve bylo potřeba mikroskop zavzdušnit, aby ho bylo možné otevřít. Poté byly do očíslovaných otvorů ve stolečku umístěny jednotlivé vzorky. Využití stolečku a očíslovaných pozic bylo velice výhodné pro následné pozorování. V softwaru můžeme použít navigaci v pravém panelu dole a pouze dvojklikem myši na konkrétní číslo se vzorek přemístil přímo do osy svazku (obr. 37, bod 2). Po umístění vzorků do otvorů stolečku byly dveře zavřeny a spuštěna vývěva pro dosažení potřebného vakua v komoře. Hodnota vakua lze kontrolovat ve spodním panelu okna ovládacího rozhraní. Ve chvíli, kdy ikona na monitoru indikuje dostatečné vakuum - zezelená (obr. 35), lze pustit elektronový svazek a začít s vlastním pozorováním.



Obrázek 34 - Umístění vzorků po vložení do komory



Obrázek 35 - Ikona signalizující dostatečné vakuum v komoře pro spuštění svazku

4.2.2 Pozorování vzorků v SEM

V elektronovém mikroskopu lze měnit mnoho parametrů, mezi které patří rozlišení, dwell time, urychlovací napětí, proud, zvětšení, pracovní vzdálenost, clonka a další. Proto byly pro tuto práci některé z nich vybrány jako pevné, neměnné a ostatní jako variabilní.

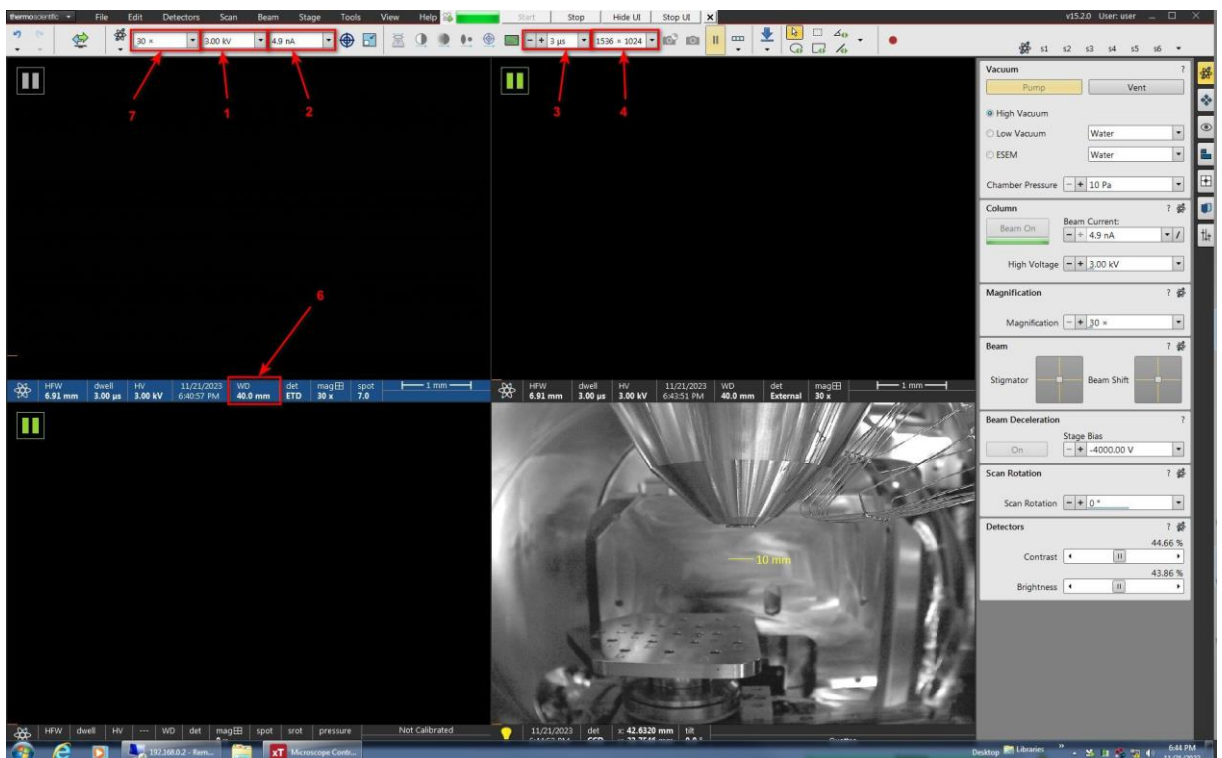
Variabilní parametry:

1. Urychlovací napětí (obr. 36, bod 1) – ovlivňuje energii elektronů, při větším urychlovacím napětí získáme větší rozlišení za cenu většího radiačního poškození vzorku. V případě této práce, kdy předmětem pozorování byly nevodivé vzorky, bylo potřeba volit spíše nižší urychlovací napětí, aby nedocházelo k nabíjení vzorku, které by deformovalo obraz.
2. Proud (obr. 36, bod 2) – ovlivňuje množství elektronů ve svazku. Čím větší množství primárních elektronů dopadne na vzorek, tím větší množství sekundárních elektronů bude emitováno a tím silnější signál získáme. Ovšem opět to způsobí větší radiační poškození vzorku. V případě této práce opět platí, že i proud byl volen spíše nižší, aby bylo zamezeno nabíjení vzorku.

Nastavené hodnoty neměnných parametrů:

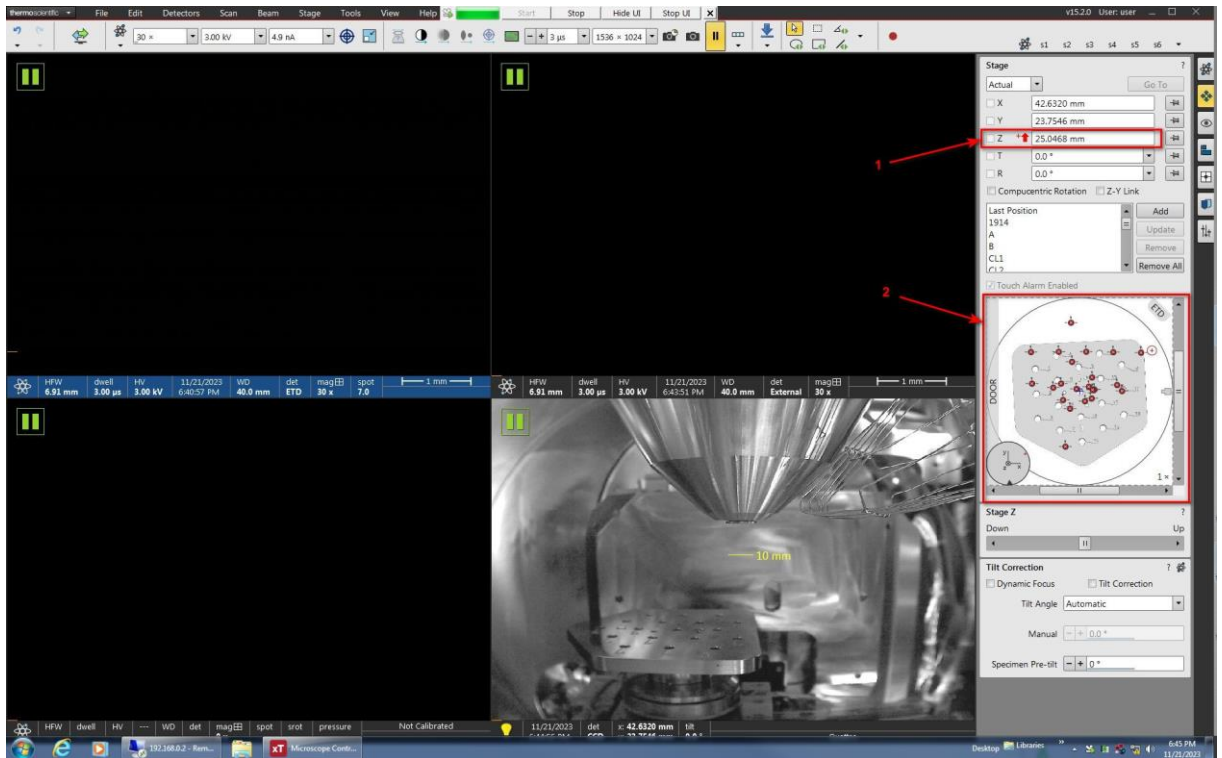
3. Dwell time (obr. 36, bod 3) 300 ns

- Určuje dobu, po kterou paprsek zůstává ve snímaném bodě.
- 4. Rozlišení (obr. 36, bod 4) 1536x1024
- Udává počet bodů, šířka × výška (rozlišení obrazu).
- 5. Clonka (obr. 38) 4
- Clonka je umístěna v tubusu mikroskopu a ořezává průměr elektronového svazku – tedy opět ovlivňuje kolik elektronů dopadne na vzorek. V případě této práce byla clonka volena napevno a množství elektronů bylo řízeno změnou hodnoty proudu.
- 6. WD (obr. 36, bod 6) ~10 mm
- Jedná se o vzdálenost vzorku od objektivu (elektromagnetických čoček mikroskopu). Zde platí, že čím blíže je vzorek k objektivu, tím větší zvětšení a rozlišení je možné získat.
- 7. Zvětšení (obr. 36, bod 7) 100x, 150x, 500x
- Vyjadřuje poměr mezi velikostí skenované plochy, primárním svazkem a plochou monitoru, na kterém je sledován obraz. Při větším zvětšení je skenována menší plocha vzorku.
- 8. Spot size 5
- Vyjadřuje poloměr elektronového svazku dopadajícího na vzorek. Platí, že čím je menší poloměr, tím je možno dosáhnout většího rozlišení.



Obrázek 36 - Ovládací rozhraní SEM Quattro

Když byly pevné parametry nastaveny, byly vzorky umístěny do správné pracovní vzdálenosti. Jak bylo uvedeno výše, WD pro pozorování bylo zvoleno na ~10 mm. Proto v pravém panelu byla změněna hodnota v ose Z (obr. 37, bod 1), a tím se stolek přesunul do správné pozice. Následně dvojklikem myši bylo vybráno číslo vzorku, který měl být pozorován, také v pravém panelu, ale nyní uprostřed (obr. 37, bod 2).



Obrázek 37 - Ovládací rozhraní SEM Quattro



Obrázek 38 - Nastavení clonky

Nyní byl vzorek a mikroskop připraven pro hledání optimálního urychlovacího napětí (obr. 39).

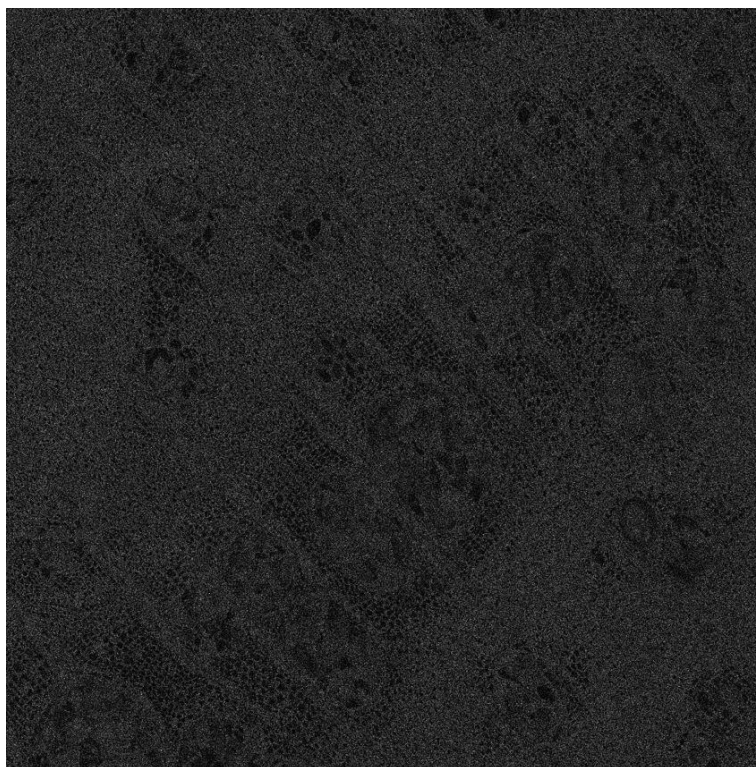


Obrázek 39 - Umístění vzorků v komoře SEM

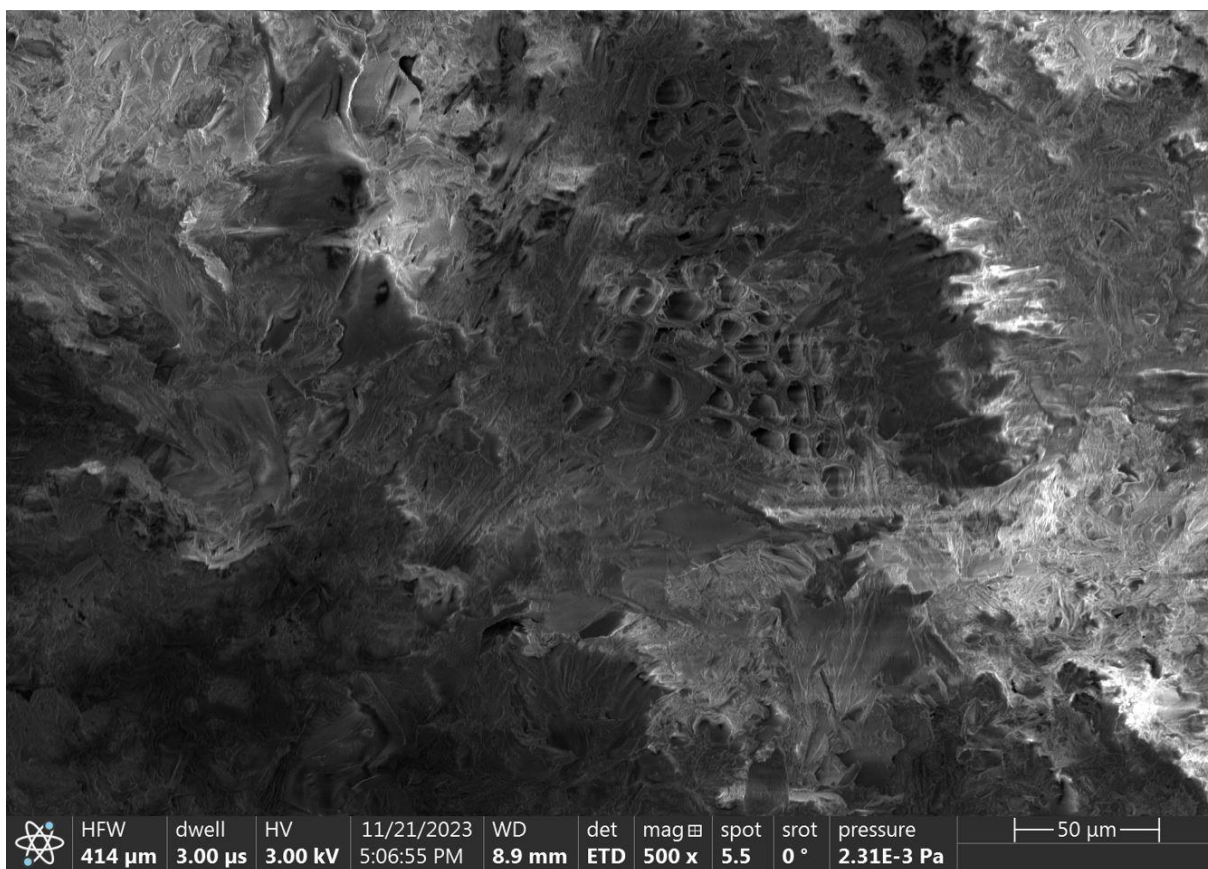
4.2.3 Hledání pozorovacího napětí/energie v SEM

Samotné hledání optimálního urychlovacího napětí, při kterém se nebude obraz nabíjet a nebude znehodnocen různými artefakty, probíhalo snímáním povrchu vzorku na několika místech. To bylo nutné, aby bylo možné vyhodnotit, zda se vzorek choval při stejném napětí

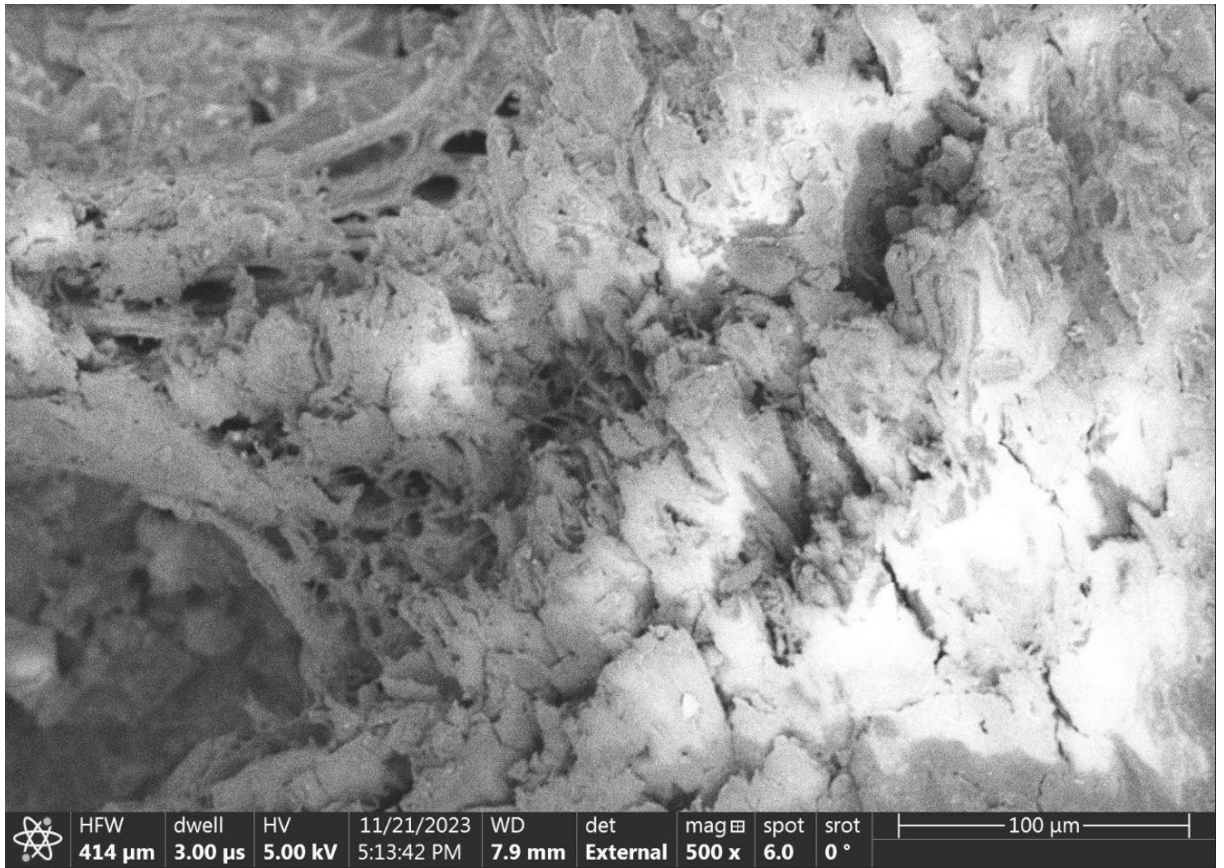
stejným způsobem na různých místech, což by mohlo být způsobeno relativně nehomogenní strukturou vzorku. Tato struktura je způsobena stavbou dřeva, kde plocha vzorku je tvořena lumeny tj, prázdnou černou plochou a buněčnými stěnami s různou tloušťkou a hustotou v závislosti na dřevině a místě pozorování jarní/letní dřevo. První hrubé hledání urychlovacího napětí proběhlo v rozsahu od 0,3 kV do 10 kV detektory SE a BSE na vzorcích s povrchem z kotoučové pily (obr. 41,42). Povrch byl v mikroskopu velmi vláknitý nehomogenní, což samo o sobě zhoršovalo nabíjení, které začínalo právě na špičkách zvednutých vláken. Dwell time byl nastaven na 3ms, které byly doporučeny v dostupné literatuře. Při tomto pozorování bylo zjištěno, že detektor BSE pravděpodobně nebude úplně vhodný pro pozorování, protože jeho hlavní výhoda v kontrastu prvkového složení (složení dřeva - uhlík – 49,5 %, kyslík – 44,2 %, vodík – 6,3 %, dusík – 0,2 až 1,5 %, (Šlezingerová a Gandelová, 1998)) neměla u dřevěných vzorků příliš efekt a hlavně použitá nízká napětí nezajišťovala dostatečně silný signál pro detekci tímto detektorem (obr. 40). Proto pro další hledání byl zvolen pouze detektor sekundárních elektronů. Samotné hledání napětí, kdy se vzorek nebude nabíjet, probíhalo postupným měněním nastavení napětí v krocích po 0,1 kV od nejnižšího po nejvyšší. Na 0,1 kV nebyl žádný pozorovatelný signál, na 0,3 kV již bylo dřevo pozorovatelné, ale signál byl velmi slabý. Na 0,5 kV již byl signál pro pozorování dostatečný, vzorek se nenabíjel a byla velmi pěkně vidět jeho struktura. Na 1 kV se vzorek nenabíjel, zlepšila se hloubka ostrosti, struktura velmi dobře viditelná. Stejný výsledek byl dosažen i při urychlovacích napětích 1,1 kV; 1,2 kV; 1,3 kV, vždy s každou další desetinou napětí se zvětšovala hloubka ostrosti, zlepšovala ostrost a rozlišení snímku. U 1,8 kV se již nabíjely vzorky všechny. Vždy, když došlo k nabití povrchu vzorku, bylo nutné posunout vzorek na skenování v místě, kde nebyl nabit, a v případě nabití celé plochy bylo nutno snížit vakuum v komoře vpuštěním vzduchu pro vybití vzorku a následně znovu spustit vývěvu pro dosažení vakua pro pozorování. V průběhu pozorování byly sledovány snímané obrazy a vyhodnocovány na základě barvy a charakteristických artefaktů vzniklých nabíjením. Stav nabíjení byl zaznamenáván do záznamového archu (obr. 44) a z každého vzorku byla uložena jedna sada snímků pro následné celkové vyhodnocení (obr. 43). Každý vzorek byl sledován na 10 různých místech a od každé dřeviny byly čtyři vzorky, dva pro pozorování rovnoběžně s vlákny a dva kolmo na vlákna.



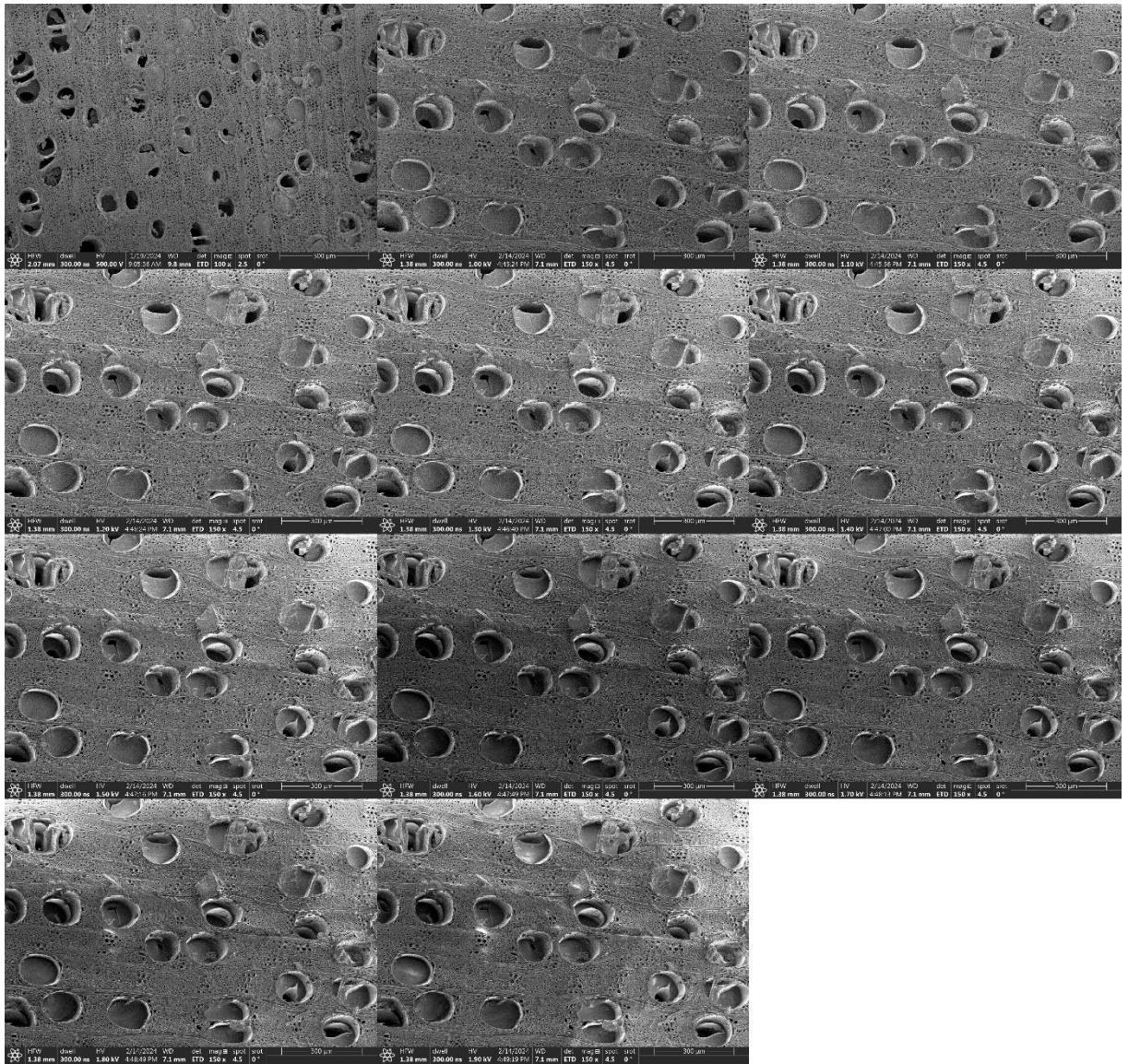
Obrázek 40 - Snímek z BSE detektoru při napětí 1,9 kV



Obrázek 41 - Snímek akátu, povrch z kotoučové pily z SE detektoru



Obrázek 42 - Snímek dubu, povrch z kotoučové pily z BSE detektoru



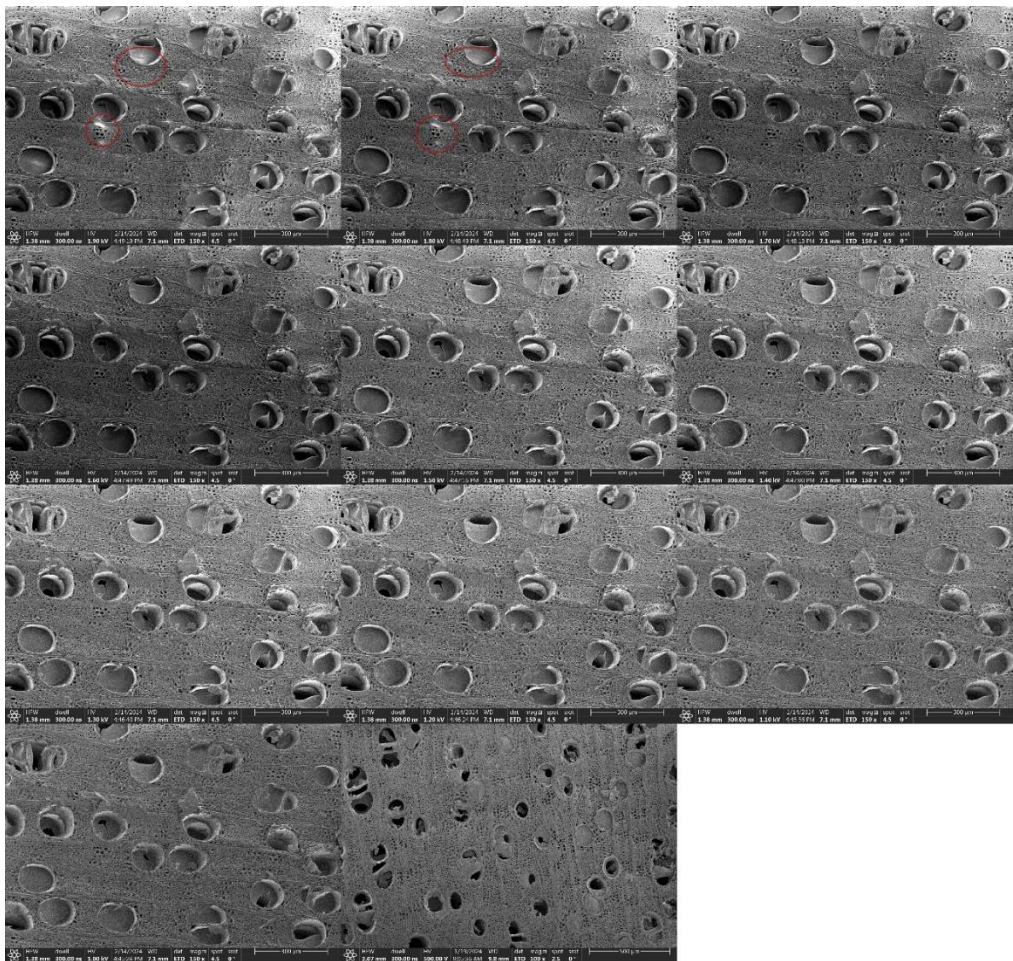
Obrázek 43 - Souhrn snímků pro vyhodnocení nabíjení 0,5 - 1,9 kV

Dřevina	Hustota [g/cm ³]	Napětí [kV]									
		0,5	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8
akát	0,770										
akát k	0,770										
dub	0,545										
dub k	0,545										
javor	0,645										
javor k	0,645										
jasan	0,725										
jasan k	0,725										
smrk	0,364										
smrk k	0,364										
thermo	0,442										
thermo k	0,442										
garapa	0,728										
garapa k	0,728										
massaranduba	1,027										
massaranduba k	1,027										
merbau	0,736										
merbau k	0,736										
ipe	1,089										
ipe k	1,089										

Obrázek 44 - záznamový arch

4.2.4 Vyhodnocování získaných snímků

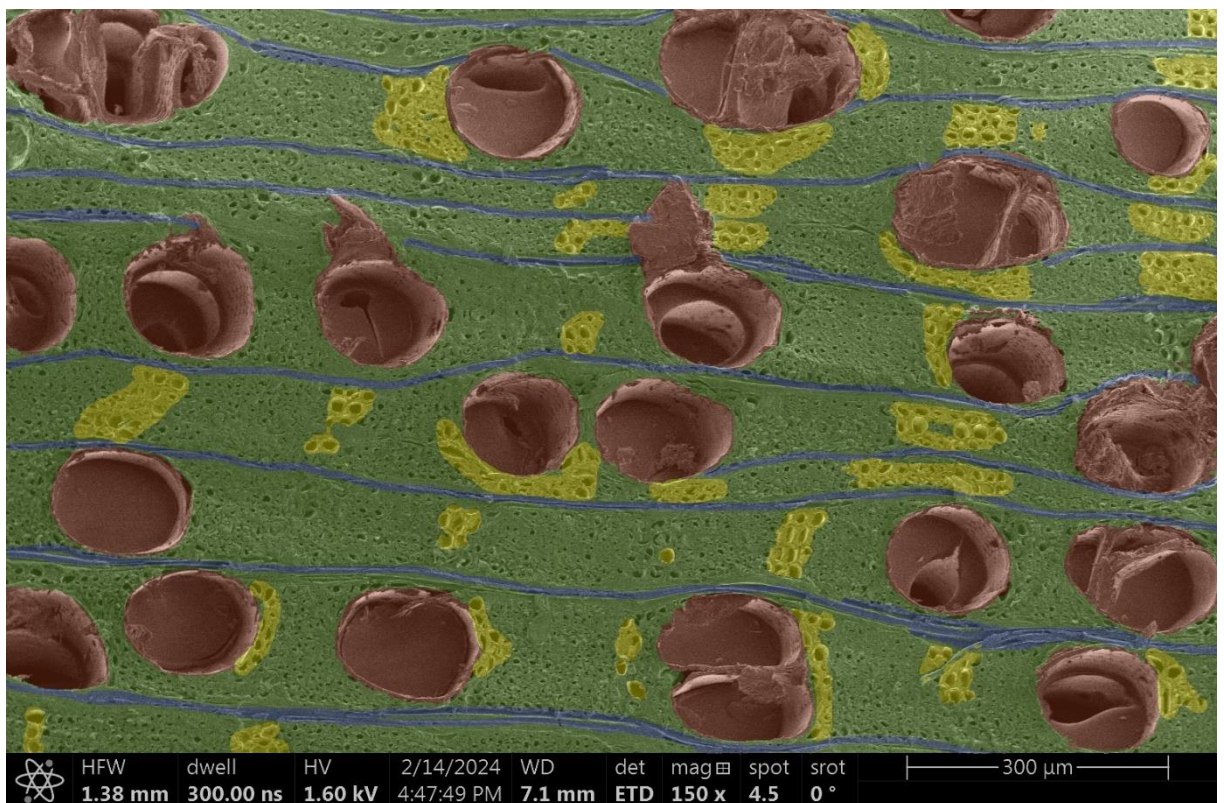
Výsledkem pozorování v mikroskopu byly záznamové archy a sady snímků jednotlivých dřevin. Pro vyhodnocení byly snímky zobrazeny pomocí softwaru FastStone Image Viewer, který umožňuje přechod mezi snímky pomocí kolečka myši. To umožnilo rychlé přechody mezi jednotlivými snímky pro hledání i minimální změny. Cílem vyhodnocení bylo zjistit, na kterém snímku a při jakém napětí již dochází k viditelnému nabíjení vzorku. Zatímco snímky byly pořizovány od nejnižšího napětí k nejvyššímu, aby nebylo nutné stále zbavovat vzorek náboje vypouštěním vzduchu do komory. Pro vyhodnocení se ukázalo jako nejvhodnější postupovat opačně, tedy vyhodnocovat snímky od nejvyššího napětí k nejnižšímu. Bylo to z důvodu, že vyhodnocování je velmi subjektivní a než oko zachytí úplně minimální změnu, je potřeba změna relativně větší. Když se ovšem postupovalo z viditelně nabitého snímku k nenabitému, oko přesně vědělo, na jaké místo se zaměřit a sledovat na něm změnu, kdy nabíjecí body kompletně zmizely. Samozřejmě bylo nutné se zaměřit na více míst v každé sadě, aby se podchytilo místo, které se začalo nabíjet jako první. Díky tomu se podařilo najít přechod od napětí, kdy se vzorek ještě nenabíjel k napětí, kdy se již minimálně nabíjel (obr. 45).



Obrázek 45 - Souhrn snímků pro vyhodnocení nabíjení 1,9 – 0,5 kV

4.2.5 Kolorování získaných snímků jednotlivých vzorků

Jedním ze dvou cílů bylo pořízení snímků pozorovaných vzorků. Z každé sady byl vybrán jeden snímek a ten byl následně pomocí postprocesu kolorován podle jednotlivých anatomických částí vybraných dřevin. Pro toto kolorování byl vybrán program MIB – Microscopy Image Browser. Po jeho spuštění byly nastaveny barvy jednotlivým anatomickým prvkům dřeva. Barvami byly odlišeny u jehličnanů jarní a letní tracheidy, parenchymatické buňky a označeny některé z dvůrkatých ztenčenin. U listnáčů cévy, cévice, libriformní vlákna a parenchymatické buňky. Každý z kolorovaných snímků byl otevřen v programu MIB a následně pomocí funkce brush za pomoci myši vybarveny anatomické prvky vzorků jednotlivými barvami (obr. 46).



Obrázek 46 - Snímek vzorku Garapy kolorovaný v MIB

5 Výsledky

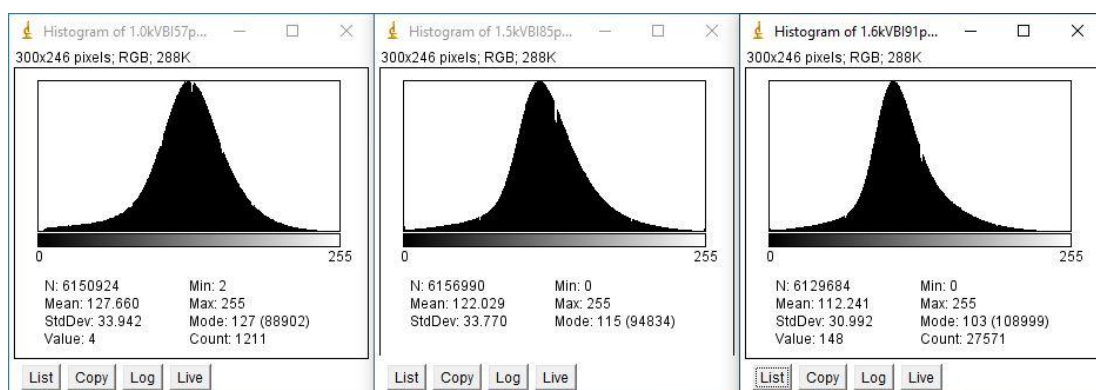
Cílem této práce bylo najít napětí, při kterém půjde pozorovat nepovrstvené vzorky dřeva v elektronovém mikroskopu, a pořízení snímků pozorovaných vzorků dřeva. Dílčími cíli byla příprava vzorků pro pozorování v elektronovém mikroskopu a porovnání zjištěných napětí mezi jednotlivými vzorky, případně směru pozorování.

5.1.1 Zjištěné pozorovací napětí

Pro jednotlivé vzorky se nejvyšší možné pozorovací napětí opravdu liší. Díky metodě, hledání a vyhodnocení opticky člověkem nebylo zjištěno pouze jedno konkrétní urychlovací napětí odpovídající kritické energii - jedna hodnota, ale rozsahy, při kterých se při pozorování vzorky nenabíjely a jejich zobrazení nebylo deformováno nabíjecími artefakty, zároveň byl signál už dost silný pro dostatečné zobrazení struktury dřeva. Následuje výčet rozsahů pro jednotlivé dřeviny a směr pozorování.

1. Akát pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,4 kV
2. Akát pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,4 kV
3. Dub pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,5 kV
4. Dub pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,6 kV
5. Javor pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,6 kV
6. Javor pohled kolmo na vlákna	0,5 - 1,5 kV
7. Jasan pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,4 kV
8. Jasan pohled kolmo na vlákna	0,5 - 1,6 kV
9. Smrk pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,5 kV
10. Smrk pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,4 kV
11. Thermowood pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,3 kV
12. Thermowood pohled kolmo na vlákna	0,5 - 1,4 kV
13. Garapa pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,7 kV
14. Garapa pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,6 kV
15. Massaranduba pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,6 kV
16. Massaranduba pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,3 kV
17. Merbau pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 1,3 kV
18. Merbau pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,5 kV
19. Ipe pohled rovnoběžně s vlákny	0,5 – 0,7 kV
20. Ipe pohled kolmo na vlákna	0,5 – 1,2 kV

Původní plán byl v nejlepším případě najít metodu, jak vyhodnotit nabíjení snímků strojově nebo už při jejich pořízení mít nějaký způsob, jak nabíjení detekovat, případně měřit a porovnávat mezi dřevinami. Jedna z metod detekce nabíjení v elektronové mikroskopii může být umístění velmi jemné křemíkové mřížky pod vzorek v kterém je otvor, nebo pod hranu vzorku. Následné nabíjení zdeformuje mřížku. Bohužel u vzorků pro tuto práci nebyl nalezen způsob, jak udělat hladkou nijak neovlivněnou hranu. V případě laseru je hrana opálená, tj ovlivněná vysokou teplotou, v případě vyvrtání byla hrana pro pozorování v elektronovém mikroskopu velmi vláknitá a při propíchnutí došlo k jednak ke vtažení vrchních vrstev do hrany a také ke „slisování“ hrany. Ve všech případech byla značně ovlivněná přirozená struktura dřeva. Proto tato detekce byla vyhodnocena pro tuto práci jako nevyhovující. Další zvažovanou metodou bylo následné vyhodnocování snímků pomocí grafického programu. Na tuto metodu byl použit program ImageJ, který umožňuje zobrazit histogram pořízeného snímku. Bohužel při vyhodnocení se ukázalo, že není prakticky žádný rozdíl mezi histogramem snímku prokazatelně nenabitého a snímku nabitého – první dva histogramy nenabitý vzorek, třetí nabitý (obr. 47).



Obrázek 47 - Test vyhodnocení pomocí ImageJ

5.1.2 Pořízení snímků pozorovaných vzorků

Jednotlivé snímky jsou součástí přílohy (příloha 1-20). Pro názornost byly kolorovány podle jednotlivých anatomických prvků.

5.1.3 Porovnání zjištěných napětí

Pro jednotlivé vzorky se nejvyšší možné pozorovací napětí opravdu liší, což je patrné z tabulky (tab. 4). Do tabulky byla umístěna i hustota jednotlivých vzorků. Vždy první řádek jednotlivé dřeviny byl pozorován ve směru vláken a druhý řádek kolmo na vlákna. Křížkem

bylo označeno napětí, při kterém se vzorek nenabíjel, slovem ano první napětí, při kterém byly detekovány první stopy nabíjení vzorku.

5.1.3.1 Porovnání z hlediska dřeviny

Prvním pohledem do tabulky (tab. 4) je viditelné, že samostatný faktor druhu dřeviny nebude tím, co by mělo jediný vliv na nejvyšší možné pozorovací napětí. Dokládá to fakt, že stejná dřevina vykazovala různá napětí při pozorování ve směru vláken a kolmo na ně. Může být ale jedním z faktorů.

5.1.3.2 Porovnání z hlediska hustoty

V tabulce 3, která byla srovnána podle hustoty pro zjednodušení hledání závislosti na hustotě, se ukázalo, že ani hustota není pravděpodobně jediný faktor, na kterém by záviselo nabíjení vzorku. Nelze vyloučit, že se nějakým způsobem na výsledku podílí, ale svým způsobem to nepotvrdil fakt, že vzorky stejné dřeviny pouze říznuté v podélném nebo příčném směru, tedy o stejné hustotě, nevykazovaly stejné nejvyšší nenabíjející se použité napětí. Z tohoto výsledku byl vyvozen názor, zda spíše než hustota neovlivňuje nabíjecí chování struktura dřeviny ve směru pozorování viz bod 5.1.3.3.

Tabulka 3 - Výsledky nabíjení vzorků seřazených dle hustoty

Dřevina	Hustota [g/cm ³]	Napětí [kV]									
		0,5	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8
smrk	0,364	x	x	x	x	x	x	x	ano		
smrk k	0,364	x	x	x	x	x	x	ano			
thermo	0,442	x	x	x	x	x	ano				
thermo k	0,442	x	x	x	x	x	x	ano			
dub	0,545	x	x	x	x	x	x	x	ano		
dub k	0,545	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
javor	0,645	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
javor k	0,645	x	x	x	x	x	x	x	ano		
jasan	0,725	x	x	x	x	x	x	ano			
jasan k	0,725	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
garapa	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	x	ano
garapa k	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
merbau	0,736	x	x	x	x	x	ano				
merbau k	0,736	x	x	x	x	x	x	x	ano		
akát	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
akát k	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
massaranduba	1,027	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
massaranduba k	1,027	x	x	x	x	x	ano				
ipe	1,089	x	ano								
ipe k	1,089	x	x	x	x	ano					

5.1.3.3 Porovnání z hlediska směru pozorování

Když pohlédneme do výše uvedené tabulky (tab. 4), opět není patrné, že by směr pozorování byl faktorem ovlivňující nejvyšší použitelné napětí. Znovu může být podílejícím se faktorem, ale z pozorovaných vzorků tento fakt nebyl viditelný. Jednou bylo vyšší napětí pro řez příčný a jindy zase pro podélný. Po vyhodnocení těchto výsledků byla jako možný důvod nabíjecí odolnosti stanovena struktura anatomické stavby a tedy nehomogenita povrchu vzorků viz bod 5.1.3.4.

Tabulka 4 - Výsledky nabíjení vzorků

Dřevina	Hustota [g/cm ³]	Napětí [kV]									
		0,5	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8
akát	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
akát k	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
dub	0,545	x	x	x	x	x	x	x	ano		
dub k	0,545	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
javor	0,645	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
javor k	0,645	x	x	x	x	x	x	x	ano		
jasan	0,725	x	x	x	x	x	x	ano			
jasan k	0,725	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
smrk	0,364	x	x	x	x	x	x	x	ano		
smrk k	0,364	x	x	x	x	x	x	ano			
thermo	0,442	x	x	x	x	x	ano				
thermo k	0,442	x	x	x	x	x	x	ano			
garapa	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	x	ano
garapa k	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
massaranduba	1,027	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
massaranduba k	1,027	x	x	x	x	x	ano				
merbau	0,736	x	x	x	x	x	ano				
merbau k	0,736	x	x	x	x	x	x	x	ano		
ipe	1,089	x	ano								
ipe k	1,089	x	x	x	x	ano					

5.1.3.4 Porovnání z hlediska podobnosti struktury anatomické stavby (tab. 5)

Z hlediska podobnosti mohly být sdruženy smrk a thermowood – uniformní struktura jarních a letních tracheid. Dále akát, dub, garapa, jasan, massaranduba a merbau – struktura zahrnující poměrně velké cévy obklopené menšími cévicemi, následně uniformní libriformní vlákna protkaná parenchymatickými buňkami, javor samostatně – zde oproti dříve zmíněné struktuře byly cévy výrazně menší, proto byla struktura uniformnější, a ipe také samostatně – zde struktura prakticky tak hladká, že byly viditelné pouze lumény ojedinelých cév. Když bylo vyhodnoceno nejvyšší použitelné napětí z hlediska sdružení podle struktury, opět tato závislost nebyla patrná. Na základě výsledků porovnání podobnosti struktury a všech výše uvedených srovnání byla jako další možnost vybrána ovlivnění nabíjení složením dřevin jako takových, a to hlavně z hlediska extraktivních látek, jejich složení a množství.

Tabulka 5 - Výsledky nabíjení vzorků sdružené dle struktury

Dřevina	Hustota [g/cm ³]	Napětí [kV]									
		0,5	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8
smrk	0,364	x	x	x	x	x	x	x	ano		
smrk k	0,364	x	x	x	x	x	x	ano			
thermo	0,442	x	x	x	x	x	ano				
thermo k	0,442	x	x	x	x	x	x	ano			
dub	0,545	x	x	x	x	x	x	x	ano		
dub k	0,545	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
jasan	0,725	x	x	x	x	x	x	ano			
jasan k	0,725	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
garapa	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	x	ano
garapa k	0,728	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
merbau	0,736	x	x	x	x	x	ano				
merbau k	0,736	x	x	x	x	x	x	x	ano		
akát	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
akát k	0,770	x	x	x	x	x	x	ano			
massaranduba	1,027	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
massaranduba k	1,027	x	x	x	x	x	ano				
ipe	1,089	x	ano								
ipe k	1,089	x	x	x	x	ano					
javor	0,645	x	x	x	x	x	x	x	x	ano	
javor k	0,645	x	x	x	x	x	x	x	ano		

5.1.3.5 Porovnání z hlediska množství a složení extraktivních látek

Toto srovnání vyplynulo ze zjištění, že dřevina ipe při přípravě vzorku na příčném řezu vyronila poměrně velké množství pryskyřice (obr. 48), povrch byl velmi lepkavý a zároveň tyto vzorky vykazovaly nejnižší odolnost proti nabíjení. Vzorek v podélném řezu neronil pryskyřici na povrch, ale byla patrná na řezu v podobě velmi lesklých stěn jednotlivých vláken. Z tohoto byla vyvozena hypotéza, že by mohlo nabíjení souviset s množstvím a složením extraktivních látek ve dřevě. Na příčném řezu, kde bylo velké množství pryskyřice na povrchu vzorku, byla odolnost proti nabíjení minimální, oproti tomu v podélném řezu, kde bylo menší množství přeříznutých vláken a díky tomu menší množství pryskyřice na povrchu, získané napětí nepatrně vyšší. Množství extraktivních látek a jejich složení se liší dřevina od dřeviny, jejich množství se liší v závislosti na směru pozorování, vždy je množství dáno místem, kde je řez veden, proto někdy může být množství větší v příčném řezu, někdy v podélném řezu, a to by mohlo mít vliv na pozorovací napětí, tedy odolnost proti nabíjení. Samozřejmě by tato hypotéza

potřebovala vědecky ověřit nebo vyvrátit, porovnat složení u jednotlivých dřevin a následně jejich množství s ohledem na vedený řez.



Obrázek 48 - Příčný řez Ipe s vyroněnou pryskyřicí

6 Diskuze

Diskuze byla rozdělena na tři části, na diskuzi o přípravě vzorků, na způsob zjišťování a vyhodnocování pozorovacích napětí, a nakonec na porovnání snímků nepovrstvených a povrstvených vzorků.

6.1 Příprava vzorků

V článku Metodika výroby mikroskopických preparátů ze vzorků dřeva (Vavřík a Gryc 2015) je popsán postup na přípravu vzorků. Jedná se o přípravu vzorků pro optický mikroskop, ve spoustě bodů se ovšem daný postup shoduje i s přípravou vzorků pro transmisní/skenovací elektronový mikroskop, kde je cílem dosáhnout velmi tenkých řezů - s neporušenou strukturou, vysušených a dokonale rovných. Tento postup zahrnuje 1) přípravu polotovarů o rozměrech 10x10x20 mm pro odběr finálních vzorků, 2) měkčení polotovarů vařením v 10% roztoku glycerinu ve vodě, 3) krájení na mikrotomu, 4) barvení mikrořezů uložením na 5 minut do safraninu, 5) odvodňování mikrořezů uložením na 10 minut do 96% etanolu, poté uložení do karbol-xyلولu (1:3) na tři minuty a nakonec uložení do xyلولu na tři minuty, 6) uzavření mikrořezů položením na podložní sklíčko, zakápnutím kanadským balzámem, přiložením krycího sklíčka, zatížením a setrváním 14 dní. Pro přípravu vzorků pro tuto práci pro pozorování ve skenovacím elektronovém mikroskopu se postup příliš nelišil, jen byl velmi zjednodušen. Hlavně z důvodu co nejmenší chemické interakce se vzorkem, u kterého byla snaha zachovat jeho co nejpřirozenější podobu. Druhým důvodem bylo zjištění, zda lze pozorovat co nejméně upravené dřevo v elektronovém mikroskopu, a proto byla snaha o co nejjednodušší postup přípravy. Postup v této práci tedy nakonec zahrnoval: 1) příprava polotovarů – shoduje se s výše zmíněným postupem, 2) vaření v tlakovém hrnci pouze ve vodě – zde odchylka oproti směsi glycerinu a vody, 3) krájení na mikrotomu – zde stejné, ale pro použití v optickém mikroskopu byly výsledkem mikrořezy, pro tuto práci byl vlastně výsledkem polotovar se seříznutou plochou, 4) bod s barvením vzorků nemá pro vzorky pro tuto práci smysl, protože výsledkem bude obraz v odstínech šedé, 5) sušení vzorku už se výrazně liší, v článku je postupné odvodňování za pomoci chemické řady, je to z důvodu zachování co nejpřirozenější struktury u mikrořezů, ovšem vzorky pro tuto práci stačilo nejprve nechat přirozeně vysychat a následně uložit do vzduchotěsného boxu se silikagelem, kde došlo k pozvolnému dosušení, 6) uzavření vzorků pro naše pozorování opět nebylo nutné, protože vzorky byly uloženy v boxu se silikagelem až do vložení do komory mikroskopu, aby bylo zamezeno získávání vlhkosti ze vzduchu.

6.2 Zjišťování napětí a vyhodnocování snímků

Optimálním výstupem z této práce by byla nalezená kritická energie pro každý vzorek. Kritickou energií se myslí jedna hodnota, při které se vyrovná množství dopadajících primárních elektronů elektronům emitovaným ze vzorku. Zjišťování kritické energie u nevodivých vzorků se mimo jiné věnuje Ústav přístrojové techniky AV. V práci Rastrovací mikroskopie při kritické energii elektronů (Káňová, 2002) je popsán postup, jak zjišťovat kritickou energii pomocí počítačově řízeného skenovacího elektronového mikroskopu Tesla BS343. Tento postup zahrnuje: 1) měření závislosti signálu na čase v místech, která nebyla dosud osvětlena, kdy následně dojde k mechanickému posuvu pro rastrování dalšího místa. Hodnota energie je předem nastavena a toto měření probíhá zpravidla v 50 bodech, 2) dojde ke zpracování a interpretaci křivek a získání hodnoty celkové změny signálu, 3) hodnoty energie, při kterých bude docházet k měření, jsou předem nastaveny operátorem. Rozhodnutí, mezi jakými hodnotami nastavit hodnoty pro zkušební software, je získáno experimentálně, kdy je nastavena nižší hodnota, než je očekáváno, že bude hodnota kritické energie, a zkontrolováno, zda se snímek nabíjí/nenabíjí. V případě nabíjení je nastavena hodnota nižší a opět je vyzkoušeno. Ve chvíli, kdy je nalezena spodní hranice, hledá se hranice horní. Následně je nastaveno rozmezí zjištěných krajových hodnot kritické energie se zvýšením mezi těmito hodnotami pro každý test o 50 eV (Frank et al., 2001). Plynulá změna mezi nastavenými energiemi je řízena pomocí vysokonapěťového zdroje. 4) Konečný výsledek kritické energie je hodnota, kde se protíná získaná křivka s vodorovnou osou, 5) jako poslední je ověření získané hodnoty pořízením snímku s nastavenou kritickou energií. Nejlepší je toto ověření provádět v místě, kde ještě nedošlo k předchozímu osvětlení elektronovým svazkem (Mika et al., 2003).

Pro tuto práci nebyl k dispozici tento testovací sw, proto bylo nutné hledat pozorovací napětí experimentálně. Byl využit postup, který dle výše zmíněného článku je používán pouze pro hraniční hodnoty, které jsou následně zadány do testovacího softwaru. Z tohoto důvodu byl postup nepatrně upraven. Hledání energie probíhalo čistě ručně, proto jako nejnižší napětí bylo nastaveno 0,3 kV a od této hodnoty byly pořizovány snímky na energie vždy zvýšené o 0,1 kV. Ve chvíli, kdy již byly snímky viditelně nabitě, byl postup opakován na dalších deseti místech na vzorku, a to se záznamem do archu, kde bylo u nastaveného napětí označováno, zda se vzorek nabíjí nebo nikoli. Při srovnání obou přístupů je samozřejmě, pro přesnost a množství získaných dat pro vyhodnocení, nejvýhodnější automatizovaný přístup bez zásahu člověka. Také v případě automatického přístupu je vzorek mnohonásobně zvětšen a hned při nájezdu do pozice sejmut snímek, tj. s minimálním ozářením elektronovým svazkem, kdežto v případě

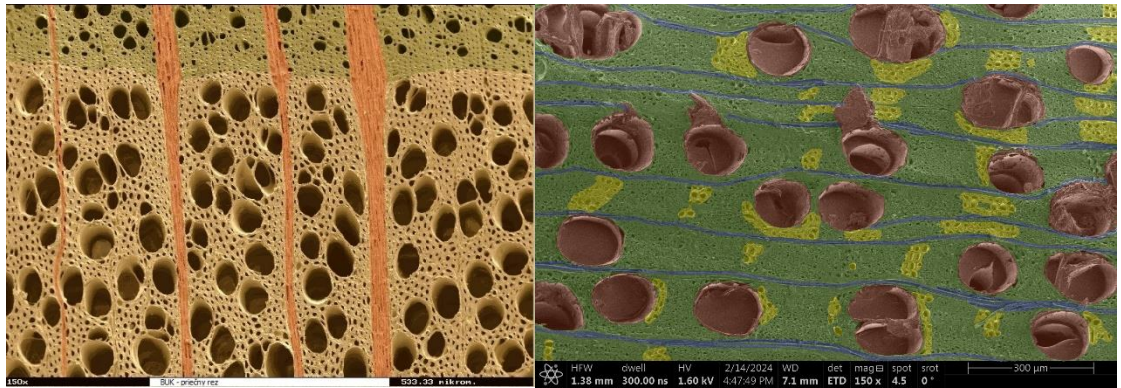
ručního přístupu bylo nutné najet na pozici a snímek zaostřit tak, aby bylo možné zpozorovat případné nabíjecí artefakty. Po celou tuto dobu dopadá elektronový svazek na vzorek. To mohlo způsobit, že ručně získané pozorování vykazovalo nižší hodnoty zjištěného nejvyššího možného napětí použitelného pro pozorování bez nabíjení.

Další faktor ovlivňující výsledek byl, že v případě vyhodnocení počítačem jsou pravděpodobně získané hodnoty přesnější než v případě okometrického vyhodnocení člověkem. Dva různí lidé nevyhodnotí všechny snímky naprosto totožně, proto byly jako hraniční hodnoty vybrány ty, kde byl snímek bez známek nabíjení naprosto bez rozporu. Optimální by samozřejmě bylo využití softwaru, ale i bez něj se podařilo najít takové rozsahy napětí, při kterých nepovrstvené dřevo pozorovat šlo, a snímky nebyly znehodnoceny nabíjecími artefakty.

6.3 Porovnání nepovrstvených a povrstvených vzorků dřeva

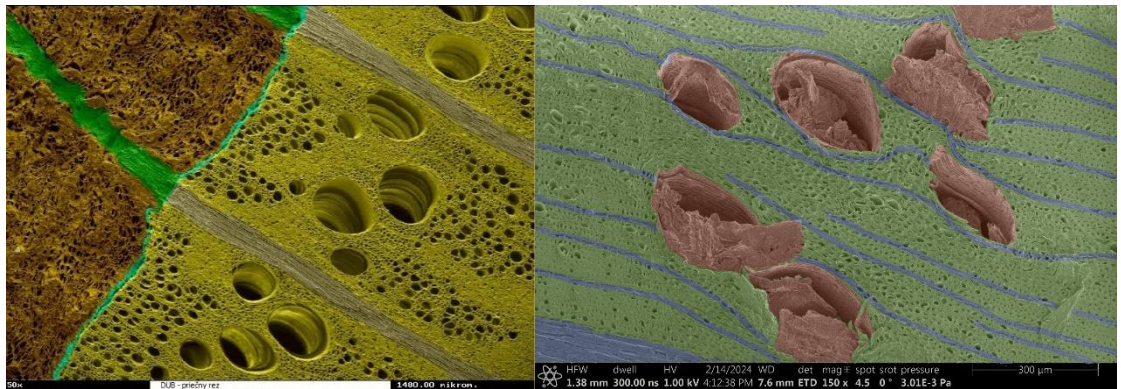
Pro diskuzi v této části práce, tedy pořízení snímků pro nalezená napětí, byly vybrány webové stránky s obrázky dřeva z elektronového mikroskopu (Mamoňová, 2019). V publikaci Elektronová mikroskopie a štúdium dřevných struktur (Mamoňová, 2018) je uveden postup přípravy vzorků pro pozorování v elektronovém mikroskopu. Do této přípravy patří i nanesení vodivé vrstvy. Tudiž v této části je porovnání získaných snímků nepovrstvených vzorků a jejich kvality se snímky povrstvenými. U snímků z uvedených stránek bohužel není lišta s popisem napětí, které bylo pro pořízení snímků použito. Nicméně v uvedené publikaci je nejčastěji použito napětí kolem 15 kV.

V případě porovnání prvních dvou snímků bohužel není použita stejná dřevina, protože ve výběru této práce není buk, z tohoto důvodu byla vybrána dřevina garapa strukturou podobná buku (obr. 49). Zvětšení bylo v obou případech 150x. Jak je ze snímků patrné, tak v případě pokoveného i neupraveného vzorku bylo dosaženo velmi podobného výsledku, naprosto jasně čitelné struktury a jednotlivých anatomických částí. I v případě neupraveného vzorku bylo při nízkých napětí dosaženo dostatečné hloubky ostroty a tím získaného pocitu 3D snímku.



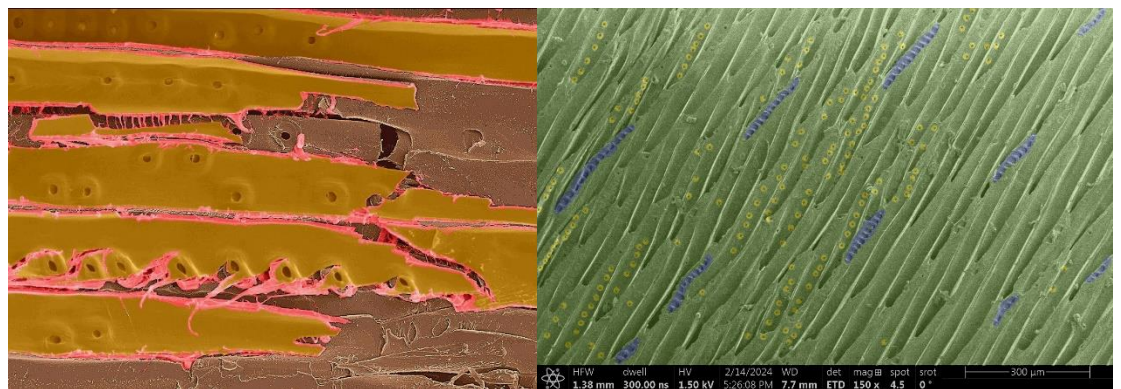
Obrázek 49 - Vlevo povrstvený vzorek buk (Mamoňová, 2019), vpravo nepovrstvený vzorek garapa

V případě druhého porovnání již máme snímky stejné dřeviny – dubu v příčném řezu (obr. 50). Opět jsou oba snímky ostré, jasné, struktura rozeznatelná, jednotlivé elementy čitelné, a tedy oba snímky kvalitou srovnatelné.



Obrázek 50 - Vlevo povrstvený vzorek dub (Mamoňová, 2019), vpravo nepovrstvený vzorek dub

V případě třetího porovnání máme v obou případech smrk v podélném řezu (obr.51). Je patrné, že povrstvený vzorek (Mamoňová, 2019) je lépe říznut, v případě vzorku této práce byl řez veden lehce našikmo, také zvětšení povrstveného vzorku je větší než v případě snímku této práce. Nicméně opět struktura čitelná, jasná, ostrá, a i dvojtečky v obou případech jasně viditelné.



Obrázek 51 - Vlevo povrstvený vzorek smrk (Mamoňová, 2019), vpravo nepovrstvený vzorek smrk

Jak je z uvedených srovnání patrné, pro pozorování nepovrstvených vzorků, u kterých bylo nutné používat poměrně nízká napětí, lze kvalitativně dosáhnout velmi podobných snímků jako u vzorků pokovených, u nichž lze použít vyšší napětí a díky tomu získat větší signál.

7 Závěr

Součástí závěru je shrnutí výsledků, přínos a využitelnost této práce a nakonec doporučení, jakým směrem by se mohlo v této práci pokračovat.

7.1 Shrnutí výsledků

Hlavní náplní této práce bylo nalezení napětí pro pozorování nepovrstvených vzorků dřeva. Tento úkol zahrnoval i přípravu vhodných vzorků a následně porovnání zjištěných napětí mezi dřevinami, případně i ve směru pozorování. Pozorovací napětí umožňující pozorovat nepovrstvené vzorky dřeva bylo nalezeno. Liší se jak mezi dřevinami, tak i ve směru pozorování. V rámci shrnutí lze říci, že u všech pozorovaných vzorků dřevin je bezpečné použití rozsahu mezi 0,5 – 1,3 kV, kdy nedocházelo k nabíjení vzorků. Jediná výjimka byl vzorek dřeviny ipe, která vykazovala nejmenší odolnost proti nabíjení. Oproti ostatním vzorkům byla jedinečná ve velkém množství vyroněné pryskyřice. Z tohoto důvodu byla vyslovena hypotéza, zda by nabíjení mohlo souviset s množstvím a složením extraktivních látek v jednotlivých dřevinách. Toto množství se bude lišit dřevina od dřeviny, ale i podle místa vedení řezu.

Nepodařilo se jednoznačně prokázat nebo vyvrátit, že by nabíjení vzorku záviselo na dřevině – i vzorky jedné dřeviny v příčném a podélném řezu nevykazovaly stejnou hodnotu napětí, při kterém se vzorek začal nabíjet. Stejná situace je i v případě prokázání nebo vyvrácení závislosti na hustotě, nebo struktuře stavby vzorku. Pouze v případě nekvalitního povrchu vzorku, který byl velmi vláknitý, docházelo od špiček vláken k nabíjení na nižších napětích než v případě vzorku se zajištěnou hladkou plochou řezu.

Příprava vzorku byla omezena na naprosté minimum operací tak, aby byl zachován charakter vzorku co nejvíce podobný nativnímu stavu dřeva. Bylo zjištěno, že i při nanesení vodivé vrstvy vzorky pozorovat lze a v dostatečné kvalitě. V postupu zůstalo pouze 5 kroků, které jsou rozepsány v části práce „Výsledky“.

7.2 Přínos práce

Přínosem této práce pro praxi a vědu je jednoznačně urychlení možného pozorování vzorků dřeva v nativním stavu. Je to optimální způsob pro rychlé zjištění, jestli má smysl, v případě hlubšího zkoumání, investovat čas do přípravy vzorků včetně pokovení. Také je přínosem zjištění, že v případě nutnosti pozorování pomocí BSE detektoru, je potřeba vzorky pokovit, aby bylo možné použít vyšší urychlovací napětí pro získání dostatečně silného signálu. Další

z možných přínosů může být výhodné využití informace, že nalezené napětí použitelné pro všechny vybrané vzorky dřevin bylo mezi 0,5 – 1,3 kV, přičemž vzorky byly vybrány jak mezi dřevinami měkkými i tvrdými, listnatými i jehličnatými, našimi i tropickými.

7.3 Návrhy pokračování práce

Dalším směrem pokračování v této práci by mohlo být potvrzení nebo vyvrácení hypotézy vlivu množství a složení extraktivních látek na nabíjení vzorku. Také by bylo zajímavé ověření dosažených výsledků zjištěných ručně v této práci s výsledky, které by bylo možné získat za pomoci automatizace a softwaru vzniklého na Ústavu přístrojové techniky AV.

8 Literatura

Tištěné

BOZZOLA, John J., RUSSELL Lonnie Dee, 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd ed. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett. ISBN 978-0-7637-0192-5.

HOADLEY, R. Bruce, 1990. *Identifying wood: accurate results with simple tools*. Newtown, CT: Taunton Press. ISBN 978-0-942391-04-6.

IVES, Ernie, 2001. *A guide to wood microtomy: making quality microslides of wood sections*. ISBN 978-0-9540551-0-3.

KLEMENT, Ivan a Miloš PÁNEK, 2018. *Sušení a hydrotermická úprava dřeva*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2892-1.

KVIETKOVÁ, Monika, 2015. *Obrábění dřeva*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2604-0.

MAMOŇOVÁ, Miroslava, REINPRECHT Ladislav a Ján GÁPER, 2019. *Anatómia dreva - mediálne skriptá*. Třetí. Zvolen: Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene. ISBN 978-80-228-2951-9.

MAMOŇOVÁ, Miroslava, 2018. *Elektrónová mikroskopia a štúdium drevných štruktúr*. První. Zvolen: Zvolen : Technická univerzita vo Zvolene. ISBN 978-80-228-3150-5.

MEYER, E., HUG Hans J. a Roland BENNEWITZ, 2004. *Scanning probe microscopy: the lab on a tip*. Berlin ; New York: Springer. Advanced texts in physics. ISBN 978-3-540-43180-0.

NĚMEC, Bohumil, 1962. *Botanická mikrotechnika*. První. Praha: ČSAV.

PANSHIN, A. J. a Carl DE ZEEUW, 1980. *Textbook of wood technology: structure, identification, properties, and uses of the commercial woods of the United States and Canada*. 4th ed. New York: McGraw-Hill. McGraw-Hill series in forest resources. ISBN 978-0-07-048441-2.

POŽGAJ, Alexander a kolektiv, 1997. *Štruktúra a vlastnosti dreva*. Bratislava: Príroda, a.s. ISBN 80-07-00960-4.

PROKEŠ, Stanislav, 1982. *Obrábění dřeva a nových hmot ze dřeva*. Třetí vydání. Praha: SNTL-Nakladatelství technické literatury. ISBN 04-833-82.

ŠLEZINGEROVÁ, Jarmila a Libuše GANDELOVÁ, 1998. *Stavba dřeva*. 1. vyd, dotisk. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-80-7157-137-7.

WILLIAMS, David B. a C. Barry CARTER, 2008. *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. 2nd ed. New York: Springer. ISBN 978-0-387-76500-6.

WIMMER, R. a Roland E. VETTER, ed., 1999. *Tree-ring analysis: biological, methodological, and environmental aspects*. Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub. ISBN 978-0-85199-312-6.

ZEIDLER, Aleš a Vlastimil BORŮVKA, 2016. *Stavba a vlastnosti dřeva hospodářsky významných dřevin - podklady pro cvičení*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2674-3.

ZEIDLER, Aleš a Vlastimil BORŮVKA, 2019. *Stavba a vlastnosti dřeva exotických dřevin*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2992-8.

Elektronické

ANDRES, B., JANKOWSKA A., KLOCH M., MAZUREK A., OLEKSIEWICZ A., PALUCKI M. a WOJCIK A., 2015. A study of natural durability of wood in selected tropical wood species from South America and Africa affected by the fungus *Serpula lacrymans* (Wulf., Fr) Schroet. *Annals of Warsaw University of Life Sciences - SGGW. Forestry and Wood Technology* [online]. **92** [vid. 2023-11-18]. ISSN 1898-5912. Dostupné z: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-7f095d67-92c1-4a48-a589-ec40f348f92d>

Anon., [b.r.]. *Diplomka.pdf* [online]. [vid. 2023a-03-20]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/rlchs/Diplomka.pdf>

Anon., [b.r.]. *Frank-InterakceElektronuSLatkou-17_03_2016.pdf* [online]. [vid. 2023b-11-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/F7850/um/Frank-InterakceElektronuSLatkou-17_03_2016.pdf

Anon., [b.r.]. *Gentle Beam - Improving Low Voltage with FE SEM.pdf* [online]. [vid. 2023c-11-19]. Dostupné z: https://jeolusa.s3.amazonaws.com/resources_eo/Gentle%20Beam%20-%20Improving%20Low%20Voltage%20with%20FE%20SEM.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAQJOI4KIAZPDULHNL&Expires=2145934800&Signature=aE8Ao7Hb13W5JV4GED1Vg1NUz%2BY%3D

Anon., [b.r.]. *JEOL Guide to Scanning Microscope Observation.pdf* [online]. [vid. 2023d-11-19]. Dostupné z: https://jeolusa.s3.amazonaws.com/resources_eo/JEOL%20Guide%20to%20Scanning%20Microscope%20Observation.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAQJOI4KIAZPDULHNL&Expires=2145934800&Signature=smU6sQ37PnoHln0sbkNPNnfSI%2FQ%3D

Anon., [b.r.]. *Kontrast_v_SEM_2020.pdf* [online]. [vid. 2024e-02-22]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2020/F7850/um/Kontrast_v_SEM_2020.pdf?lang=en

Anon., [b.r.]. *MRSA_-_07-SEM-konstrukce-priprava_vzorku.pdf* [online]. [vid. 2024f-02-22]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/files/PrF/katedry/kbf/materialy/MRSA_-_07-SEM-konstrukce-priprava_vzorku.pdf

Anon., [b.r.]. *MyScope_SEM.pdf* [online]. [vid. 2023g-11-17]. Dostupné z: https://myscope.training/pdf/MyScope_SEM.pdf

Anon., [b.r.]. *Publikace-Transmisni-elektronova-mikroskopie.aspx.pdf* [online]. [vid. 2023h-11-17]. Dostupné z: <https://www.lfhk.cuni.cz/Fakulta/Organizacni-struktura/Domaci-stranky/Ustav-histologie-a-embryologie/Vyzkum/Transmisni-elektronovy-mikroskop/Publikace-Transmisni-elektronova-mikroskopie.aspx/>

Anon., [b.r.]. *semmanual.pdf* [online]. [vid. 2023i-11-15]. Dostupné z: <http://www.geo.umass.edu/courses/geo311/semmanual.pdf>

CAZAUX, Jacques, 2004. Charging in scanning electron microscopy “from inside and outside”. *Scanning* [online]. **26**(4), 181–203. ISSN 1932-8745. Dostupné z: doi:10.1002/sca.4950260406

DEJMAL, Aleš, [b.r.]. MODIFIKACE DŘEVA.

DELONG, Armin a Vladimír DRAHOŠ, 1958. *Praktická elektronová mikroskopie* [online]. Praha: ČSAV. Dostupné z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:5b699b42497c1b4e4966e320184f6b30>

FILHO, B Raz, [b.r.]. THE FLAVONES OF APULEIA LEIOCARPA*t.

FRANK, Luděk, ZADRAŽIL Martin a Ilona MÜLLEROVÁ, 2001. Scanning electron microscopy of nonconductive specimens at critical energies in a cathode lens system. *Scanning* [online]. **23**(1), 36–50. ISSN 1932-8745. Dostupné z: doi:10.1002/sca.4950230106

FRANKLIN, G. L., 1945. Preparation of Thin Sections of Synthetic Resins and Wood-Resin Composites, and a New Macerating Method for Wood. *Nature* [online]. **155**(3924), 51–51. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/155051a0

HAFNER, Bob, [b.r.]. Scanning Electron Microscopy Primer.

CHAN, D. S. H., SIM K. S. a J. C. H. PHANG, 1993. A Simulation Model for Electron Irradiation Induced Specimen Charging in a Scanning Electron Microscope.

KÁŇOVÁ, Jitka, [b.r.]. Rastrovací mikroskopie při kritické energii elektronů.

KIM, Ki Woo, CHOI Seung Jun a Tae Wha MOON, 2008. Backscattered electron imaging for reduced charging of moisturized corn starch granules: Implications for versatile imagery of hygroscopic powder specimens. *Micron* [online]. **39**(8), 1160–1165. ISSN 0968-4328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2008.05.007

MAMOŇOVÁ, Miroslava, 2019. *Elektronovy mikroskop* [online] [vid. 2024-02-27]. Dostupné z: <https://mamonova.webz.cz/mikroskop/index.html>

MIKA, Filip, RYŠÁVKA Josef, LOPOUR Filip, ZADRAŽIL Martin, MÜLLEROVÁ Ilona a Luděk FRANK, 2003. Computer Controlled Low Energy SEM. *Microscopy and Microanalysis* [online]. **9**(S03), 116–117. ISSN 1431-9276, 1435-8115. Dostupné z: doi:10.1017/S1431927603014119

MILLER, Dean J., 1991. Artifacts of specimen charging in X-ray microanalysis in the scanning electron microscope. *Ultramicroscopy* [online]. **35**(3–4), 357–366. ISSN 0304-3991. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3991(91)90088-N

MOHAMMED, Azad a Avin ABDULLAH, [b.r.]. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM): A REVIEW.

NEBESÁŘOVÁ, Jana, 2001. *Elektronová mikroskopie pro biology* < Jana Nebesářová > - Hl. stránka [online] [vid. 2024-02-27]. Dostupné z: <http://lembook.paru.cas.cz/>

NĚMEČEK, Ing Jiří, 2017. Metody skenovací elektronové mikroskopie SEM a analytické techniky.

REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA, 2006. *Encyklopedie fyziky* [online]. B.m.: Jaroslav Reichl [vid. 2023-11-17]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1674-elektronovy-mikroskop>

SADER, Kasim, STOPPS Martyn, CALDER Lesley J. a Peter B. ROSENTHAL, 2013. Cryomicroscopy of radiation sensitive specimens on unmodified graphene sheets: Reduction of electron-optical effects of charging. *Journal of Structural Biology* [online]. **183**(3), 531–536. ISSN 1047-8477. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jsb.2013.04.014](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.014)

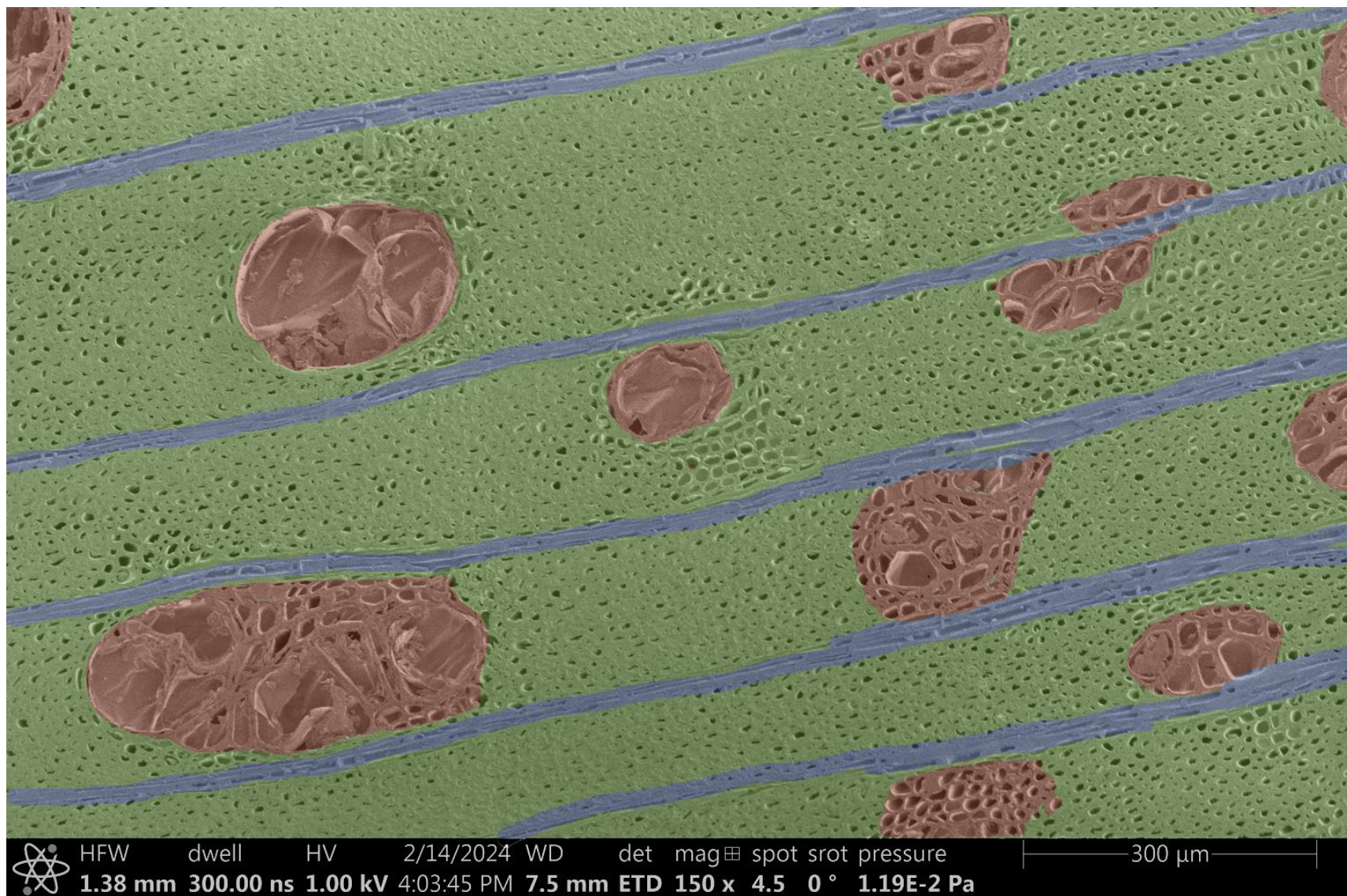
VAVRČÍK, Hanuš a Vladimír GRÝC, 2015. The methodology of making microscopical preparations of wood. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. **52**(4), 169–176. ISSN 12118516, 24648310. Dostupné z: [doi:10.11118/actaun200452040169](https://doi.org/10.11118/actaun200452040169)

ZOBAČOVÁ, J. a L. FRANK, 2003. Specimen Charging and Detection of Signal from Non-conductors in a Cathode Lens-Equipped Scanning Electron Microscope. *Scanning* [online]. **25**(3), 150–156. ISSN 0161-0457, 1932-8745. Dostupné z: [doi:10.1002/sca.4950250307](https://doi.org/10.1002/sca.4950250307)

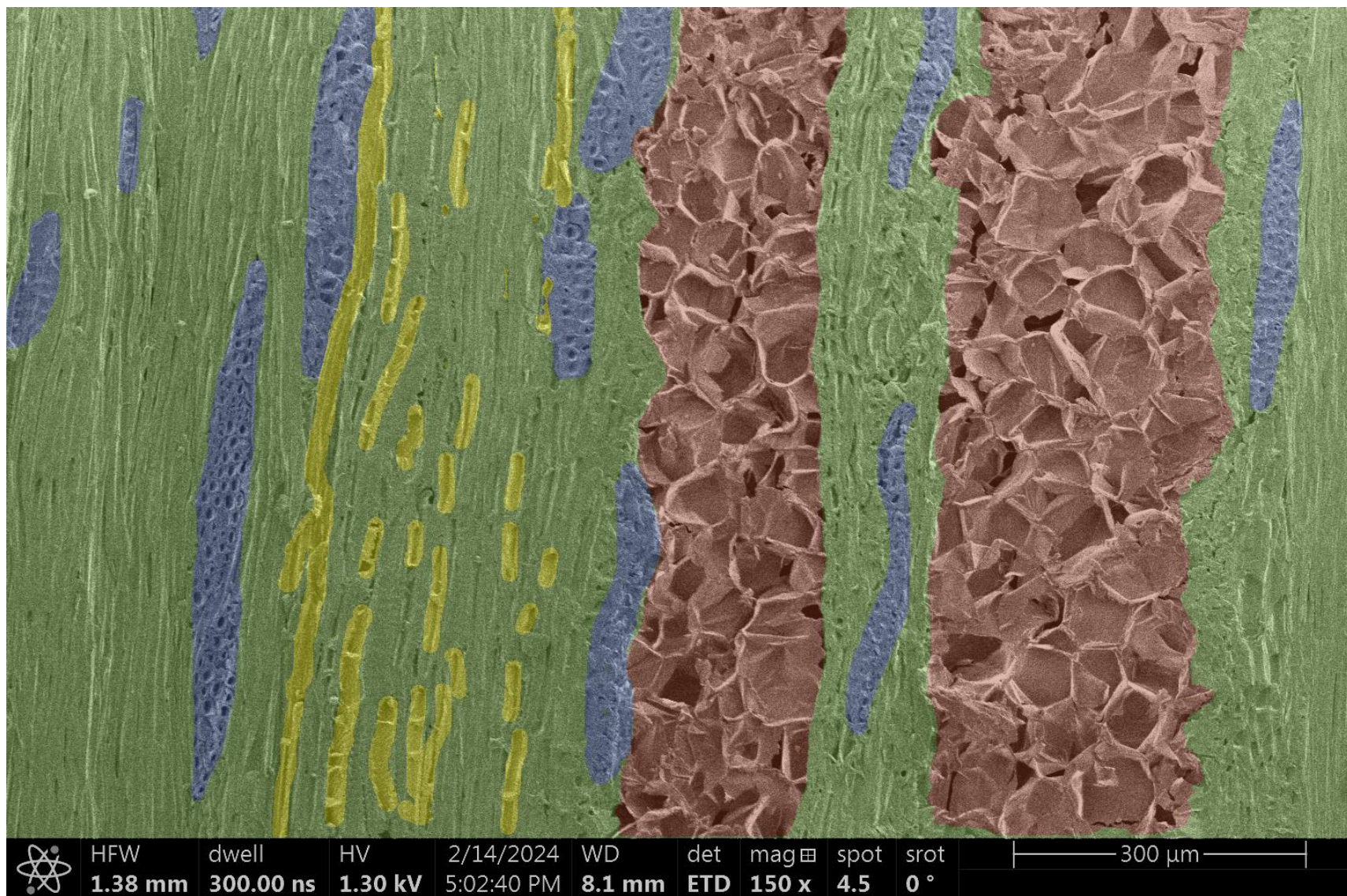
9 Samostatné přílohy

1. Akát pohled rovnoběžně s vlákny
2. Akát pohled kolmo na vlákna
3. Dub pohled rovnoběžně s vlákny
4. Dub pohled kolmo na vlákna
5. Javor pohled rovnoběžně s vlákny
6. Javor pohled kolmo na vlákna
7. Jasan pohled rovnoběžně s vlákny
8. Jasan pohled kolmo na vlákna
9. Smrk pohled rovnoběžně s vlákny
10. Smrk pohled kolmo na vlákna
11. Thermowood pohled rovnoběžně s vlákny
12. Thermowood pohled kolmo na vlákna
13. Garapa pohled rovnoběžně s vlákny
14. Garapa pohled kolmo na vlákna
15. Massaranduba pohled rovnoběžně s vlákny
16. Massaranduba pohled kolmo na vlákna
17. Merbau pohled rovnoběžně s vlákny
18. Merbau pohled kolmo na vlákna
19. Ipe pohled rovnoběžně s vlákny
20. Ipe pohled kolmo na vlákna

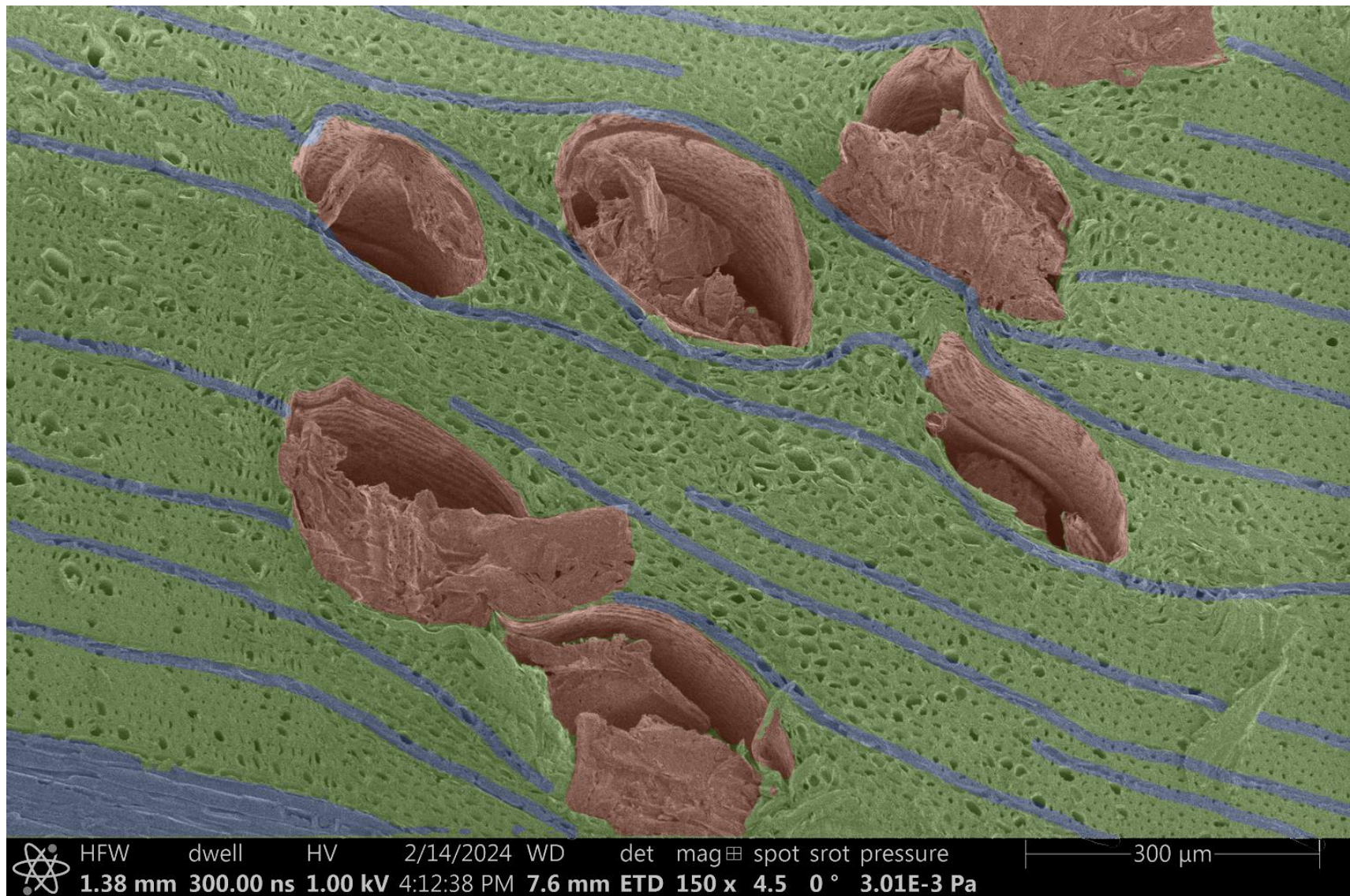
Příloha 1 - akát pohled rovnoběžně s vlákny



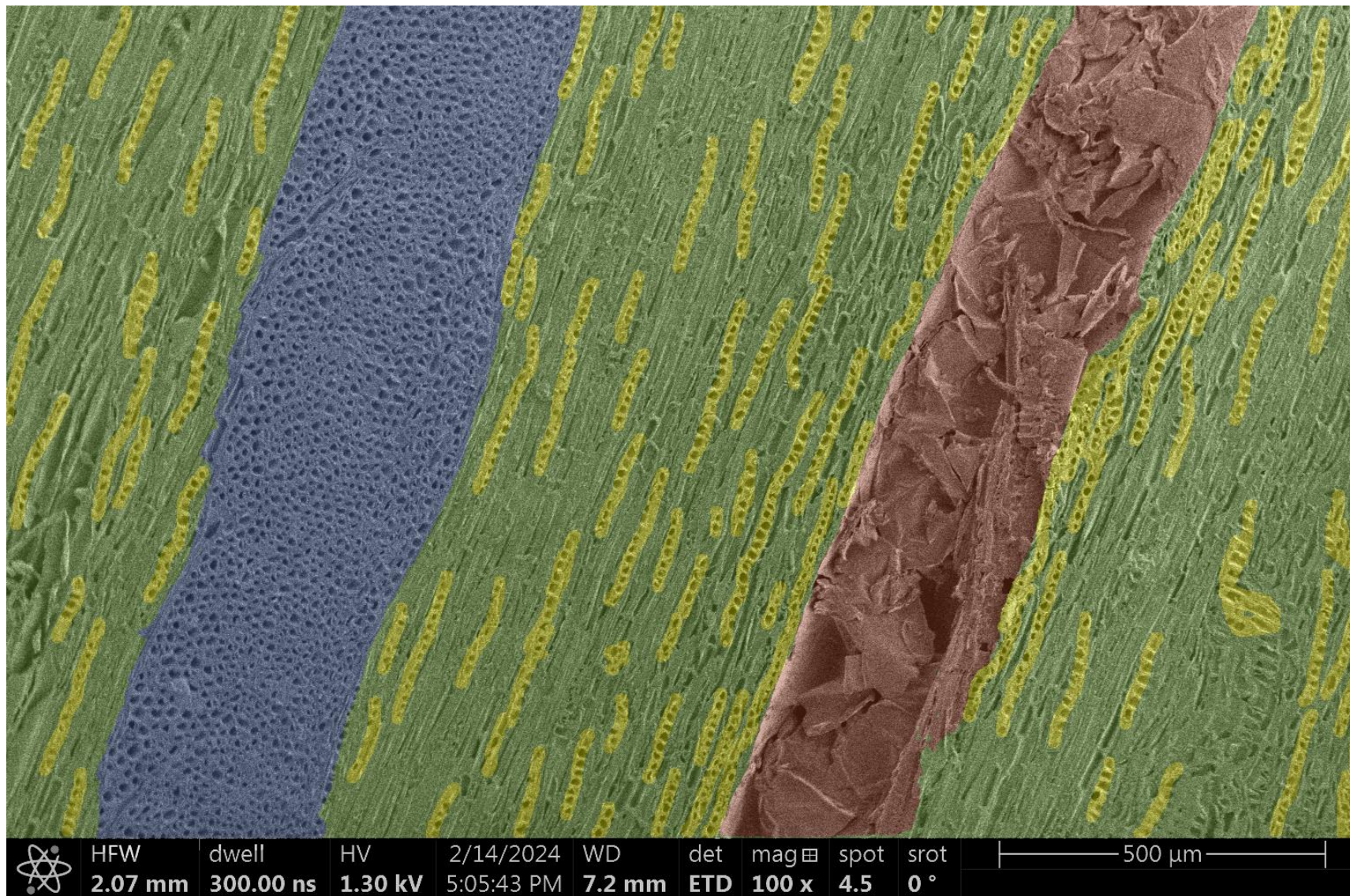
Příloha 2 - akát pohled kolmo na vlákna



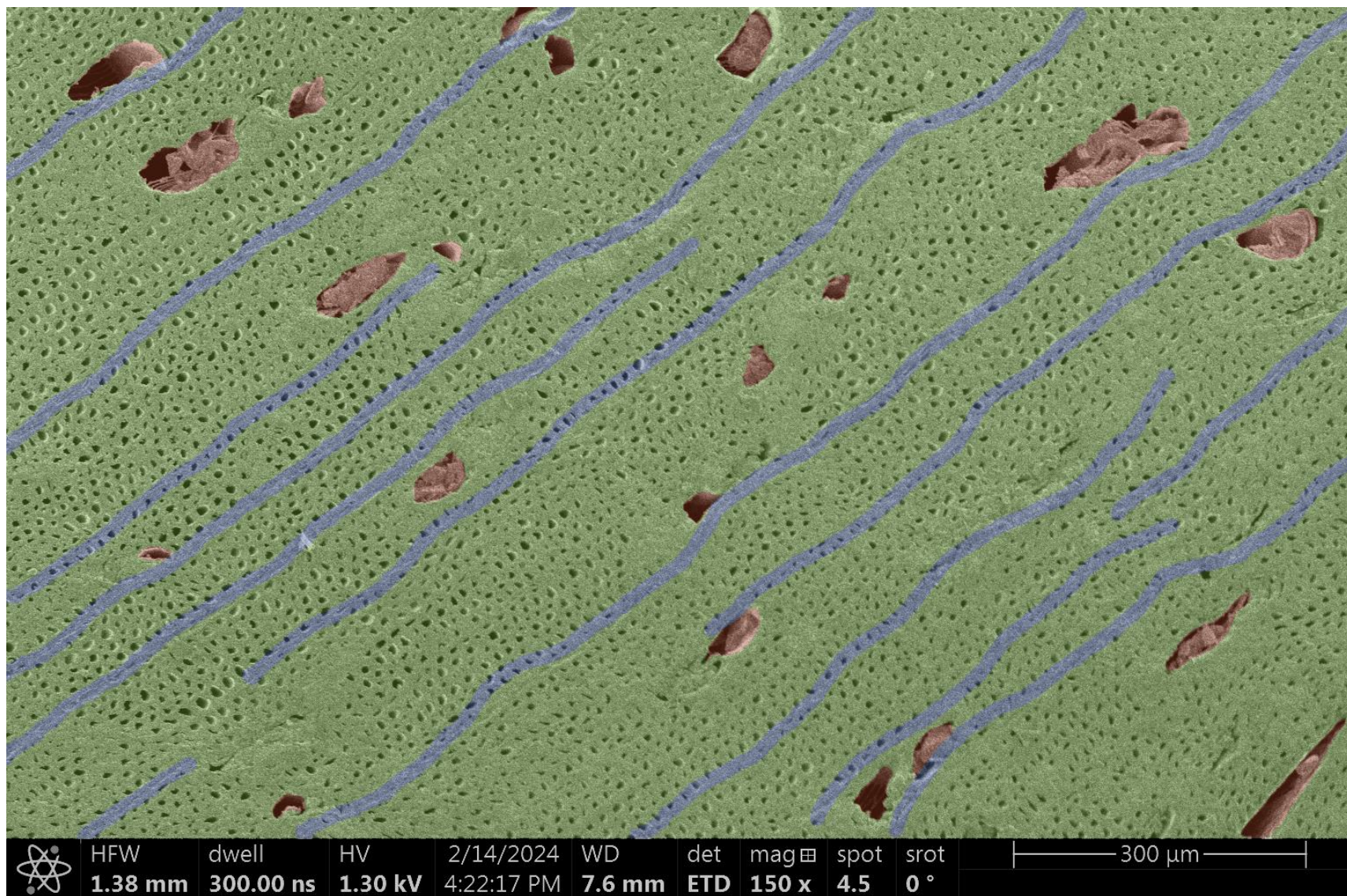
Příloha 3 - dub pohled rovnoběžně s vlákny



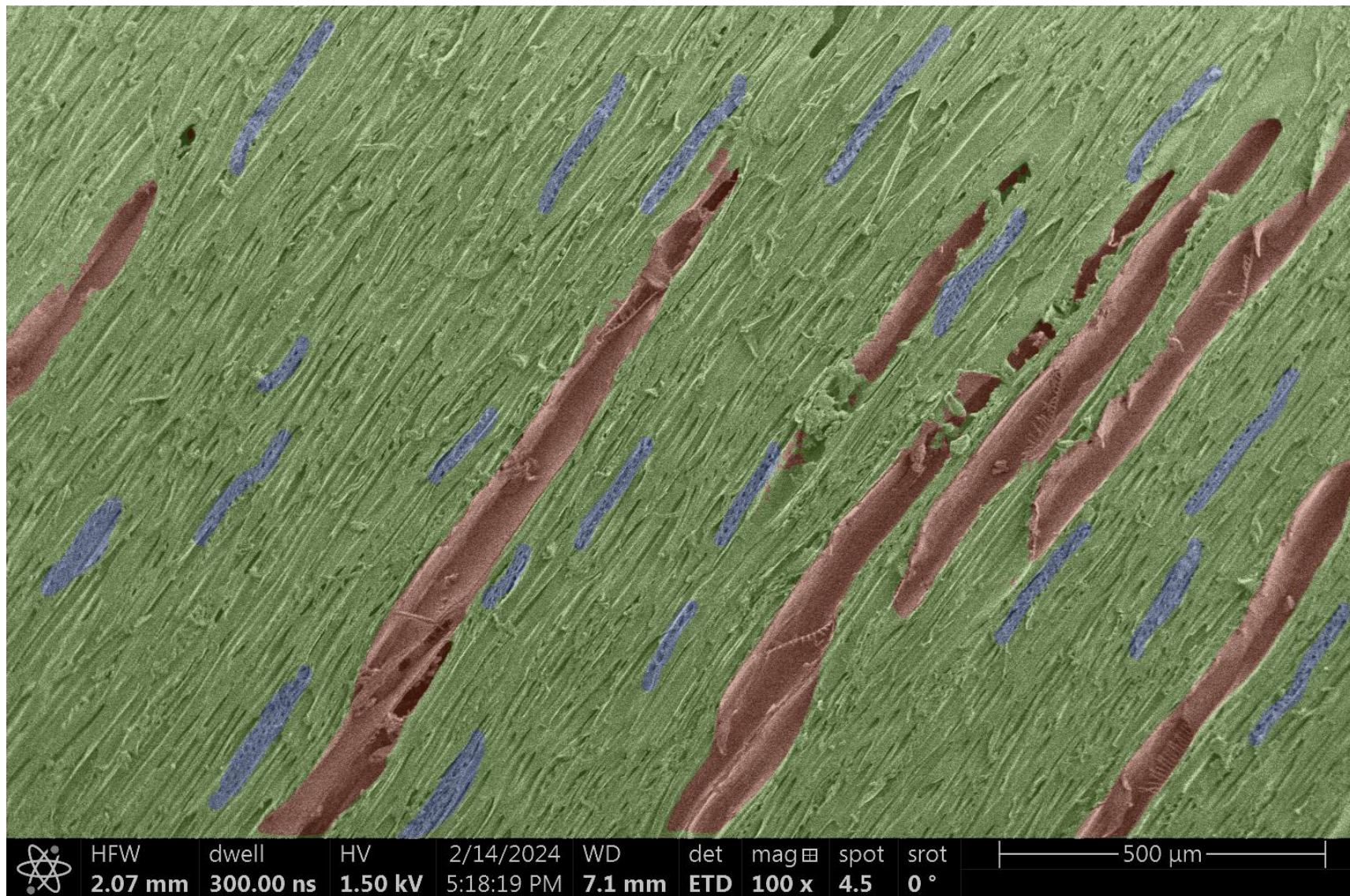
Příloha 4 - dub pohled kolmo na vlákna



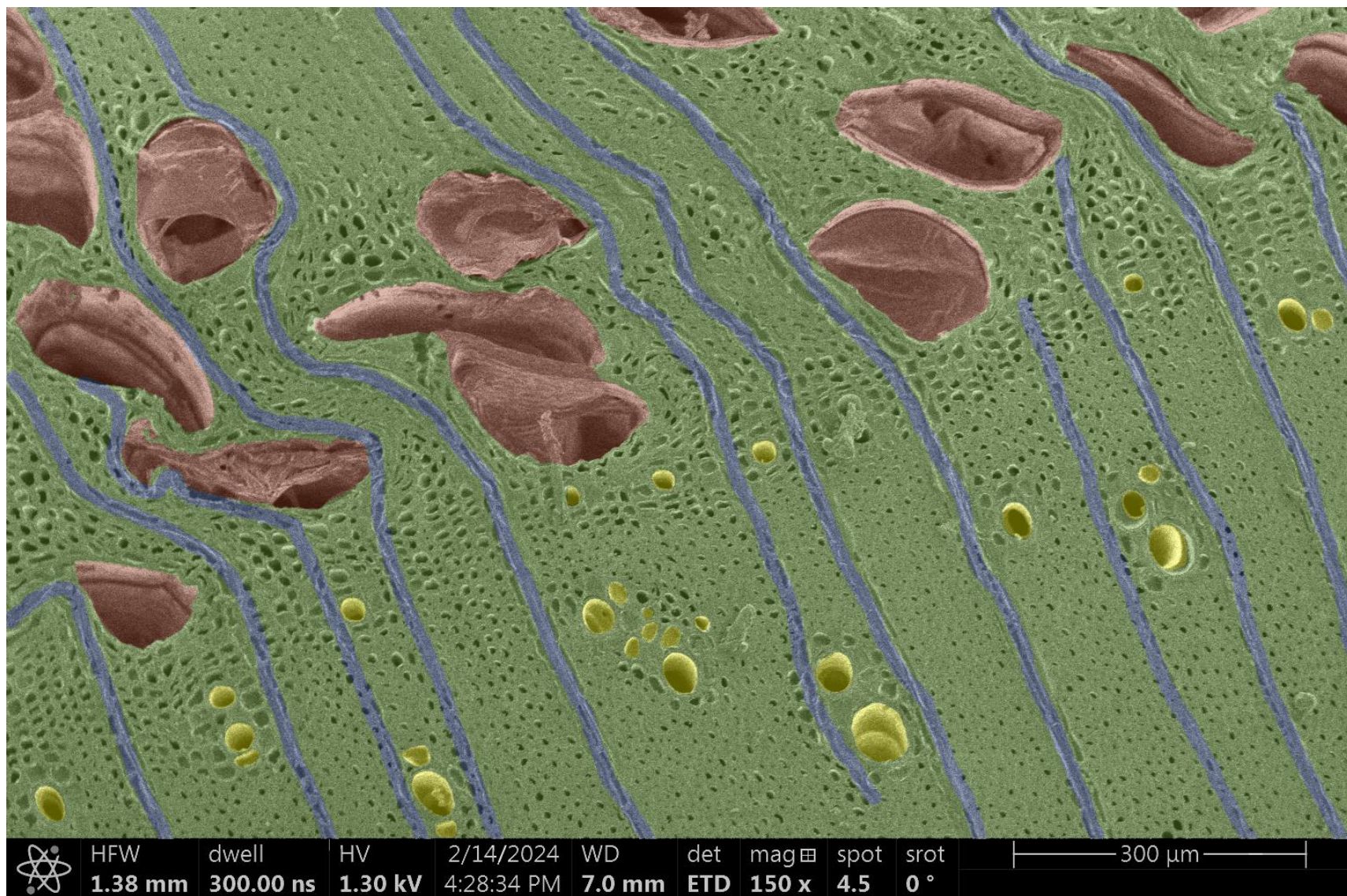
Příloha 5 - javor pohled rovnoběžně s vlákny



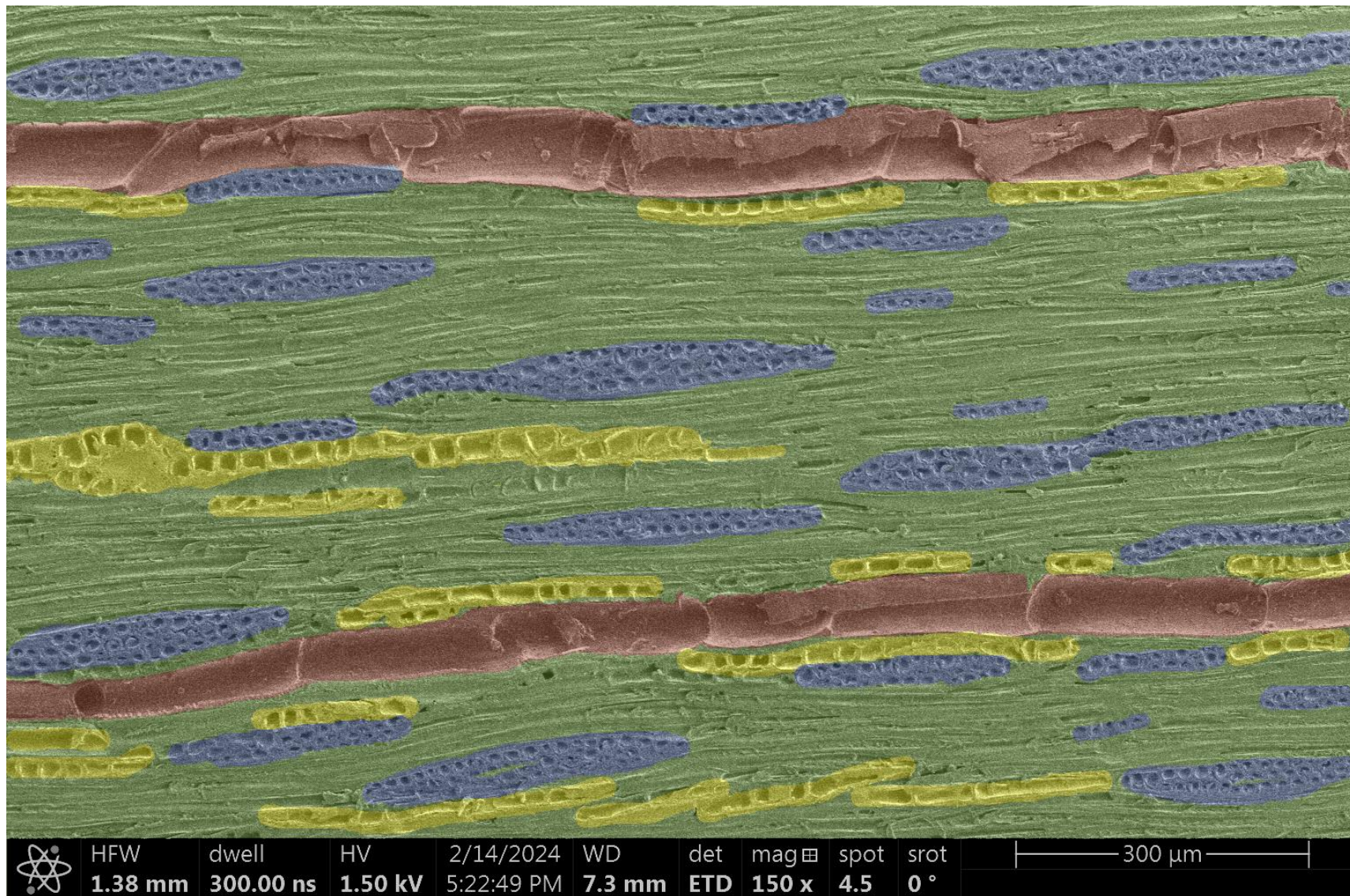
Příloha 6 - javor pohled kolmo na vlákna



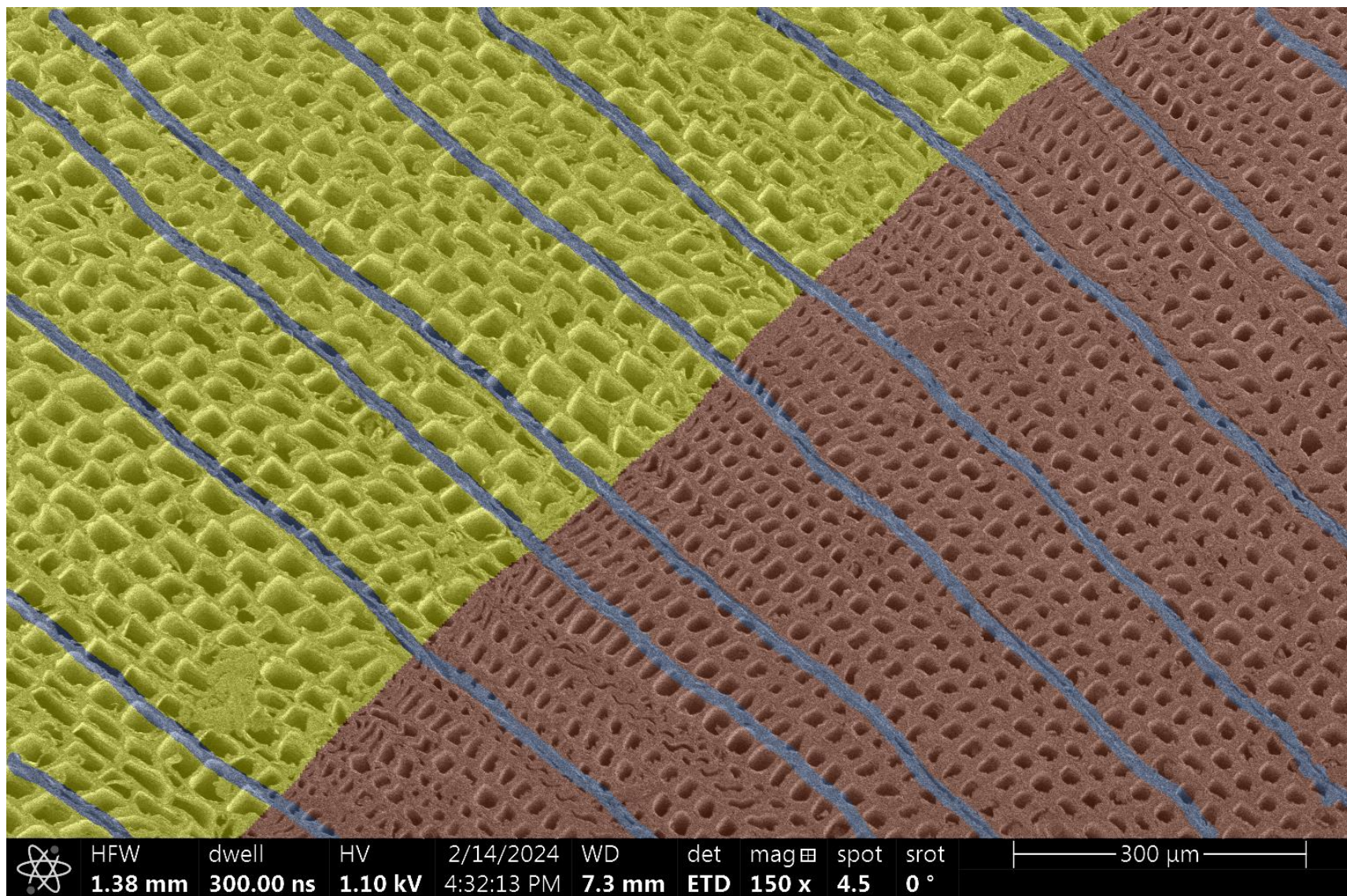
Příloha 7 - jasan pohled rovnoběžně s vlákny



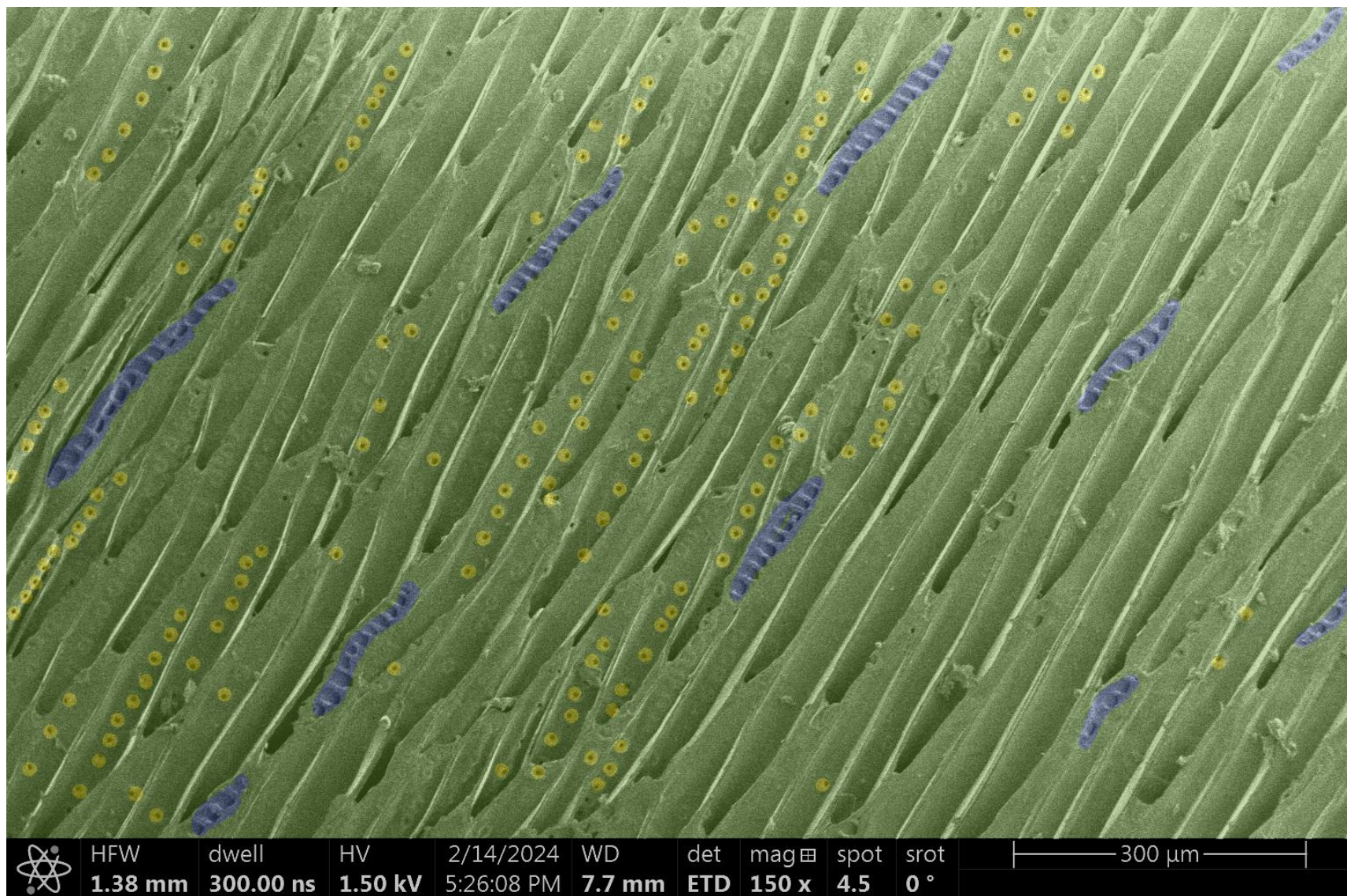
Příloha 8 - jasan pohled kolmo na vlákna



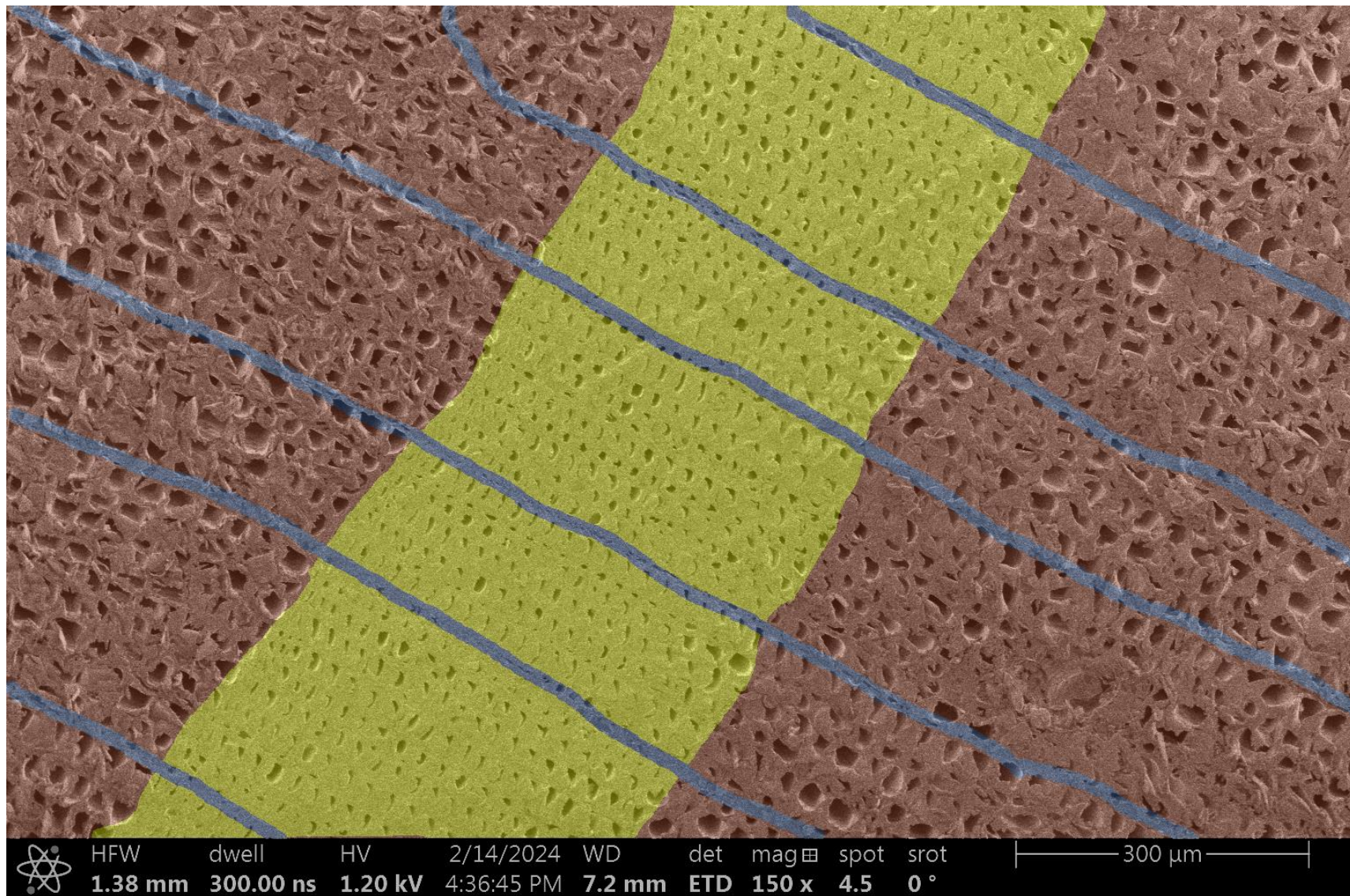
Příloha 9 - smrk pohled rovnoběžně s vlákny



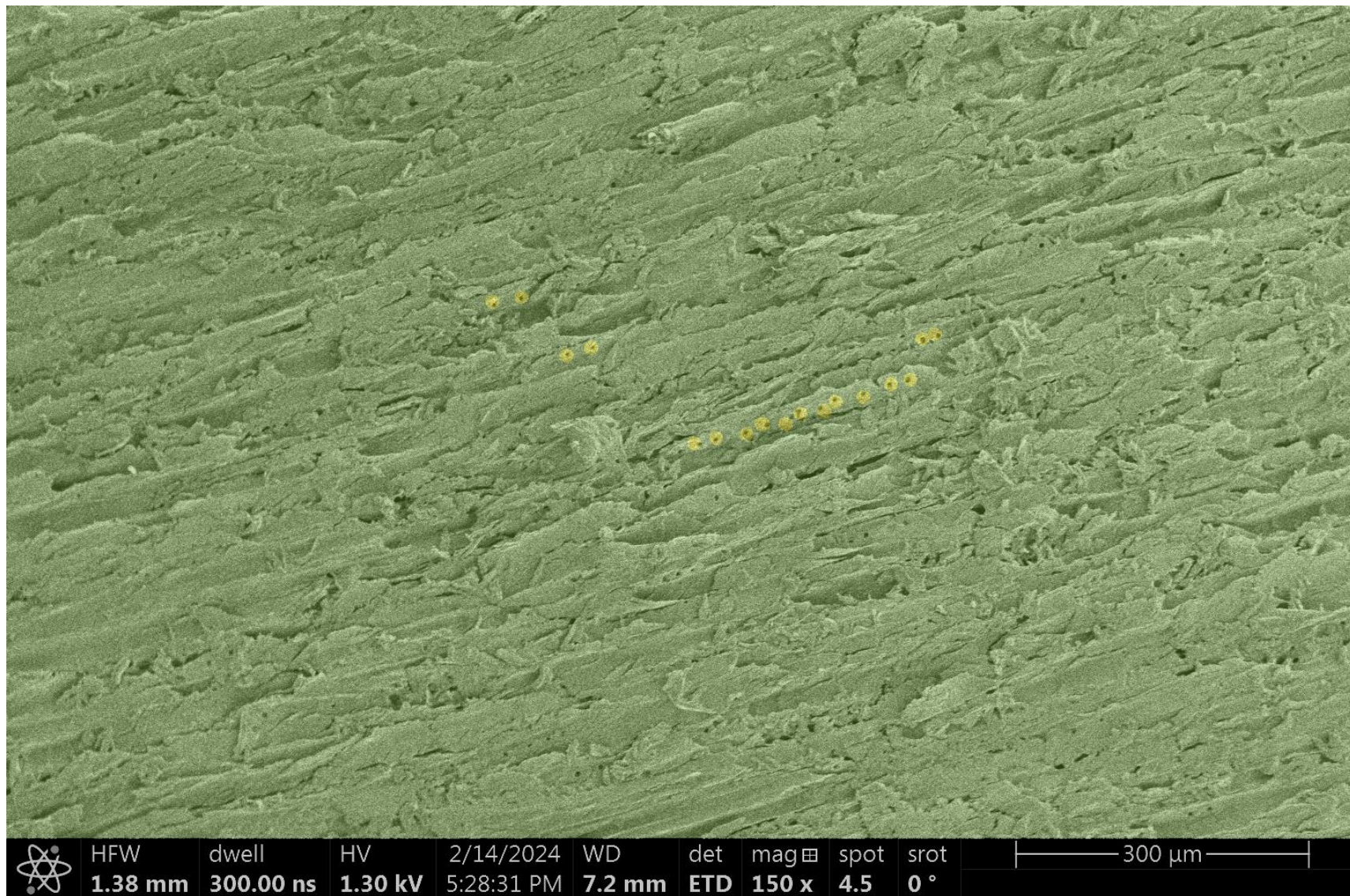
Příloha 10 - smrk pohled kolmo na vlákna



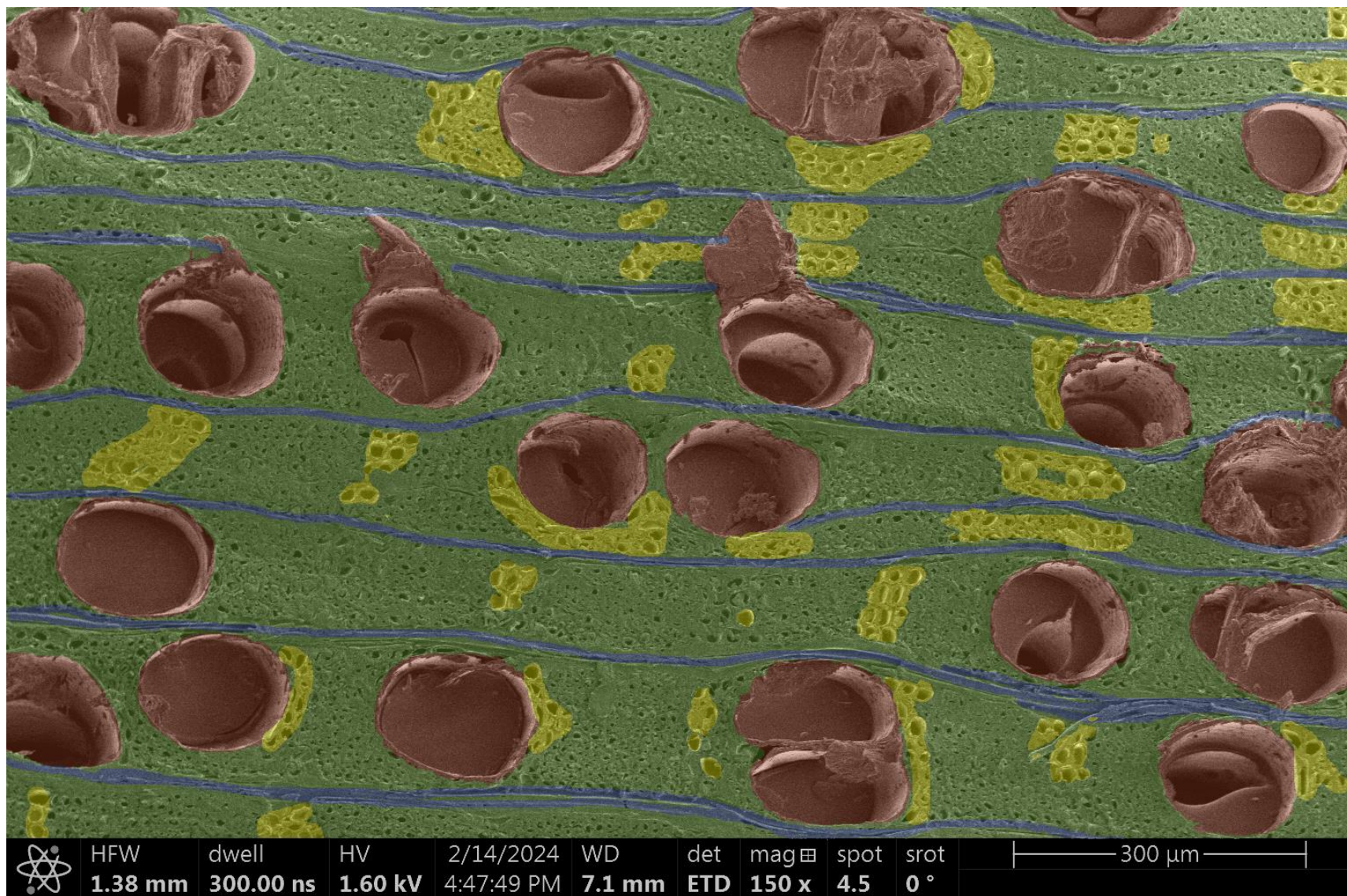
Příloha 11 - thermowood pohled rovnoběžně s vlákny



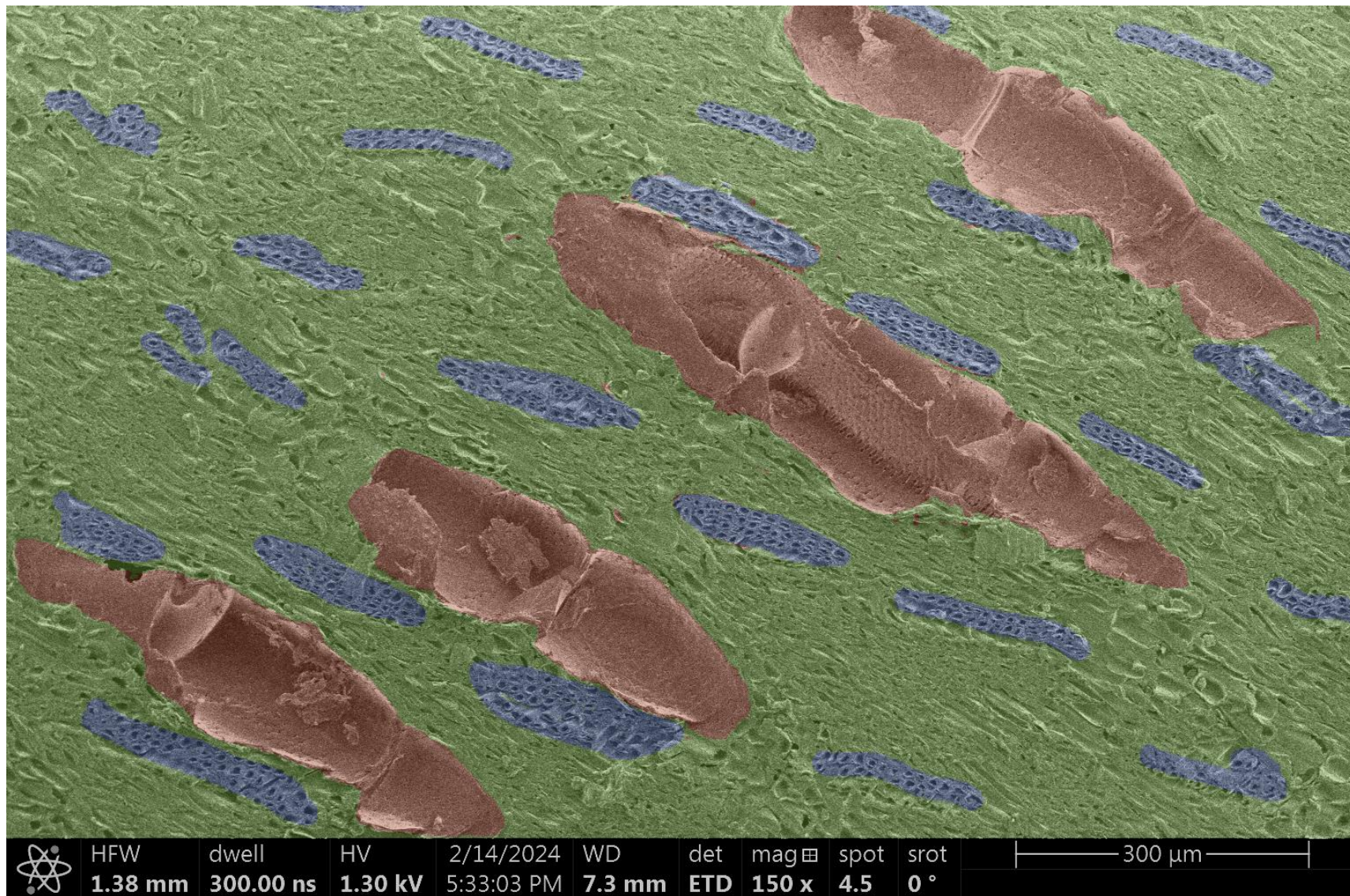
Příloha 12 - thermowood pohled kolmo na vlákna



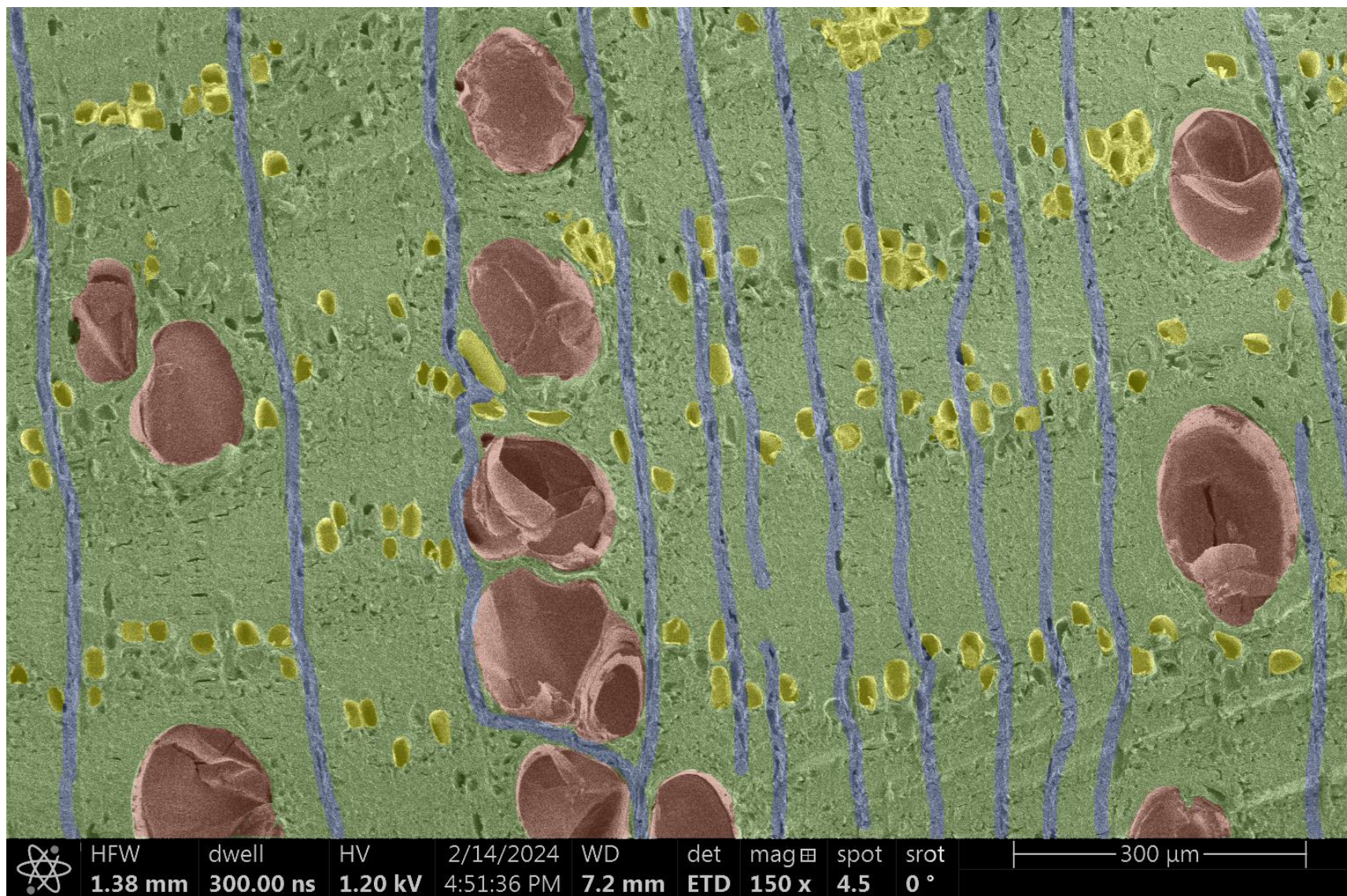
Příloha 13 - garapa pohled rovnoběžně s vlákny



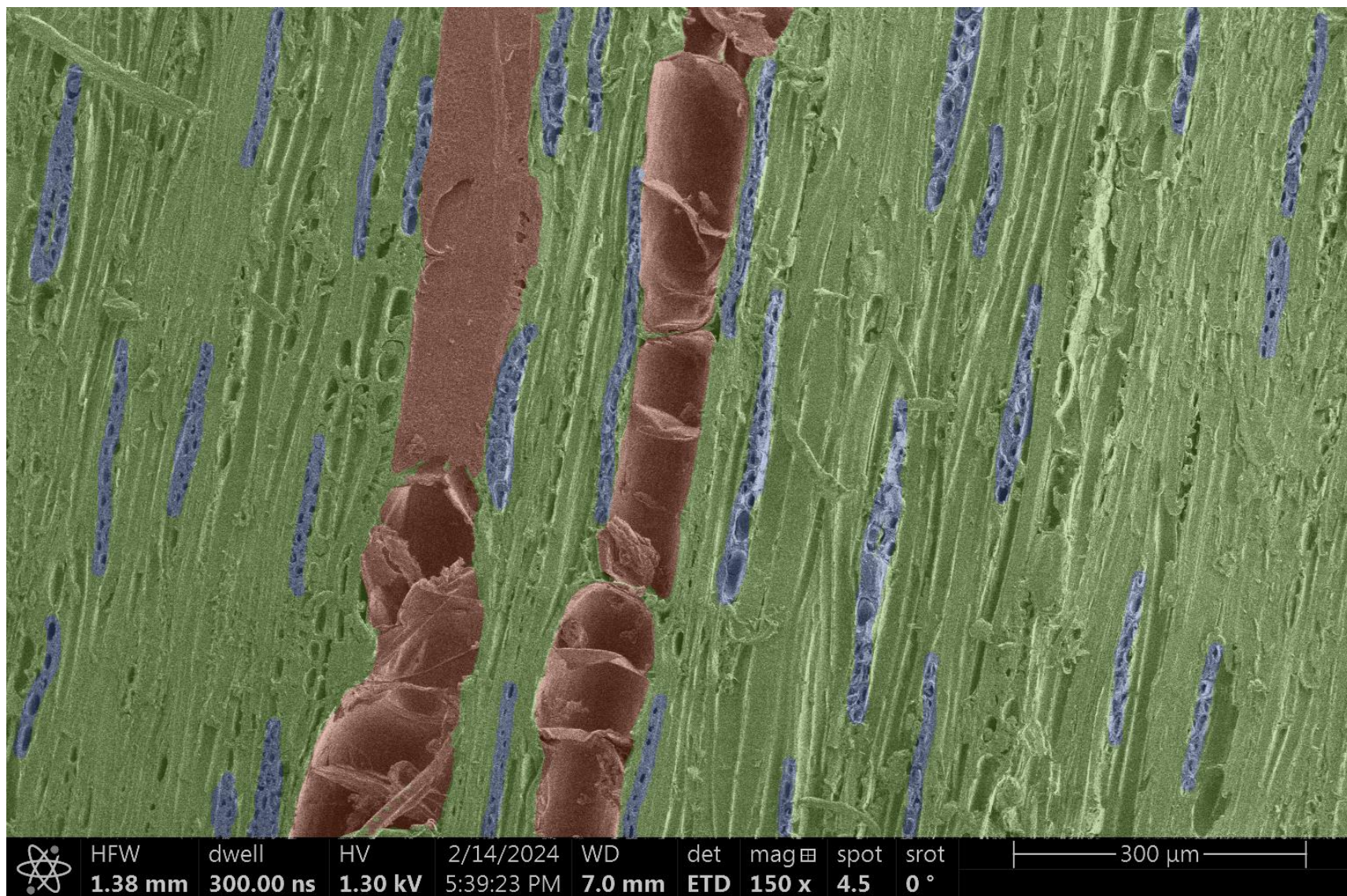
Příloha 14 - garapa pohled kolmo na vlákna



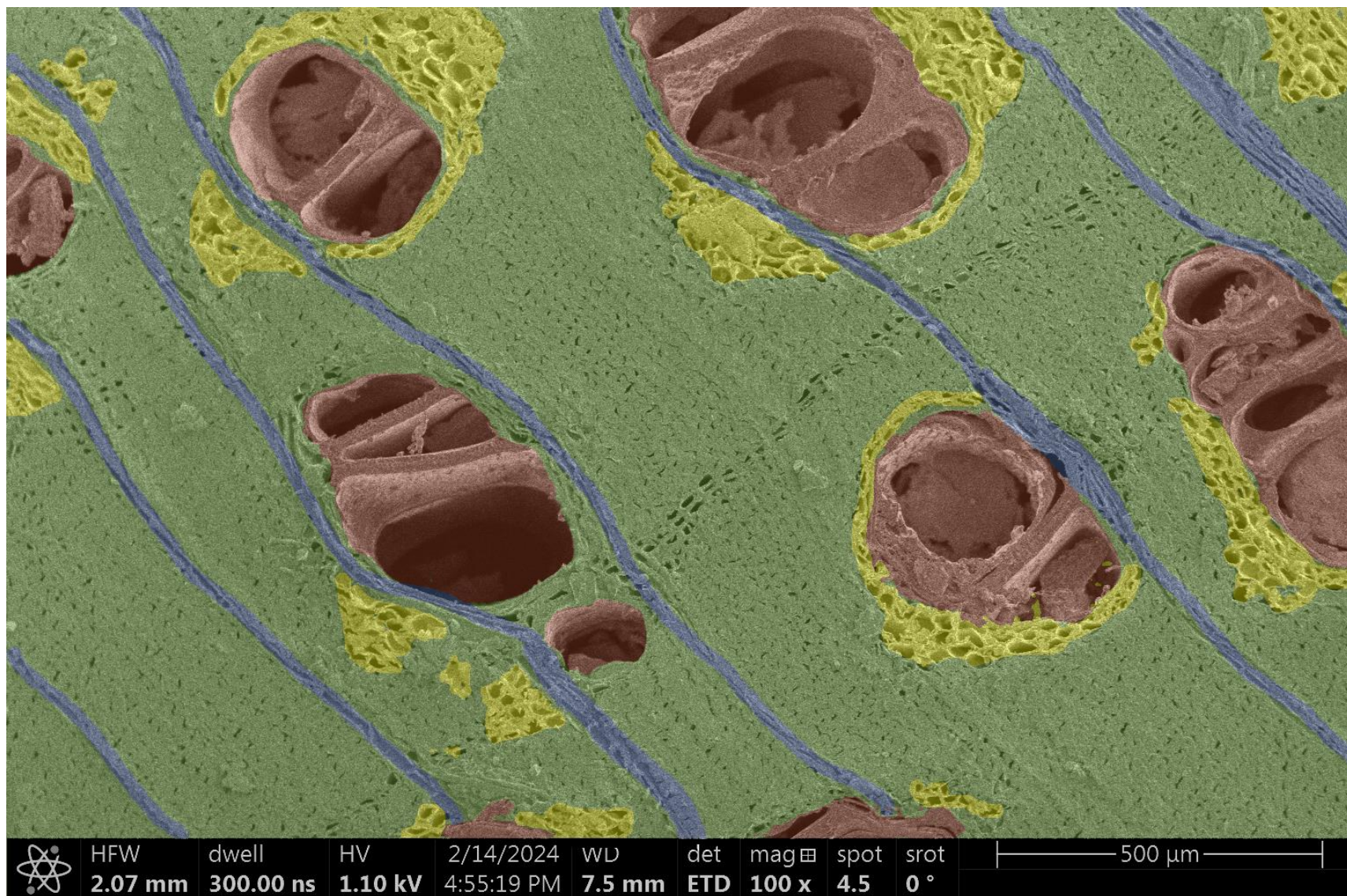
Příloha 15 - massaranduba pohled rovnoběžně s vlákny



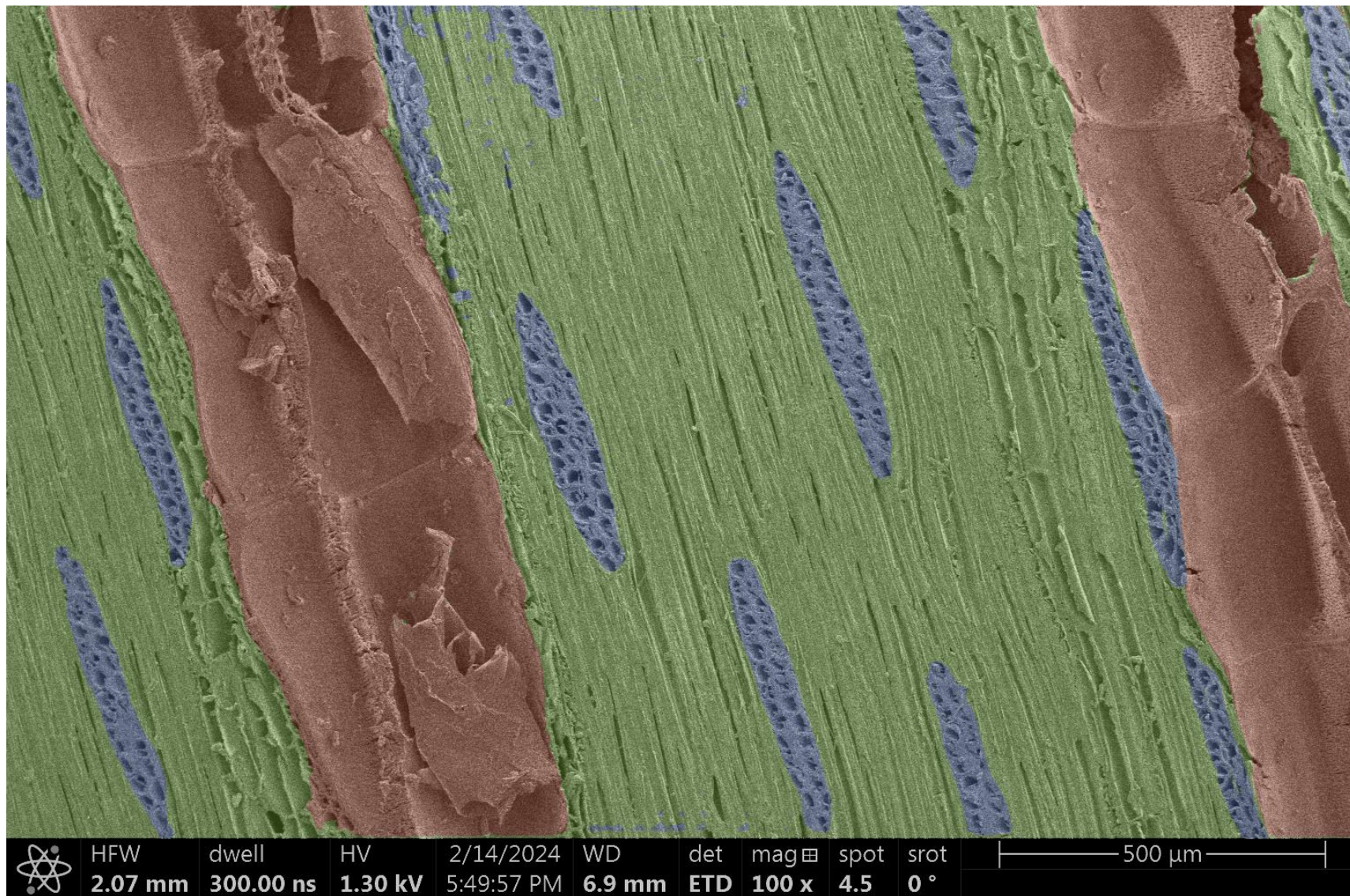
Příloha 16 - massaranduba pohled kolmo na vlákna



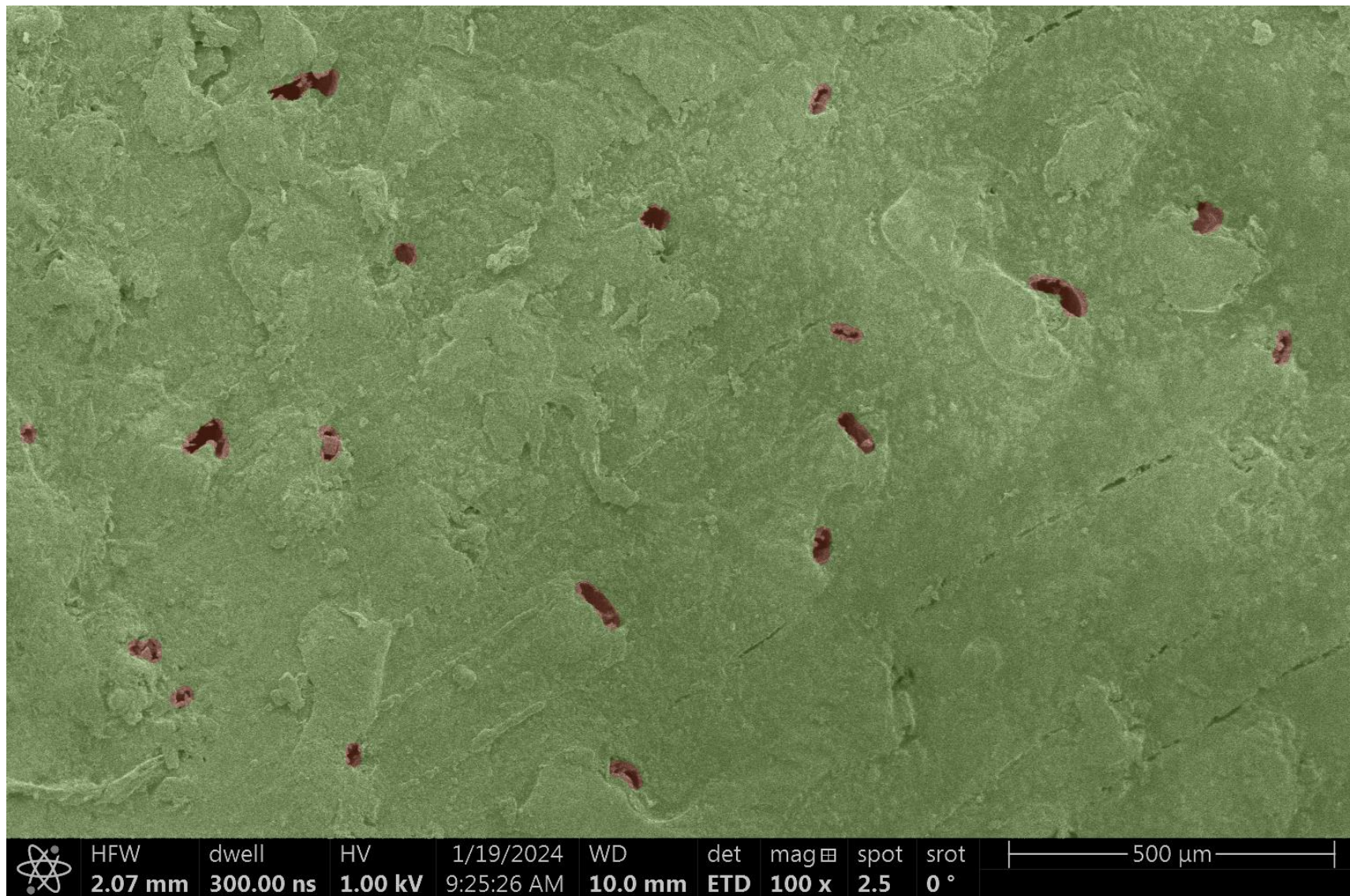
Příloha 17 - merbau pohled rovnoběžně s vlákny



Příloha 18 - merbau pohled kolmo na vlákna



Příloha 19 - ipe pohled rovnoběžně s vlákny



Příloha 20 - ipe pohled kolmo na vlákna

