

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Pedagogická fakulta

Katedra fyziky

Diplomová práce

**Rozptyl primárních elektronů na atomech zalévacího média
biologického materiálu u nízkonapětového transmisního
elektronového mikroskopu LV EM 5**

Vedoucí práce: RNDr. Stanislav Hucek, Ph.D.

Konzultanti: Ing. Jana Nebesářová, CSc.

Mgr. David Kaftan, Ph. D.

Autor práce: Bc. Tomáš Bílý

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracoval samostatně, s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 20. dubna 2011

Tomáš Bílý:

Abstrakt:

Tato magisterská práce je zaměřena na prozkoumání vlastní struktury zalévacího média v nízkonapěťovém transmisním elektronovém mikroskopu (LV TEM), dále je zaměřena na prozkoumání povrchové morfologie mikroskopem atomárních sil (AFM) a skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM). Je popsán princip jednotlivých mikroskopů, zejména tvorba kontrastu a konstrukce LV TEM. V závěru je zhodnocen vliv povrchové struktury zalévacího media na obrazový kontrast v LV TEM a rozbor minimalizace jeho vlivu ve výsledném obraze.

Abstract:

This master thesis deals with researching the structure of embedding resin in the Low-Voltage Transmission Electron Microscope (LV TEM). Further, it focuses on researching the surface morphology by the Atomic Force Microscope (AFM) and by the Scanning Electron Microscope (SEM). The principle of each of the microscopes is explained – the contrast formation and construction of the LV TEM in particular. In the conclusion the evaluation of the effect of the surface structure of the embedding resin on the image contrast in the LV TEM and the analysis of the minimalization of its effect on the final image is given.

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval RNDr. Stanislavu Huckovi, Ph.D. (PF JU) za poskytnuté cenné rady při vedení této práce. Dále děkuji svým odborným školitelům Ing. Janě Nebesářové, CSc. (LEM) a Mgr. Davidu Kaftanovi, Ph.D. (UFB JU) za jejich podněty a odbornou pomoc při práci s jednotlivými přístroji a za poskytnuté zázemí. Poděkování také patří všem mým spolupracovníkům z Laboratoře elektronové mikroskopie, především Petře Masařové za náročné krájení ultratenkých řezů, Jiřímu Vaněčkovi a Mgr. Janu Langhansovi. Také chci poděkovat RNDr. Miroslavu Šloufovi Ph.D. (UMCH) za umožněné měření mikrotvrdoti a RNDr. Petru Bartošovi, Ph.D. (PF JU) za jeho cenné rady z oblasti programovacího prostředí Matlab.

Obsah:

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Historie mikroskopických technik	9
2.2	Elektronová mikroskopie.....	10
2.2.1	Historie.....	10
2.2.2	Principy elektronových mikroskopů	11
2.2.3	Elektronové čočky	12
2.2.4	Elektronové trysky	16
2.2.5	Vakuová technika.....	20
2.2.6	Elektronový rozptyl	21
2.3	Transmisní elektronový mikroskop (TEM)	22
2.3.1	Elektronová tryska	23
2.3.2	Kondenzor.....	23
2.3.3	Předmět	23
2.3.4	Objektiv	26
2.3.5	Projektiv.....	27
2.3.6	Stínítko.....	27
2.3.7	Kamera.....	27
2.4	Skenovací elektronový mikroskop (SEM)	29
2.4.1	Elektronová tryska	30
2.4.2	Kondenzor.....	30
2.4.3	Vychylovací cívky	31
2.4.4	Objektiv	31
2.4.5	Předmět	32
2.4.6	Detektor	37
2.5	Nízkonapěťový elektronový mikroskop 5 (LV EM 5).....	39
2.5.1	Historie.....	40
2.5.2	Konstrukce LV EM 5.....	40
2.5.3	Elektronová tryska	42
2.5.4	Vakuová technika.....	42
2.5.5	Elektronový kondenzor	43
2.5.6	Preparát	43
2.5.7	Elektronový objektiv.....	44
2.5.8	Elektronový projektiv	44

2.5.9	Fluorescenční stínítko	44
2.5.10	Světelný mikroskop.....	45
2.5.11	CCD kamera.....	46
2.5.12	Tvorba kontrastu	46
2.5.13	Parametry LV EM 5	49
2.6	Mikroskopie atomárních sil (AFM)	49
2.6.1	Historie.....	50
2.6.2	Princip funkce AFM	50
2.6.3	Interakce mezi raménkem s hrotem a preparátem.....	51
2.6.4	Kontaktní mód	54
2.6.5	Bezkontaktní mód	55
2.6.6	Pokleповý mód (tapping mód).....	56
2.6.7	Hroty	57
2.6.8	Fotodetektor	58
2.6.9	Piezoelektrický skener	59
3	Materiál a metody	60
3.1	Materiál	60
3.1.1	EPON 812	60
3.1.2	Spurr.....	61
3.1.3	Příprava bločků.....	61
3.2	Krájení ultratenkých řezů	61
3.2.1	Příprava řezů	62
3.2.2	AFM.....	62
3.2.3	LV EM 5	63
3.2.4	SEM	63
3.3	Prohlížení preparátů	64
3.3.1	AFM.....	64
3.3.2	LV EM 5	66
3.3.3	SEM	67
3.4	Zpracování výsledků	67
3.4.1	AFM.....	67
3.4.2	LV EM 5	70
3.4.3	SEM	71
3.5	Zkouška mikrotvrdomosti.....	72
3.6	Měření hustoty	72
4	Výsledky	74

4.1	AFM	74
4.2	LV EM 5	77
4.2.1	Analýza šířky výběžků (Chatteru)	77
4.2.2	Analýza kontrastu	78
4.3	SEM	79
4.4	Zkouška mikrotvrdoti	80
4.5	Měření hustoty	81
4.6	Rychlost krájení	81
5	Diskuze	82
5.1	Příprava preparátu.....	82
5.2	AFM	85
5.3	LV EM 5	85
5.4	SEM.....	87
5.5	Rozbor minimalizace vlivu zalévacího media na výsledný obraz.....	87
6	Závěr:	89
7	Použitá literatura - zdroje:	90
8	Přílohy:	95

1 Úvod

Cílem diplomové práce je se v teoretické části seznámit se základními fyzikálními principy a funkcemi při zobrazování preparátů v transmisní elektronové mikroskopii (TEM), skenovací elektronové mikroskopii (SEM) a mikroskopii atomárních sil (AFM). Dále prostudovat fyzikální podstatu tvorby kontrastu a konstrukci nízkonapěťového elektronového mikroskopu (LV EM).

V praktické části je cílem nasnímání ultrastrukturálního vzhledu zalévacích médií v LV EM a zobrazení jejich povrchové struktury v AFM a SEM. Výstupem této práce bude zhodnocení vlivu povrchové struktury zalévacích médií na obrazový kontrast v LV EM a jeho ultrastrukturu a dále rozbor minimalizace vlivu zalévacího média na výsledný obraz.

LV EM je zapůjčen firmou Delong Instruments a.s. Laboratoři elektronové mikroskopie, jakožto součást Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR v.v.i., která je aplikačním pracovištěm nízkonapěťové elektronové mikroskopie. Za vývoj LV EM pod záštitou firmy Delong Instruments a.s. obdržel prof. Armin Delong v roce 2005 národní cenu Česká hlava.

2 Teoretická část

2.1 Historie mikroskopických technik

Historie mikroskopických technik sahá až do roku 1590, kdy byl objeven světelný mikroskop Hansem Jansenem a jeho synem Zachariášem, kteří se živilí výrobou brýlí. Někteří historikové přisuzují tento objev až Corneliusi Drebbelovi, jenž sestavil světelný mikroskop v roce 1619 [1]. V dalších letech následoval rozvoj této mikroskopické techniky. Roku 1873 Ernst Karl Abbe zkoumal teoretické možnosti světelného mikroskopu a odvodil rovnici (1) pro výpočet rozlišovací schopnosti d . Rozlišovací schopnost je definována jako nejmenší vzdálenost mezi dvěma body v obraze, které lze rozlišit ještě jako oddělené. Rozlišovací schopnost d má zároveň význam poloměru rozptylového kroužku způsobeného difrakcí [2]. Obecně je v mikroskopických technikách používána rozlišovací schopnost daného snímku ve formě měřítko, neboť v hodnotě zvětšení může být zahrnuto i prázdné zvětšení, které nepřináší žádné nové informace o objektech.

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

kde: λ je vlnová délka použitého světla

n je index lomu prostředí před objektivem

α_0 je úhlová apertura objektivu

Z Abbeho vztahu (1) vyplývá, že maximální teoretické zvětšení světelného mikroskopu je nepřímo úměrné úhlové apertuře objektivu (člen $n \cdot \sin \alpha$), která má u nejkvalitnějších objektivů s imersním olejem hodnoty okolo 1,40 – 1,49 [3]. Limitní rozlišovací schopnost světelných mikroskopů se pohybuje okolo 240 – 225 nm pro žlutozelené světlo ($\lambda = 550$ nm). Rozlišení světelného mikroskopu umožňuje u biologických preparátů pozorovat buňky a některé větší buněčné organely, ale už není možné pozorovat např. ribozomy či vnitřní strukturu mitochondrií. Tento fakt vedl k úvahám použít světlo nebo vlnění s menší vlnovou délkou λ . Avšak musíme být schopni sestavit pro takové vlnění optiku [2].

2.2 Elektronová mikroskopie

2.2.1 Historie

Louis de Broglie roku 1924 vyslovil myšlenku, že částice mohou mít vlnové vlastnosti, a teoreticky odvodil vztah (2) pro průvodní vlnu urychlených hmotných částic [2][4]. Davisson a Germer v USA a G.P. Thomson v Anglii nezávisle na sobě prokázali roku 1927 de Broglieho hypotézy na základě difrakce elektronů na krystalech s vhodně uspořádanými atomy. Pokus Davissona Gramera spočíval v odstřelování niklového terčíku elektronovým svazkem, u něhož mohli měnit energii elektronů a odražené elektrony detekovali detektorem, jehož poloha byla měnitelná. Při prvním pokusu neprokázali de Broglieho teorii a kvůli chybě na vakuové aparatuře museli pokus přerušit a vypálit ve vysokoteplotní peci zoxidovaný povrch niklového terčíku. Tím v kovu došlo k uspořádání malých krystalků a při dalším pokusu se elektrony rozptylovaly do určitých úhlů, takže bylo možné pozorovat maxima a minima způsobené difrakcí [5].

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v} \quad (2)$$

kde: h je Planckova konstanta

p je hybnost částice

m je hmotnost částice

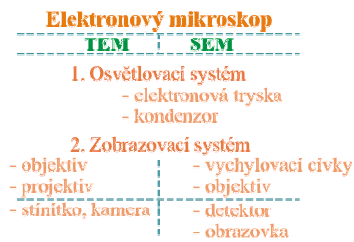
v je rychlost částice

Po prokázání správnosti teorie de Broglieho průvodní vlny urychlených hmotných částic netrvalo dlouho, aby Max Knoll a Ernst Ruska ve svých úvahách nahradili v Abbeho rovnici (1) vlnovou délku λ použitého světla za vlnovou délku urychlených elektronů. Krátce na to v Berlíně na Vysoké škole technické navrhl Ruska elektromagnetickou čočku a v roce 1931 sestrojil prototyp transmisního elektronového mikroskopu, za tento objev obdržel v roce 1986 Nobelovu cenu za fyziku [6]. Vynález principu skenovacího elektronového mikroskopu je připisován Manfredovi von Ardenne, který jej publikoval roku 1938. Fyzická realizace byla provedena až v roce 1942 Vladimírem Kosma Zworykinem [7].

2.2.2 Principy elektronových mikroskopů

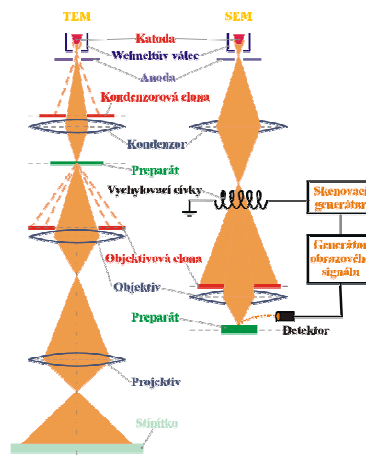
Elektronové mikroskopy jsou přístroje umožňující prohlížení a záznam zvětšeného obrazu pozorovaného objektu. Jsou založeny na základech elektronové optiky, kterou lze do určité míry zjednodušit paprskovými diagramy používanými ve světelné optice a dále na interakcích elektronového svazku se hmotou. Pro funkci mikroskopu musí být elektronová optika pod vakuem, s tím je spojena nutnost při přípravě preparátu jej zbavit vody, a také musí být zajištěna výměna preparátů do vakua.

Optická soustava elektronových mikroskopů se skládá z osvětlovacího systému tvořeného elektronovou tryskou produkující svazek primárních elektronů, který je zaostřen požadovaným způsobem elektronovou čočkou kondenzoru, dále ze zobrazovacího systému a z projekčního systému [6]. Podle typu mikroskopu (SEM, TEM) se liší zobrazovací a projekční systém – Obr. 1.



Obr. 1: Základní optické části elektronových mikroskopů [9]

Na Obr. 2 jsou přehledně zobrazeny optické soustavy obou základních typů elektronových mikroskopů s paprskovými diagramy primárního svazku elektronů.



Obr. 2: Optická soustava elektronového mikroskopu [9]

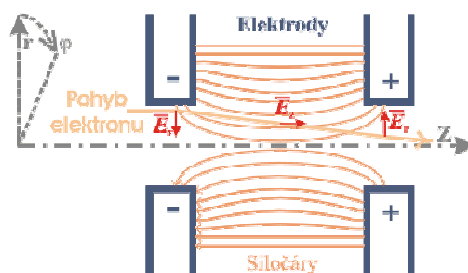
Základními typy interakcí primárního elektronového svazku s hmotou může být buďto pružný anebo nepružný rozptyl.

2.2.3 Elektronové čočky

Úkolem elektronových čoček je zaostřovat svazek primárních elektronů. Jsou založeny na principu vychylování urychlených nabitých částic elektrostatickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem [8].

Tenká elektrostatická čočka

Princip tenké elektrostatické čočky je znázorněn na Obr. 3, pro funkci čočky platí vztahy vyplývající z řešení Newtonových rovnic sestavných na základě Gaussovy věty [8].



Obr. 3: Ostření svazku elektronů tenkou elektrostatickou čočkou [8][9]

Elektrony jsou zaostřovány do ohniska f působením radiálního elektrického pole E_r podle rovnice (3) – kde l je aktivní délka čočky v ose Z , v_i je maximální rychlost elektronu v ose Z a v_0 je vstupní rychlost elektronu [8].

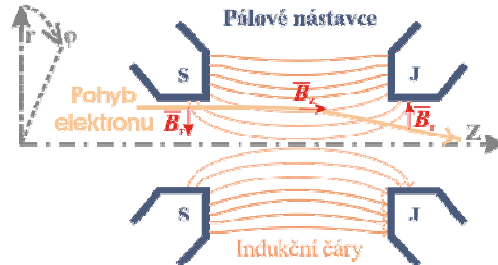
$$f = \frac{4 \cdot l \cdot v_i \cdot v_0}{(v_i + v_0) \cdot (v_i - v_0)} \quad (3)$$

Na elektron uprostřed čočky působí paraxiální elektrické pole E_z , které jej urychluje v paraxiálním směru v závislosti na rozdílu potenciálů podle vztahu (4) – kde e je náboj elektronu, m je hmotnost elektronu a φ_0 , φ_1 jsou potenciály elektrostatické čočky [8].

$$\Delta v = -\left(\frac{2e}{m}\right) \cdot (\varphi_0 - \varphi_1) \quad (4)$$

Tenká elektromagnetická čočka

Princip tenké elektromagnetické čočky je znázorněn na Obr. 4, pro funkci čočky platí vztahy vyplývající z řešení Newtonových rovnic sestavených na základě Biot-Savartova zákona [8].



Obr. 4: Ostření svazku elektronů elektromagnetickou čočkou [8][9]

Elektrony jsou zaostřovány do ohniska f působením radiálního magnetického pole \mathbf{B}_r podle rovnice (5) – kde μ_0 je permeabilita vakua, N je počet závitů a I je proud procházející vinutím cívky [8].

$$f = \left(\frac{2 \cdot m \cdot v}{(e \cdot \mu_0 \cdot N \cdot I)} \right)^2 \cdot l \quad (5)$$

Elektron při vstupu do magnetického pole čočky nabude azimutální rychlost podle rovnice (6) a při jeho výstupu bude mít opět nulovou azimutální rychlost [8].

$$v_\phi = -\frac{e \cdot \mu_0}{2 \cdot m} \cdot \frac{r \cdot N \cdot I}{l} \quad (6)$$

Zaostřování magnetickými čočkami lze řešit obdobně jako u čoček elektromagnetických. Důležitým rozdílem mezi čočkami založenými na působení elektrického a magnetického pole je, že elektron po průchodu elektrickým polem získá kromě radiálního přírůstku rychlosti také axiální přírůstek rychlosti. Naproti tomu elektron po průchodu magnetickým polem získá pouze přírůstek radiální rychlosti, změnou oproti poli elektrickému je, že elektron se pohybuje uvnitř čočky po šroubovité dráze. Konstrukčně jsou jednodušší čočky elektrostatické a magnetické, protože vinutí

elektromagnetických čoček musí být chlazeno např. vodou, to však umožňuje sestavit čočku s relativně větší optickou mohutností.

Teoretickou rozlišovací schopnost elektron-optické soustavy lze vypočítat Abbeho rovnicí (1), kde bude hodnota indexu lomu prostředí před objektivovou čočkou $n = 1$ (vakuum). Dalším rozdílem oproti světelným mikroskopům je vlnová délka elektronů primárního svazku závisující na urychlovacím napětí U – Tabulka 1 (od energie 100 keV je nutné počítat s relativistickým efektem λ_{rel} , v_{rel}) a úhlová apertura objektivu pohybující se v řádech $10^{-2} - 10^{-3}$ rad [6].

Tabulka 1: Závislost vlnové délky a rychlosti elektronu na urychlovacím napětí [9]

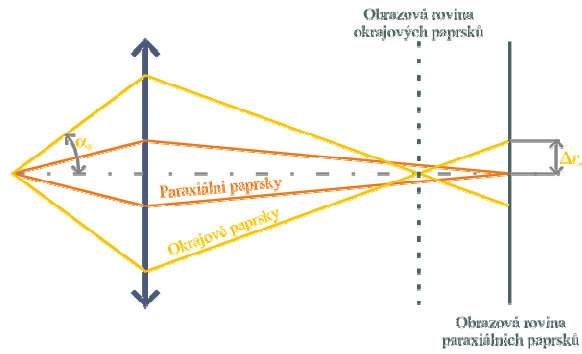
U [kV]	0,15	0,25	0,5	1	5	10	15	30	100	200
λ [pm]	100,15	77,58	54,86	38,79	17,35	12,27	10,02	7,08	3,88	2,74
λ_{rel} [pm]	100,15	77,57	54,84	38,77	17,31	12,21	9,94	6,98	3,7	2,51
$v \times 10^8$ [ms^{-1}]	0,07	0,09	0,13	0,19	0,42	0,59	0,73	1,03	1,88	2,65
$v_{rel} \times 10^8$ [ms^{-1}]	0,07	0,09	0,13	0,19	0,42	0,58	0,71	0,98	1,64	2,09

Relativně malé hodnoty úhlové apertury jsou dány řešením optimální velikosti rozptylového kroužku δ_{sf} způsobeného sférickou vadou (konstanta sférické vady C_{sf}) objektivu – rovnice (7) a rozptylového kroužku d způsobeného difrakcí – rovnice (1) [6].

$$\delta_{sf} = C_{sf} \cdot \alpha^3 \quad (7)$$

Sférická vada

Sférická vada vytváří rozptylový kroužek Δr_{sf} tak, že elektrony pohybující se dále od paraxiální dráhy jsou zaostřovány do kratší ohniskové vzdálenosti, než elektrony pohybující se blíže paraxiální dráze (Obr. 5).



Obr. 5: Sférická vada [8][9]

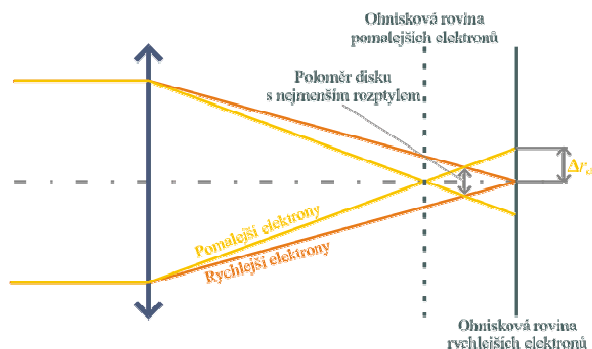
Z tabulky - Tabulka 2 je patrná změna rozlišovací schopnosti d optické soustavy v závislosti na urychlovacím napětí U a jemu přizpůsobené úhlové apertuře α_{opt} při konstantě sférické vady $C_{sf} = 4 \text{ mm}$ [9].

Tabulka 2: Teoretická rozlišovací schopnost při různých urychlovacích napětích [9]

U	0,15	0,25	0,5	1	5	10	15	30	100	200
λ	100,15	77,58	54,86	38,79	17,35	12,27	10,02	7,08	3,7	2,51
$\alpha_{opt} \times 10^{-2}$	1,42	1,33	1,22	1,12	0,92	0,84	0,8	0,73	6,23	5,65
d [nm]	4,46	3,68	2,84	2,19	1,2	0,92	0,79	0,61	0,38	0,28

Chromatická vada

Teoretická rozlišovací schopnost může být dále snižována chromatickou vadou, která je způsobena rozdílnými energiemi elektronů primárního svazku (nekoherentností). Chromatická vada vytváří rozptylový kroužek Δr_{chr} tak, že elektrony s nižší energií jsou zaostřovány do kratší ohniskové vzdálenosti, než elektrony s vyšší energií [6] – Obr. 6.



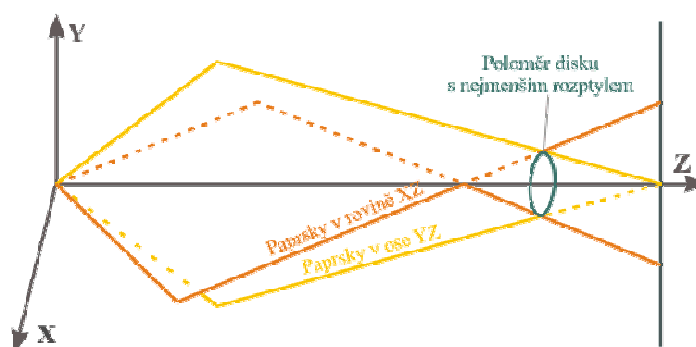
Obr. 6: Chromatická vada [8][9]

Příčiny vzniku chromatické vady jsou v kolísání urychlovacího napětí, rozdílné rychlosti elektronů opouštějících povrch katody a v Coulombovských interakcích mezi elektrony procházejícími křižiskem katody [6].

Osový astigmatismus

Osový astigmatismus též snižuje rozlišovací schopnost elektronového mikroskopu, avšak lze jej zcela kompenzovat stigmátory. Způsobuje jej nehomogenita a osová nesymetrie čočky. Čočka má pak různé ohniskové vzdálenosti ve dvou na sebe kolmých osách. Osový astigmatismus může také způsobovat lokální bodový náboj tvořený například usazenými nevodivými nečistotami v tubusu mikroskopu [6].

Na Obr. 7 je znázorněn vznik rozptylového disku způsobeného osovým astigmatismem elektronové čočky.



Obr. 7: Osový astigmatismus [8][9]

2.2.4 Elektronové trysky

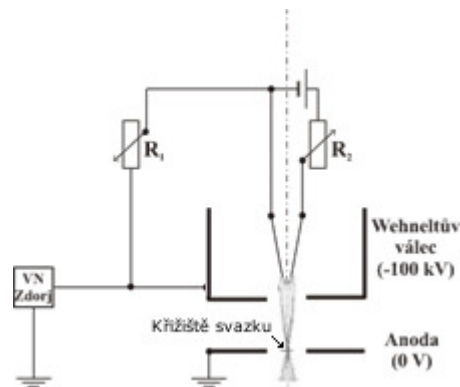
Elektronová tryska je zdrojem svazku primárních elektronů. Emise primárních elektronů nastane, když elektrony překonají výstupní práci kovu ϕ . Za tímto účelem se užívají dva krajní způsoby emise - termoemise a autoemise. Emise elektronových trysek je hodnocena úhlovou aperturou svazku α a proudovou hustotou emisního proudu j [6].

Termoemise

Hustota termoemisního proudu j_T je popsána Richardson-Dushmanovou rovnicí (8), kde A je materiálová konstanta, T je teplota katody a k Boltzmannova konstanta (pro polykrystalický wolfram $A = 6 \times 10^{-5} \text{ Am}^{-2}$, $\phi = 4,5 \text{ eV}$) [8].

$$j_T = A \cdot T^2 \cdot e^{-\frac{\phi}{k \cdot T}} \quad (8)$$

Elektrony jsou emitovány z povrchu katody do vakua poté, co jejich energie v důsledku tepelného působení vzrostla nad energetickou úroveň volných elektronů ve vakuu. Dále jsou elektrony odsáty a urychleny elektrickým polem působícím mezi anodou a katodou. Urychlovací napětí je obvykle zapojeno tak, aby nulový zemnicí potenciál byl na anodě a na katodu je přivedeno záporné předpětí. Mezi anodu a katodu je vložen Wehneltův válec, který je vůči katodě na ještě zápornějším potenciálu (Obr. 8). Wehneltův válec funguje jako filtr zadržující elektrony s nízkou energií a je zároveň elektrostatickou čočkou vytvářející první křížiště primárního svazku elektronů [8][9].



Obr. 8: Zapojení katody [9]

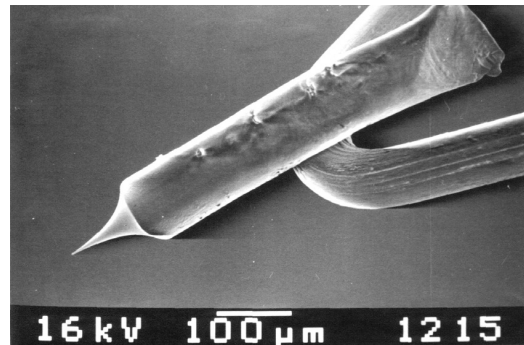
Provozní teplota wolframové termoemisní katody se pohybuje okolo 2700 K, kdy rozdělení intenzity proudu ve svazku má tvar Gaussovy křivky. Zaostřením kulatého hrotu katody dojde ke zvýšení gradientu elektrostatického pole v oblasti hrotu a ke snížení výstupní práce kovu [8][9]. Pak je možné při zachování proudové hustoty svazku snížit provozní teplotu a tím prodloužit životnost katody.

Autoemise

Pokud se gradient elektrického pole zvýší nad $10.000.000 \text{ Vmm}^{-1}$, lze dosáhnout emise elektronů již za teplot 300 – 1800 K. To vyžaduje, aby měl hrot katody submikrometrový poloměr (Obr. 9) [10]. Hustota autoemisního proudu j_A je popsána Fowlerovo-Nordheimovo rovnicí (9), kde E je intenzita elektrického pole na povrchu katody a k_1, k_2 jsou konstanty [8].

$$j_A = \frac{k_1 \cdot E^2}{\varphi} \cdot e^{-\frac{k_2 \cdot \varphi^{\frac{3}{2}}}{T}} \quad (9)$$

Výstupní práce kovu φ monokrystalického wolframu je 4,2 – 4,6 eV (liší se uspořádáním krystalové mřížky) a u wolframu aktivovaného zirkoniem a kyslíkem je 2,4 eV [8]. Jak je výše uvedeno katody lze provozovat již za pokojových teplot, tím ale dochází k sorpci zbytkových plynů na povrch katody mající za následek zhoršení emisního proudu j_A . Tento problém se odstraní odplyněním katody krátkým ohřevem [11]. Autoemisní katody nemají Wheneltův válec ale extrakční elektrodu.



Obr. 9: Detail hrotu autoemisní trysky [10]

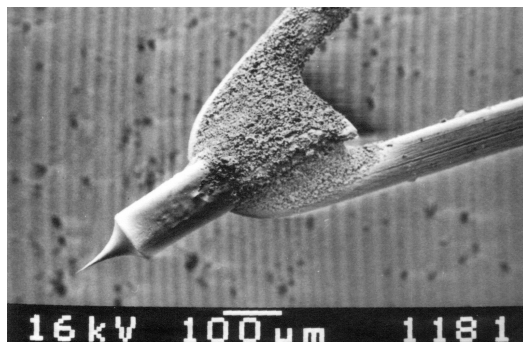
Trysky s emiterem LaB₆

Výstupní práce těchto trysek je $\varphi = 2,2$ eV, provozní podmínky jsou na pomezí termoemise a autoemise. Pracovní teplota je okolo 1800 K a velikost hrotu krystalu LaB₆ bývá 1 – 10 μm [8]. Tyto katody mají blíže k termoemisním katodám, což dokládá i fakt, že je lze poměrně snadno vyměnit za klasické žhavené termoemisní katody.

Termoautoemisní aktivované katody

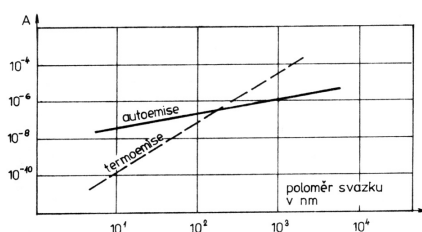
Tyto katody mají blíže k autoemisním katodám, ale pracují při teplotě, kdy se začíná projevovat vliv termoemise. Aktivace spočívá v pokrytí povrchu katody atomární vrstvou jiného prvku, který důsledkem vzniklé vazby sníží výstupní práci kovu φ . Provozní teplota bývá 1200 – 1800 K. Pro aktivaci je používán kyslík nebo zirkonium s kyslíkem. Technické řešení termoautoemisní trysky je na Obr. 10

– k wolframové vlásence je uchycen monokrystal wolframového hrotu a na protější konec je nakápnuto zirkonium, které difunduje k povrchu hrotu. Pokud se vyčerpá zásoba zirkonia je životnost katody u konce.



Obr. 10: Termoautoemisní tryska [10]

V grafu (Obr. 11) je zakreslena závislost proudu svazku na jeho poloměru pro daný typ katody. Obecně lze říci, že autoemisní trysky jsou vhodnější pro aplikace vyžadující malý poloměr svazku s velkým proudem a termoemisní pro velké poloměry svazku s velkým proudem [10].



Obr. 11: Závislost proudu svazku na jeho poloměru [10]

Tabulka 3 ukazuje parametry výše zmíněných elektronových trysek, kde odshora dolů roste cena trysek. Pro většinu aplikací nabízejí nejlepší parametry trysky termoautoemisní a autoemisní, ale vyžadují pro svůj provoz ultravakuum.

Tabulka 3: Parametry elektronových trysek [12]

Typ trysky	Proudová hustota [Am ⁻²]	Proud svazku Ø 1 nm [pA]	Maximální proud [nA]	Energetický rozptyl [eV]	Pracovní Teplota [K]	Pracovní tlak [Pa]	Životnost [hod.]
Termoemisní	10 ⁵	0,1	10 ³	1 – 3	2700	10 ⁻³	60 – 200
LaB ₆	10 ⁶	1	10 ³	0,5 – 2	2000	10 ⁻⁴	1000
Termoautoemisní	10 ⁸	10 ²	>200	0,4 – 0,6	1800	10 ⁻⁶	>2000
Autoemisní	10 ¹⁰	10 ³	10 – 20	0,2 – 0,4	300	10 ⁻⁸	>2000

2.2.5 Vakuová technika

Jak bylo již zmíněno, pro funkci elektronové optiky je uvnitř tubusu nutné vakuum, které musí být minimálně tak velké, aby střední volná dráha elektronu byla větší než největší vnitřní rozměr tubusu [4]. Nerozptýleného elektronového svazku lze dosáhnout již při tlaku menším než 10^{-1} Pa [4] a při tlaku 10^{-4} Pa je střední volná dráha elektronu 50m [13], takže podmínky limitující velikost vakua určuje použitá katoda viz. Tabulka 3.

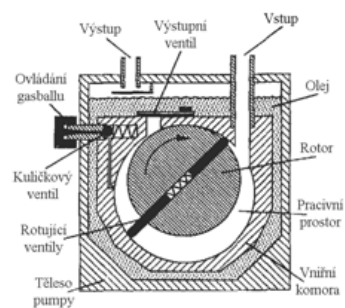
Vakuová aparatura je obvykle vícestupňová. V prvním stupni jsou vývěvy pracující na principu opakovaného mechanického zvětšování a zmenšování pracovního prostoru – rotační vývěva (Obr. 12a), membránová vývěva. Jejich mezní tlak se pohybuje okolo 10^{-1} Pa [4][14]. Rotační vývěva pracuje v olejové lázni, vakuum je tedy znečištěno olejovými parami. Naproti tomu membránové vývěvy nevnaší do vakua žádné páry, ale mají nižší čerpací rychlost.

Vývěvy v druhém stupni jsou předčerpávány vývěvami prvního stupně. Nejpoužívanější je difusní vývěva (Obr. 12b), kde jsou molekuly strhávány proudem olejových par do nichž difundují a jsou unášeny k výstupu. Tato vývěva vnaší do vakua olejové páry, proto je výhodné ji v prvním stupni předčerpávat rotační vývěvou. Mezní tlak se pohybuje okolo 10^{-4} Pa [4][14].

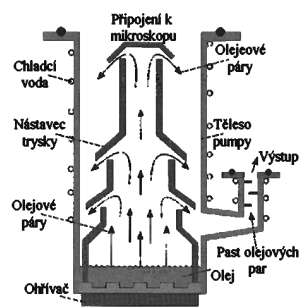
Další často využívanou vývěvou je turbomolekulární vývěva (Obr. 12c) uvnitř které je turbína otáčející se rychlostí 20.000 – 50.000 otáček za minutu. Molekula po srážce s rotorem dostává impuls v požadovaném směru čerpání. Mezní tlak se pohybuje okolo 10^{-6} Pa [4][14].

Ve třetím stupni jsou nejčastěji používány iontové vývěvy (Obr. 12d) pracující na principu ionizace zbytkového plynu tvořeného srážkami s elektrony, které jsou emitovány z katody. Pro zvýšení pravděpodobnosti srážky rotují elektrony v magnetickém poli po spirále. Ionty jsou kladně nabitě a dopadají na titanovou katodu, z které vyrážejí atomy titanu. Ty dopadem na elektrody chemicky fixují adsorbované atomy [4][14].

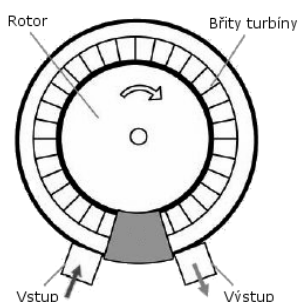
a)



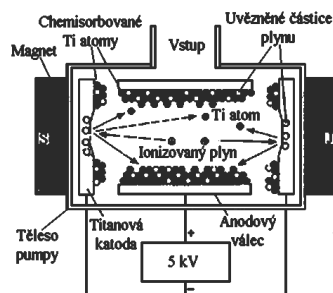
b)



c)



d)



Obr. 12: Vývěvy - a) rotační, b) difusní, c) turbomolekulární, d) iontová [4][14][15]

2.2.6 Elektronový rozptyl

Elektronový rozptyl lze primárně dělit na elastický při němž nedochází ke ztrátám energie elektronu, nebo neelastický kdy dochází ke ztrátám energie. Dále může být rozptyl jednoduchý nebo vícenásobný, dopředný nebo zpětný (více než 90°) a koherentní či nekoherentní (pružný rozptyl je koherentní v určitém rozsahu hodnot). Fyzikálně je popsán elektronový rozptyl pomocí účinných průřezů [4][9].

Účinný průřez jako plocha – jedné částice

Pro určitý rozptylový proces se definuje účinný průřez σ jako efektivní plocha πr^2 rozptylového centra vyjadřující celkovou pravděpodobnost výskytu dané srážkové události (10), uvažována je srážka s jedinou částicí. Lze vyjádřit totální účinný průřez σ_T jako součet elastického σ_{elst} a neelastického $\sigma_{neelast}$ účinného průřezu [4][9].

$$\sigma = \pi \cdot r^2 \quad (10)$$

Účinný průřez jako tloušťka

Místo jedné částice je uvažován materiál hustoty ρ v němž je N atomů a totální účinný průřez Q_T udává počet všech rozptylových událostí (pružné i nepružné) na jednotku vzdálenosti – rovnice (11), kde N_0 je Avogadrova konstanta a A je atomová hmotnost dané látky. Reciproká hodnota účinného průřezu Q_T je střední volná dráha λ . Pravděpodobnost srážky je $p = Q_t \cdot t$, kde t je tloušťka vzorku [4][9].

$$Q_T = N \cdot \sigma_T = \frac{N_0 \cdot \rho \cdot \sigma_T}{A} \quad (11)$$

Diferenciální účinný průřez

Diferenciální účinný průřez $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ popisuje rozdělení rozptylu elektronů do prostorového úhlu $d\Omega$ – rovnice (12), kde θ je úhel rozptylu do prostorového úhlu Ω [4].

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{1}{2\pi \cdot \sin\theta} \cdot \frac{d\sigma}{d\theta} \quad (12)$$

2.3 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Princip funkce TEM je znázorněn v levé části Obr. 2. Elektronovou tryskou je produkován svazek primárních elektronů, které mají energii danou velikostí urychlovacího napětí mezi anodou a katodou. Primární svazek elektronů je zaostřován kondenzorem tak, aby osvítil požadovanou plochu řezu (předmětu) s určitou proudovou hustotou. Dále elektrony procházejí řezem, jehož tloušťka musí být úměrná energii elektronů primárního svazku (pro $E_0 = 100$ keV je tloušťka ~ 100 nm). Interakcemi svazku s hmotou dochází k rozptylu elektronů a ke vzniku kontrastu obrazu. Část rozptýlených elektronů je absorbována objektivovou clonou a zbylá část prochází objektivovou čočkou. Ta svazek primárních elektronů, nyní nesoucí obrazovou informaci, zaostřuje za účelem zvětšení a obdobně se děje při průchodu svazku projekтивem. Poté dopadá svazek primárních elektronů na stínítko, nebo CCD kameru, kde je transformován na zpracovatelný obraz. Je možno pozorovat zvětšený obraz předmětu ve standardním módu světlého pole (výše popsany princip), v tmavém poli

– zobrazení se účastní pouze rozptýlené elektrony a v difrakčním módu, kdy je elektronová optika přestřena tak, aby se zobrazovaly difraktované svazky od atomů krystalického předmětu dle Braggovy difrakce (15).

2.3.1 Elektronová tryska

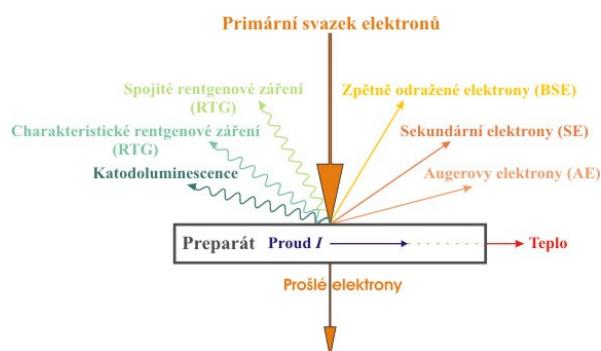
Urychlovací napětí mezi anodou a katodou je jeden ze základních parametrů TEM, neboť na základě Abbeho rovnice (1) je dána teoretická rozlišovací schopnost TEM. TEM pro rutinní použití má obvykle hodnotu urychlovacího napětí 100 kV. Výběr trysky je dán kombinací mnoha parametrů, přičemž pro rutinní použití jsou výhodnější termoemisioní katody, neboť jsou schopny dosáhnout při větších poloměrech svazku $\sim \mu\text{m}$ většího proudu [10], alternativou s delší životností je LaB_6 a pro maximální koherentnost svazku se volí autoemisioní tryska.

2.3.2 Kondenzor

Kondenzor soustřeďuje elektrony do křižáku, které je možno zobrazit v různé vzdálenosti od předmětové roviny. Pro její velikost je rozhodující průměr osvětlené plochy předmětu vyplývající z aktuálního zvětšení a z velikosti zorného pole. Volba emisního proudu svazku je dána intenzitou obrazu a citlivostí předmětu na radiační poškození, také za tímto účelem je zde kondenzorová clona. Pro dosažení lepších parametrů se užívá dvojitý kondenzor [6].

2.3.3 Předmět

Výsledkem interakce primárního svazku elektronů se hmotou je některý ze signálů naznačených na Obr. 13. Signály na Obr. 13 znázorněné nad preparátem se nevyužívají k tvorbě obrazu v TEM [9].

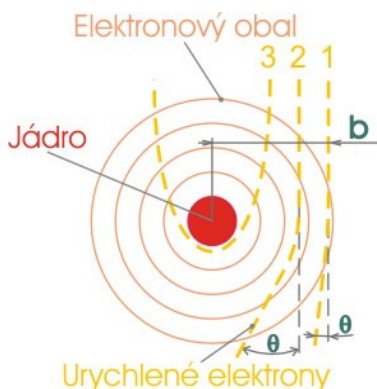


Obr. 13: Možné signály vzniklé interakcí primárních elektronů se hmotou [4][9]

Pro tvorbu obrazu je důležitý signál prošlých elektronů, který se podílí na tvorbě kontrastu obrazu (tj. podíl nebo rozdíl jasů mezi pozadím a nejsvětlejším místem v obrazu) čtyřmi základními mechanismy:

1. Amplitudový kontrast

Vzniká elastickým rozptylem elektronů Coulombovskými silami naznačenými na Obr. 14. Úhel odklonu od přímé dráhy pohybu je tím větší, čím blíže jádru atomu se elektron pohybuje. Elektron pohybující se po dráze 1 na Obr. 14 je rozptylován převážně elektrony v obalu atomu, které zároveň odstiňují náboj jádra atomu. Elektrony pohybující se po dráze 2 a 3 začínají být na základě zmenšující se náměrné vzdálenosti b stále více ovlivňovány jádrem atomu. Proto lze amplitudový kontrast vzniklý elastickými srážkami dělit na [4][9]:



Obr. 14: Rozptyl elektronů na atomu [9]

a. Elastický rozptyl způsobený elektronovým obalem atomu

Na základě této interakce dochází k rozptylu elektronů primárního svazku do úhlů $0 - 5^\circ$. Ze vztahu (13) je patrné, že celková pravděpodobnost srážky σ_e primárního elektronu s elektronem v obalu atomu je funkcí urychlovacího napětí U (ϵ_0 je permitivita vakua a r_e je efektivní poloměr elektronu) [4][9].

$$\sigma_e = \pi \cdot r_e^2 \sim \pi \cdot \left(\frac{e}{U \cdot \theta \cdot \epsilon_0} \right)^2 \quad (13)$$

b. Elastický rozptyl způsobený jádrem atomu

Na základě této interakce dochází k rozptylu elektronů primárního svazku do úhlů větších než 5° . Ze vztahu (14) je patrné, že celková pravděpodobnost srážky σ_j primárního elektronu s jádrem atomu je funkcí $\left(\frac{Z}{U}\right)^2$ (r_j efektivní poloměr jádra) [4][9].

$$\sigma_j = \pi \cdot r_j^2 \sim \pi \cdot \left(\frac{Z \cdot e}{U \cdot \theta \cdot \epsilon_0} \right)^2 \quad (14)$$

Pro rutinní TEM ($E_0 = 100$ keV) je kontrast biologických preparátů natolik malý, že vlastní struktura musí být zvýrazněna kontrastováním pomocí prvků s vyšším atomovým číslem (uran ve formě uranil acetátu, osmium ve formě oxidu osmičelého).

2. Fázový kontrast

Fázový kontrast je způsoben superpozicí elektronové vlny na obrazové rovině, jenž je výsledkem interferenčních jevů primárního svazku elektronů představujícího rovinnou vlnu. Je závislý na rozostření, sférické aberaci, úhlové apertuře objektivu a na podmínkách osvětlení preparátu. Fázový kontrast způsobuje komplexní rozptylová amplituda atomu, která vytváří fázový posun (pro atomy s nízkým atomovým číslem je pro energii primárních elektronu 100 keV tento vliv zanedbatelný). Fázový kontrast se projeví v obraze, pokud dojde k fázovému posuvu mezi rovinou vlnou primárního svazku elektronů vůči rozptylové vlně většímu než $\frac{\pi}{2}$. Rozlišujeme pozitivní a negativní fázový kontrast, který lze v obraze pozorovat jako Fresnelovy kroužky při rozostření obrazu [16]. Fázový kontrast způsobuje zhoršení rozlišovací schopnosti při zobrazování v amplitudovém kontrastu.

3. Pružný kolektivní rozptyl – difrakce

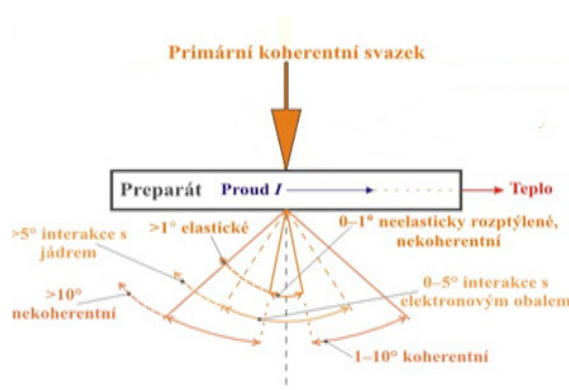
Při tomto rozptylu svazek primárních elektronů představující rovinnou vlnu interaguje s rozptylovým centrem, kolem kterého vzniká kulová rozptylová vlna. Tato vlna pak interferuje s původní rovinnou vlnou a v určitých směrech vznikají

difrakční vlny vyšších řádů. Difrakci lze zjednodušeně popsat Braggovým zákonem (15) [4][9].

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (15)$$

4. Nepružný rozptyl

K nepružnému rozptylu dochází vlivem srážek s elektrony v obalu atomu. Výsledkem je vždy ztráta energie primárního elektronu. Pokud dojde k transmisi elektronu vzorkem, je tento elektron rozptýlen do úhlu menšího než 1° – tím zhoršuje rozlišení amplitudového obrazu. Dále může nastat zpětný rozptyl nebo elektronový záchyt způsobující tok proudu, jenž bude převeden na Jouleovo teplo a další signály nepodílející se na amplitudovém kontrastu TEM naznačené v horní části Obr. 13 [4]. Úhlové rozdělení všech typů rozptylů transmisičních elektronů je znázorněno na Obr. 15.



Obr. 15: Úhlové rozdělení prošlých elektronů [9]

2.3.4 **Objektiv**

Na parametrech objektivu nejvíce závisí rozlišovací schopnost TEM. Pokud je objektiv tvořen čočkou s proměnným ohniskem, pak s klesající ohniskovou vzdáleností se zmenšuje velikost sférické vady C_s . K objektivu je přidružena objektivová clona na níž dochází k záchytu pružně rozptýlených elektronů. Změnou průměru objektivové clony lze zmenšit velikost radiačního poškození vzorku, tím se také sníží jas obrazu a vzroste kontrast obrazu, neboť obraz je tvořen nedopadnutím elektronů na stínítko [6][9].

2.3.5 Projektiv

Projektiv má za úkol dosáhnout požadovaného zvětšení v celém jeho rozsahu, neboť ostatní čočky mají obvykle nastavenou pevnou hodnotu zvětšení. Velikost minimálního zvětšení bývá omezena, protože při něm dochází vlivem sférické vady ke zkreslení. Pro dosažení vyšší kvality se používají dva projektivy [6][9].

2.3.6 Stínítko

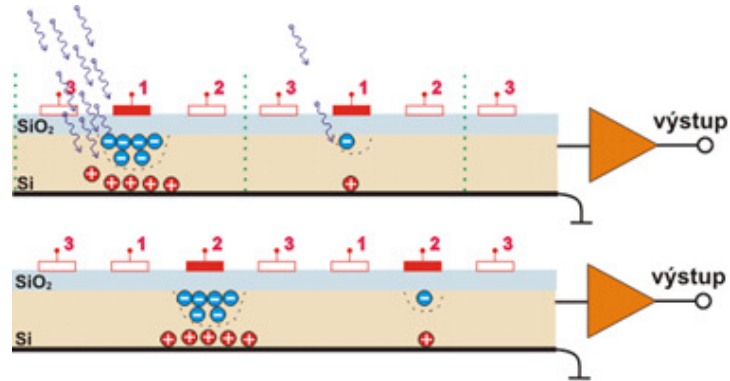
K přímému pozorování se využívá luminiscenčních materiálů přeměňujících pohybuující se elektrony na fotony, ty se nanášejí ve formě prášku (velikost zrna určuje rozlišení) na kovovou podložku do vrstvy, jejíž efektivní tloušťka je dána energií primárních elektronů [6].

2.3.7 Kamera

Pro elektronovou mikroskopii lze k záznamu obrazu použít fotografické techniky ve formě planfilmů. Jejich výhodou je zatím stále největší rozlišovací schopnost z dostupných záznamových technik. Nevýhodou je doba zhotovení snímku. Proto je téměř vytlačily CCD (Charge Couple Device) kamery pracující na principu fotoefektu [9]. Pro elektronovou mikroskopii jsou CCD snímače spojeny se scintilátory převádějící signál primárních elektronů na světelný, ten je usměrněn na povrch CCD čipu pomocí optických vláken bezztrátově, nebo za cenu ztrát pomocí čočky umožňující větší flexibilitu. Dále se využívají chlazené pomalu skenující CCD kamery (Slow-scan CCD camera – SSC), čímž dochází ke snížení šumu [17].

CCD snímač pracuje tak, že se v první fázi odsaje veškerý náboj ze snímače (Obr. 16). V druhé fázi je přivedeno na elektrodu 1 kladné napětí a snímač se vystaví působení světla. Dopadající fotony vytvářejí v polovodiči páry elektron-díra. Elektrony jsou přitahovány k elektrodě 1, která je od polovodičové vrstvy oddělena nevodivě vrstvou SiO₂. Díry jsou přitahovány k záporné elektrodě, kde zelená tečkovaná čára znázorňuje hranice pixelu. Po ukončení expozice dochází ve třetí fázi ke sběru elektronů z jednotlivých pixelů. Sběr elektronů je prováděn snižováním napětí na elektrodě 1, vedle toho je na elektrodě 2 zvyšováno napětí, které elektrony přitahuje.

Tento proces se děje poté mezi elektrodou 2 a 3. Celý cyklus je opakován dokud nejsou odsáty elektrony ze všech pixelů. Elektrony vytváří na výstupu CCD snímače proud který je zesilován a dále zpracován pro digitální přenos [9].



Obr. 16: Vytváření a posun náboje v CCD snímači [18]

CCD snímač jako dvourozměrný detektor převádí reálný obraz na digitální, rozdíly mezi nimi popisují charakteristiky CCD snímače:

- *Střední hodnota zisku \bar{g}* : Je definována rovnicí (16), kde \bar{I} je střední hodnota výstupního (digitálního) signálu při homogenním osvětlení čipu, \bar{b} je průměrná hodnota pozadí měřená pro určitou expoziční dobu bez osvětlení a \bar{N}_e je průměrná elektronová dávka na pixel. Střední hodnota zisku je výsledkem účinnosti scintilátoru, optického vedení na CCD čip a citlivosti CCD čipu [17].

$$\bar{g} = \frac{\bar{I} - \bar{b}}{\bar{N}_e} \quad (16)$$

- *Linearita*: Zisk by měl být lineární a neměl by se měnit s elektronovou dávkou dopadající na čip [17].
- *Homogenost $\gamma(n)$* : Je definována rovnicí (17) pro n -tý pixel snímače a určuje variace signálu mezi pixely při homogenním osvětlení [17].

$$\gamma(n) = \frac{\bar{I}(n) - \bar{b}(n)}{\bar{N}_e \cdot \bar{g}} \quad (17)$$

- *Dynamický rozsah R*: vyjadřuje rozsah signálů, které může zaznamenat detektor, neboli signály jenž jsou měřitelné. Standardně se používá pro vědecké CCD kamery rovnice (18), kde \bar{I}_{\max} je největší hodnota zaznamenaného signálu detektorem a σ_b je čtecí šum čipu [17].

$$R = 20 \cdot \log_{10} \left(\frac{\bar{I}_{\max}}{\sigma_b} \right) \quad (18)$$

- *Detekční kvantová účinnost (DQE)*: Je vždy menší než 1 nebo pro ideální detektory rovna 1, takový detektor nevnáší do signálu žádný šum. Vypočítává se z poměrů signálu S k šumu N (SNR) pro vstupní a výstupní signály – rovnice (19) [17]. Pomocí DQE lze hodnotit celý optický systém i jednotlivé části (scintilátor, převodní čočka)

$$DQE = \frac{SNR_{\text{výstupní}}^2}{SNR_{\text{vstupní}}^2} = \frac{\left(\frac{S}{N} \right)_{\text{výstupní}}^2}{\left(\frac{S}{N} \right)_{\text{vstupní}}^2} \quad (19)$$

- *Modulační přenosová funkce MTF*: Rozlišení detektoru není dáno jednoduše pouze velikostí pixelu, ale bodovou rozptylovou funkcí (PSF), která koresponduje se zobrazováním bodového objektu menšího než velikost pixelu. Pro PSF s rotační symetrií je spíše používána modulační přenosová funkce (MTF) [17]. MTF vyjadřuje změnu přenosu jasu (druhá mocnina amplitudy) v závislosti na frekvenci. MTF lze vyjádřit pro elektronový mikroskop jako celek součtem MTF jednotlivých podskupin ($MTF = MTF_{\text{mikroskopu}} + MTF_{\text{CCD kamery}}$) [19].

2.4 Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

Princip funkce je znázorněn v pravé části Obr. 2. V elektronové trysce vzniká svazek primárních elektronů, jejichž energie je určena velikostí urychlovacího napětí, které je pro SEM do 30 kV. Primární svazek elektronů je zaostřen kondenzorem tak, aby měl požadovaný průměr křížiště s požadovanou proudovou hustotou.

Dále je svazek primárních elektronů zaostřen objektivem na povrch preparátu po němž skenuje pozorovanou plochu pomocí vychylovacích cívek. Povrch preparátu musí být z důvodu odvodu náboje vodivý. Interakcí svazku primárních elektronů se hmotou preparátu vznikají signály v nichž je zakomponována obrazová informace. Nejobvykleji užívaným signálem ve zobrazování jsou sekundární elektrony (SE) nesoucí topografický kontrast, které se detekují pomocí detektoru SE a jsou převáděny na obrazový signál, jenž lze zaznamenat nebo přímo zobrazit na obrazovce. Obdobně se zpracovávají i další signály v SEM.

2.4.1 Elektronová tryska

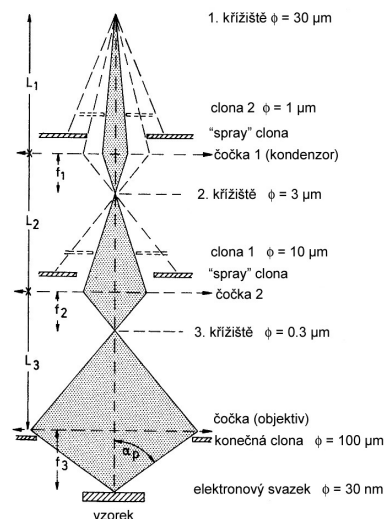
Pro SEM je urychlovací napětí, podobně jako v TEM, jedním ze základních parametrů, protože ovlivňuje rozlišovací schopnost SEM, která je dána především průměrem dopadajícího svazku primárních elektronů a energií elektronů ovlivňující velikost interakčního objemu. Výběr katody je dán mnoha parametry, přičemž pro dosažení maximální rozlišovací schopnosti je kladen důraz na minimální energetický rozptyl svazku primárních elektronů a proud svazku pro jeho určitý průměr. Cílem je dosáhnout co nejmenšího průměru svazku. Tyto parametry nejlépe splňují autoemisní trysky viz. Tabulka 3 a Obr. 11 [21].

2.4.2 Kondenzor

Kondenzor soustřeďuje elektrony do křížiče požadovaných rozměrů (primární je zmenšit průměr křížiče) s požadovaným proudem svazku. Obr. 17 zobrazuje paprskovým diagramem elektron optické soustavy postupné zmenšování průměru křížiče, první čočka je kondenzor. Pro všechny čočky platí vztah (20) pro zmenšení M na základě ohniskové vzdálenosti f a předmětové vzdálenosti L_n .

$$M = \frac{f}{L_n} \quad (20)$$

Pro zvýšení koherence svazku je kondenzor vybaven kondenzorovou clonou. Změnou průměru clony lze docílit vyšší koherence svazku a menšího radiačního poškození vzorku.



Obr. 17: Paprskový diagram elektronově optické soustavy SEM [20]

2.4.3 Vychylovací cívky

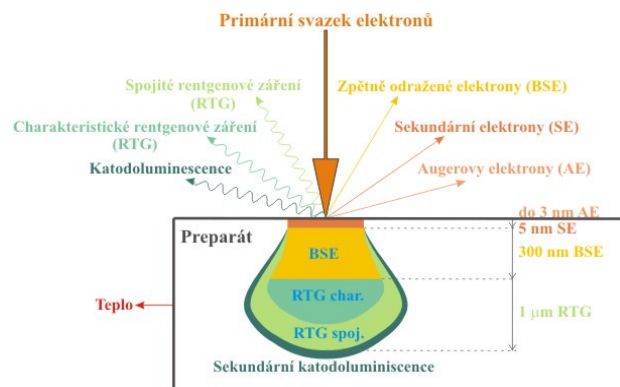
Svazek primárních elektronů je vychylován ve dvou na sebe kolmých osách, kde pro každou osu je použita dvojice cívek, tím se snižují optické vady ve zobrazení. Skenování po povrchu preparátu se děje po řádkách, čehož se dosahuje napájením vychylovacích cívek ze zdroje pilového napětí. Frekvence pilového napětí v řádkovém kmitočtu je vyšší než frekvence snímkového kmitočtu. Signál budící vychylovací cívky také synchronizuje tvorbu obrazu ve zobrazovací jednotce [7][9].

2.4.4 Objektiv

Na vlastnostech objektivu je závislá maximální dosažitelná rozlišovací schopnost SEM. Omezení rozlišovací schopnosti je dáno především velikostí sférické vady, která určuje minimální možný průměr křížiště. Sférická vada klesá se zmenšující se ohniskovou vzdáleností objektivové čočky a maximální úhlovou aperturou objektivu danou průměrem objektivové clony (Obr. 17). Objektiv má také za úkol zaostřit svazek primárních elektronů do roviny povrchu preparátu po němž svazek primárních elektronů skenuje. Pak lze maximální rozlišovací schopnosti SEM dosáhnout pokud bude preparát co nejbližší objektivu, kdy lze vytvořit minimální průměru křížiště. Umístěním detektoru sekundárních elektronů do vnitřního prostoru objektivu lze docílit minimální ohniskové vzdálenosti objektivu, elektrony se pohybují v magnetickém poli čočky směrem k detektoru po spirále [7][9][11].

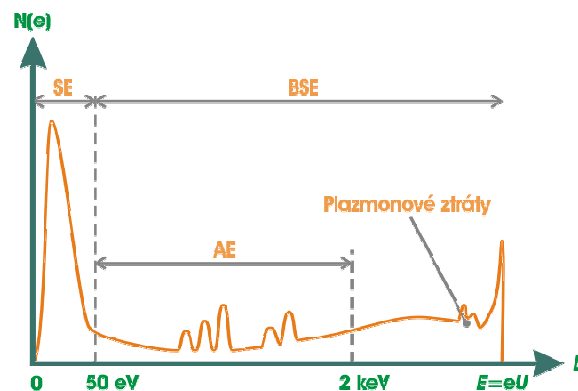
2.4.5 Předmět

Výsledkem interakce primárního svazku elektronů se hmotou je některý ze signálů znázorněných v horní části Obr. 18. Uvnitř preparátu je dále naznačen interakční objem (pro určitou velikost energie primárních elektronů), z něhož tyto signály unikají. Interakční objem se zmenšuje s energií primárního svazku elektronů. Proti tomu se od určité meze zvětšuje průměr primárního svazku elektronů v závislosti na snižující se energii – dáno Abbeho rovnicí (1) [4][7].



Obr. 18: Interakční objem a vznikající signály v SEM [4][7][9]

Obr. 19 naznačuje počet elektronů opouštějící vzorek v určitém rozsahu energií, který odpovídá dané interakci. Sekundární elektrony (SE) mají energii do 50 eV oproti zpětně odraženým elektronům (BSE), které se mohou vyskytovat v rozsahu energií od 50 eV až po energii elektronů primárního svazku. Ke zpětnému odrazu může dojít i díky vícenásobným srážkám [4][7][9].



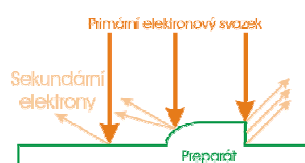
Obr. 19: Rozdělení elektronů podle energie [9][20]

1. Sekundární elektrony (SE)

Pravé SE vznikají nepružným rozptylem primárních elektronů s elektrony ve valenčním nebo vodivém pásu [4]. Velikost energie SE se pohybuje do 50 eV. Pro emisi SE se nepoužívá účinný průřez, protože není schopen pokrýt veškeré mechanismy produkce SE, proto se zavádí výnos δ podle vztahu Obr. 20, kde N_{SE} je počet sekundárních elektronů a N_E je počet primárních elektronů [7].

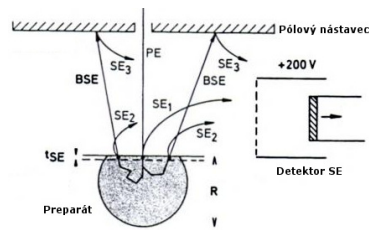
$$\delta = \frac{N_{SE}}{N_E} \quad (21)$$

Výnos SE δ se mění s energií primárních elektronů E_0 , ale střední energie SE zůstává stejná. Pravděpodobnost výskytu SE je nejvyšší při energii 5 eV a klesá k nule při hodnotách větších než 50 eV. Vliv výstupní práce kovu a vliv krystalové struktury látky, z níž SE unikají je minimální, v řádu jednotek procent. Největší vliv na množství excitovaných SE má úhel dopadu primárního svazku elektronů vůči normále k povrchu preparátu, tím vzniká topografický kontrast – Obr. 20 [7].



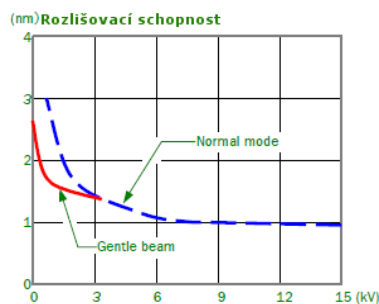
Obr. 20: Emise sekundárních elektronů [9]

Se změnou topografie povrchu se mění počet SE, který je ovlivněn ještě dalšími způsoby excitace SE naznačenými na Obr. 21. Kde SE_1 jsou pravé sekundární elektrony, SE_2 jsou sekundární elektrony excitované srážkou zpětně odražených elektronů v tenké povrchové vrstvě preparátu t_{SE} a SE_3 jsou sekundární elektrony excitované dopadem zpětně odražených elektronů na stěnu komory SEM. Dále je v pravé části Obr. 21 znázorněn detektor sekundárních elektronů s předpětím 200 V, jež je schopno odsát většinu SE, tím se stává prostorová distribuce SE méně podstatnou [4][12][22].



Obr. 21: Různé způsoby excitace SE [22]

Z pohledu maximální rozlišovací schopnosti jsou SE_2 a SE_3 rušivým signálem [23]. Vliv změny velikosti urychlovacího napětí na rozlišovací schopnost SEM JEOL JSM-7401F při normálním módu lze vidět na modré čárkované křivce (Obr. 22), červená křivka znázorňuje rozlišovací schopnost při módu jemného svazku. V tomto módu je na preparát přiložen záporný potenciál, který zpomaluje dopadající elektrony a navíc svým elektrostatickým polem zkracuje ohniskovou vzdálenost objektivu. Výhodou tohoto principu je také, že svazek primárních elektronů je zaostřován při vyšší energii do určitého průměru křížiče a až poté je zpomalen, navíc je tím sníženo radiační poškození a vliv prostorového náboje projevující se u nedostatečně pokoveného preparátu [11][20].



Obr. 22: Rozlišovací schopnost SEM pro dané urychlovací napětí [11]

2. Zpětně odražené elektrony (BSE)

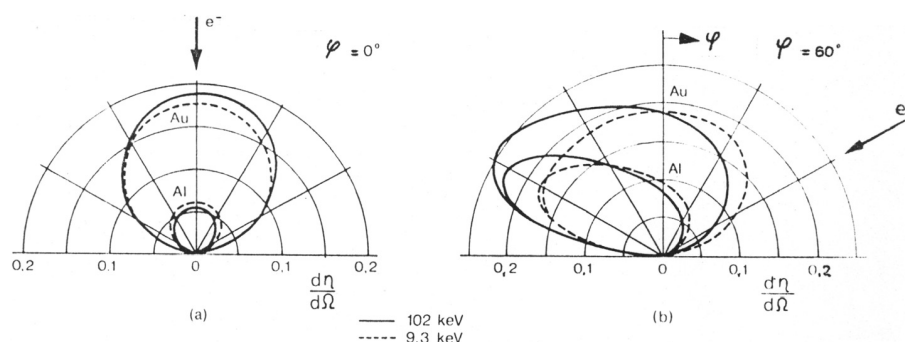
Signál BSE je dalším nejpoužívanějším signálem pro zobrazování v SEM. Zahrnuje v sobě topografický kontrast a materiálový kontrast. Obecně jsou BSE takové elektrony, jenž jsou rozptýleny do úhlu většího než 90° . To může nastat na základě pružného rozptylu jádrem jediného atomu, který lze popsat Rutherfordovým rozptylem (22), nebo na základě vícenásobných srážek. Pokud se elektron nachází ve vhodné vzdálenosti od povrchu a má dostatek energie, tak opouští preparát (ke ztrátě energie

dochází skrze nepružný rozptyl, ale i při pružném rozptylu elektron ztrácí část své energie – pružný rozptyl je uvažován v určitém rozmezí energií) [4][7].

$$\frac{d\sigma(\theta)}{d\Omega} = \frac{e^4 \cdot Z^2}{16 \cdot (4\pi\epsilon_0)^2 \cdot E_0^2 \cdot \sin^4 \frac{\theta}{2}} \quad (22)$$

kde: E_0 je energie primárních elektronů

Diferenciální účinný průřez $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ podle rovnice (22) popisuje pravděpodobnost s jakou bude elektron rozptýlen do prostorového úhlu $d\Omega$, která roste v závislosti na atomovém čísle Z . Proto BSE také zobrazují materiálový kontrast – čím je vyšší atomové číslo Z , tím lze detekovat více zpětně odražených elektronů [4]. Tuto skutečnost zobrazuje Obr. 23 jako velikost kružnice pro Au a pro Al, kde $\frac{d\eta}{d\Omega}$ je diferenciální účinný průřez, φ je úhel dopadu primárních elektronů [22][23].



Obr. 23: Graf uhlového rozdělení diferenciálního účinného průřezu [22]

Z Obr. 23 lze vidět prostorovou distribuci BSE, jenž je závislá na úhlu dopadu primárních elektronů. Základní umístění detektoru BSE je obvykle v horní části komory, připevněný k pólovým nástavcům objektivu, kde je schopen detekovat maximum BSE pro nulový úhel dopadu primárních elektronů vůči normále povrchu preparátu. Na detektoru není přiložen žádný potenciál, protože BSE mají relativně více energie oproti SE a pohybují se v prostoru preparátové komory přímočaře. Tím vzniká topografický kontrast pro BSE, jenž má opačnou závislost oproti SE. Detekované množství BSE s rostoucím úhlem dopadu primárního elektronů vůči normále k povrchu preparátu klesá. Podobně jako u SE existuje více způsobů excitace BSE – BSE₁ jsou

pružně zpětně odražené primární elektrony, BSE₂ jsou nepružně zpětně odražené primární elektrony, BSE₃ jsou elektrony odražené dopadem BSE₁ od komory SEM [23].

3. Charakteristické RTG a Augerovy elektrony

Pokud se primární elektron nepružně srazí s elektronem ve vnitřní vrstvě atomu a předá mu kinetickou energii větší než kritickou E_c (pro danou vrstvu K, L atd.), tak elektron opouští svoji energetickou vrstvu a zanechá po sobě díru. Ionizovaný atom je nyní v excitovaném stavu. Atom se může vrátit do základního stavu, v němž má nejnižší energii, zaplněním díry elektronem z některé vnější vrstvy. Elektron opouštějící vnější vrstvu a zaplňující díru má energii větší, než příslušná vrstva ve které díra je. Tato energie se buďto vyzáří jako charakteristické RTG záření, nebo se předá Augerovu elektronu. Oba signály jsou charakteristické pro daný atom [4][9].

Největší pravděpodobnost vzniku emise Augerových elektronů nastává u prvků s relativně malým atomovým číslem (uhlík, dusík, kyslík atd.). Augerovy elektrony unikají v malé vzdálenosti od povrchu preparátu (do 3 nm), tím je tato analýza velmi náročná na čistotu vakua a povrchu [4][9].

4. Brzdné RTG záření

Brzdné RTG záření vzniká, když je pronikající elektron natolik přiblížen k jádru atomu, že jádro elektron zpomaluje Coulombovskými silami. Zpomalení elektronu v elektrickém poli jádra může vyvolat souvislé RTG záření, jež může nabývat hodnot energie až o velikosti energie primárního svazku. Brzdné záření zhoršuje kvalitu analýzy charakteristického RTG záření [4][9].

5. Katodoluminiscence

Vzniká přechodem elektronu z valenčního pásu přes zakázaný do vodivého, kdy po tomto přechodu vyvolaného srážkou vznikne ve valenčním pásu díra. Následnou rekombinací elektronu dojde k vyzáření jeho přebytečné energie ve formě fotonu [4][9].

6. Plazmony

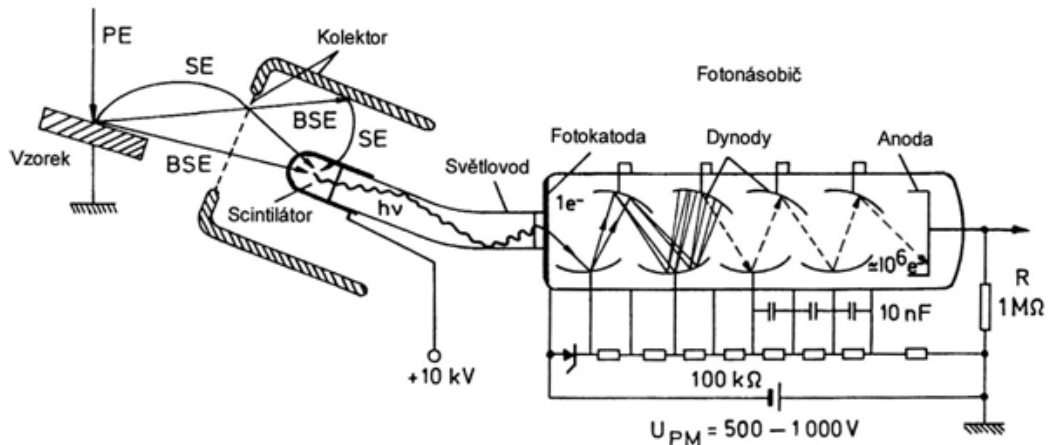
Plazmony jsou kolektivní oscilace volných elektronů, které nastanou, když primární svazek elektronů prochází preparátem a interaguje s elektronovým plynem tvořeným shlukem volných elektronů [4][9].

Předmět je uchycen v křížovém stolku, který umožňuje pohyb v ose X, Y, Z, rotaci kolem osy Z o 360° a náklon do 90° obvykle v ose Y. Translační pohyb se vzorkem je uskutečněn přesnými mikrometrickými posuvy s vůlí menší než 1μm, které mohou být mechanické nebo vybaveny elektromotorickým posuvem [7]. Poloha preparátu v ose Z určuje vzdálenost preparátu od objektivové čočky, a tím hloubku ostrosti h pro SEM podle vztahu (23), kde d je požadovaná rozlišovací schopnost a α je poloviční úhlová apertura svazku vystupujícího z objektivu. Hloubka ostrosti se tedy zvětšuje se vzdáleností preparátu od objektivu, neboť tím se zmenšuje úhlová apertura svazku.

$$h = \frac{d}{\alpha} \quad (23)$$

2.4.6 Detektor

Nejběžnějším detektorem SE je detektor podle Everharta a Thornleye (ET), kteří jej zkonstruovali. Detektor je složen dle Obr. 24 z kolektoru, na němž je přiložen kladný potenciál (200 – 400 V) odsávající SE, uvnitř kolektoru je scintilátor, na kterém je kladný potenciál 10 kV, jenž urychluje SE před dopadem na scintilátor. Ten je spojený se světlovodem, jímž se šíří foton vyvolaný nepružným rozptylem SE při dopadu na scintilátor. Dále následuje fotonásobič, kde foton fotoelektrickým jevem uvolní do vakua elektron, který je urychlován k první dynodě s kladným potenciálem. Dopadem elektronu na dynodu jsou vyráženy sekundární elektrony, které jsou urychleny k další dynodě, jenž má vyšší potenciál. Z poslední elektrody (anody) je přes oddělovací kondenzátor odebíráán detekovaný proud [9][23].



Obr. 24: Everhart-Thornley detektor SE [22]

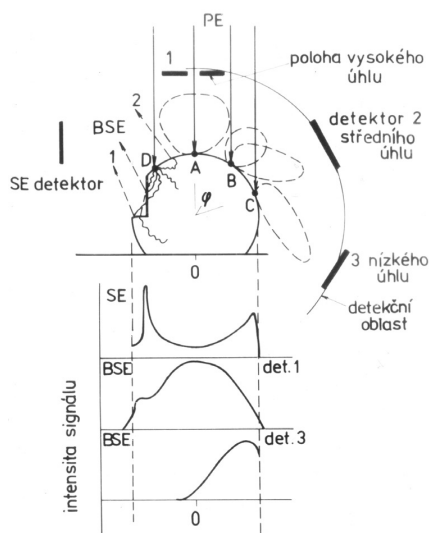
Jako scintilátory se používají:

- Plastické scintilátory – z polymethylmethakrylátu, lze je snadno vyrobit chemickou polymerací do požadovaných tvarů. Nevýhodou je pokles účinnosti radiačním poškozením (až 50 % za hodinu) [23].
- Skleněné scintilátory – skla aktivovaná lithiem, mají nízký světelný výtěžek [23].
- Práškové scintilátory (polykrystalické) – nejpoužívanější křemičitan ytritý aktivovaný cérem, označovaný jako P47 [23].
- Monokrystaly – použitelné jsou pro SEM pouze anorganické monokrystaly, např. YAG (ytrium hlinitý granát aktivovaný cerem) a YAP (ytrium hlinitý perovskit aktivovaný cerem). Ty mají nejlepší vlastnosti z výše uvedených scintilátorů [23].

Dalšími méně používanými detektory jsou polovodičové detektory, které mají horší DQE, nebo násobičové detektory u nichž dochází k problémům s kontaminací a jsou vhodné pro speciální aplikace [23].

BSE se šíří díky své energii od 50 eV po energii primárního svazku přímočaře, proto se na scintilátor nepřikládá napětí, jenž by odsávalo elektrony. Pro detekci BSE je důležitá poloha detektoru. Základní poloha je naznačena na Obr. 25 jako poloha vysokého úhlu 1 a k ní se váže zachycený signál z detektoru 1, kde lze vidět topografický kontrast pro BSE. Ten je možné porovnat také signálem SE,

jenž má opačný průběh jasu. V bodě D dopadu primárního svazku elektronů dochází k tzv. hranovému jevu, jenž nastává dopadem primárního svazku elektronů na hranách, kde se extrémně zvětšuje interakční plocha, jenž mohou opustit SE [23].



Obr. 25: Poloha detektoru SE a BSE [23]

Signál zachycený detektory spolu se synchronizačními signály lze zobrazit na obrazovce, či zpracovat záznamovou technikou buďto digitálně, nebo analogově. Zvětšení obrazu je pak dáno poměrem šířky plochy zobrazovacího média ku šířce skenované plochy, kdy takto vypočtená hodnota zvětšení obvykle zahrnuje určité prázdné zvětšení.

2.5 Nízkonapěťový elektronový mikroskop 5 (LV EM 5)

Rutinní TEM s urychlovacím napětím 100 kV dosahuje rozlišovací schopnosti v řádu desetin nanometrů, avšak u biologických vzorků výsledný obraz vykazuje nízký kontrast, který je nutné zvýšit kontrastovacími metodami využívající těžkých kovů – vztah (14). Tento postup však může vnést do obrazu artefakty, neboť nepozorujeme samotný vzorek, ale atomy těžkých kovů, které struktury obklopují. Přirozenou cestou ke zvýšení kontrastu je snížení urychlovacího napětí, čímž vzroste pravděpodobnost rozptylu dle rovnic (13), (14) [24].

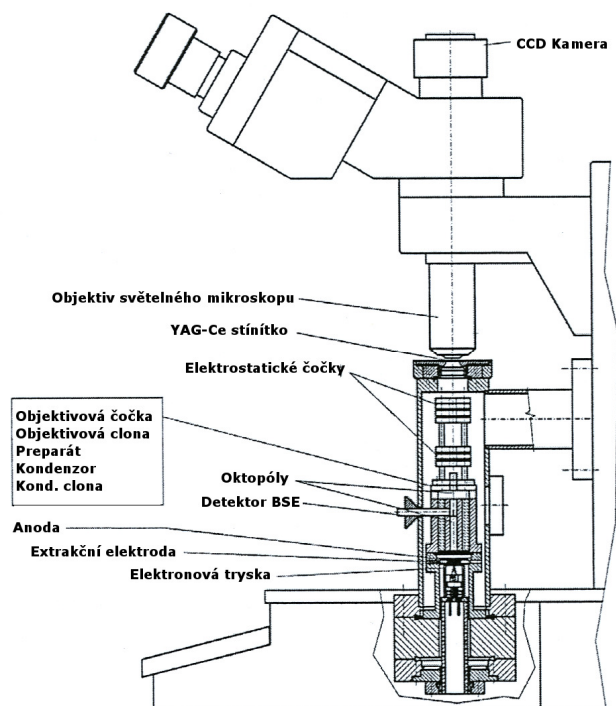
2.5.1 Historie

Tato myšlenka ohledně zlepšení kontrastu biologických objektů v TEM pomocí užití pracovního napětí několika kV je stará více než 40 let. V roce 1958 Nixon poukázal na to, že zvyšující se pravděpodobnost neelastického rozptylu při nízkých energiích může zároveň zvýšit kontrast. Prakticky tuto myšlenku rozvíjeli Willska a Möllenstedt [25]. Möllenstedt a Heinemann použili vyšší urychlovací napětí a elektrony před průchodem preparátem zpomalili ve Faradayově klídce a poté je opět urychlili. Elektrony, které jako nízkoenergetické vytvořily průchodem preparátem kontrastní obraz měly být na své dráze před i za preparátem jako vysokonenergetické odolnější vůči cizím elektrickým polím a navíc měly po dopadu na stínítko vytvářet jasnější obraz. Takto upravený elektronový mikroskop však vykazoval podstatně horší rozlišovací schopnost než běžné elektronové mikroskopy [26] a úsilí k sestrojení nízkonapěťového prozařovacího mikroskopu (LV TEM) bylo zastaveno přibližně před 30 léty. Dle Möllenstedta byla důvodem nízká světlost elektronového zdroje při nízkém urychlovacím napětí a tedy nedostatečná intenzita obrazu na detekčním zařízení (stínítko, fotografická emulze), vyšší kontaminace a vyšší citlivost na magnetická a elektrická rozptylová pole [25].

Počátkem devadesátých let profesor Delong analyzoval, zda je možné v současných podmínkách překlenout uvedené problémy a realizovat LV TEM pro studium převážně lehkých atomů jako jsou H, N, O, C, P, S. Zjistil, že při optimální hodnotě energie 5 keV to možné je [24]. K fyzické realizaci pomohl technologický vývoj na poli elektronové mikroskopie za posledních 20 let. Byly vyvinuty nízkonapěťové trysky s vysokou světlostí pracující v Schottkyho režimu, nebo s LaB₆ krystalem a dále byly vyvinuty kvalitnější vývěvy produkující čisté vakuum [25].

2.5.2 Konstrukce LV EM 5

Konstrukce LV EM 5 vychází z Willskyho konceptu LV TEM, který počítá s elektronovým mikroskopem umožňujícím zvětšení v řádu násobků desítek až stovek. Obrazová informace zahrnutá v elektronovém svazku je převedena na světelný obraz na fluorescenčním stínítku a ten je dále zvětšen pomocí světelného mikroskopu [25]. Na Obr. 26 je konstrukční uspořádání LV EM 5, kde lze vidět v dolní části elektronovou optiku, v níž netradičně svazek primárních elektronů směřuje vzhůru proti gravitaci a v horní části je standardní světelný mikroskop s binokulárem a CCD kamerou.



Obr. 26: Konstrukce LV EM 5 [27]

V TEM režimu vzniká v elektronové trysce svazek primárních elektronů s energií danou urychlovacím napětím, jehož hodnota se pohybuje okolo 5 kV a lze jej z důvodu změny průměru svazku měnit, neboť dále je svazek zaostřen dvojitým kondenzorem s neměnnou ohniskovou vzdáleností. Průchodem svazku primárních elektronů preparátem dochází k interakci elektronů s hmotou a určitá část rozptýlených elektronů je ze svazku vyloučena záchytem na objektivové cloně. Svazek primárních elektronů, nyní nesoucí obrazovou informaci je poté zaostřen objektivem s neměnnou ohniskovou vzdáleností, tak aby došlo ke zvětšení, které je dále uskutečněno projektivovými čočkami s proměnnou ohniskovou vzdáleností [24][25][26][28].

Finálně je svazek primárních elektronů transformován na světelný obraz dopadem na stínítko, které nemá prakticky žádnou mikrostrukturu [24][25][26][28]. Zvětšení pomocí elektronové optiky je možné až 360× [29]. Obraz vytvořený na stínítku je dále zvětšován standardním světelným mikroskopem s maximálním zvětšením 400×. Maximální celkové zvětšení je 145.000× [27] [29].

LV EM 5 umožňuje pracovat v režimu TEM, který je předmětem zájmu této diplomové práce, dále lze pracovat v režimu elektronové difrakce (ED), transmisního

elektronového mikroskopu (STEM) a v režimu SEM. V režimu STEM je kontrast obrazu podobný jako při zobrazení v režimu TEM, avšak ke zobrazení se využívá prošlých elektronů z primárního svazku zaostřeného do bodu. Takovýmto svazkem je skenována pozorovaná plocha preparátu. Režim STEM přináší možnost pozorovat preparáty, které již nelze pro jejich šířku zobrazit v režimu TEM. Preparáty vhodné pro režim TEM by měli mít tloušťku okolo 20 nm, kdežto v režimu STEM lze pozorovat preparáty až do tloušťky 60 nm [24][30][31]. V režimu SEM je zdrojem kontrastu signál BSE, který je snímán pomocí dvou polovodičových detektorů umístěných ve stejné velkých opačně orientovaných úhlech od osy primárního svazku elektronů. Odečtením signálů z obou detektorů se získá topografický kontrast a naopak sečtením je získán materiálový kontrast [23][24][29].

2.5.3 Elektronová tryska

Zdrojem primárního svazku elektronů LV EM 5 je elektronová tryska na bázi Schottkyho emise tvořená z wolframového mono krystalu (100) aktivovaného oxidem zirkonia pro snížení výstupní práce kovu [29]. Elektronová tryska je vložena do magnetického pole první kondenzorové čočky (Obr. 28 – pozice 1) [28], emitované elektrony jsou urychlovány nebo zpomalovány mezi extrakční elektrodou a anodou, která je na nulovém potenciálu [27]. Provoz trysky s Schottkyho emisí vyžaduje vakuum 10^{-7} Pa [10].

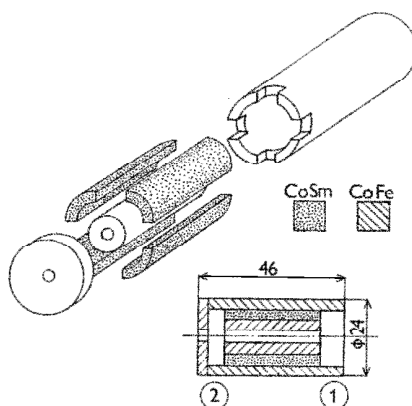
2.5.4 Vakuová technika

Předkomora oddělená systémem samouzavírací vakuové propusti je čerpána v prvním stupni přes ručně ovládaný ventil membránovou vývěvou a v druhém stupni turbomolekulární vývěvou. Výše popsané oba stupně tvoří jeden celek dodávaný firmou Pfeiffer vakuum. Dále je tento čerpací systém spojen přes ručně ovládané ventily s tubusem mikroskopu a slouží k prvotnímu čerpání z atmosférického tlaku nebo při vniknutí vzduchu v důsledku chybné výměny preparátu [29]. Dosažený tlak je měřen Penningovo vakuometrem pracujícím na principu doutnavého výboje ve zředěném plynu v magnetickém poli [14]. Tlak dostačující pro výměnu preparátu a ke spuštění iontových vývěv je 5×10^{-5} Pa. Pracovní tlak uvnitř tubusu je kontinuálně udržován dvěma iontovými pumpami, z nichž jedna je připojena k tubusu v prostoru elektronové trysky a druhá v prostoru preparátu. Měření tlaku je uskutečněno na základě

proudu protékajícího mezi elektrodami iontové vývěvy. Provozní tlak uvnitř tubusu v oblasti katody je 10^{-7} Pa a v oblasti preparátu 10^{-6} Pa [29].

2.5.5 Elektronový kondenzor

Elektronová kondenzorová čočka je konstruována na základě nových typů elektron optických čoček s permanentními magnety. Elektronové čočky s permanentními magnety nemohou být realizovány jako jednoduché čočky bez vlivu nevhodných rozptylových polí. Řešení tohoto problému je v implementaci magnetického obvodu se dvěma mezerami, tak vzniknou čočky dvě. Pro konstrukci čočky je využito moderních permanentních magnetů na bázi SmCo_5 . Na Obr. 27 je znázorněna složená čočka, jejíž součástí je kondenzorová čočka a objektiv. Část 1 kondenzoru je integrovanou součástí elektronové trysky a část 2 tvoří druhou zónu objektivové čočky. Obě elektronové čočky jsou vybaveny elektrostatickými oktopóly, které slouží jako stigmátory a také umožňují vychylování svazku primárních elektronů. Současně je v oblasti kondenzoru umístěna kondenzorová clona [27][28].



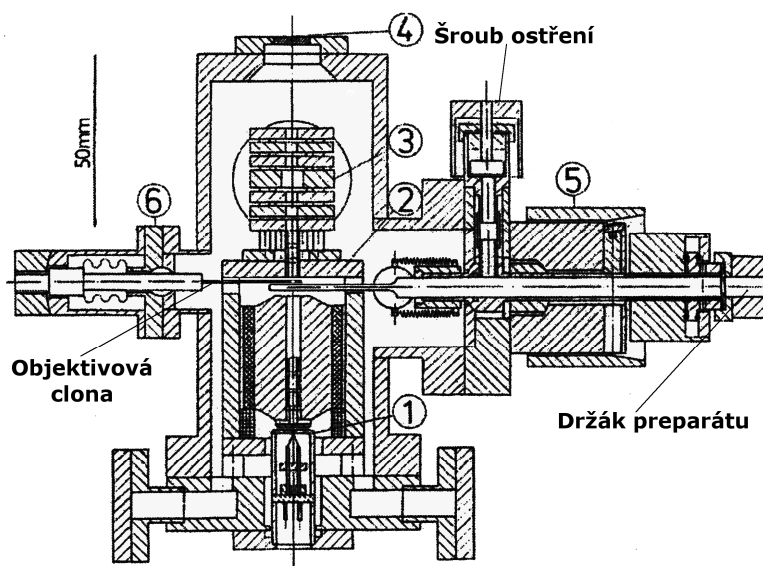
Obr. 27: Konstrukce elektronové čočky s permanentními magnety [28]

2.5.6 Preparát

Preparát lze vkládat do LV EM 5 vstupním systémem – Obr. 28 pozice 5, který je čerpán turbomolekulární vývěvou [25][28]. Preparáty jsou vkládány jako řezy na standardních elektron mikroskopických sítkách \varnothing 3 mm [29] pomocí držáku preparátu – Obr. 28 [25][28]. Ostření elektron mikroskopického obrazu se uskutečňuje mechanicky pomocí šroubu ostření – Obr. 28, protože objektivová čočka je tvořena permanentním magnetem s pevnou ohniskovou vzdáleností [32].

2.5.7 Elektronový objektiv

Elektronový objektiv je podobně jako kondenzor vyroben z permanentního magnetu a je součástí složené čočky z Obr. 27. Na Obr. 28 je zakreslena elektron optická část LV EM 5, kde lze vidět umístění objektivu – pozice 2 a objektivové clony [27][28].



Obr. 28: Schématické znázornění elektron optické části LV EM 5 [25][28]

2.5.8 Elektronový projektiv

Elektronový projektiv je tvořen dvěma elektrostatickými čočkami viz Obr. 26 [27] (Obr. 26 je náčrtek komerční verze z roku 2000, kdežto Obr. 28 je náčrtek experimentálního LV EM z roku 1994, kde byl projektiv řešen třemi elektrostatickými čočkami – pozice 3). Změnou potenciálu elektrostatických čoček lze docílit měnitelného finálního zvětšení v rozmezí 36× až 360× [29].

2.5.9 Fluorescenční stínítko

Fluorescenční stínítko je tvořeno monokrystalem YAG aktivovaným cerem o průměru 10 mm a tloušťky 0,2 mm, jenž dovoluje použít standardní světelné objektivy s obvyklou hodnotou kompenzace krycího skla. Stínítko je umístěno v horní části tubusu na pozici 4 (Obr. 28), kde je uchyceno v tělese matice, která umožňuje změnu polohy stínítka v ose Z. Tím je možno zaostřit obraz pozorovaný světelným mikroskopem. DQE YAG stínítka Q_s je 5 %, Index lomu n je 1,85, čímž je snížen

světelný tok vstupující do objektivu světelného mikroskopu na $\frac{1}{3}$. Snížení kontrastu vlivem totálního odrazu nehraje žádnou roli. Porovnáním světelných toků pozorovaných pouhým okem na standardním stínítku z polykrystalického materiálu vůči světelnému toku pozorovaného objektivem světelného mikroskopu na YAG stínítku ze vztahu (24) vyplývá, že poměr světelných toků je přibližně $\frac{1}{300}$. To umožňuje snížit proudovou hustotu primárního svazku 300× a tím zmenšit radiační poškození vzorku [25][27][28].

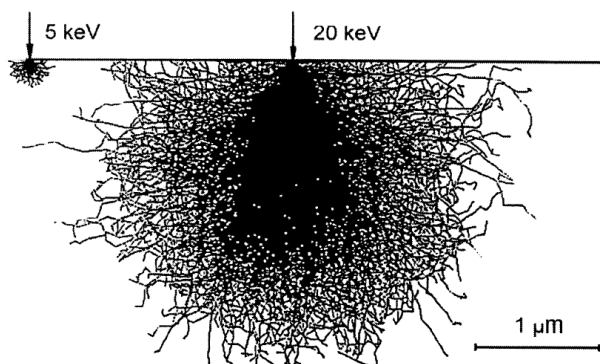
$$\frac{Q_p \cdot (N_e)^2}{Q_s \cdot (N_o)^2 \cdot 0,3} \doteq \frac{1}{300} \quad (24)$$

kde: Q_p je DQE polykrystalického stínítka ($Q_p = 0,25$)

N_e je numerická apertura oka ($N_e = 0,01$)

N_o je numerická apertura světelného objektivu (uvažován $20 \times N_o = 0,7$)

Rozlišovací schopnost stínítka je na základě rozptylu elektronů závislá na jejich energii, jak dokládá simulace metodou Monte Carlo (Obr. 29). Pro energii elektronů 5 keV je rozlišovací schopnost stínítka přibližně 0,2 μm [28][34].



Obr. 29: Simulace trajektorie elektronů v monokrystalu YAG [28][34]

2.5.10 Světelný mikroskop

K LV EM 5 je připojen standardní světelný mikroskop firmy Olympus vybavený objektivem M4×, M40× a binokulárem M10×. Mikroskop umožňuje pozorovat obraz binokulárem nebo binokulárem a CCD kamerou nebo jen CCD kamerou [29]. Výhodou pozorování YAG stínítka pomocí světelného mikroskopu oproti konvenčnímu přímému

pozorování finálně zvětšeného obrazu elektronovou optikou na stínítku je, že zorné pole (virtuální) může být až 265 mm tj. až 3× větší oblast oproti konvenčním TEM [28][29].

2.5.11 CCD kamera

Mikroskop je vybaven slow scan CCD kamerou firmy Proscan HSS 1300 připojenou k PC skrze PCI kartu umožňující vyčítání digitálních dat. Kamera je vybavena CCD snímačem firmy Sony s přenosovými mikročočkami. Rozměr pixelu je $6,7 \mu\text{m} \times 6,7 \mu\text{m}$. Aktivní plocha pixelů (rozlišení CCD) je 1300×1030 . Rozsah spektra je 280 – 1000 nm [29] (maximální emisní vlnová délka YAG je 550 nm) [23]. Maximální kapacita pixelu je 25.000 elektronů. Střední kvadratická odchylka vyčítacího šumu je okolo 18 elektronů. Digitální výstup je 12 bitový s frekvencí 16 MHz. A/D převodník převádí 6 elektronů na bit. Kamera je chlazená pomocí Peltierova článku. Pracovní teplota kamery je od 0 do 35 °C a vlhkost vzduchu nesmí překročit 75 % [29].

2.5.12 Tvorba kontrastu

Vznik kontrastu v LV TEM je dán rozptylem elektronů a lze jej stanovit z podílu počtu elektronů dopadlých na stínítko n ku počtu srážejících elektronů n_0 , jenž korespondují s intenzitou I svazku elektronů dopadajícího na stínítko ku intenzitě primárního svazku I_0 dle vztahu (25) [32].

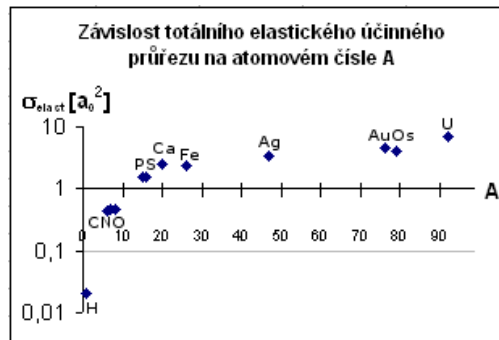
$$\frac{n}{n_0} = \frac{I}{I_0} = e^{-(p)} = e^{-\left(\frac{t}{\lambda}\right)} = e^{-(Q_T \cdot t)} = e^{-(N \cdot \sigma_T \cdot t)} = e^{-\left(\frac{N_0 \cdot \sigma_T \cdot \rho \cdot t}{A}\right)} \quad (25)$$

Kontrast C pak lze definovat jako $C = 1 - \frac{n}{n_0}$ [35], nebo jako logaritmický

kontrast $c_{\log} = \log\left(\frac{N_0}{N}\right)$ [36].

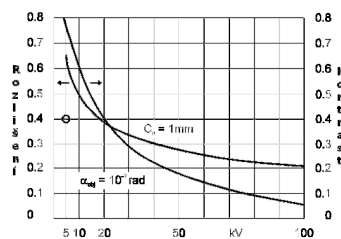
Ve vzorci (25) se vyskytuje totální účinný průřez pro jednu částici σ_T , který je součtem účinného průřezu σ_e – vztah (13) závisujícího na $\frac{1}{U^2}$ a σ_j – vztah (14) závisujícího na $\left(\frac{Z}{U}\right)^2$. Z čehož je patrné, že kontrast obrazu roste s klesajícím urychlovacím napětím a se zvyšujícím se atomovým číslem Z . Pro biologické preparáty

je závislost kontrastu na atomovém čísle minimální, neboť v nich převažují prvky s nízkým atomovým číslem – od nejpočetnějšího O, H, C a N [37][38]. Konkrétní závislost totálního elastického účinného průřezu σ_{elast} na atomovém čísle pro jmenované prvky při $E_0 = 5\text{keV}$ znázorňuje graf (Obr. 30 – a_0 je Bohrovův poloměr), kde je patrný minimální rozdíl mezi O, C a N, oproti nim je σ_{elast} pro H dvacetkrát menší, čímž se stává vliv vodíku na kontrast téměř zanedbatelný.



Obr. 30: Totální elast. účinný průřez při $E_0 = 5\text{ keV}$ [33]

Závislost kontrastu 20 nm uhlíkové folie na urychlovacím napětí je znázorněna na grafu (Obr. 31), kde je také zakreslena závislost teoretické rozlišovací schopnosti, která klesá se snižujícím se urychlovacím napětím dle Abbeho vztahu (1) [28]. Kontrast je pro urychlovací napětí 5 kV 20× vyšší oproti urychlovacímu napětí 100 kV [34] a teoretická rozlišovací schopnost pro danou objektivovou čočku (Obr. 31) se snížila na 0,6 nm [28]. Experimentálně byla zjištěna rozlišovací schopnost pro LV EM 5 v TEM režimu $d = 2,5\text{ nm}$ [32].



Obr. 31: Závislost rozlišovací schopnosti a kontrastu na urychlovacím napětí [28]

V rovnici (25) je zásadní pro tvorbu kontrastu parametr $(\rho \cdot t)$, lokální změna hustoty nebo tloušťky preparátu vyvolá změnu ve výsledném kontrastu obrazu [32]. Nejmenší zjištěná diference hustoty preparátu při jeho konstantní tloušťce (autoři neudávají tloušťku řezů) byla změřena experimentálně na směsi dvou polymerů, kde byl rozdíl hustot mezi komponentami $0,005 - 0,04\text{ gcm}^{-3}$. Je tedy možné s jistotou

pozorovat difference hustoty $\geq 0,04 \text{ gcm}^{-3}$ [34]. Teoreticky byla vypočtena 5 % difference kontrastu pro uhlíkovou vrstvu hustoty $\rho = 2,34 \text{ gcm}^{-3}$ metodou Monte Carlo při změně tloušťky 0,53 nm [35].

Pro totální neelastický účinný průřez je stále otázkou kvantitativní různost při snižující se energii elektronu, protože totální účinný průřez pro jednu částici σ_T v rovnici (25) zahrnuje jak totální elastický, tak i totální neelastický účinný průřez [32]. Tato otázka byla řešena pomocí simulace metodou Monte Carlo. Tabulka 4 zobrazuje kritickou tloušťku pro daný rozptylový proces, která je definována jako tloušťka, v níž elektrony podstupují průměrně jeden elastický nebo neelastický rozptyl během průchodu vzorkem [36].

Tabulka 4: Kritická tloušťka pro uhlíkovou vrstvu různé hustoty [36]

Hustota [gcm ⁻³]	Charakteristická kritická tloušťka [nm]		
	Elastická	Neelastická	Všechny
2,34	15,0	8,9	5,5
2,00	17,7	10,3	6,3
1,60	21,4	12,8	7,9

Vliv difrakce elektronů na výsledný obrazový kontrast je pro biologické vzorky minimální, neboť obvykle neobsahují krystalické struktury. Fázový kontrast, jak bylo popsáno v kapitole 2.3.3, je nejvíce patrný při rozostření obrazu a lze jej minimalizovat správným zaostřením pomocí diskrétní dvojdimenzionální rychle Fourierovy transformace (2D FFT) – obrazová funkce $f(x,y)$ je rozložena na lineární kombinace harmonických ortonormálních funkcí (sinus a cosinus) [39]. V obraze 2D FFT je dobře patrný projev Fresnelových kroužků způsobených rozostřením obrazu.

K celkovému kontrastu výsledného digitálního obrazu zaznamenaného Slow Scan CCD kamerou, také krom kontrastu tvořeného elektronovým rozptylem přispívá DQE celého systému – YAG stínítko, světelný objektiv (M40× s numerickou aperturou 0,95), převodní čočka a CCD snímač, DQE je přibližně 0,75 [27].

V této práci je kladen důraz na zobrazení utrastruktury zvrásnění (chatter), jehož kontrast vzniká na základě rozdílné tloušťky řezu v místech zvrásnění vytvořeného kompresí ultratenkých řezů při jejich krájení [40][41].

2.5.13 Parametry LV EM 5

Urychlovací napětí	5kV (nominální)	Zobrazovací režimy	
Preparát		TEM	
Standardní sítky	Ø 3 mm	Rozlišovací schopnost	2,5 nm
Čas výměny preparátu	cca. 3 min	Celkové zvětšení	
		se světelným objektivem M4×	1.500 – 14.500
		se světelným objektivem M40×	15.000 – 145.000
Elektronová optika			
Kondenzor	Perm. magnet	ED	
Ohnisková vzdálenost	4,3 mm	Minimální zkoumaná velikost	100 nm
Nejmenší osvětlená oblast	100 nm	Difrakční čočka – zvětšení	3,5
Kondenzorové clony	Ø 50, 30 µm		
Objektiv	Perm. magnet	STEM	
Ohnisková vzdálenost	1,26 mm	Rozlišovací schopnost	2,5 nm
Konst. sfér. vady	0,64 mm	minimální zvětšení	6.000
Konst. chrom. vady	0,89 mm		
Teoretická rozliš. schopnost	1,1 nm	SEM (BSE detektor)	
Teoretická úhlová apertura	10 ⁻² rad	Rozlišovací schopnost	5 nm
Objektivové clony	Ø 50, 30 µm	minimální zvětšení	1.200
Projektivové čočky	elektrostatické		
zvětšení na stínítku YAG	30 – 360	Vakuum	
Elektronová tryska		Systém výměny preparátu	
Schottkyho katoda	W(100)–ZrO	Membránová a Turbom. vývěva	10 ⁻³ Pa
Světelná optika		Objektový prostor	
Objektiv Olympus M40×	NA = 0,95	Iontová vývěva (10 ls ⁻¹)	10 ⁻⁶ Pa
Objektiv Olympus M4×	NA = 0,16	Prostor elektronové trysky	
		Iontová vývěva (3 ls ⁻¹)	10 ⁻⁷ Pa
Záznam obrazu		Spotřeba	
Slow scan CCD kamera	1.300 × 1.030 px	Trvalé čerpání ion. vývěvami	11 W
Velikost pixelu	6,7 × 6,7 µm	Napájení řídicí elektroniky	120 W
Pomalé skenování až do	16 MHz	Membránová a Turbom. vývěva	250 W
Digitalizace	12 bitů		

2.6 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie atomárních sil umožňuje zobrazovat povrchy preparátů s rozlišením umožňujícím zobrazení až jednotlivých atomů na základě silových interakcí mezi ostrým hrotem a povrchem preparátu po němž skenuje. Výsledný obraz obsahuje informace o rozměrech povrchu preparátu v trojdimenzionálním prostoru.

AFM patří do rodiny mikroskopických technik se skenující sondou (SPM), které využívají interakcí mezi sondou a povrchem preparátu jako funkci pozice. Základními typy SPM jsou: skenovací tunelová mikroskopie (STM), kde je měřen tunelovací proud elektronů; mikroskopie atomárních sil (AFM), kde jsou měřeny interakční síly při atomárních vzdálenostech; optická skenovací mikroskopie v blízkém poli (SNOM), kde jsou měřeny lokální optické vlastnosti. AFM umožňuje aplikováním speciálních módů měřit krom topografie povrchu, měření laterálních a normálových sil, adhezi, tření, elasticitu, elektrické a magnetické lokální vlastnosti [21].

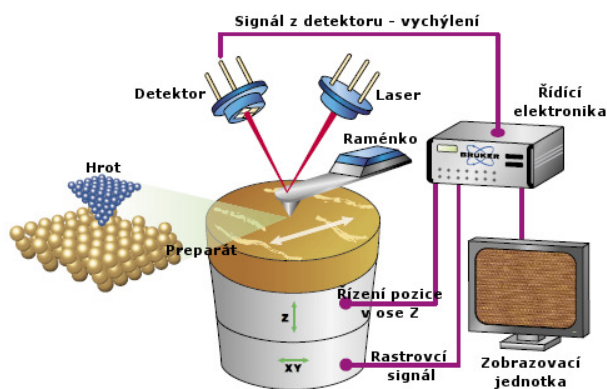
2.6.1 Historie

První STM byl představen roku 1982 G. Binnigem a spolupracovníky [21]. V laboratořích IBM v Curychu pomocí STM pracujícím ve vakuu poprvé zobrazili trojdimenzionální topografii povrchu v atomárním rozlišení na vzorku CaIrSn_4 a Au [42]. Za STM obdrželi G. Binning a H. Rohrer v roce 1986 Nobelovu cenu, tedy ve stejném roce jako E. Ruska za TEM. STM je založen na elektronovém tunelovacím jevu, ke kterému dochází mezi dvěma vodiči, pokud je jejich vzdálenost nižší než 10 nm. Jedná se o kvantový jev umožňující elektronům překonat na základě určité pravděpodobnosti potenciální bariéru. Tunelovací proud se zmenšující se vzdáleností mezi sondou a preparátem roste exponenciálně – toho lze využít k měření meziatomární vzdálenosti. Problém je, že povrch preparátu musí být vodivý a navíc se změnou vzdálenosti mezi sondou a preparátem dochází k meziatomárním silovým interakcím. Těchto silových interakcí se rozhodl G. Binning využít ke zobrazování a roku 1986 představil AFM umožňující pozorovat preparáty s nevodivým povrchem [21].

2.6.2 Princip funkce AFM

Základní části AFM jsou znázorněny na Obr. 32, kde lze vidět raménko s hrotem pohybující se skenovacím způsobem po povrchu preparátu v ose X a Y pomocí piezoelektrického scanneru. Vlivem změny topografie povrchu dochází k ohybu raménka. Ohyb raménka je měřen na základě odrazu laserového svazku od jeho povrchu na fotodetektor, který je rozdělen do čtyř segmentů. Změnou proudu mezi jednotlivými segmenty je získána informace o změně topografie povrchu v aktuálním místě

preparátu. Řídící elektronika tuto změnu vyhodnotí a piezoelektrickým skenerem upraví polohu hrotu vůči povrchu preparátu v ose Z tak, aby síla působící na raménko byla konstantní (kontaktní mód v režimu konstantní síly). Změna polohy hrotu vůči povrchu preparátu určuje barvu daného bodu zobrazeného na obrazovce korespondující se vzdáleností v ose Z. V principu se jedná o zpětnovazební řízení polohy v ose Z.



Obr. 32: Princip funkce AFM [43]

2.6.3 Interakce mezi raménkem s hrotem a preparátem

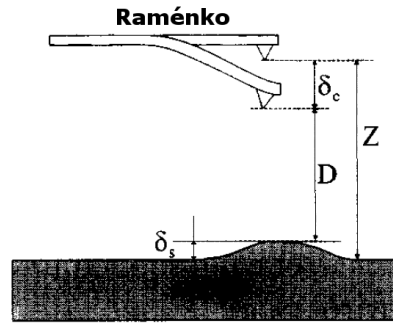
Přibližováním raménka s hrotem k povrchu preparátu vznikne síla působící na raménko, která způsobí jeho prohnutí dané Hookovým zákonem (26), kde k_c je konstanta pružnosti raménka a δ_c je výchylka ohnutého raménka s hrotem [44].

$$F = -k_c \cdot \delta_c \quad (26)$$

Vzdálenost kontrolovaná během měření není aktuální vzdálenost mezi hrotem a povrchem preparátu D , ale jedná se o vzdálenost Z mezi povrchem preparátu a hrotem připevněným k raménku jenž nejsou v kontaktu [44].

$$D = Z - (\delta_c + \delta_s) \quad (27)$$

Vzdálenost D lze vyjádřit ze vztahu (27), kde δ_s koresponduje s velikostí zakřivení povrchu preparátu (Obr. 33) [44].



Obr. 33: Vzdálenosti v systému hrot – preparát [44]

System raménko–preparát může být popsán potenciálem U_{tot} , který je součtem tří potenciálů: $U_{\text{cs}}(D)$, $U_{\text{c}}(\delta_{\text{c}})$ a $U_{\text{s}}(\delta_{\text{s}})$. Potenciál $U_{\text{s}}(\delta_{\text{s}})$ popisuje zakřivení povrchu preparátu a potenciál $U_{\text{c}}(\delta_{\text{c}})$ vyjadřuje elasticitu raménka popsanou Hookovým zákonem. Potenciál $U_{\text{cs}}(D)$ popisuje interakce mezi hrotem a preparátem [44].

Síly působící na hrot potažmo na raménko mají nejružnější fyzikální charakter – nejčastější je Van der Waalsova síla, která je složena ze tří různých sil, jejichž potenciály jsou úměrné vzdálenosti $\frac{1}{r^6}$ [44].

1. Keesomova síla – je výsledkem interakce mezi permanentními dipóly dvou atomů nebo molekul. Potenciál Keesomovy síly je dán rovnicí (28), kde u_1 a u_2 jsou dipólové momenty molekul, ϵ je permitivita prostředí, k_{B} je Boltzmannova konstanta a T je teplota. Pro určité podmínky lze nahradit dané proměnné Keesomovo konstantou C_{K} . Rovnice (28) platí za předpokladu, že $k_{\text{B}}T > \frac{u_1 \cdot u_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon r^3}$ [44].

$$U_{\text{K}}(r) = -\frac{u_1^2 \cdot u_2^2}{3 \cdot (4\pi\epsilon_0\epsilon)^2 \cdot k_{\text{B}} \cdot T \cdot r^6} = -\frac{C_{\text{K}}}{r^6} \quad (28)$$

2. Debyeova síla – je výsledkem interakce permanentního dipólu s indukovaným dipólem mezi atomy nebo molekulami. Potenciál Debyeovy síly je dán rovnicí (29), kde α_{01} a α_{02} vyjadřují elektrickou polarizovatelnost molekul. Pro určité podmínky lze nahradit dané proměnné Debyeovo konstantou C_{D} [44].

$$U_D(r) = -\frac{u_1^2 \alpha_{01} \cdot u_2^2 \alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2 \cdot r^6} = -\frac{C_D}{r^6} \quad (29)$$

3. Londonova síla – je nejvíce přispívající silou ve Van der Walsově síle, protože působí mezi všemi atomy nebo molekulami na vzdálenosti větší než 10 nm až 0,2 nm. Může mít přitažlivý i odpudivý charakter. Tato síla je způsobena okamžitou interakcí mezi permanentním dipólem a indukovaným dipólem a je kvantově-mechanické povahy, její potenciál je dán rovnicí (30), kde $h\nu_1$ a $h\nu_2$ jsou první ionizační potenciály molekul. Pro určité podmínky lze nahradit dané proměnné Debyeovo konstantou C_L [44].

$$U_L(r) = -\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_{01} \cdot \alpha_{02}}{(4\pi\epsilon_0)^2 \cdot r^6} \cdot \frac{(h\nu_1) \cdot (h\nu_2)}{h\nu_1 + h\nu_2} = -\frac{C_L}{r^6} \quad (30)$$

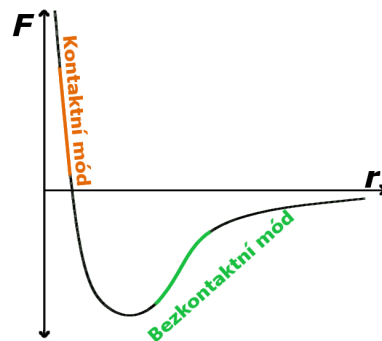
Další síla působící na hrot je Pauliho kvantově mechanická síla, která je vždy odpudivá a je důsledkem Pauliho vylučovacího principu a působí mezi atomy, pokud je jejich vzdálenost menší než součet atomových poloměrů. Dále se mohou uplatňovat další síly např.: elektrostatické, třecí, adhezní, deformační a kapilární – která zatěžuje měření chybou [45].

Závislost síly na vzdálenosti je nejčastěji modelována na základě odvození Lennard-Jonesova potenciálu (31), kde r_0 je konečná poloha, v níž je potenciál nulový a ϵ je konstanta [45].

$$U(r) = \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (31)$$

Průběh Lennard-Jonesova potenciálu v závislosti na vzdálenosti je znázorněn na Obr. 34, kde jsou barevně naznačeny oblasti, v kterých může pracovat AFM. Kontaktní režim pracuje v rozsahu odpudivých sil a je vhodnější pro tvrdé preparáty, avšak lze při něm dosáhnout relativně vysokého rozlišení. Meziatomární síla mezi jedním nebo několika atomy je 20 – 40 nebo 50 – 100 pN. Pro atomární rozlišení

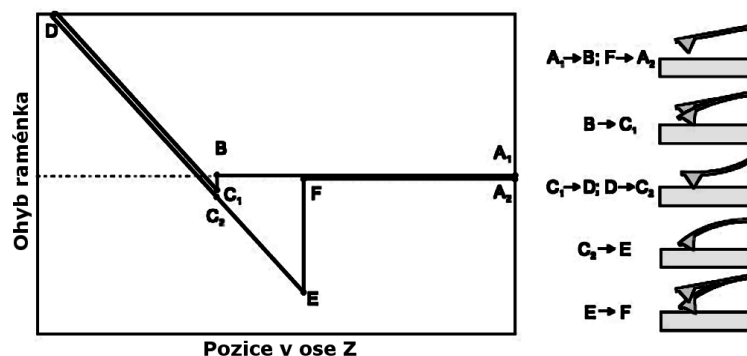
je nutné, aby odpudivá síla byla menší než 100 pN, což je možné s extrémně ostrým hrotem [21]. Naproti tomu bezkontaktní mód, jenž pracuje v rozsahu přitažlivých sil, nabízí relativně nižší rozlišení, ale s menším poměrem signál šum. Tento mód je provozován při rozkmitání raménka frekvencí blízkou jeho vlastní rezonanční frekvenci a je měřena změna amplitudy korelující se změnou velikosti zakřivení povrchu preparátu δ_s [45][46].



Obr. 34: Závislost síly na vzdálenosti [45]

2.6.4 Kontaktní mód

Průběh síly působící na raménko v závislosti na vzdálenosti hrotu od povrchu preparátu je znázorněn na Obr. 35. Hrot je přibližován k povrchu preparátu ($A_1 \rightarrow B$), kdy nedochází ještě k žádnému ohybu raménka. Dalším přibližováním hrotu k povrchu preparátu ($B \rightarrow C_1$) začne působit přitažlivá síla, která přitahuje hrot a v místě rovnosti konstanty tuhosti raménka k_c s gradientem pole vyvolávajícím silové účinky na hrot (na Obr. 34 zelená část křivky) dojde ke skokovému přiblížení k preparátu až do oblasti odpuzivých sil. Další přibližování ($C_1 \rightarrow D$) vede k ohybu raménka do opačné polohy, neboť na něj působí odpudivé síly (na Obr. 34 oranžová část křivky). V bodě D bude hrot oddalován od preparátu, až do bodu C_2 , kde na hrot působí minimum síly způsobené pružností raménka. Dalším oddalováním ($C_2 \rightarrow E$) se bude zvyšovat síla působící přitažlivě na hrot, jedná se především o kapilární sílu vzniklou vodní kontaminací obsaženou ve vzduchu, která způsobuje hysterezi při cyklickém přiblížování a oddalování. V bodě E dojde k překonání této síly a ke skokovému oddálení hrotu a při pohybu ($E \rightarrow A_2$) je hrot již mimo silové působení s povrchem preparátu. Tímto cyklickým přiblížováním a oddalováním lze zkoumat mechanické vlastnosti materiálů, jako například adhezi materiálu, či elasticitu [21] [45].



Obr. 35: Průběh síly působící na raménko v závislosti na vzdálenosti [21]

Kontaktní mód lze provozovat v režimu konstantní výšky, v němž nerovnosti povrchu preparátu způsobí prohnutí raménka (tento režim je provozován s vypnutou zpětnou vazbou řídící změnu vzdálenosti preparátu vůči raménku v ose Z), nebo v režimu konstantní síly, kdy je změnou polohy raménka v ose Z vůči povrchu preparátu udržováno jeho konstantní ohnutí. V režimu konstantní výšky je získávána informace o topografii povrchu z velikosti prohnutí raménka, oproti tomu v režimu konstantní síly je tato informace získávána z velikosti posuvu piezoelektrického skeneru v ose Z, to umožní vyvarovat se chybě měření vznikající kupříkladu z kapilární síly, což je vykoupeno nižší rychlostí skenování [45].

2.6.5 Bezkontaktní mód

Poškozování vzorku vlivem kontaktu s hrotem lze eliminovat pomocí bezkontaktního módu, v němž je využíváno Van der Waalových sil působících ve vzdálenosti 1 – 10 nm od povrchu preparátu. Na takovéto interakci se podílí větší množství atomů, čímž je snížena rozlišovací schopnost. Síla působící na raménko je v řádech pN, to klade na raménko požadavek pružnosti, ale zároveň musí být raménko natolik tuhé, aby nedošlo k jeho zachycení na povrchu preparátu. Proto je tento mód nejčastěji provozován v režimu, kdy je raménko rozkmitáváno budící frekvencí, která je blízká rezonanční frekvenci raménka f_r , tzv. střídavý mód (AC). AC mód oproti bezkontaktnímu módu bez oscilací raménka vykazuje lepší poměr signálu k šumu [21][45][46].

Rezonanční frekvence f_r ramének se pohybuje od 5 kHz do 500 kHz a je dána konstantou pružnosti raménka k_c podle rovnice (32), kde ω_r je rezonanční úhlová rychlost a m je hmotnost oscilujícího raménka [21][45][46].

$$\omega_r = \sqrt{\frac{k_c}{m}} \Rightarrow f_r = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k_c}{m}} \quad (32)$$

V AC módu lze měřit změnu amplitudy oscilujícího raménka, jež způsobují nerovnosti povrchu preparátu. Síly působící na raménko s hrotem mění efektivní tuhost raménka a ta způsobuje změnu jeho rezonanční frekvence f_r . Odpudivé síly jsou zdrojem pozitivního posuvu rezonanční frekvence raménka f_r vůči budící frekvenci a přitažlivé síly jsou zdrojem negativního posuvu. Posunutí rezonanční frekvence raménka f_r vůči budící frekvenci bude doprovázeno poklesem amplitudy oscilací [21][45].

AC mód lze provozovat v režimu konstantní výšky, ve kterém je vypnuta zpětná vazba řídící změnu polohy preparátu vůči raménku v ose Z. Na základě změny amplitudy je vyhodnocena aktuální výška povrchu preparátu. Častější možností je provozování AC módu v režimu konstantní amplitudy, při němž je udržována konstantní amplituda oscilací změnou vzdálenosti raménka vůči povrchu preparátu pomocí posuvu piezoelektrického skeneru vyplývajícího ze změny amplitudy oscilací [21][45].

2.6.6 Poklepový mód (tapping mód)

Raménko s hrotem je opět rozkmitáváno na frekvenci blízké oscilační frekvenci raménka f_r , podobně jako v AC módu, ale s vyšší energií kmitů a tedy s větší amplitudou. V místě obratu směru pohybu hrotu nacházejícího se v kontaktu s povrchem preparátu lze překonat na základě vyšší energie kmitajícího raménka kapilární síly, které negativně ovlivňují zobrazení a rozlišení obrazu. V poklepovém módu je hrot po určitou dobu v kontaktu s povrchem preparátu, což přináší možnost vyššího rozlišení oproti AC módu a zároveň díky oscilacím raménka s hrotem nedochází k výraznému mechanickému poškození povrchu preparátu vlivem skenování. Změna amplitudy ovlivňuje zpětnovazební řízení vzdálenosti mezi povrchem preparátu a raménkem s hrotem ovládaného piezoelektrickým skenerem. Na základě změny této vzdálenosti je vyhodnocována aktuální výška povrchu preparátu [21][45].

Změna fáze rezonanční frekvence raménka f_r vůči budící frekvenci raménka vypovídá o mechanických vlastnostech materiálu. Přitažlivé síly zvětšují fázový posun a odpudivé síly zmenšují fázový posun. Pokud při interakci hrotu s povrchem preparátu nedochází k neelastickým interakcím (materiálová deformace), je fázový posun nejčastěji projevem elastického modulu pružnosti preparátu a adhezních sil mezi hrotem a preparátem [21][45][47].

2.6.7 Hroty

Hroty jsou upevněny na raménko, které slouží jako senzor, z tohoto důvodu jsou na něj kladeny určité požadavky. Raménko by mělo mít malou setrvačnost, aby nedocházelo k tepelným driftům, a také co nejvyšší rezonanční frekvenci – obojí lze řešit zmenšením hmotnosti. Dalším požadavkem je, aby bylo raménko dostatečně citlivé na malé síly a bylo tedy snadno ohebné, ale zároveň dostatečně tuhé, aby nedocházelo k přidržování raménka v místě kontaktu s preparátem. Při skenování povrchu preparátu dochází i k bočním náklonům, které jsou pro běžné zobrazování nežádoucí. Z tohoto důvodu je výhodné vyrábět raménka ve tvaru písmene V. Povrch raménka musí dobře odrážet laserový svazek. Hroty by měly být v ideálním případě až atomárně ostré a musí být mechanicky odolné. Hroty a raménka jsou vyráběny z Si, SiO₂ a Si₃N₄, z nichž posledně uvedený materiál vykazuje největší tvrdost. Hroty lze také vyrábět z diamantu či nanotrubiček. Hroty s raménky se upevňují na čipy, které lze snadněji přenést a upnout v AFM. Na jeden čip lze připevnit několik ramének s hroty, jež mohou mít různé hodnoty konstanty pružnosti k_c (Obr. 36) [43] [45].



Obr. 36: Nitrid-křemíkové hroty připevněné k čipu [43]

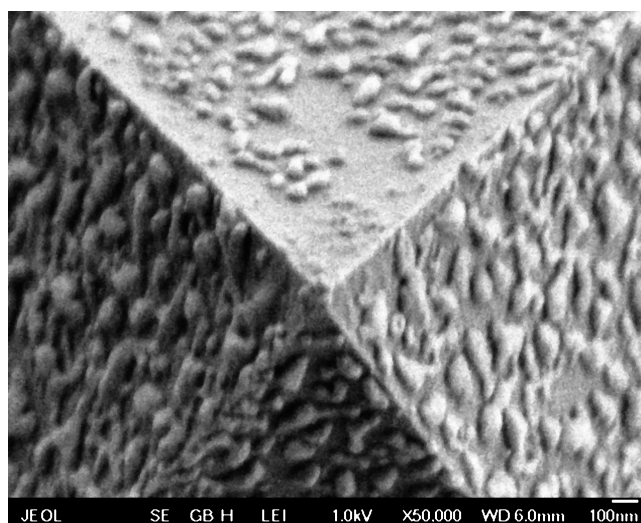
V tabulce jsou uvedeny parametry jednotlivých ramének s hroty zachycenými na Obr. 36, kde hrot B je první zleva (hrot A je umístěn samotný na opačné straně čipu) [43].

Tabulka 5: Parametry ramének [43]

Raménko	Frekvence [kHz]	k_c [Nm^{-1}]	Šířka [μm]	Tloušťka [μm]	Délka [μm]
A	22	0,07	22	0,55	175
B	15	0,02	20	0,55	210
C	7	0,01	20	0,55	310
D	15	0,03	20	0,55	225
E	38	0,1	18	0,55	140
F	125	0,6	18	0,55	85

Dalším parametrem ramének je poloměr křivosti hrotu, který určuje rozlišovací schopnost AFM v laterální rovině XY. Použitím užšího hrotu lze dosáhnout přesnějšího měření reálné topografie povrchu. Tvar hrotu je definován jako parametr poloměru křivosti, který je pro uvedená raménka s hroty 10 – 20 nm (Tabulka 5). Do určité míry lze digitálními úpravami snímku na základě znalosti poloměru křivosti hrotu korigovat naměřené výsledky [43] [45].

Detail povrchu použitého hrotu E (Tabulka 5) v rámci magisterské práce lze vidět na snímku – Obr. 37.

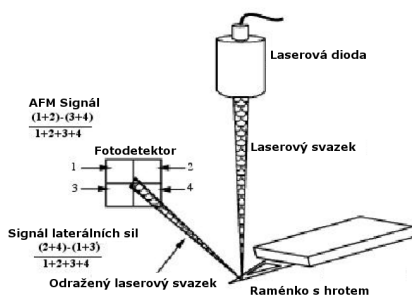


Obr. 37: Detail AFM hrotu při zvětšení 50.000 snímáno na JEOL 7401 F

2.6.8 Fotodetektor

Raménko je osvětlováno laserovým svazkem generovaným laserovou diodou s nejčastěji používanou vlnovou délkou v infračervené oblasti (dříve však 670 nm) a odrazem od povrchu raménka dopadá na fotodetektor, který je rozdělen na čtyři segmenty. Z velikosti intenzit dopadajících na jednotlivé segmenty lze určit velikost

laterální síly (ohyb raménka v příčné ose) nebo sil ohýbajících raménko v podélné ose (AFM signál) – Obr. 38 [48].



Obr. 38: Princip detekce ohybu raménka [48]

2.6.9 Piezoelektrický skener

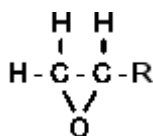
Základním materiálem aktivní části skeneru je piezokrystalická keramická směs PZT (PbZrO_3 nebo PbTiO_3), jenž se dotuje určitými příměsemi pro dosažení požadovaných vlastností. Výroba piezokeramiky je prováděna spékáním PZT prášku ve formě požadovaného tvaru. Piezoelektrický jev je podmíněn přítomností vlastních dipólů krystalků, které jsou u prášku náhodně uspřádány a způsobují ve výsledku po přivedení napětí nulové prodloužení. Proto se musí po spečení piezokeramika opět zahřát a vystavit působení stejnosměrného pole, které jednotlivé dipóly orientuje stejným směrem. Na základě rychlého zchlazení si dipóly uchovávají svojí orientaci. Piezokeramika umožní změnu tvaru v intervalu přibližně od 0,1 nm až po stovky mikrometrů při napětích od 1 mV po 1000 V. Základní charakteristikou je piezoelektrická konstanta udávající velikost změny rozměru po přiložení napětí a má charakter tenzoru. Piezokeramické skenery jsou ve výsledku sestaveny z jednotlivých piezokeramických tělísek umožňující pohyb v jednom směru. Celý systém musí vykazovat žádané vlastnosti v oblastech – rezonanční frekvence (desítky kHz), pevnosti, linearity pohybu a ortogonalitu. Ve výsledku je skener ještě vybaven systémem uchycení vzorku nebo čipu s raménkem a hrotem [45].

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Biologický materiál je nutné před prohlížením v LV EM 5 v režimu TEM odvodnit a připravit do podoby ultratenkých řezů. Celý postup začíná v první fázi fixací, čímž dojde k zastavení biologických procesů a degradace materiálu. Dalším krokem je dehydratace, po níž následuje prosycení materiálu zalévacím médiem, které zpevní preparát natolik, že jej lze krájet na ultratenké řezy [49]. K prosycení materiálu jsou k dispozici polyakrylová, polyesterová a epoxidová zalévací media [2]. Pro použití v LV EM 5 jsou vhodná zalévací media na bázi epoxidů, z nichž byla pro tuto práci na základě dosavadní experimentální zkušenosti vybrána EPON 812 a Spurr (firma SPI).

Zalévací média jsou čtyř-složkové epoxidové pryskyřice obsahující určitý počet epoxidových skupin (Obr. 39). Trojčlenný epoxidový kruh se otevírá při reakci s vodíkem nebo hydroxylovou skupinou (OH). Poté může dojít k reakci s anhydridy organických kyselin (organické kyseliny zbavené libovolného počtu molekul H₂O), tím vzniká složitě zesíťovaný polymer [2].



Obr. 39: Obecný vzorec epoxidové skupiny [2]

3.1.1 EPON 812

Základní složkou EPONu je Glycerin glycid ether označovaný jako SPI-Pon 812, ten je smíchán s anhydridy DDSA (C₁₆H₂₆O₂) a NMA (C₁₀H₁₀O₃) sloužící jako tvrdidla, jejichž poměr ovlivňuje mechanické vlastnosti polymeru. DDSA změkčuje polymer a NMA naopak dodává polymeru tvrdost. Poslední složkou je akcelerátor DMP-30 (C₁₅H₂₇N₃O), který je donorem vodíku [2][50][51].

3.1.2 Spurr

Základní složkou je ERL 4221 ($C_{14}H_{20}O_4$), ten je smíchán s anhydridem NSA ($C_{13}H_{20}O_3$) a flexibilisátorem Der 736 ($C_{12}H_{22}O_5$), který podobně jako u EPONu určuje tvrdost polymeru. Poslední složkou je akcelerátor DMAE ($C_4H_{11}NO$) [2][50][51].

3.1.3 Příprava bločků

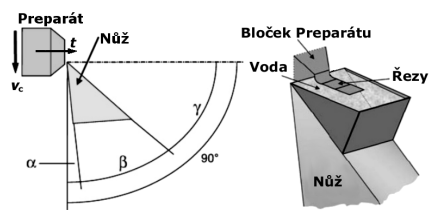
Polymery byly vytvořeny smícháním složek v poměru uvedeném v tabulce (Tabulka 6), a poté byla směs nalita do forem, kde zaujme tvar bločku během čtyřicetiosmihodinové polymerace při teplotě 62 °C. Z poměrů hmotnosti DDSA ku NMA a NSA ku Der 736 lze očekávat, že oproti EPONu bude Spurr měkčí.

Tabulka 6: Příprava zalévacích medií EPON a Spurr

EPON		Spurr	
Složky	hmotnost [g]	Složky	hmotnost [g]
SPI-Pon 812	49,12	ERL 4221	10
DDSA	27,94	NSA	6
NMA	22,94	Der 736	26
DMP-30	1,946	DMAE	0,4

3.2 Krájení ultratenkých řezů

Pro elektronový mikroskop LV EM 5 je nutné dodržet tloušťku preparátu ~ 20 nm, která je dána na základě urychlovacího napětí a tvorby kontrastu (viz kapitola 2.5). Ke krájení ultratenkých řezů (tloušťka < 90 nm) slouží ultramikrotomy. Pomocí skleněných nebo diamantových nožů lze oddělovat materiál v požadované tloušťce obvykle v rozmezí od 5 -2000 nm. Krájení je uskutečňováno pohybem preparátu (Obr. 40) vůči stojícímu noži určitou řeznou rychlostí v_c , jenž se pohybuje v řádu mms^{-1} . Pohyblivý držák s preparátem se cyklicky pohybuje nahoru a dolů, před každým pohybem směrem dolů je preparát přiblížen k noži o vzdálenost t určující tloušťku řezů. K tomuto účelu se využívá piezoelektrického posuvu nebo posuvu na základě tepelné dilatace. Ukrojené řezy se hromadí splavováním na vodní hladině (mokré krájení) nebo na ploše nože (suché krájení používané pro krájení při kryo teplotách) [2][21].



Obr. 40: Základní úhly nože a splavování řezů

Skleněné nože mají nejčastěji úhel břitu $\beta = 45^\circ$ a diamantové nože, které jsou tvrdší, mohou mít úhel β ještě menší, obvykle 45° a 35° . Na obrázku (Obr. 40) lze vidět úhel zábřitu α , jehož zvětšením se snižuje otěr bločku o přední stěnu nože, ale zároveň je zdrojem zvlnění řezu (chatteru). Součet úhlů α a β je označován jako řezný úhel, ten ovlivňuje jednak životnost nože, jednak zvlnění řezu, které je předmětem zkoumání této práce (zvlnění vzniká po celé šířce řezu podél řezné hrany nože). Čím větší je řezný úhel, tím dochází ke větší kompresi řezů. Krájením při pokojových teplotách může zkrácení řezu ve směru krájení dosáhnout vlivem komprese až 30 %. Snížení komprese lze dosáhnout kromě změny řezného úhlu, také použitím tvrdšího zalévacího media nebo zmenšením plochy řezu, případně oscilačním diamantovým nožem s piezoelektrickým oscilátorem [21][52].

3.2.1 Příprava řezů

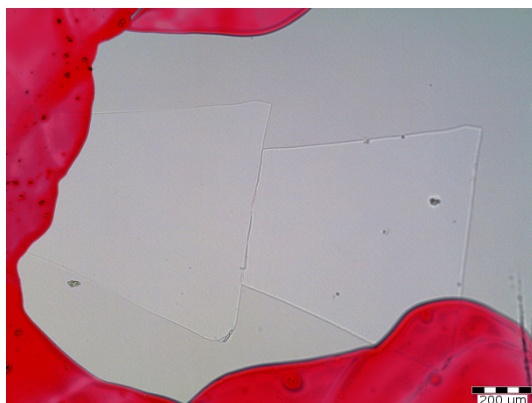
Zpolymerovaná samotná zalévací média Spurr a EPON mají tvar obdélníkového bločku, který umožňuje upnutí do držáku v ultramikrotomu. Pro samotné krájení byla trimováním na krájeném konci připravena řezná plocha ve tvaru lichoběžníku s velikostí stran v řádu několika stovek mikrometrů. Samotné krájení bylo prováděno ultramikrotomem LEICA Ultracut UCT, řezná rychlost byla $1,4 - 0,05 \text{ mms}^{-1}$. Řezy byly krájeny diamantovými noži firmy DIATOME s úhlem břitu 45° a vibračním nožem s úhlem 35° s vibracemi a bez vibrací, řezy byly splavovány na vodní hladinu tvořené destilovanou vodou. Z vodní hladiny byly řezy střídavě odebírány pro AFM a LV EM 5. Krájení ultratenkých řezů vyžaduje značné zkušenosti, zručnost a koncentraci, proto byly připravovány laborantkou Petrou Masařovou.

3.2.2 AFM

Pro AFM jsem jako podložní materiál použil slídu – muskovit, protože drsnost jejího čerstvě odštěpeného povrchu je menší než $0,1 \text{ nm}$ [53]. Vytvoření takto atomárně rovné vrstvy jsem provedl přilepením lepicí pásky na její povrch a jejím následným

strhnutím. Poté jsem slídu promyl v čistém ethanolu v ultrazvukové vaně Škoda po dobu 15 minut a po usušení na ni byly kladeny řezy, jenž byly nabírány z vodní hladiny.

Po usušení řezů na slídě jsem slídu prohlížel ve světelném mikroskopu Olympus CX41 s připojeným digitálním fotoaparátom Olympus E-510. Ke snadnější orientaci při hledání místa pro přiblížení hrotu v AFM jsem na spodní straně slídy označil řezy lihovým fixem (Obr. 41 – změnil jsem jas křivkovou transformací pro zvýšení kontrastu řezů v programu GIMP).



Obr. 41: Řezy 20 nm na slídě pro AFM

3.2.3 LV EM 5

Nakrájené řezy byly kladeny na standardní měděné sítky s počtem 400 řádků na palec (Mesh 400), které byly předem očištěny v acetonu.

3.2.4 SEM

Očekávaná výška zvlnění řezů je v řádu několika nanometrů a povrch řezů není vodivý, proto musí být na povrchu vytvořena dostatečně vodivá vrstva, která zároveň nepřekryje povrchové struktury řezu. K tomuto účelu nelze použít standardní metoda naprašování spočívající v ionizaci zbytkových plynů elektrickým polem ve vakuu, jejichž ionty dopadem na elektrodu z naprašovaného materiálu (např. Au) vyrážejí atomy, které vlivem gravitace dopadají na povrch preparátu. Problém je v mechanismu kondenzace naprašovaného materiálu, který prochází různými stádii (kondenzace, tvoření zárodků, růst zrn, slučování) a souvislá vrstva vzniká až při několika desítkách nanometrů tloušťky (zlato při 45 nm) [54].

Řešením je napaření tenké vrstvy ve vakuu metodou stínového napařování. Tato metoda spočívá v napaření kovů, nebo dalších látek jako je uhlík, které se rozžhavením ve vakuu odpařují do všech směrů. Preparát se umísťuje do napařovací komory tak, aby byl v odpovídajícím úhlu od zdroje napařované látky a navíc může být tento úhel vymezen clonou a náklonem preparátu. Pro objekty o rozměrech několika nanometrů se volí napařovací úhel menší než 10° , tím dojde k napaření materiálu na hrany objektů a zvýší se jejich kontrast při zobrazování v SEM nebo TEM [2][54][55].



Obr. 42: Stínování napařováním ve vakuu [55]

Pro prohlížení řezů v SEM jsem použil měděné sítky, které byly prohlédnuty v LV EM 5. Sítky s řezy jsem přilepil oboustrannou uhlíkovou lepenkou na hliníkový terčík a na okraje sítky jsem nakapal roztok koloidního stříbra, které mělo za úkol zvýšit vodivost za účelem odvodu náboje z povrchu preparátu. Na takto připravený preparát jsem napařil tenkou palladiovou vrstvou metodou stínového napařování. Vypařeno bylo 0,024 g palladiového drátku namotaného na vrchol wolframového nosníku ve tvaru písmene V. Napařování bylo uskutečněno ve vysokém vakuu čerpaném difusní vývěvou. Napaření kovu bylo pod úhlem 7° skrze clonu s dírou umístěnou v jedné třetině vzdálenosti mezi vrcholem nosníku a preparátem, přičemž vzdálenost mezi preparátem a vrcholem nosníku byla 11 cm. K napařování jsem použil napařovací aparaturu JEOL JEE 4C.

3.3 Prohlížení preparátů

3.3.1 AFM

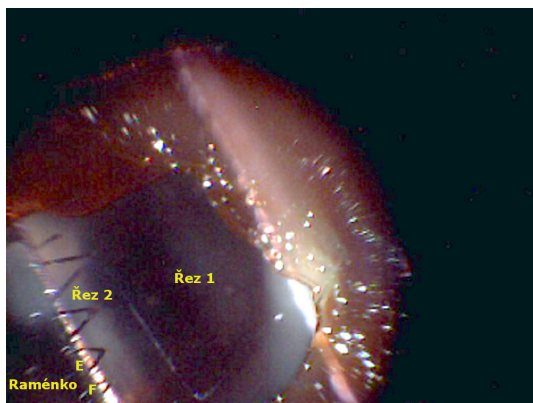
Označené řezy ležící na povrchu slídy jsem umístil na kruhový držák preparátu nad střed kruhového otvoru a držák preparátu jsem připevnil na magnetickou trojnožku mikroskopu Pico SPM firmy Molecular imaging (Obr. 43). Trojnožka umožňuje mikrometrický posuv preparátu ve všech třech osách, přičemž třetí nožka je spojena se servomotorkem zajišťující mikrometrické přiblížení preparátu k hrotu.



Obr. 43: Mikroskop Pico SPM firmy Molecular Imaging

Místo kontaktu hrotu s povrchem preparátu jsem nastavil na základě pohledu zesponu mikroskopu Pico SPM skrze díru v držáku preparátu pomocí světelného mikroskopu vybaveného kamerou. Protože světelný mikroskop není součástí Pico SPM, tak jsem za tímto účelem upravil světelný mikroskop Zeiss Jena a vybavil jej USB mikroskopem Ednet se zvětšením 10× – 50×. Takto upravené zařízení obsahuje shora: dvoustupňový posuvný stolek v ose Z, na němž je umístěn Pico SPM, v ose Z posuvný objektiv Zeiss 10× dovolující změnu pozice v osách X, Y s aretací polohy, digitální USB mikroskop Ednet dovolující změnu pozice ve všech třech osách s aretací polohy, osvětlení s bílou LED diodou svítící pod úhlem 20° s jednoduchou regulací intenzity světla potenciometrem napájené z USB počítače a umístěné na ohebném rameni. Zařízení slouží pouze k informativnímu zobrazení pozice preparátu vůči raménku s hrotem (Obr. 44 – zvýšen jas obrazu v programu GIMP). Skenování preparátů jsem prováděl v poklepovém módu. Pro EPON jsem použil hrot s raménkem E a pro Spurr hrot s raménkem F (Tabulka 5). Rychlost skenování byla 3,1 řádků za sekundu, tedy 91.553 nms^{-1} .

K záznamu obrazu jsem používal software Pico Scan. Skenovaná plocha byla $3,072 \times 3,072 \mu\text{m}$ a velikost digitálního obrázku byla $1024 \times 1024 \text{ px}$, rozlišovací schopnost v laterální ose byla tedy 3 nm a barevná hloubka byla 8 bitů stupňů šedi, přičemž rozlišení v ose Z je 0,05 nm. Pro každé zalévací medium (EPON, Spurr) a každý způsob krájení (nože 45°, 35° bez vibrací, 35° s vibracemi) jsem nasnímal ze třech různých řezů čtyři různá místa, celkem 72 snímků.



Obr. 44: Raménka s hroty nad řezy

3.3.2 LV EM 5

Počet snímků jsem si stanovil stejným způsobem jako pro AFM, tedy v ideálním případě 72. Vlastní kontrast zalévacího média je natolik nízký, že jsem očekával, že nebude ve všech případech možné zaostřit obraz a dodržet stanovený počet snímků. Snímky jsem pořizoval při zvětšení $Z = 50.000\times$, kdy je rozlišení jednoho pixelu pro danou kameru (viz kapitola 2.5) $d = 3 \text{ nm}$ – dle vzorce (33) určeného výrobcem Delong Instrument a.s. (uvedený vzorec je stanoven pro pozorování bez binningu – sloučení pixelů za účelem zkrácení doby vyčítání a zlepšení SNR). Rozlišení snímků jsem omezil na $1200 \times 900 \text{ px}$ a barevná hloubka byla 12 bitů.

$$d = \frac{150.000}{Z} \text{ [nm]} \quad (33)$$



Obr. 45: LV EM 5 firmy Delong instrument a.s.

3.3.3 SEM

Snímky povrchů řezů jsem pořizoval SEM JEOL JSM 7401 F (Obr. 46), ke zobrazování bylo využíváno signálu sekundárních elektronů a zpětně odražených elektronů. Urychlovací napětí bylo měněno v rozsahu od 500 V do 10 kV za účelem nalezení optimální energie při níž bude signál (SE, BSE) ideální pro zobrazení zvlnění na základě interakčního objemu (kapitola 2.4). Zvětšení snímků bylo 50.000× a rozlišení 1280×1024 px s 8 bit stupňů šedi. Mikroskop obsluhoval operátor Jiří Vaněček.



Obr. 46: JEOL JSM 7401 F

3.4 Zpracování výsledků

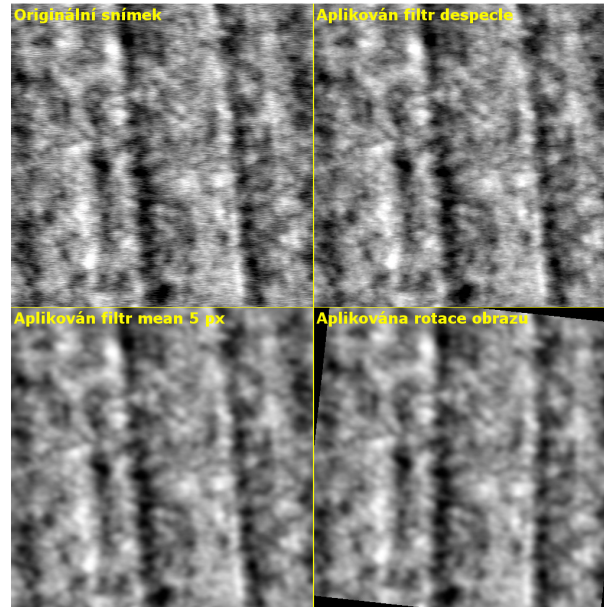
Nasnímané obrázky jsem upravoval v programu ImageJ a analyzoval v programovém prostředí Matlab, které je zároveň skriptovacím programovacím jazykem pracujícím s maticemi jako se základní datovou strukturou, u nichž lze definovat jejich dimenze.

3.4.1 AFM

Úprava snímků před zpracováním:

1. Odstranění šumu – Z obrazu jsem odstranil šumu typu „pepř a sůl“ funkcí `despeckle`, funkce nahradí každý pixel v obrazu na základě výpočtu mediánu z matice sousedních pixelů 3×3 (Obr. 47).
2. Průměrování 5 px – Filtr `mean` vypočítá pro každý pixel v obrazu jeho průměrnou hodnotu z matice okolních pixelů 5×5 . Aplikace filtru je z důvodu eliminace vysokých frekvencí jasové složky, neboť jsem předem změřil, že šířka jediného výběžku není menší než 25 pixelů (Obr. 47).

3. Rotace obrazu – Rotací obrazu jsem natočil zvlnění tak, aby bylo orientováno na výšku obrazu pod úhlem 90° (Obr. 47).
4. Výřez – Pro další analýzu jsem aplikoval výřez 900×500 pixelů



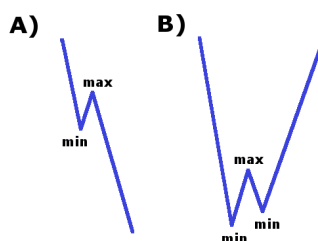
Obr. 47: Úprava obrázků před zpracováním

Zpracování snímků pomocí skriptu v programu Matlab:

1. Skript importuje příslušný snímek do matice I a převede její dimenzi (8 bit) na double (reálná čísla).
2. Zprůměrováním všech sloupců matice I převede matici na vektor (jediný řádek), tím se docílí zprůměrnování zvlnění z celého snímku do jediného řádku (využívám toho že zvlnění má jeden určitý směr).
3. Skript findpeaks.m s funkcí function $[k,v] = \text{findpeaks}(x,m,w)$ dostupný zde [56] vyhledává ve vstupním vektoru x podle nastaveného módu m , buď minima nebo maxima a je možno zapnout kvadratickou interpolaci, která nahrazuje funkci na daném intervalu parabolou, což je správné vzhledem k obrazu tvořenému diskrétními body. Parametrem w je určena minimální vzdálenost (osa X) mezi dvěma následujícími lokálními extrémy. Výstupem funkce je vektor pozic v (osa X) a odpovídající vektor intenzit k (osa Y).

Funkce je volána dvakrát (hledá minima a poté maxima – vzniknou vektory k_1, k_2, v_1, v_2).

4. Čtyři vektory minim a maxim jsou spojeny do dvou matic ($X_c = k_1 \cup k_2, Y_c = v_1 \cup v_2$) tak, aby v prvním řádku každé matice (X_c, Y_c) následovaly postupně za sebou dle osy X a ve druhém řádku je uchována informace, zda šlo o lokální max. (hodnota 1) nebo min. (hodnota 2).
5. Následuje vyhledávání dvou a více za sebou jdoucích minim nebo maxim, pokud taková situace nastane bude uchována extrémnější hodnota a ostatní vymazány.
6. Nyní matice X_c a Y_c obsahují pouze střídavě po sobě jdoucí minima a maxima. V tuto chvíli se odstraní minima a maxima, která nesplňují požadovanou velikost rozdílu jejich intenzit (výšek). Obecně mohou nastat dva případy výskytu variace lokálních maxim nebo minim, které nejsou skutečnými extrémy v příslušném intervalu pro požadovanou velikost rozdílu intenzit (Obr. 48). A) následují jakékoli dva extrémy za sebou – v takové případě, pokud rozdíl jejich intenzit bude menší než nastavené minimum, budou oba vymazány. Situaci lze zobecnit na 2·n za sebou jdoucích extrémů. B) v případě 3·n po sobě jdoucích extrémů budou všechny vymazány, krom největšího extrému takového typu, kterým začíná a končí posloupnost (Obr. 48 B) to by bylo první min. zleva).



Obr. 48: Lokální minima a maxima

7. Po této operaci následuje vlastní měření šířek a výšek výběžků.

Na Obr. 49 je znázorněn graf (modře výškový profil, červeně výška výběžku, zeleně šířka výběžku, žlutě okraje výběžku a fialová čára nastavuje horní mez pro minima) výše uvedeným způsobem zpracovaného snímku, výstupem analýzy všech

snímku je hodnota minima, průměru, střední kvadratické odchylky, mediánu a maxima pro výšky i šířky.



Obr. 49: Graf výšek povrchu zalévacího media

3.4.2 LV EM 5

Úprava snímků před zpracováním:

1. Odstranění šumu – Funkce `despeckle` odstraní „přesvícené“ (více citlivé) pixely, po tomto kroku jsem si poznamenal hodnotu nejtmaší jasové složky (pozadí)
2. Odstranění pozadí – Funkce `subtract background` odečte od snímku nerovnoměrně nasvícené pozadí, funkce vychází z myšlenky „rolujícího míče“ na spodní straně 3D plochy tvořené 2D snímkem a intenzitami jednotlivých bodů
3. Průměrování 5 px – Filtr `mean`.
4. Rotace obrazu
5. Inverze obrazu – AFM zobrazuje prohlubně na povrchu jako tmavá místa (nízké hodnoty stupňů šedi korelující s rozměry v ose Z), ale v TEM to jsou světlá místa.
6. Výřez – pro další analýzu jsem aplikoval výřez 700×500 pixelů

Zpracování obrázků pomocí skriptu v programu Matlab:

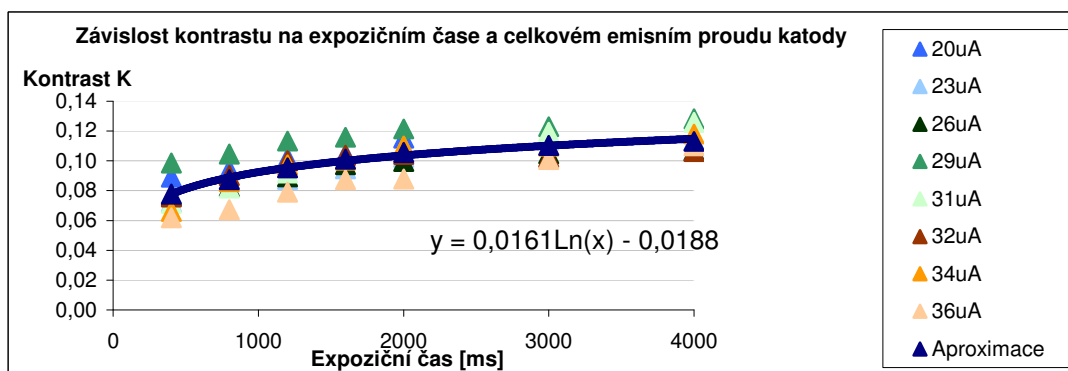
Obraz jsem zpracoval podobným způsobem jako pro AFM s tím rozdílem, že jsem počítal pouze šířku výběžku.

Výpočet kontrastu snímků:

Kontrast snímků K jsem počítal podle Michelsona [57], kde L_{\max} je maximální osvětlení a L_{\min} je minimální osvětlení v obrazu (pozadí), tato hodnota je získána v bodě 1. při úpravě snímků. Kontrast K může nabývat hodnot od 0 do 1 a je bezrozměrný.

$$K = \frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\max} + L_{\min}} \quad (34)$$

Michelsonův kontrast by měl být v ideálním případě při snímání stejné scény pro různé expoziční doby konstantní, protože s prodloužením doby expozice vzrůstá počet stupňů šedi, ale zároveň úměrně tomu roste intenzita L_{\min} . Tuto skutečnost jsem ověřoval snímáním preparátu (Spurr krájený 45° nožem) ve stejném místě a při různých časech expozice a snímky upravil výše uvedeným postupem. Dále jsem zkoumal změnu kontrastu obrazu se změnou celkového emisního proudu katody. Obr. 50 ukazuje změnu kontrastu závislou na celkovém emisním proudu katody a na expozičním čase. Tuto závislost jsem aproximoval z průměrů hodnot kontrastů pro danou dobu expozice. Na základě logaritmické rovnice regrese budu přepočítávat (normalizovat) kontrast porovnávaných snímků (snímaných při různých dobách expozice) na dobu expozice 3000 ms. Tím se mohou dopustit největší odchylky kontrastu 0,021. Takto počítaný kontrast je maximálním kontrastem, který je způsoben největším možným rozdílem výšky a hloubky pozorovaného řezu.



Obr. 50: Závislost kontrastu na expozičním čase a celkovém emisním proudu katody

3.4.3 SEM

Obraz jsem zpracoval v programu Matlab, analyzoval jsem pouze šířku výběžků.

3.5 Zkouška mikrotvrlosti

Provedl jsem zkoušku mikrotvrlosti EPONU a Spurru podle Vickerse, která je založena na vtlačování diamantového jehlanu se čtvercovou základnou do materiálu a pomocí světelného mikroskopu je zjišťována střední délka vytlačených úhlopříček l_1, l_2 do materiálu.

Měření jsem prováděl na přístroji UHL VMHT Microhardness Tester (Obr. 51) (na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v.v.i.). Zatěžovací síla F byla $F = 0,4905$ N a rychlost zatěžování byla $50 \mu\text{s}^{-1}$. Výslednou mikrotvrdot MH_v jsem vypočítal dle vzorce (35).

$$MH_v = 1,854 \cdot \frac{F}{l} = 1,854 \cdot \frac{2F}{l_1 + l_2} [\text{MPa}] \quad (35)$$



Obr. 51: Přístroj na měření mikrotvrlosti UHL VMHT

3.6 Měření hustoty

Hustotu zalévacích medií jsem změřil na základě měření hustoty pyknometrem. Měření pyknometrem spočívá v reprodukovatelnosti objemu naplnění pyknometru kapalinou a ze změn hmotnosti prázdného pyknometru m_1 , vůči pyknometru s měřeným tělesem m_2 , vůči pyknometru plného vody m_4 , vůči pyknometru s vodou a s měřeným tělesem m_3 – rovnice (36).

$$\rho = \frac{(m_2 - m_1) \cdot \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{m_4 - m_3 - m_1 + m_2} \quad (36)$$

Vlastní měření jsem prováděl ve dvou plastových kapslích s rovným dnem, jejichž objem je přibližně 1,360 ml. V prvním kroku jsem zvažil prázdné kapsle m_1 , poté jsem zvažil kapsle plné vody m_4 (zde vlivem povrchového napětí vody vznikala určitá chyba měření). V dalším kroku jsem kapsle naplnil do dvou třetin zalévacími medii a nechal po dobu 48 h polymerovat při teplotě 62 °C. V posledním kroku jsem zvažil kapsle se zalévacími medii m_2 , poté jsem doplnil celý objem vodou a zvažil m_3 . K měření jsem použil deionizovanou vodu, kterou jsem dávkoval automatickou pipetou Eppendorf s objemem 1000 μl . Hmotnost jsem stanovoval laboratorními váhami AND HF 2006 s přesností 0,001 g.

4 Výsledky

Cílem experimentální části práce je:

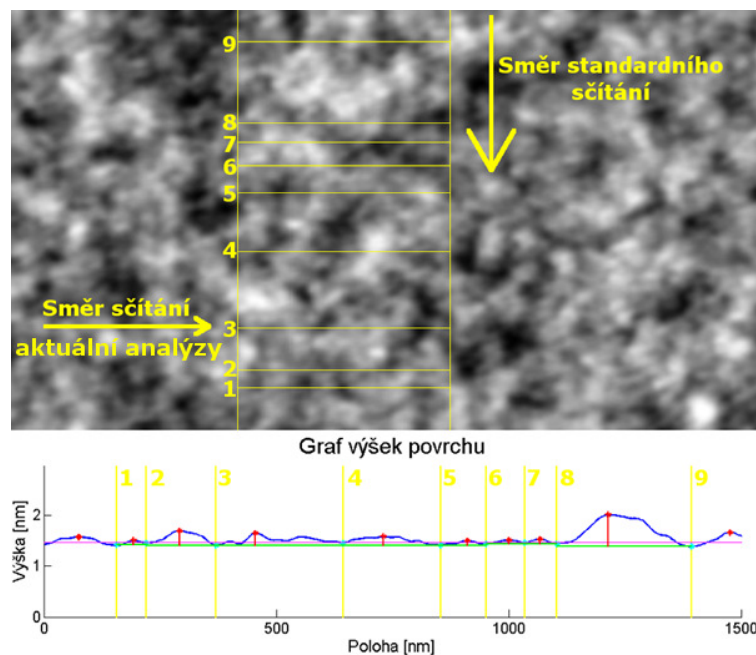
- Zobrazení povrchové morfologie zalévacího media v AFM
- Ultrastrukturální vzhled zalévacího media v LV TEM
- Zhodnocení vlivu povrchové struktury pryskyřic na obrazový kontrast v LV TEM
- Zobrazení povrchové morfologie zalévacího media v SEM

4.1 AFM

Důkazem, že se jedná o pozorované zvlnění je snímek (Obr. 44), kde jsou vidět raménka s hroty nad dvěma řezy, které jsou v těsném spojení. Řez je lichoběžníkového tvaru a raménko je v kolmé pozici vůči delší straně tohoto lichoběžníku. Ostří nože je umístěno paralelně s touto stranou a zvlnění je vytvářeno taktéž paralelně vůči této straně. Stejný řez je lépe vidět i s měřítkem na Obr. 41. Řez pozorovaný AFM by měl obsahovat zvlnění ve směru skenování (na výsledném snímku vodorovně), jak se také stalo, ale pro získání kvalitního snímku je výhodnější skenovat hrotem kolmo na zvlnění. Z tohoto důvodu jsem otočil smysl skenování o 90° a výsledný snímek je v příloze (Příloha 1).

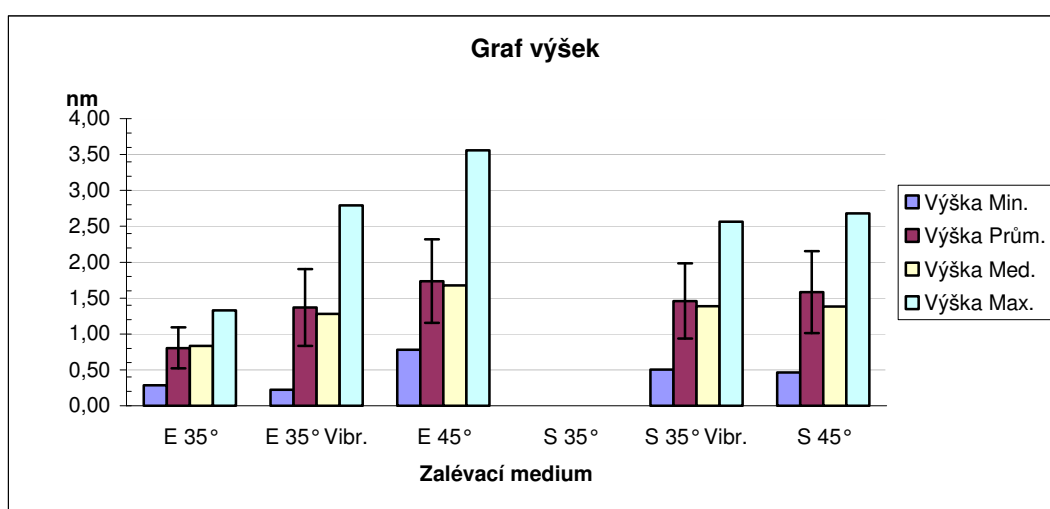
Zobrazení povrchové morfologie jednotlivých zalévacích medií, krájených různými způsoby lze vidět v příloze (Příloha 1 až Příloha 6)

Před vlastní analýzou zvlnění jsem analyzoval způsobem popsaným v kapitole 3.4.1 v horizontálním směru (viz směr sčítání Obr. 52) jeden výběžek z preparátu zalévacího media EPON krájeného nožem 35° bez vibrací. Výsledkem jsou hodnoty ovlivněné hrubostí materiálu, která by měla mít náhodnou distribuci a po sečtení do jediného řádku by výsledek analýzy měl být jednoznačně odlišný (nižší hodnota průměrné výšky a šířky) od zkoumaného zvlnění. Naměřil jsem tyto hodnoty: průměrná šířka je 154 ± 92 nm a průměrná výška je $0,21 \pm 0,18$ nm. Tyto hodnoty definují hranici mezi zkoumaným zvlněním a vlastní hrubostí materiálu povrchu řezu.

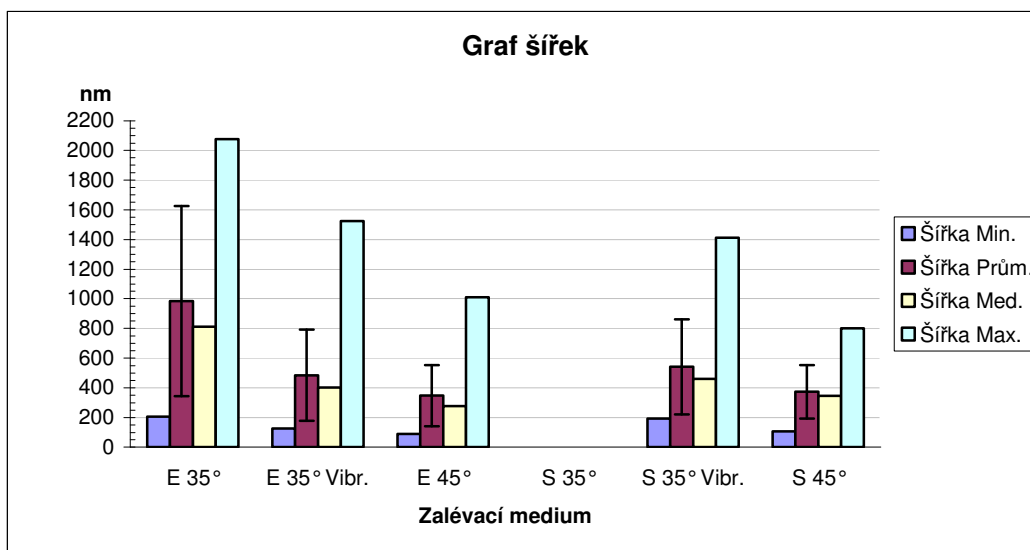


Obr. 52: Vyhodnocení obrazu v příčném směru

Výsledek analýzy povrchového reliéfu řezu způsobeného krájením je znázorněn ve dvou grafech, jeden zobrazuje změnu výšky výběžku pro daný typ zalévacího media a daný typ nože (Obr. 53), druhý zachycuje změnu šířky výběžku pro daný typ zalévacího media a daný typ nože (Obr. 54) – S znamená Spurr a E znamená EPON. Spurr krájený nožem s úhlem 35° v grafech není uveden, protože na jeho povrchu není patrné žádné typické zvlnění způsobené krájením viz. příloha (Příloha 4).



Obr. 53: Graf statistických hodnot výšek zvlnění – AFM



Obr. 54: Graf statistických hodnot výšek zvlnění – AFM

V tabulce (Tabulka 7) jsou uvedeny konkrétní naměřené hodnoty uvedené v grafech (Obr. 53, Obr. 54).

Tabulka 7: Naměřené statistické hodnoty z analýzy zvlnění – AFM

Statistika analýzy šířek						
Zalévací medium	E 35°	E 35° Vibr.	E 45°	S 35°	S 35° Vibr.	S 45°
Šířka Min. [nm]	206	127	88		193	107
Šířka Prům. [nm]	985	485	348		542	374
Šířka Med. [nm]	812	403	278		461	347
Šířka Max. [nm]	2077	1525	1009		1412	800
Šířka stř. kvad. odch. [nm]	640	307	206		319	180
Statistika analýzy výšek						
Zalévací medium	E 35°	E 35° Vibr.	E 45°	S 35°	S 35° Vibr.	S 45°
Výška Min. [nm]	0,28	0,22	0,78		0,50	0,46
Výška Prům. [nm]	0,81	1,37	1,74		1,46	1,58
výška Med. [nm]	0,84	1,28	1,68		1,39	1,38
výška Max. [nm]	1,33	2,79	3,56		2,56	2,68
Výška stř. kvad. odch. [nm]	0,29	0,53	0,58		0,52	0,57

Histogramy z analýzy šířek a výšek pro dané zalévací médium a typ nože jsou uvedeny v příloze (Příloha 7).

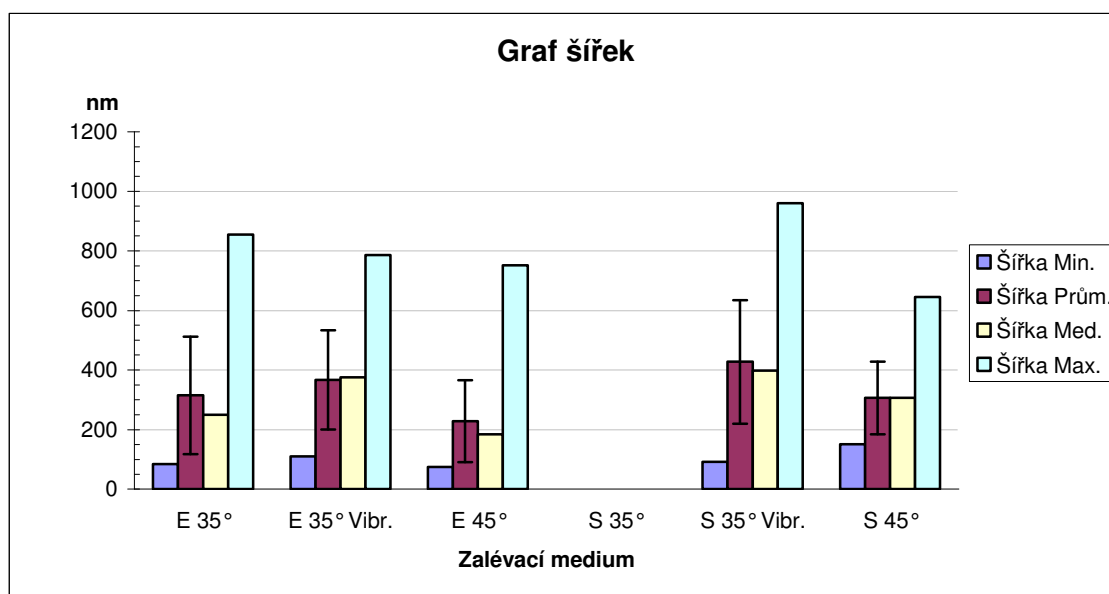
4.2 LV EM 5

Snímky ultrastrukturálního vzhledu řezů jednotlivých zalévacích medií krájených různými způsoby jsou v příloze (Příloha 8 až Příloha 13).

4.2.1 Analýza šířky výběžků (Chatteru)

Před vlastní analýzou zvlnění jsem analyzoval způsobem popsaným v kapitole 3.4.2 v horizontálním směru (viz směr sčítání Obr. 52) jeden výběžek z preparátu zalévacího media EPON krájeného nožem 35° bez vibrací. Naměřil jsem tuto hodnotu průměrné šířky 63 ± 17 nm. Tyto hodnoty definují hranici mezi zkoumaným zvlněním a vlastní hrubostí materiálu povrchu řezu.

Výsledek analýzy je znázorněn v grafu, který zobrazuje změnu šířky výběžku pro daný typ zalévacího media a daný typ nože (Obr. 55). Spurr krájený nožem s úhlem 35° v grafech není uveden, protože na jeho povrchu není patrné žádné typické zvlnění způsobené krájením (chatter) viz. příloha (Příloha 11).



Obr. 55: Graf statistických hodnot šířek zvlnění – LV TEM

Histogramy z analýz pro dané zalévací médium a typ nože jsou uvedeny v příloze (Příloha 14).

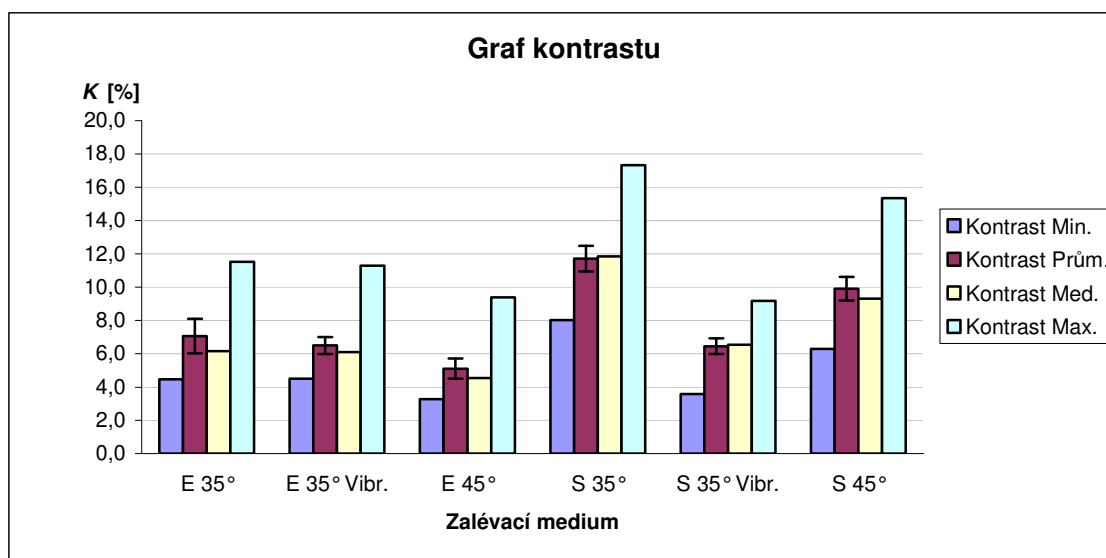
V Tabulce (Tabulka 8) jsou uvedeny konkrétní naměřené hodnoty zobrazené v grafu (Obr. 55).

Tabulka 8: Naměřené statistické hodnoty z analýzy šířky zvlnění – TEM

Statistika analýzy šířek						
Zalévací medium	E 35°	E 35° Vibr.	E 45°	S 35°	S 35° Vibr.	S 45°
Šířka Min. [nm]	85	111	75		92	151
Šířka Prům. [nm]	315	367	228		428	306
Šířka Med. [nm]	250	375	184		398	306
Šířka Max. [nm]	855	786	752		960	646
Šířka stř. kvad. odch. [nm]	197	166	137		207	122

4.2.2 Analýza kontrastu

Výsledek analýzy je znázorněn v grafu, který zobrazuje změnu kontrastu obrazu pro daný typ zalévacího media a daný typ nože (Obr. 56), hodnoty kontrastu K jsou přepočteny na procenta.



Obr. 56: Graf statistických hodnot kontrastu – LV TEM

V Tabulce (Tabulka 9) jsou uvedeny konkrétní naměřené hodnoty zobrazené v grafu (Obr. 56).

Tabulka 9: Naměřené statistické hodnoty z analýzy kontrastu – TEM

Statistika analýzy kontrastu						
Zalévací medium	E 35°	E 35° Vibr.	E 45°	S 35°	S 35° Vibr.	S 45°
Kontrast Min. [%]	4,5	4,5	3,3	8,0	3,6	6,3
Kontrast Prům. [%]	7,1	6,5	5,1	11,7	6,5	9,9
Kontrast Med. [%]	6,2	6,1	4,5	11,8	6,5	9,3
Kontrast Max. [%]	11,5	11,3	9,4	17,3	9,2	15,3
Kontrast stř. kvad. odch. [%]	1,0	0,5	0,6	0,8	0,5	0,7

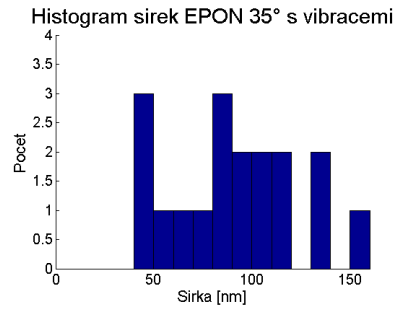
Konkrétní parametry snímků z kterých byla počítána analýza kontrastu jsou pro EPON v příloze (Příloha 15) a pro Spurr (Příloha 16), kde hodnota původní $L_{\min 0}$ značí hodnotu nejnižšího kontrastu snímku po odstranění šumu. Hodnoty $L_{\min 1}$ a $L_{\max 1}$ jsou hodnoty minima a maxima kontrastu po provedení všech úprav snímku uvedených v kapitole 3.4.2. Hodnota kontrastu K je vypočítána dle vzorce (34), kde za hodnotu L_{\min} a L_{\max} dosazují $L_{\min} = L_0 + L_{\min 1}$ a za $L_{\max} = L_0 + L_{\max 1}$. Hodnota normalizovaného kontrastu K_p je dána přepočtem dle rovnice regrese (Obr. 50).

4.3 SEM

SEM jsem pořídil snímky jednoho řezu EPONu krájeného 35° nožem s vibracemi. V příloze (Příloha 17 až Příloha 19) je vidět povrch řezu zobrazovaného pomocí SE na němž je napařeno paladium metodou stínového napařování, povrch je tvořen pouze vlastní strukturou napařené vrstvy. Obrázek (Příloha 20) zobrazuje stejný povrch ale s využitím BSE, kde je již patrné zvlnění řezu. Na tomto obrázku byla provedena analýza šířky zvlnění – tabulka (Tabulka 10), histogram (Obr. 57) ukazuje distribuci šířek jednotlivých výběžků. Průměrná šířka výběžků je 91 ± 33 nm.

Tabulka 10: Naměřené statistické hodnoty z analýzy šířky – SEM

Mín. [nm]	Prům. [nm]	stř. kvad. odch. [nm]	Med. [nm]	Max. [nm]
41	91	33	90	155



Obr. 57: Histogram analýzy snímku ze SEM

4.4 Zkouška mikrotvrlosti

Výsledky měření mikrotvrlosti jsou znázorněny i s jednotlivými hodnotami v tabulce (Tabulka 11). Mikrotvrdot EPONu je $MH_v = 124,83 \pm 1,6$ MPa a Spurr $MH_v = 110,9 \pm 1,3$ MPa.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty mikrotvrlosti zalévacích medií EPON a Spurr

Č.měř.	l_1 [μm]	l_2 [μm]	l [μm]	MH_v [MPa]	$MH_{v-\text{prum}}$ [MPa]	\pm [MPa]
1	86,2	87,0	86,6	121,26	124,8	1,6
2	84,5	89,5	87,0	120,15		
3	86,2	85,3	85,8	123,67		
4	81,1	83,7	82,4	133,94		
5	83,7	86,2	85,0	126,01		
6	81,1	92,0	86,6	121,40		
7	86,2	82,8	84,5	127,36		
Č.měř.	l_1 [μm]	l_2 [μm]	l [μm]	MH_v [MPa]	$MH_{v-\text{prum}}$ [MPa]	\pm [MPa]
1	90,3	87,0	88,7	115,72	110,9	1,3
2	88,7	88,7	88,7	115,59		
3	92,0	92,9	92,5	106,40		
4	91,2	92,9	92,1	107,33		
5	89,5	90,3	89,9	112,52		
6	92,0	90,3	91,2	109,45		
7	92,0	90,3	91,2	109,45		

V příloze jsou snímky mikrovpichů jednotlivých zalévacích medií (Příloha 21 a Příloha 22)

4.5 Měření hustoty

Výsledky měření hustoty jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 12 – E je EPON a S je Spurr). Hustota EPONu je $\rho = 1,191 \pm 0,006 \text{ gcm}^{-3}$ a hustota pro Spurr je $\rho = 1,151 \pm 0,005 \text{ gcm}^{-3}$.

Tabulka 12: Měření hustoty zalévacích medií EPON a Spurr

n	m_1 [g]		m_4 [g]		m_2 [g]		m_3 [g]		ρ [gcm^{-3}]		
	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	
1	0,485	0,489	1,348	1,357	1,076	1,058	1,460	1,434	1,232	1,154	
2	0,485	0,489	1,349	1,367	1,077	1,059	1,453	1,440	1,211	1,145	
3	0,485	0,489	1,365	1,357	1,077	1,059	1,457	1,446	1,182	1,183	
4	0,485	0,488	1,362	1,363	1,077	1,058	1,450	1,436	1,172	1,145	
5	0,486	0,490	1,355	1,355	1,077	1,058	1,452	1,431	1,194	1,152	
6	0,486	0,489	1,363	1,367	1,077	1,058	1,459	1,435	1,192	1,134	
7	0,485	0,490	1,358	1,369	1,076	1,059	1,458	1,434	1,202	1,127	
8	0,485	0,489	1,368	1,352	1,076	1,058	1,455	1,438	1,171	1,176	
9	0,485	0,489	1,365	1,361	1,077	1,059	1,452	1,434	1,170	1,145	
10	0,485	0,490	1,360	1,362	1,077	1,059	1,454	1,436	1,187	1,147	
									ρ [gcm^{-3}]	1,191	1,151
									\pm [gcm^{-3}]	0,006	0,005

4.6 Rychlost krájení

V tabulce (Tabulka 13) uvádím rychlosti jakými byla krájena jednotlivá zalévací media.

Tabulka 13: Rychlosti krájení preparátů

EPON	Rychlost krájení [mms^{-1}]	Spurr	Rychlost krájení [mms^{-1}]
35° bez vibrací	0,1	35° bez vibrací	0,1
35° s vibracemi	0,15	35° s vibracemi	0,05
45°	1,2 – 1,4	45°	0,1

5 Diskuze

Od doby sestrojení prvního elektronového mikroskopu došlo v průběhu let k řadě změn a vylepšení týkajících se jeho parametrů a elektron-mikroskopických technik zaměřených zejména na pozorování preparátů a jejich přípravu. Obecně je vývoj elektronových mikroskopů směřován k dosažení co nejvyšší možné rozlišovací schopnosti, jenž se v současné době pohybuje v řádu desítek pikometrů (TEM). Příkladem je projekt TEAM, který si klade za cíl úplně vykompenzovat vady elektronových čoček, především sférickou a chromatickou vadu. V oblasti mikroskopických technik je nyní v TEM nejvíce rozvíjena technika 3D zpětné rekonstrukce (elektronová tomografie) umožňující zobrazování preparátů trojrozměrně. V oblasti přípravy a pozorování biologických preparátů jsou čím dál častěji využívány kryo techniky, které umožňují pozorovat preparáty co nejbližší nativnímu stavu. Díky stále se zvyšujícímu požadavku pozorovat preparáty minimálně upravované, a tedy blíže nativnímu stavu, má LV EM 5 na poli elektronové mikroskopie své stále nezastupitelné místo, i přes to, že nabízí relativně malé rozlišení 2,5 nm, neboť vznik kontrastu umožňuje přímé pozorování vlastní struktury preparátu.

5.1 Příprava preparátu

Mým ideálem bylo pokud možno pozorovat stejná místa preparátu v LV EM 5 a v AFM. Za tímto účelem jsem si nechal nakrájené řezy položit na značené síťky (sítky označené písmeny v loukotích firma SPI), které jsem pozoroval v LV EM 5, a poté v AFM. Zobrazení řezů v LV EM 5 bylo úspěšné, ale v AFM jsem nebyl schopen docílit zobrazení povrchu řezu. Zkoušel jsem pracovat v kontaktním i poklepovém módu. Indicie v podobě průběhu sil ohýbajících raménko naznačily, že dochází k prohýbání řezu v ploše oka sítky. Tuto skutečnost potvrzuje úspěšné zobrazení povrchu řezu v místě, kde řez leží přímo na loukoti, která zamezila jeho prohýbání. Řešením tohoto problému způsobeného silovým působením hrotu na relativně velkou plochu řezu ($37 \times 37 \mu\text{m}$ – Mesh 400 [51]), by mohlo být v deponování materiálu na opačnou stranu řezu tak, aby došlo k jeho zpevnění. Je otázkou jakou měrou může tato úprava ovlivnit vlastnosti samotného řezu a tím zkreslit výsledky měření pomocí AFM. Hledání vhodných podmínek (tloušťka deponované vrstvy, deponovaný materiál,

metoda deponování vrstvy) a vlivu deponování na vlastnosti řezů může být předmětem dalšího výzkumu.

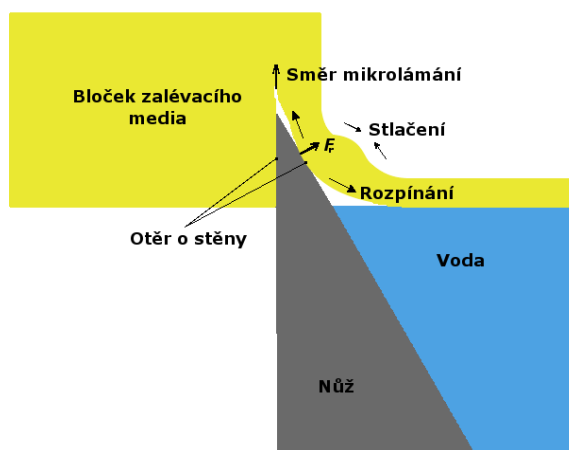
V předchozích výzkumech využívajících obou mikroskopických technik (AFM, TEM) byly použity k zobrazení stejného místa speciální držáky s integrovaným AFM, které lze připojit přímo na držák bločku k ultramikrotomu. Po krájení je poslední řez umístěn na síťku a zkoumán v TEM, poté je na bločku pozorována protilehlá strana řezu pomocí AFM. [38][58]. Tato technika vyžaduje mít v krájeném bločku zalitý materiál, který vytváří kontrast v AFM i v TEM, pak lze na základě jednoznačně identifikovatelných objektů v obrazu nalézt v obou mikroskopech a nasnímat stejné místo pozorování. Tuto techniku bych mohl provést na dvou za sebou jdoucích řezech. První by byl kladen na měděnou síťku a druhý na slídu. Problém nastává v náročné jednoznačné identifikaci stejného místa pozorování u obou mikroskopů na řezech tvořených samotným zalévacím mediem. Díky časové náročnosti a nejistoty výsledku jsem tento způsob přípravy preparátů zavrhl. Z předběžných zkoumání zalévacích medií v LV TEM jsem vyzoroval, že zvlnění řezů vykazuje určitý rozptyl šířek, který je charakteristický pro dané zalévací medium a způsob krájení, a který lze na základě statistických údajů z dostatečně velkého souboru dat prokázat. Na základě této úvahy jsem zvolil způsob přípravy preparátů a vyhodnocení měření popsané v kapitolách 3 a 4.

K přípravě slídy promýváním pro AFM jsem používal čistý ethanol a ultrazvukovou vanu Škoda, abych snížil znečištění povrchu řezů kontaminacemi, z nichž lze jednu vidět na obrázku (Příloha 5) na souřadnicích $X = 2850 \text{ nm}$ a $Y = 2450 \text{ nm}$.

Je známo, že při krájení preparátu dochází ke kompresi zalévacího media, která je závislá na řezném úhlu nože – čím je nůž ostřejší tím nižší bude komprese krájeného materiálu. Dalšího snížení komprese se dosahuje vibracemi nože, protože vibracemi do stran je snižován úhel zábřitu a tím i řezný úhel, ale pouze u jedné strany nože [52]. Zde vyvstává otázka na kolik bylo ovlivněno krájení tímto procesem u nože DIATOME s úhlem břitu 35° s vibracemi, předmětem dalšího výzkumu může být hledání závislosti frekvence vibrací nože na výšku a šířku výběžků povrchového reliéfu.

Další otázkou zůstává, nakolik ovlivňuje povrchové napětí vody, na níž je splavován řez, jeho povrchový reliéf.

Z grafu výšek výběžků (Obr. 53) získaného z analýzy AFM snímků je jednoznačně patrná závislost zmenšující se výšky výběžků se zmenšujícím se úhlem břitu. Tato závislost je tím menší čím měkčí je materiál, v grafu (Obr. 53) je vidět malá změna průměrné výšky výběžků v závislosti na úhlu břitu pro zalévací medium Spurr, jehož hustota byla dle tabulky (Tabulka 12) menší. Domnívám se, že je to způsobeno pružností zalévacího media Spurr, které je schopno kompenzovat kompresi způsobenou ostrím nožem. O větší pružnosti svědčí nižší hustota (Tabulka 12) a tvrdost zalévacího (Tabulka 12) media Spurr, dále o ni svědčí nutnost použití hrotu s raménkem F, které má největší konstantu pružnosti z ramének uvedených v tabulce (Tabulka 5). Nutnost použití raménka F u Spurrů oproti EPONu, kde jsem používal raménko E, je dána pružností zalévacího media, neboť čím je materiál pružnější tím dochází při kontaktu hrotu s materiálem k působení větších přitažlivých sil, které přidržují hrot v kontaktu „lepení“. V poklepovém módu je sice energie oscilací raménka vyšší oproti střídavému módu, ale po dosažení maximální amplitudy při dané konstantě pružnosti raménka, již nelze zvýšit energii kmitajícího raménka nucenými oscilacemi pokud se nezvýší jeho frekvence a to lze pouze změnou raménka s vyšší rezonanční frekvencí danou konstantou pružnosti. Zajímavé je, že u Spurrů při krájení nožem 35° bez vibrací nevzniklo zvlnění povrchu řezu, ale jakési vytrhané domény (Příloha 4). Nůž s úhlem břitu 35° by měl krájet materiál s nejmenší způsobovanou kompresí, jak dokazuje graf (Obr. 53) pro EPON krájený tímto nožem. Domnívám se, že je to způsobeno vyšší měkkostí a pružností Spurrů, do něž může ostří nože vniknout hlouběji, než stěny nože vyvinou na zalévací medium dostatečně velkou sílu F_r , která vyvolá mikrolámání ve směru daném pohybem bločku vůči noži – obrázek (Obr. 58). Samotné vytrhávání domén pak pravděpodobně způsobuje otěr materiálu o stěny nože.



Obr. 58: Síly působící na řez při krájení, poloha nože je s nolovým úhlem zábřitu

Šířka výběžků je dle grafu (Obr. 54) závislá na zmenšujícím se úhlu břitu nože tak, že čím je úhel břitu nože menší, tím je šířka výběžků větší. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že velice ostrý nůž je schopen krájet tak, že mikrolámání, jímž jsou přerušovány vazby zřetěženého polymeru, se přesněji ubírá směrem vymezeným ostřím nože. Nůž je proto schopen uříznout delší úsek, než mikrolámání změní svůj směr od původního směru vymezeného nožem. Kdežto u nožů s větším úhlem břitu dochází ke změně směru mikrolámání na kratší vzdálenosti. Touto úvahou lze vysvětlit i rozdílnost údaje o tloušťce krájeného řezu nastavenou na ultramikrotomu s reálnou tloušťkou řezu. Z tohoto důvodu je nutné považovat údaj o tloušťce řezu na ultramikrotomu jako orientační. Závislost šířky výběžků na hustotě zalévacího media není z grafu patrna (Obr. 54).

5.2 AFM

Údaje naměřené z AFM velmi spolehlivě popisují povrch řezů ve všech třech osách s rozlišením 0,05 nm v ose Z, v osách X a Y je možné rozlišení až 0,5 nm. Spolehlivost piezoelektrického skeneru je pravidelně ověřována na kalibračních preparátech.

5.3 LVEM 5

Výsledky měření šířek výběžků pomocí LV TEM uvedené v grafu (Obr. 55) korelují s výsledky měření šířek pomocí AFM (Obr. 53), až na patrný pokles šířek u obou typů zalévacích medií a ve všech způsobech jejich krájení. Tento pokles může být způsoben úpravami obrazu popsány v kapitole (3.4.2) nebo odchylkou přesnosti

měření LV TEM od reálných rozměrů, která je obecně udávána pro elektronové mikroskopy do 5%.

Závislost kontrastu na jednotlivých typech zalévacích medií pro různé způsoby krájení řezů (Obr. 56) vychází pro Spurr podle očekávání. Spurr krájený nožem 45° vykazuje větší kontrast, než Spurr krájený nožem 35° s vibracemi a Spurr krájený nožem 35° vykazuje nejvyšší kontrast, protože vytrhané domény způsobují velké změny ve výšce (Příloha 4). EPON vykazuje opačnou závislost na výšce výběžků, než jsem očekával, s větší výškou výběžků klesá kontrast snímku z LV TEM. Tento paradox přisuzuji pravděpodobně tomu, že jak bylo zmíněno, krájení nožem s větším úhlem břitu vykazuje větší rozdíly v reálně ukrojené šířce řezu, která má vliv na výsledný kontrast snímku a tím že jej snižuje.

U zalévacího media EPON krájeného nožem 35° bez vibrací a nožem 45° bylo problematické nalézt a zaostřit na řezu místa, na nichž by bylo vidět zvlnění řezu, proto není k dispozici uvažovaných dvanáct snímků.

Otázkou je jakým způsobem ovlivňuje kontrast obrazu povrch zvlněného řezu, který má zvlněný povrchový reliéf na obou svých stranách. Pokud je příspěvek kontrastu způsobený z obou stran řezu stejný, pak je možné, že při náhodném rozmístění výběžků po obou stranách může docházet ke skládání nebo odčítání jejich výšek a tím byl ovlivněn výsledný kontrast snímku. To měření šířek nepotvrdilo, protože nebyla patrná výrazná změna v šířce výběžků, která by na základě sčítání a odčítání horní a spodní strany měla být v rozsahu od minima (nuly) až po přibližně dvojnásobek šířky změřené v AFM.

Na Obrázku v příloze (Příloha 23) lze vidět rostlinnou tkáň tabáku fixovanou 2,5 % glutaraldehydem a dehydratovanou acetonovou řadou od 30% do 100% s následným zalitím do zalévacího media Spurr. Preparát byl krájen 35° nožem s vibracemi. Na tomto snímku jsem spočítal kontrast celého obrazu, který byl 62,2 % , dále jsem vypočítal kontrast buněčné stěny A), který byl 42,8 % a na závěr jsem spočítal kontrast oblasti zvlnění, které je dobře patrné mezi šipkami, jeho kontrast byl 11 %. V porovnání kontrastu zvlnění řezu s kontrastem rostlinného preparátu je kontrast zvlnění minimálně téměř čtyřikrát menší (Příloha 27).

5.4 SEM

Snímky pořízené SEM (Příloha 17 – Příloha 19) zobrazují pomocí signálu SE povrchovou morfologii nikoliv řezu, ale napařené vrstvy. Protože interakční objem SE je při energii primárních elektronů 10 keV (Příloha 19) stále tak malý, že vyražené SE nejsou uvolňovány z takové hloubky, aby mohli nést informaci o zvlněném reliéfu řezu. Snímek (Příloha 20) zobrazuje obraz částečně vypovídající o zvlněném reliéfu řezu, protože BSE, které byly zdrojem kontrastu tohoto snímku, jsou generovány z dostatečné hloubky, kde má zvlnění povrchového reliéfu řezu vliv na tvorbu BSE. Tabulka statistických hodnot analýzy šířek (Tabulka 10) výběžků pro EPON krájený 35° nožem s vibracemi ukazuje průměrnou hodnotu šířek čtyřnásobně menší než měření prováděné AFM. Toto vše je jasným důkazem, že tloušťka napařené vrstvy byla příliš velká. Ideální tloušťka napařené vrstvy by měla být okolo 1 nm. Problém v napaření spočívá v mnoha faktorech jako je, žhavicí proud, kvalita vakua, množství odpařovaného drátku, kvalita spojení namotaného drátku na nosníku určující výměnu tepla, všechny tyto faktory vedou k obtížné reprodukovatelnosti napařované vrstvy. Z tohoto důvodu se v běžné laboratorní praxi používá přímé měření aktuálně napařené tloušťky pomocí oscilujícího krystalu, který mění svoji frekvenci vlivem zvýšení hmotnosti v důsledku napařené vrstvy. Touto metodou měření není v laboratoři elektronové mikroskopie vybavena napařovací aparatura JEOL JEE 4C. Z důvodu, že tloušťka napařené vrstvy ovlivňuje výsledné měření šířek výběžků, a také z důvodu, že měření šířek výběžků ze snímků pořízených v SEM nepřináší žádné nové informace oproti AFM jsem po domluvě se školitelem specialistou Ing. Janou Nebesářovou, CSc. v tomto měření dále nepokračoval.

5.5 Rozbor minimalizace vlivu zalévacího media na výsledný obraz

V první řadě je nejlépe, když zalévací medium bude vykazovat minimální zvlnění vzniklé krájením. Toho lze docílit použitím nejostřejšího možného nože a zalévacího media s největší hustotou a tvrdostí. Jak bylo uvedeno v kapitole (3.1) obě zalévací media obsahují anhydridy sloužící jako tvrdidlo, jejichž množství v zalévacím mediu ovlivňuje jeho výslednou tvrdost. Pro EPON je to NMA a pro Spurr je to Derr 736. Další možností by mohlo být krájení za kryo teplot, při kterých se zvýší tvrdost krájeného bločku. Pro krájení co nejméně zvlněných řezů je vhodné používat co nejmenší rychlosti krájení.

Pokud snímek z LV TEM obsahuje v obrazu patrné pravidelné zvlnění (Příloha 25), tak jej lze velice dobře odstranit pomocí 2D Fourierovy transformace. V obraze centrovaného výkonového spektra (Příloha 26) se zvlnění objeví jako světlý pruh otočený oproti originálnímu snímku o 90°. Tento pruh lze odstranit začerněním a pomocí zpětné Fourierovy transformace převést výkonové spektrum na původní obraz zbavený frekvencí, které byly ve výkonovém spektru začerněny (Příloha 27).

Předmětem dalšího zkoumání může být vytvoření aplikace využívající poznatků o zvlnění preparátů z této práce za účelem odstranění zvlnění ze snímku.

6 Závěr:

- Podařilo se mi zobrazit povrchovou morfologii a ultrastrukturální vzhled zalévacích médií EPON a Spurr krájených nožem 45°, 35° bez vibrací a 35° s vibracemi mikroskopu AFM a LV EM 5.
- Zhodnotil jsem vliv povrchové struktury pryskyřic na obrazový kontrast LV TEM, jehož průměrná hodnota nepřekračuje 12 %. Kontrast biologického rostlinného materiálu začíná na hodnotě 11%, v místě buněčné cytoplasmy a v místě buněčné stěny je 42,8 % a nejvyšší kontrast je způsoben škrobovým zrnem a to 62,2 %
- Podařilo se zobrazit povrchovou morfologii zalévacího media v SEM, která byla značně ovlivněna přípravou preparátu danou vybavením pro vakuové napařování – stínování.
- Podařilo se mi změřit závislost výšky výběžků na úhlu břitu nože, která má klesající tendenci se zmenšujícím se úhlem břitu nože.
- Podařilo se mi změřit závislost šířky výběžků na úhlu břitu nože, která má klesající tendenci se zvětšujícím se úhlem břitu nože.
- Podařilo se mi změřit hustoty jednotlivých zalévacích médií, pro EPON je hustota $\rho = 1,191 \pm 0,006 \text{ gcm}^{-3}$ a hustota pro Spurr je $\rho = 1,151 \pm 0,005 \text{ gcm}^{-3}$
- Podařilo se mi změřit mikrotvrlosti jednotlivých zalévacích médií, pro EPON je $MH_v = 124,83 \pm 1,6 \text{ MPa}$ a Spurr $MH_v = 110,9 \pm 1,3 \text{ MPa}$.

7 Použitá literatura - zdroje:

- [1] **P. Lafferaty**, Neviditelný svět, Edice věda, Praha: Orbis Pictus 1993
- [2] **T.Kalina, V. Pokorný**, Základy elektronové mikroskopie pro biology, Univerzita Karlova: Praha 1981
- [3] Olympus, [Online] <http://microscope.olympus-global.com>
- [4] **D. B. Williams, C. B. Carter**, Transmission Electron Microscopy, A Textbook for Materiál Science, New York and London: Plenum Press 1996
- [5] **A. Beiser**, Úvod do moderní fyziky, Praha: Academia 1975
- [6] **P. Bartl, A. Delong, V. Drahoš, I. Hrivňák, M. Rosenberg**: Metody elektronové mikroskopie, Praha: Nakladatelství Československé akademie věd 1964
- [7] **V. Hulínský, K. Jurek**: Zkoumání látek elektronovým paprskem, Praha: SNTL Praha 1982
- [8] **L. Eckrtová, L. Frank, A. Delong, Z. Knor, V. Kolařík, J. Komrska, M. Láznička, M. Lenc, B. Lencová, F. Máca, M. Rozsival, J. Wild**, Metody analýzy povrchů – elektronová mikroskopie a difrakce, Praha: Academia 1996
- [9] **T. Bílý**, Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie, Bakalářská práce, České Budějovice: 2007
- [10] **V. Kolařík**, Zdroje elektronů, Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, Prezentace, Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2009
- [11] JSM-7401F, Field emission scanning electron microscope, Uživatelský manuál, Tokyo: JEOL Ltd. 2005
- [12] **P. Wandrol**, Rastrovací elektronový mikroskop v biologickém použití, Biologické preparáty v elektronových mikroskopech, Prezentace, České Budějovice: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2006
- [13] **J. Šavel**, Elektrotechnologie, Materiály technologie a výroba v elektronice a elektrotechnice, Praha: Ben 2006

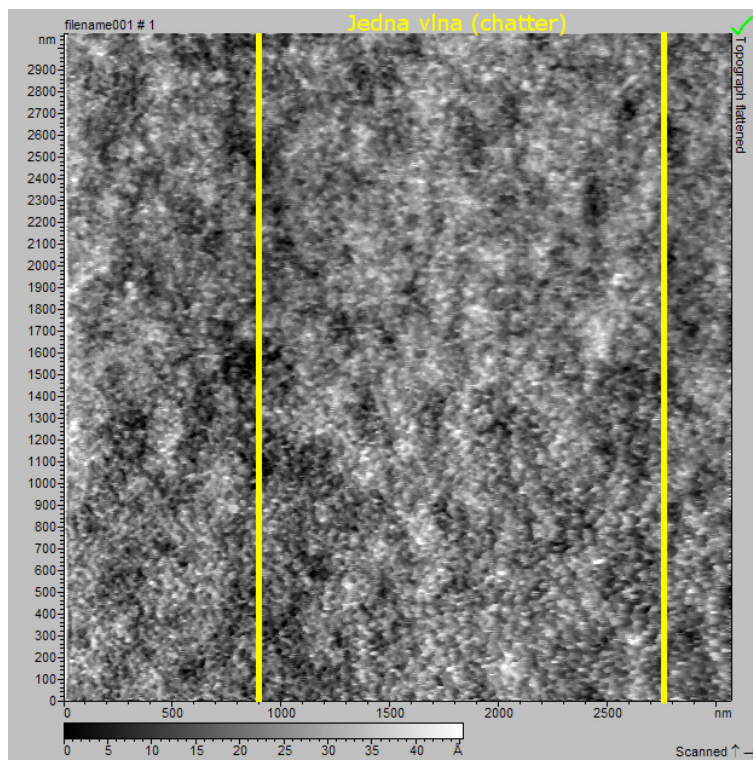
- [14] **L. Dupák**, Vakuová technika a technologie, Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, Prezentace, Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2009
- [15] Pfeiffer vakuum, [Online] <http://www.pfeiffer-vacuum.com>
- [16] **L. Reimer**, H. Kohl: Transmission Electron Microscopy, Physics of Image Formation, New York: Springer Science+Business Media, LLC 2008
- [17] **J. M. Zuo**, Electron Detection Characteristics of a Slow-Scan CCD Camera, Imaging Plates and Film, and Electron Image Restoration, 2000, Microscopy research and technique 49:245–268
- [18] Wikipedia, [Online] <http://www.wikipedia.org>
- [19] **H. Stahlberg**: Data Collection in TEM, MCB, CBS, UC-Davis, prezentace, Centrum for Cellular Imaging and Nano Analitics, University Basel 2008
- [20] **I. Müllerová**: Základy rastrovací elektronové mikroskopie pomalými a velmi pomalými elektrony, Podzimní škola základů elektronové mikroskopie Prezentace, Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2009
- [21] **G. H. Michler**, Electron Microscopy of Polymers, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2008
- [22] **L. Reimer**, Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 1985, 1998
- [23] **R. Autrata**, Detekce signálních elektronů v rastrovací elektronové mikroskopii, Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, Prezentace, Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2003
- [24] **P. Štěpán**, Nízkovoltový prozařovací elektronový mikroskop, Jemná mechanika a optika, Vědecko-technický časopis, Nakladatelství Fyzikálního ústavu AVČR 2/2005
- [25] **A. Delong**, Low voltage TEM, Elektron Microscopy, Volume 1. EUREM 92, Spain, Granada: 1992
- [26] **A. Delong**, Nízkovoltový prozařovací elektronový mikroskop, Patentová přihláška 1992-1574, Brno: Delong Instruments 1992

- [27] **A. Delong**, K. Hladil, V. Kolařík, P. Pavelka, Low voltage electron microscope I. – design, Eurem 12, Czech Republic, Brno: 2000
- [28] **A. Delong**, K. Hladil, V. Kolařík, A Low Voltage Transmission Electron Microscope, European Microscopy and Analysis: 1994
- [29] LV EM 5, Operating manual, Uživatelský manuál, Delong Instruments: Brno
- [30] **E. Coufalova**, A. Delong, Low voltage electron microscope II. – Applications, Eurem 12, Czech Republic, Brno: 2000
- [31] **A. Delong**, E. Coufalova, P. Stepan, Low Voltage STEM, ICEM – 15, Durban: 2002
- [32] **L. F. Drummy**, J. Yang, D.C. Martin, Low-voltage electron microscopy of polymer and organic molecular thin films, Ultramicroscopy 99 (2004), 247–256
- [33] **A. Jablonski**, NIST Electron Elastic-Scattering Cross-Section Databáze, Program NIST standard reference Databáze 64, Version 3.2, 2010
- [34] **F. Lednický**, E. Coufalová, J. Hromádková, A. Delong, V. Kolařík, Low-voltage TEM imaging of polymer blends, Polymer 41 (2000), 4909–4914
- [35] **V. Starý**, J. Nebesářová, Contrast of karbon in low-voltage electron microscopy – Monte-Carlo simulation, Proceedings of 8th Multinational Congress on Microscopy, p 97-98, Praha: 2007
- [36] **V. Starý**, J. Nebesářová, Contrast of karbon in low-voltage electron microscopy – Monte-Carlo simulation, Journal of Physics: Konference Series 126 (2008), IOP Publishing Ltd, 2008
- [37] **J. Nebesářová**, M. Vancová, It is necessary to stain ultrathin sections for low voltage electron microscope?, Proceeding of 13th European Microscopy Congress, Antwerp, Belgium, 2004
- [38] **N. B. Matsko**, W. Grogger, B. Stadlober, Correlative AFM and TEM of Soft Materiál, About the Synergetic Use of Two Analytical Techniques, Correlative Microscopy, G.I.T. Imaging and Microscopy, 1/2008
- [39] **V. Hlaváč**, Fourierova transformace v 1D a 2D, Prezentace, Praha: ČVUT

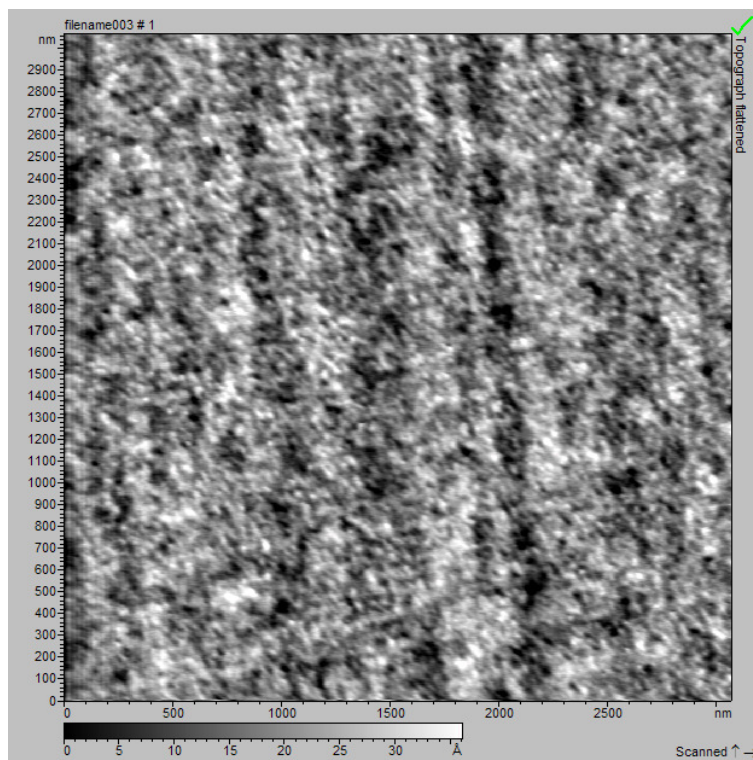
- [40] **J. Nebesářová**, M. Vancová, The first experience with the specimen preparation for low-voltage transmission electron microscope, *Microscopy 2002*, Proceedings of the 2nd Annual Meeting of the Czechoslovak Microscopy Society, Czech Republic, GRAPHICAL Brno: 2002
- [41] **J. Nebesářová**, M. Vancová, První zkušenosti s oscilujícím diamantovým nožem při přípravě ultratenkých řezů z biologických vzorků pro TEM, *Mikroskopie 2006*, Proceedings of the Annual Meeting of the Czechoslovak Microscopy Society, Nové Město na Moravě: 2006
- [42] **G Binning**, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel, *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*, IBM Zurich Research Laboratory, Switzerland, The American Physical Society, 1982
- [43] Probes and Accessories, Bruker, [Online] <http://www.brukerafmprobes.com>
- [44] **B. Capella**, G. Dietler, Force–distance curves by atomic force microscopy, *Surface Science Report 34*, 1999
- [45] **R. Kubínek**, M. Vůjtek. M. Mašlán, *Mikroskopie skenující sondou*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc: 2003, dostupná online <http://atmilab.upol.cz/mss/>
- [46] *AC Mode User's Manual*, Molecular Imaging, Phenix, 1997
- [47] **R. García**, J. Tamayo, M. Calleja, F. García, Phase contrast in tapping-mode scanning force microscopy, *Applied Physics A Materiále, Science & Processing*, Springer-Verlag 1998
- [48] *PicoSPM User's Manual, Version 2.4*, Molecular Imaging, Phenix
- [49] **J. Nebesářová**, Strategie přípravy biologických preparátů pro EM, Podzimní škola základů elektronové mikroskopie, Prezentace, Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR 2009
- [50] **A. W. Robards**, A. J. Wilson, *Procedures in Electron Microscopy*, Wiley and Sons, Ltd. 1993
- [51] **SPI**, Structure Probe Inc., [Online] <http://www.2spi.com/>
- [52] **D. Studer**, H. Gnaegi, Minimal compression of ultrathin sections with use of an oscillating diamond knife, *Journal of Microscopy*, Vol. 197, 2000

- [53] **P. Baton**, P. West, Atomic Force Microscopy, Oxford UNIVERSITY PRESS, Oxford: 2010
- [54] BAL-TEC AG, Coatings and Shadow Casting Techniques for Electron Microscopy and Improvements in Coating Quality, 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, 2000
- [55] Mc Donnell Souhlas Astronautics Company Huntington Beach, SEM/TEM Fractography Hand Book, Materials and Ceramics Information Center, California 1975
- [56] **M. Brookes**, skript s funkcí findpeaks v 1.5, [Online], <http://www.ee.ic.ac.uk/hp/staff/dmb/voicebox/doc/voicebox/findpeaks.html>, 2010
- [57] **E. Peli**, Contrast in complex images, Optical Society of America, Vol. 7, 1990
- [58] **A. E. Efimov**, A. G. Tonevitsky, M. Dittrich, N. B. Matsko, Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer complex, Royal Microscopical Society, Vol. 226, 2007

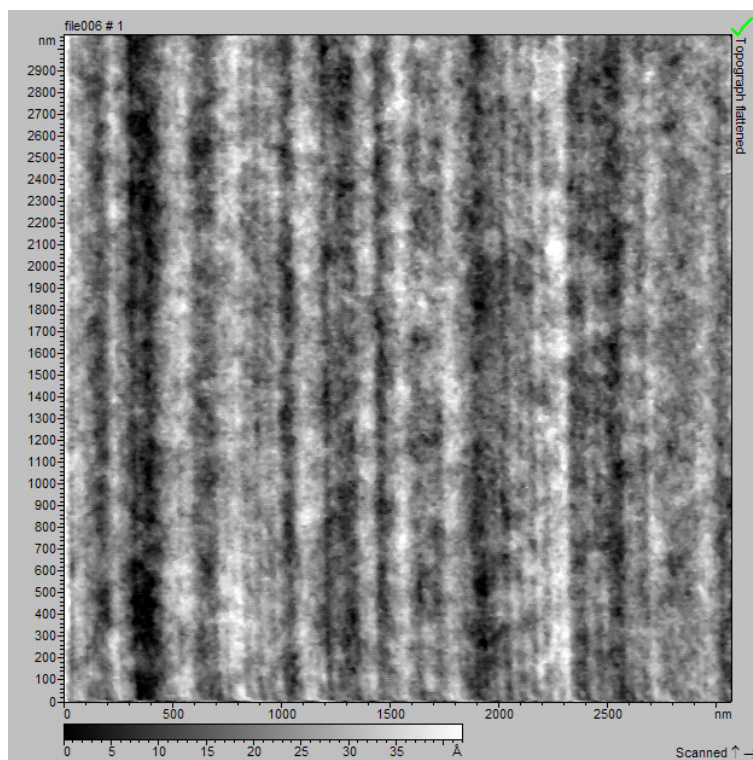
8 Přílohy:



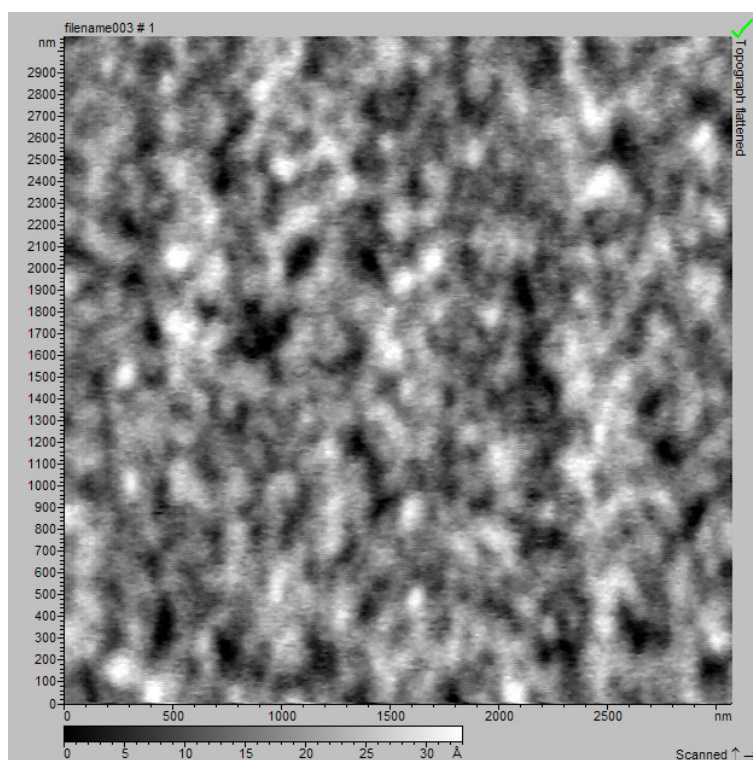
Příloha 1: Originální snímek z AFM – EPON 35° bez vibrací



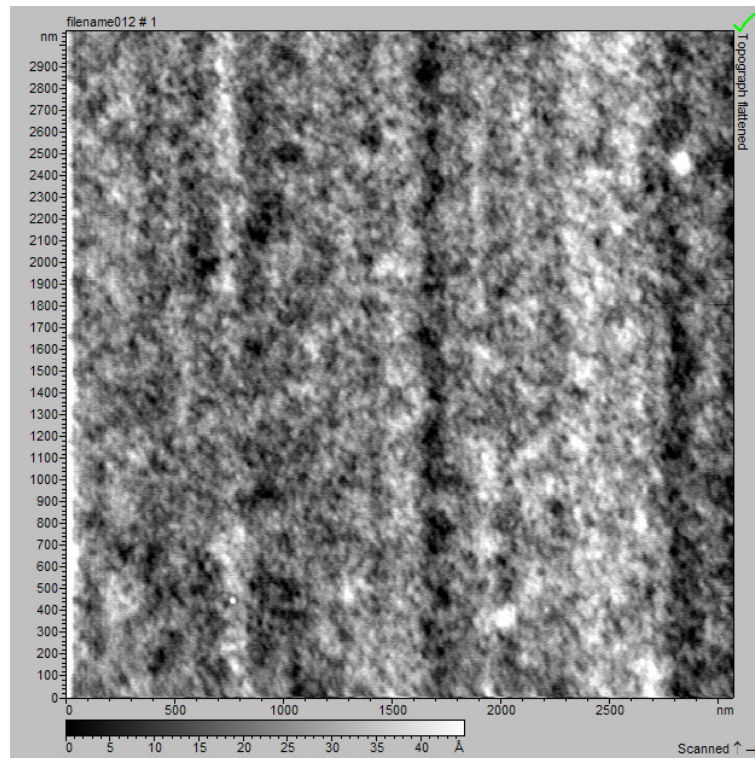
Příloha 2: Originální snímek z AFM – EPON 35° s vibracemi



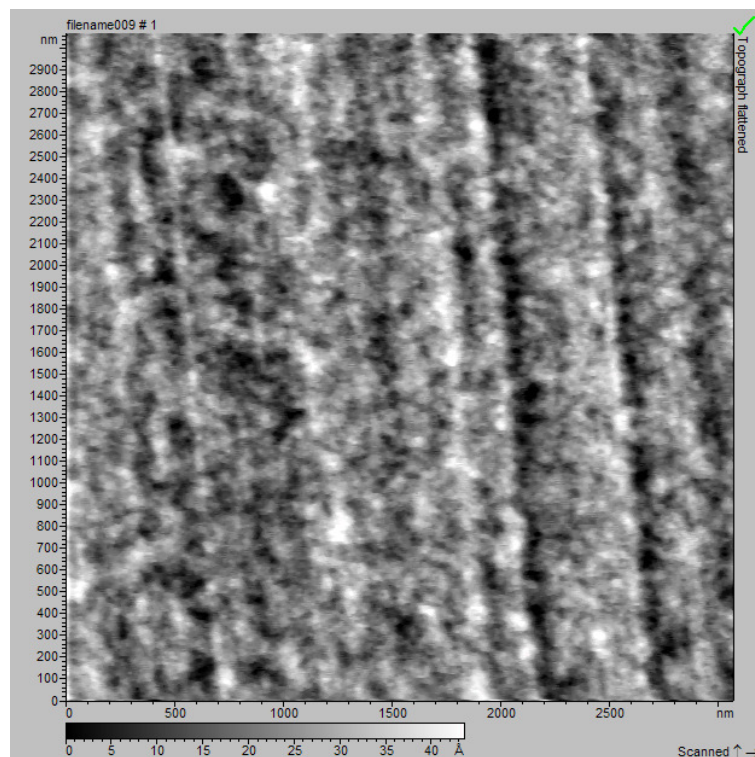
Příloha 3: Originální snímek z AFM – EPON 45°



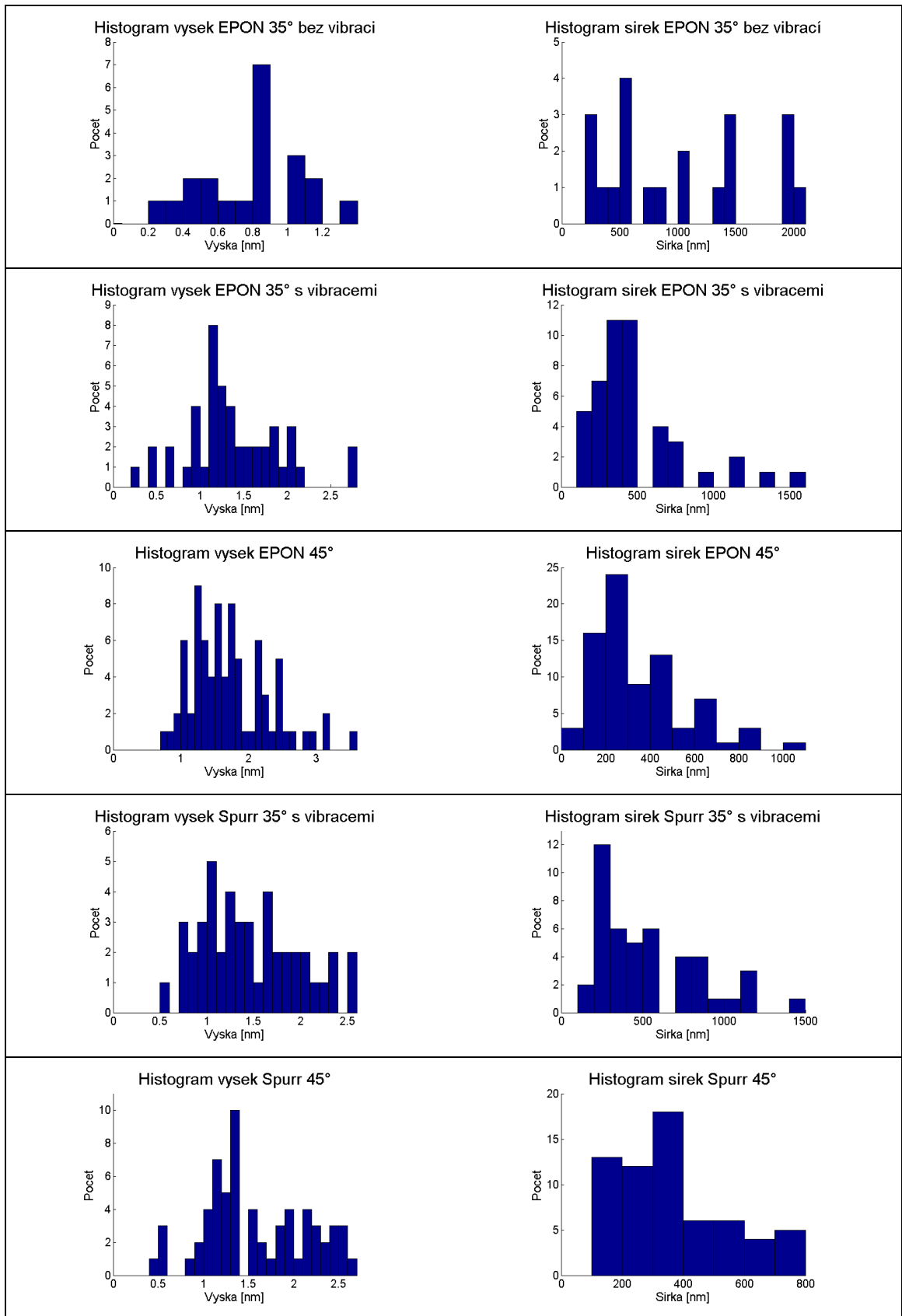
Příloha 4: Originální snímek z AFM – Spurr 35° bez vibrací



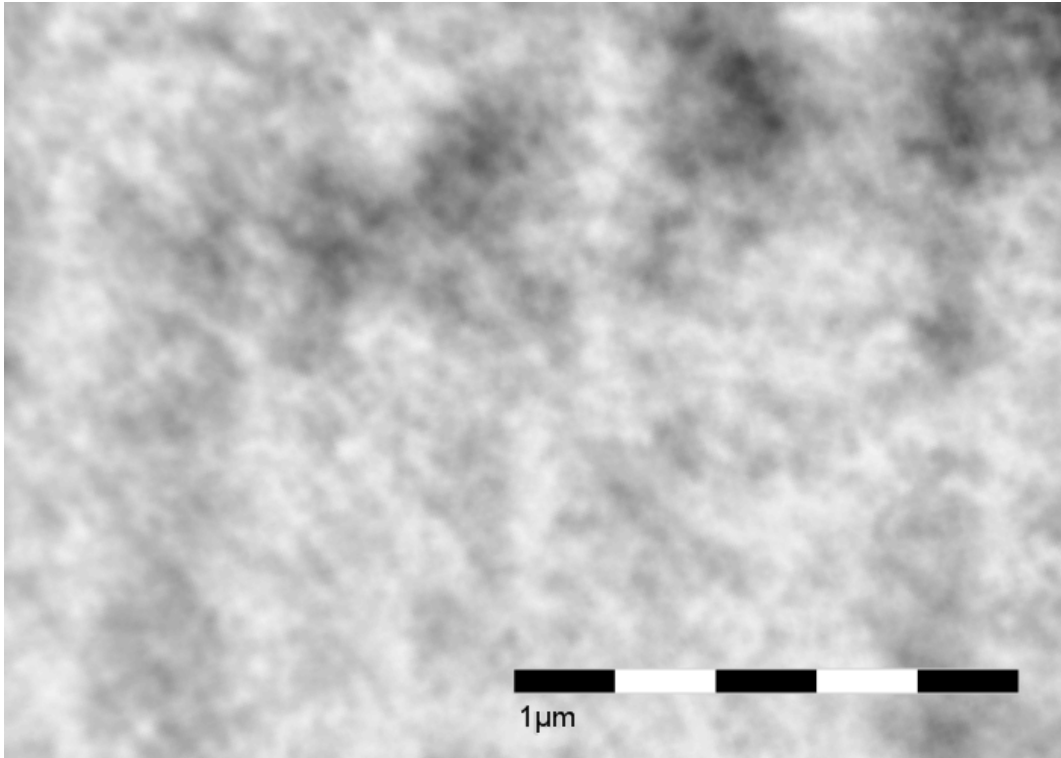
Příloha 5: Originální snímek z AFM – Spurr 35° s vibracemi



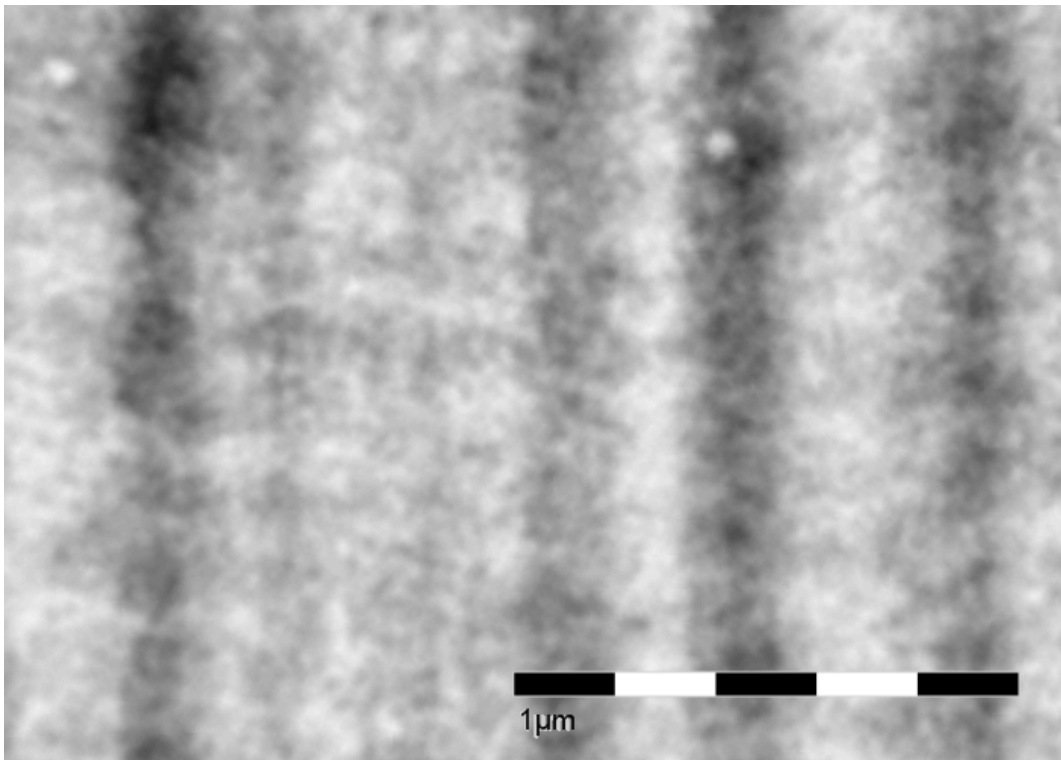
Příloha 6: Originální snímek z AFM – Spurr 45°



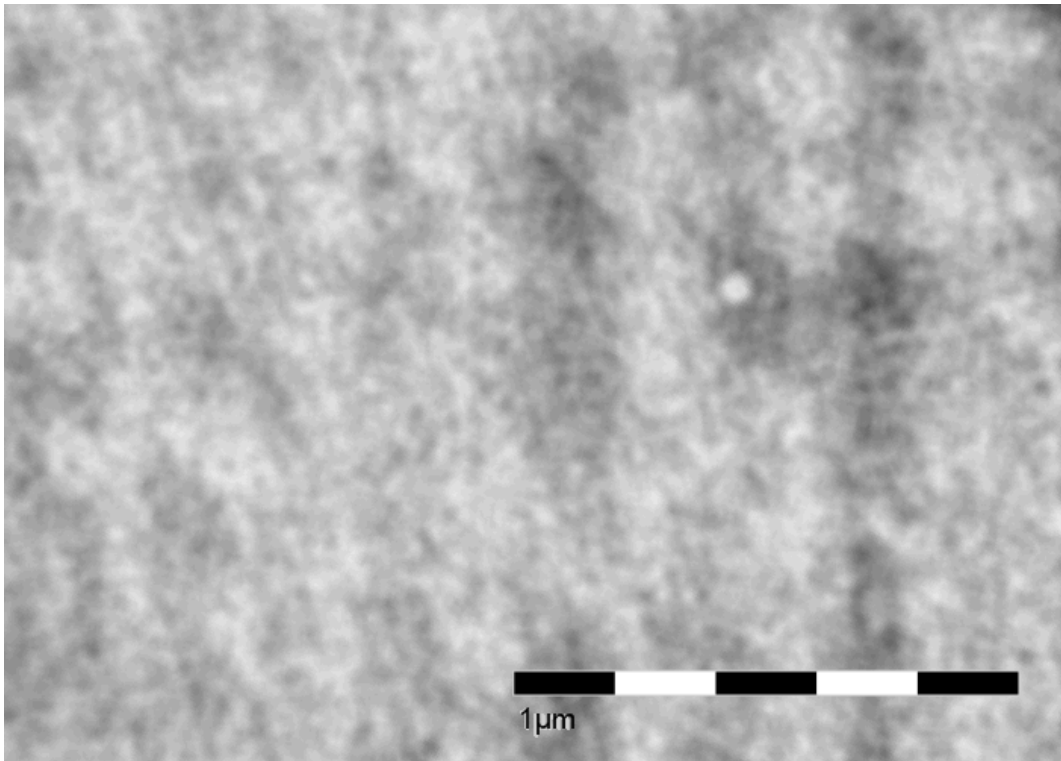
Příloha 7: Histogramy analýzy snímků z AFM



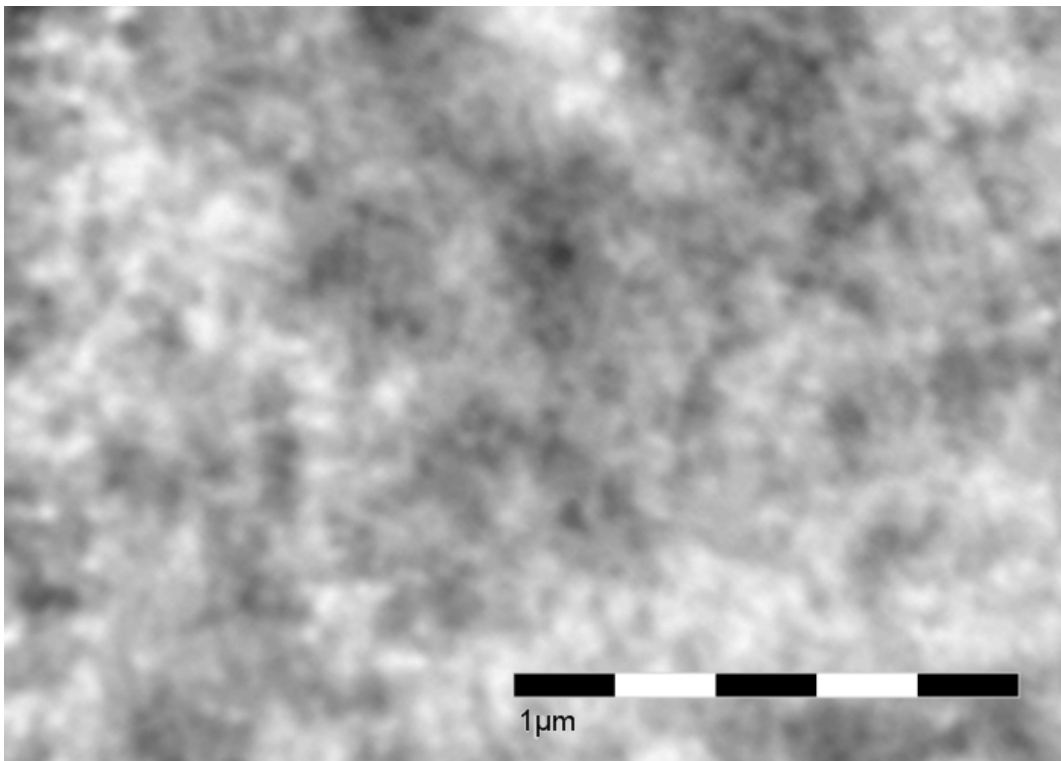
Příloha 8: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – EPON 35° bez vibrací



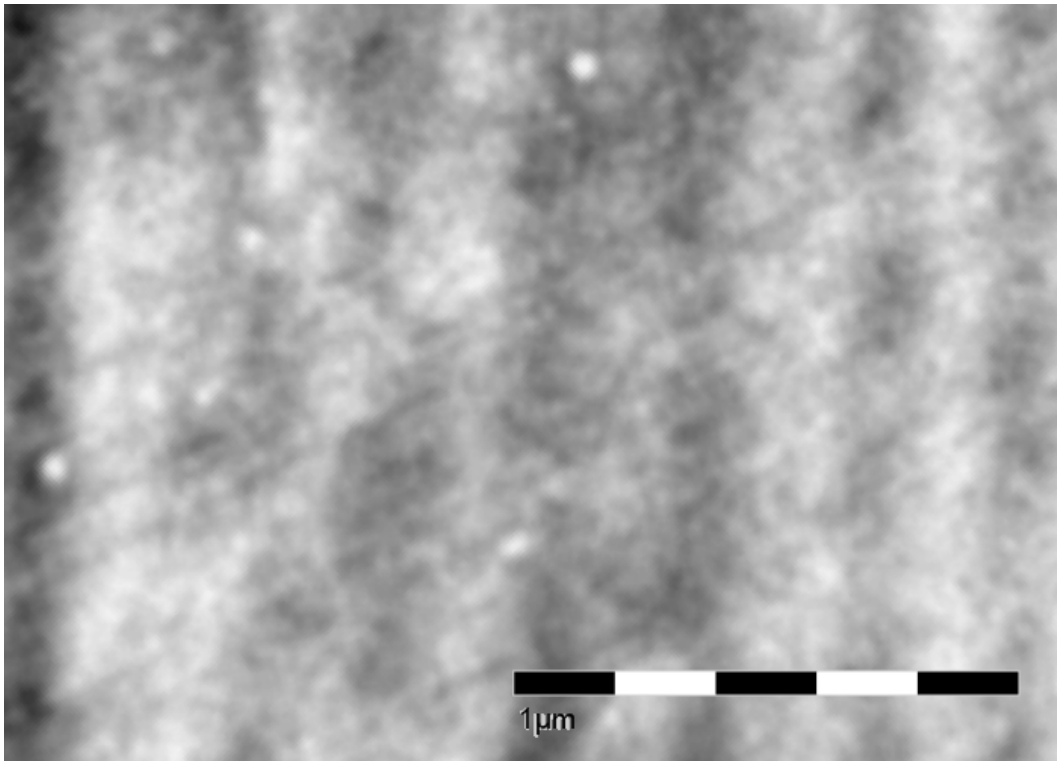
Příloha 9: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – EPON 35° s vibracemi



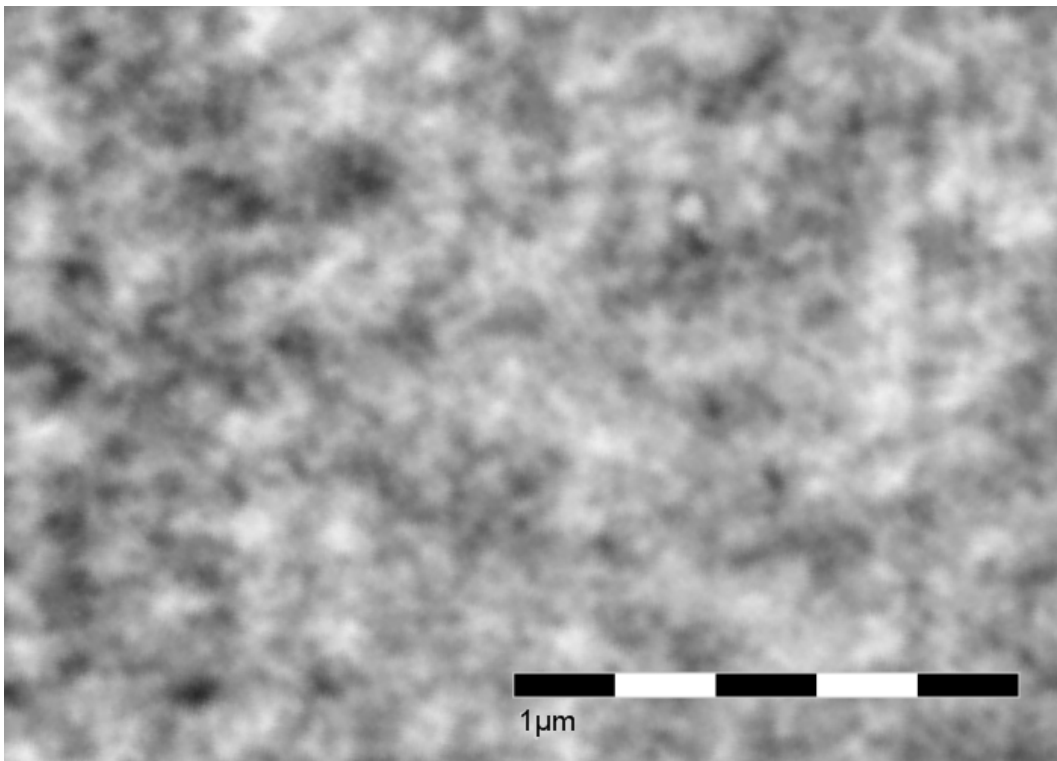
Příloha 10: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – EPON 45°



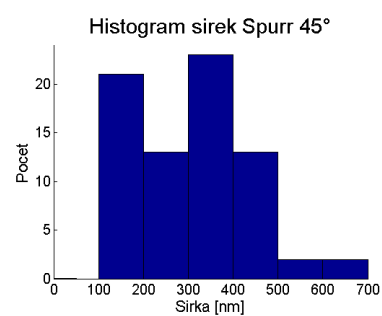
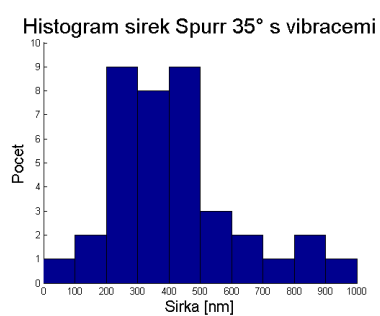
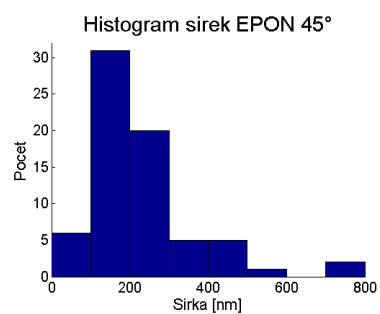
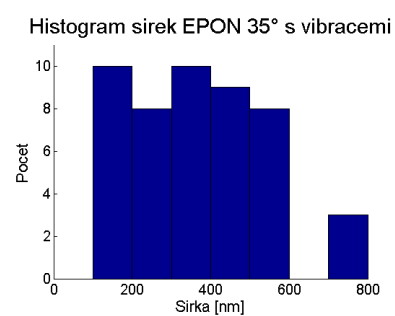
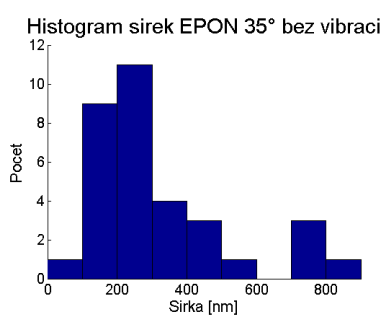
Příloha 11: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – Spurr 35° bez vibrací



Příloha 12: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – Spurr 35° s vibracemi



Příloha 13: Upravený a invertovaný snímek z LV TEM – Spurr 45°



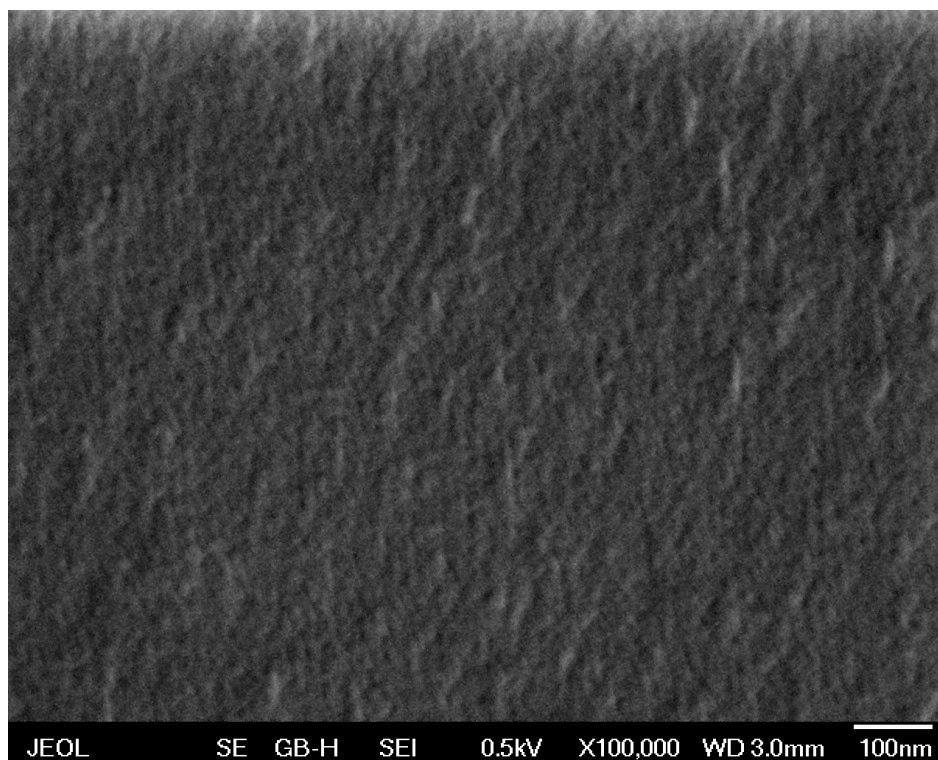
Příloha 14: Histogramy analýzy snímků z TEM

EPON krájený 35° nožem bez vibrací					
Cas [ms]	Původní L_{min0}	L_{min1} po odečtení	L_{max1} po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
1500	369	23	83	0,071	0,079
1500	286	18	45	0,043	0,047
1500	290	34	72	0,055	0,062
1500	294	17	46	0,045	0,050
1500	236	15	36	0,040	0,045
1000	580	13	118	0,081	0,097
1500	1678	69	472	0,103	0,115
EPON krájený 35° nožem s vibracemi					
Cas [ms]	Původní L_{min0}	L_{min1} po odečtení	L_{max1} po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
2500	1235	224	584	0,110	0,113
2500	516	8	72	0,058	0,059
2500	554	11	63	0,044	0,045
2500	669	0	82	0,058	0,059
2500	793	11	89	0,046	0,048
2500	750	12	100	0,055	0,056
2500	1254	26	192	0,061	0,063
2500	1136	0	169	0,069	0,071
2500	705	7	103	0,063	0,065
2500	1152	0	178	0,072	0,074
2500	520	5	67	0,056	0,057
2500	1542	40	273	0,069	0,070
EPON krájený 45° nožem					
Cas [ms]	Původní L_{min0}	L_{min1} po odečtení	L_{max1} po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
1500	414	17	80	0,068	0,076
1500	220	11	32	0,043	0,048
1500	485	4	94	0,084	0,094
1500	324	35	62	0,036	0,040
1500	343	22	44	0,029	0,033
1500	370	7	37	0,038	0,043
1500	312	8	38	0,045	0,050
1500	339	12	36	0,033	0,037
1500	221	9	31	0,046	0,051
1500	202	10	26	0,036	0,040

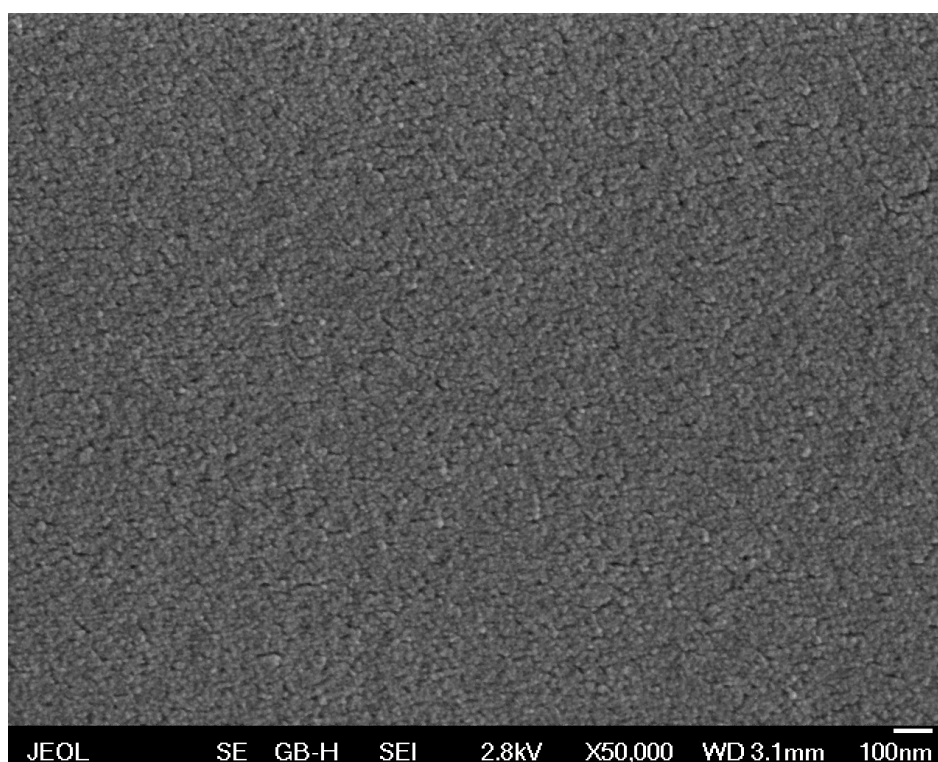
Příloha 15: Souhrn kontrastu snímků pro EPON

Spurr krájený 35° nožem bez vibrací					
Cas [ms]	Původní $L_{\min 0}$	$L_{\min 1}$ po odečtení	$L_{\max 1}$ po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
800	192	27	70	0.089	0.111
800	240	3	82	0.140	0.173
800	275	29	100	0.105	0.130
800	247	40	118	0.120	0.148
800	254	2	58	0.099	0.122
800	248	44	86	0.067	0.083
800	306	22	83	0.085	0.105
800	257	24	87	0.101	0.125
800	215	60	119	0.097	0.120
800	246	76	126	0.072	0.089
800	228	25	60	0.065	0.080
800	222	23	74	0.094	0.117
Spurr krájený 35° s vibracemi					
Cas [ms]	Původní $L_{\min 0}$	$L_{\min 1}$ po odečtení	$L_{\max 1}$ po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
2500	994	42	245	0.089	0.092
2500	772	1	96	0.058	0.059
2500	813	12	108	0.055	0.056
2500	886	6	142	0.071	0.073
2500	840	114	269	0.075	0.077
4000	619	4	80	0.057	0.055
5000	1565	16	184	0.050	0.047
5000	1779	54	413	0.089	0.083
5000	409	42	78	0.038	0.036
5000	507	10	96	0.077	0.071
5000	442	29	108	0.077	0.072
5000	710	13	100	0.057	0.053
Spurr krájený 45°					
Cas [ms]	Původní $L_{\min 0}$	$L_{\min 1}$ po odečtení	$L_{\max 1}$ po odečtení	Kontrast K	Přepočítaný K_p
2000	1347	41	374	0.107	0.114
2000	1276	0	321	0.112	0.119
2000	1280	61	299	0.082	0.087
2000	1017	42	243	0.087	0.092
2000	1062	0	152	0.067	0.071
800	879	14	266	0.124	0.153
800	859	12	166	0.081	0.101
800	774	40	213	0.096	0.119
800	621	26	129	0.074	0.091
800	606	77	177	0.068	0.085
3000	670	8	149	0.094	0.094
2000	1167	48	201	0.059	0.063

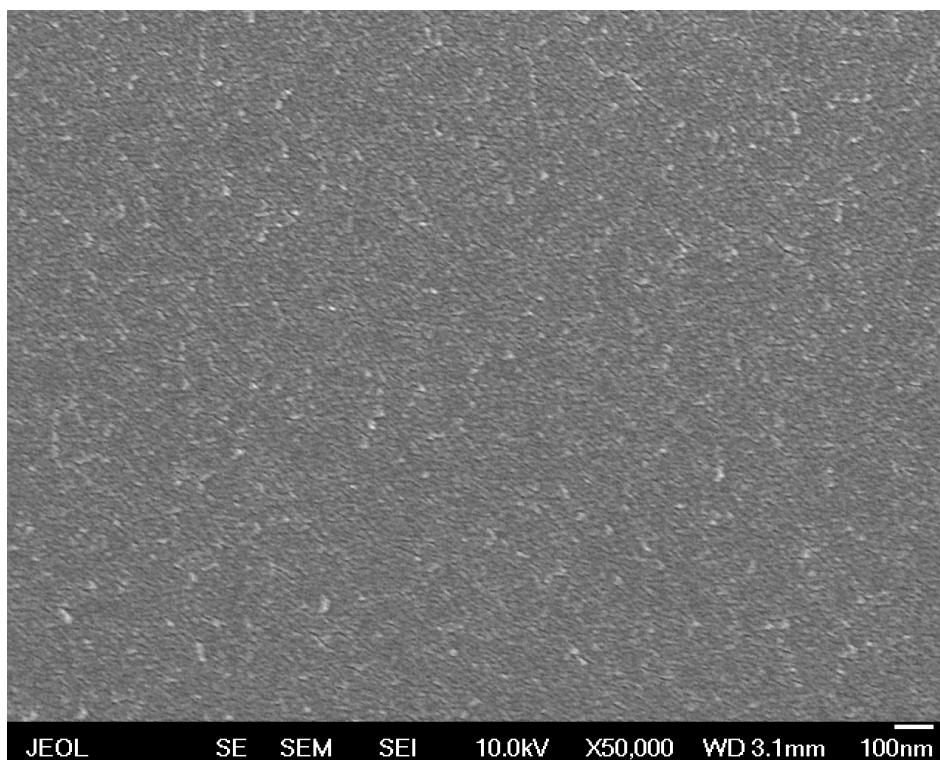
Příloha 16: Souhrn kontrastu snímků pro Spurr



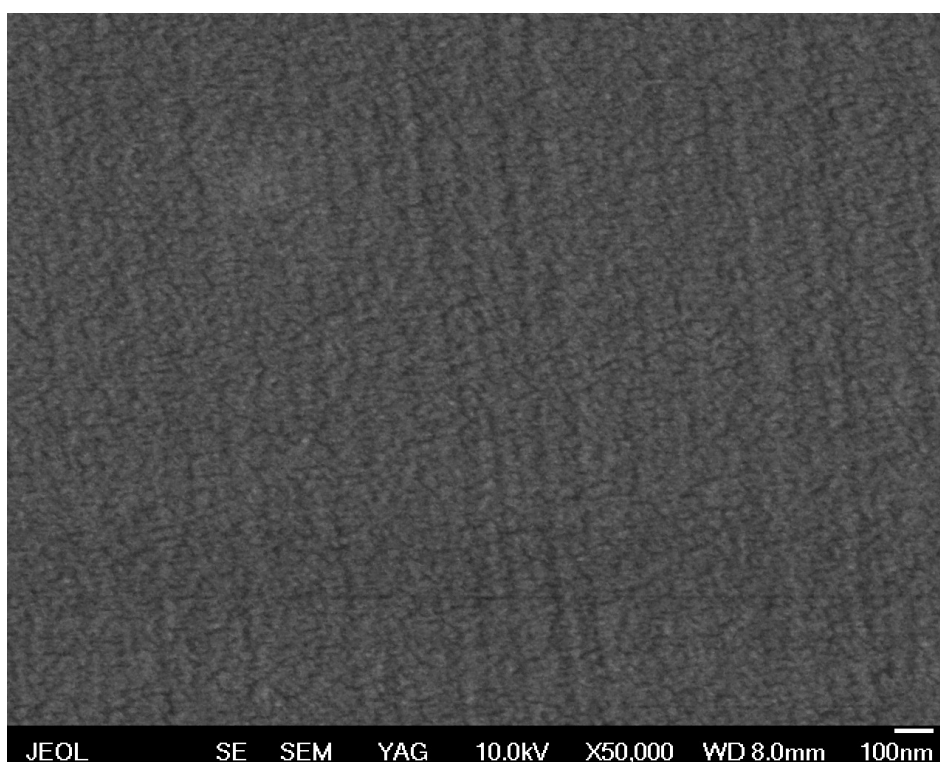
Příloha 17: Povrch řezu EPONu krájeného 35° nožem s vibr. (obraz SE, $E_0 = 0,5$ keV)



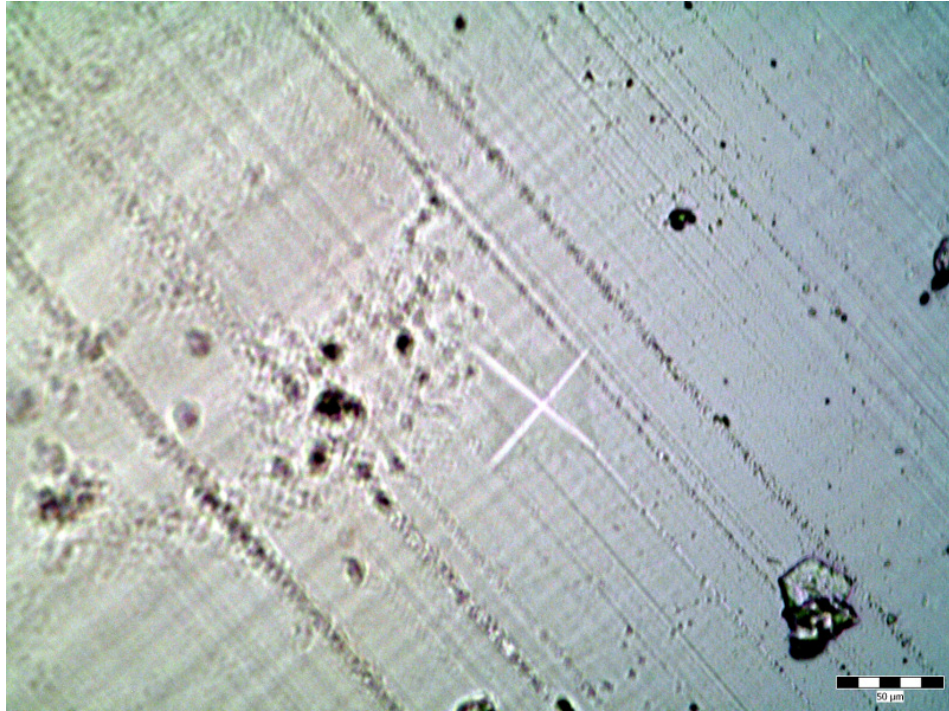
Příloha 18: Povrch řezu EPONu krájeného 35° nožem s vibr. (obraz SE, $E_0 = 2,8$ keV)



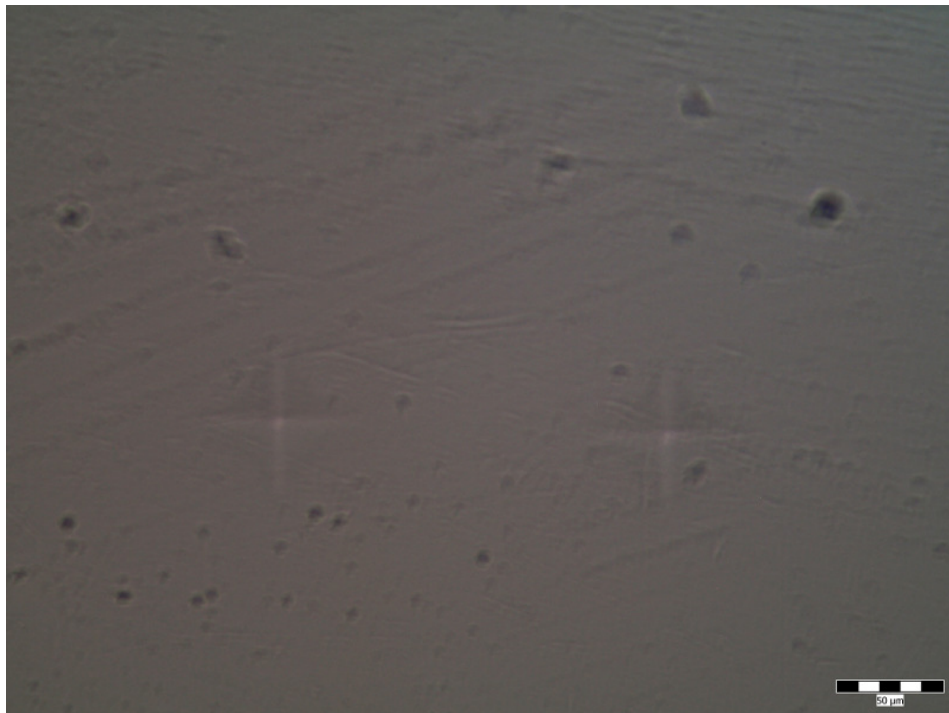
Příloha 19: Povrch řezu EPONu krájeného 35° nožem s vibr. (obraz SE, $E_0 = 10$ keV)



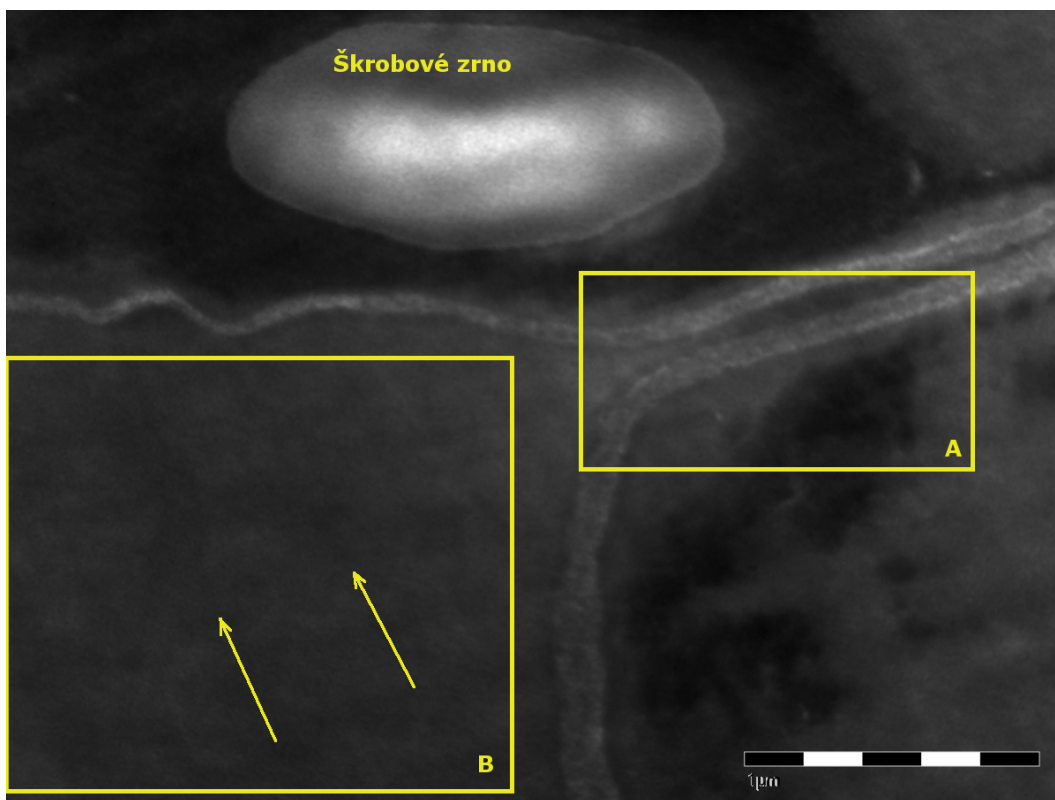
Příloha 20: Povrch řezu EPONu krájeného 35° nožem s vibr. (obraz BSE, $E_0 = 0,5$ keV)



Příloha 21: Mikrovpich do zalévacího media EPON



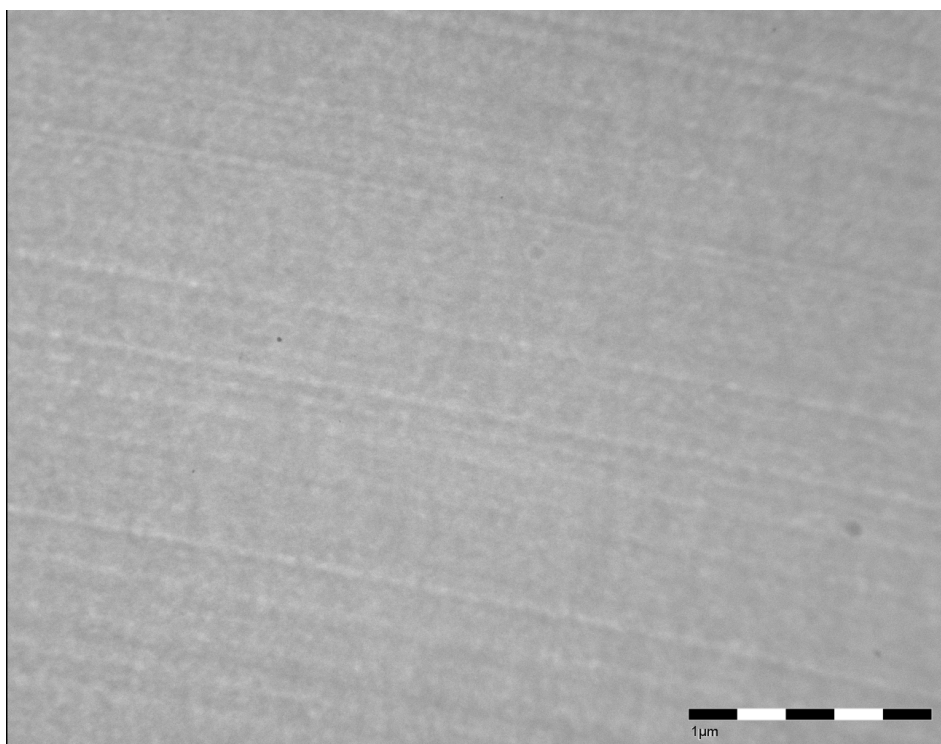
Příloha 22: Mikrovpich do zalévacího media Spurr



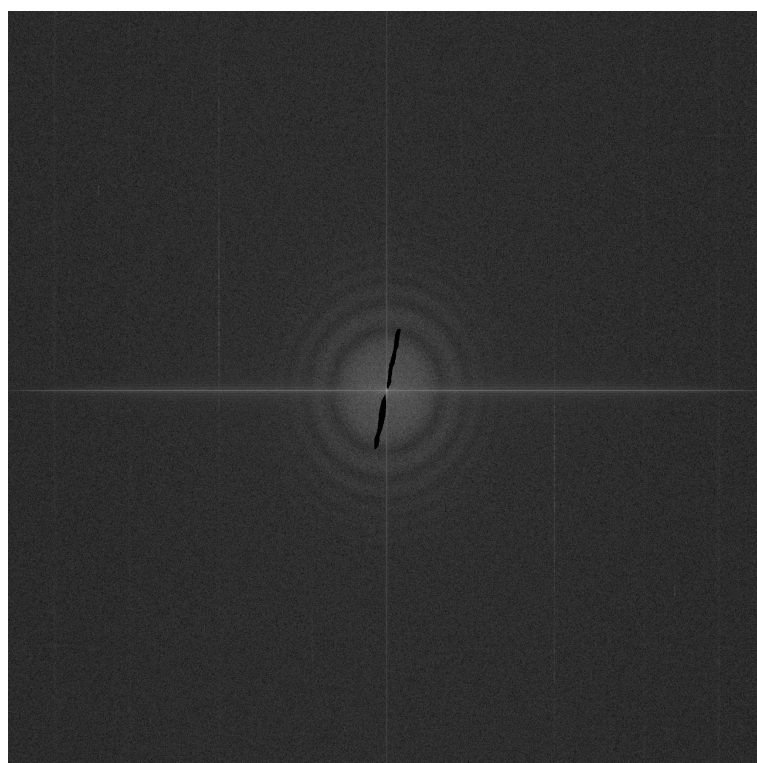
Příloha 23: Rostlinná tkáň tabáku

Oblast	čas [ms]	min.	max.	K
Oblast chatteru (B)	800ms	460	574	0,110
Cely snímek	800ms	336	1440	0,622
Oblast buněčné stěny (A)	800ms	385	960	0,428

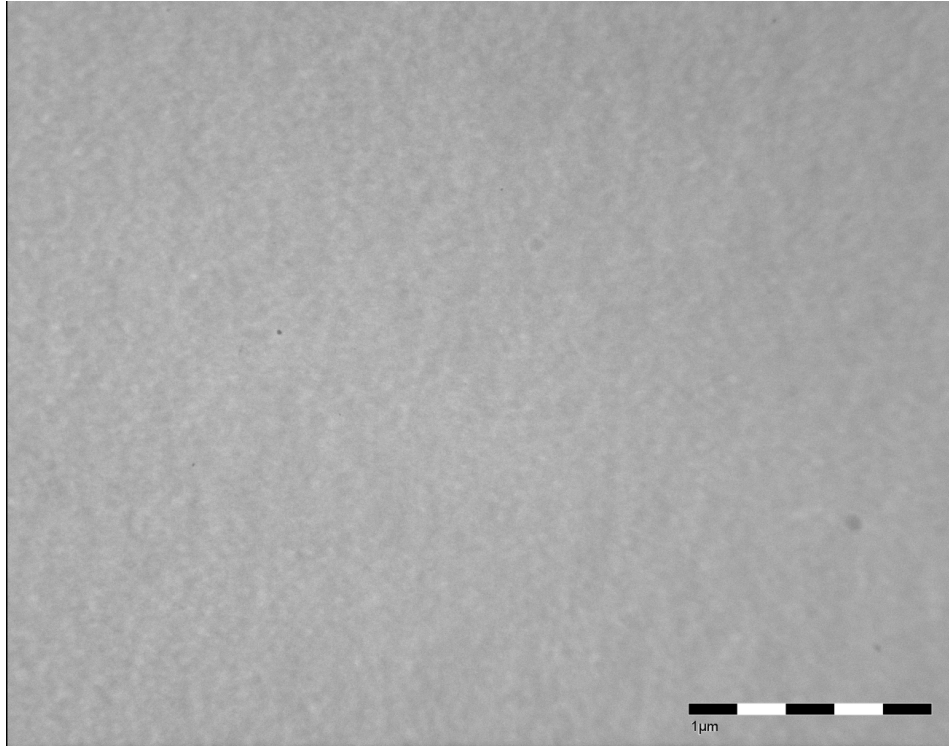
Příloha 24: Kontrast jednotlivých oblastí snímku (Příloha 23)



Příloha 25: Snímek EPON krájeného nožem 35° s vibracemi



Příloha 26: Obraz Fourierovy transformace



Příloha 27: Snímek vytvořený zpětnou Fourierovo transformací