

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií
Ústav přístrojové techniky AV ČR

Ing. Jitka Káňová

**RASTROVACÍ MIKROSKOPIE
PŘI KRITICKÉ ENERGII ELEKTRONŮ**

**SCANNING MICROSCOPY
AT CRITICAL ENERGY OF ELECTRONS**

ZKRÁCENÁ VERZE PHD THESIS

Obor: Elektrotechnická a elektronická technologie

Školitel: RNDr. Luděk Frank, DrSc.

Oponenti: Prof. Ing. Armin Delong, DrSc.
RNDr. Oldřich Benada, CSc.
Doc. Ing. Josef Jiráček, CSc.

Datum obhajoby: 4. dubna 2002

KLÍČOVÁ SLOVA

nízkoenergiová elektronová mikroskopie - SLEEM, kritická energie, dřevokazné houby, katodová čočka, nabíjení nevodivého preparátu v SEM

KEYWORDS

scanning low energy electron microscopy - SLEEM, critical energy, wood rotting fungi, cathode lens, charging of the non – conductive specimen in SEM

Disertační práce je uložena na oddělení vědy a výzkumu FEKT VUT v Brně, Údolní 53.

© Jitka Káňová, 2002

ISBN 80-214-2118-5

ISSN 1213-4198

OBSAH

1 ÚVOD.....	5
2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	8
3 CÍLE PRÁCE	13
4 METODY A ZPRACOVÁNÍ	14
4.1 Elektronově-optické vlastnosti katodové čočky.....	14
4.1.1 Simulace vlivu nabíjení zorného pole	14
4.1.2 Trajektorie signálních elektronů v poli katodové čočky s nabitým preparátem.....	14
4.1.3 Účinnost detekce a obrazový signál	19
4.1.4 Závislost povrchového potenciálu na velikosti nabitého zorného pole	21
4.1.5 Závěry plynoucí ze simulací.....	22
4.2 Použití metody pro studium nevodivých vzorků živé hmoty	26
4.2.1 Studium přítomnosti těžkého kovu v dřevokazných houbách	26
4.2.2 Výsledky pozorování buněk parazitů při kritické energii elektronů.....	30
5 ZÁVĚR.....	32
SUMMARY.....	34
LITERATURA	37
Seznam publikací.....	37
Curriculum vitae	39

1 ÚVOD

Rozdíl mezi množstvím dopadajících a emitovaných elektronů při zkoumání nevodivých či hůře vodivých vzorků v SEM způsobí v místě dopadajícího svazku náboj. Rovnováha může být dosažena i za cenu vzrůstu rozdílů potenciálu na povrchu vzorku v řádu tisíců voltů. Náboj může zapříčinit radiační poškození vzorku, pole způsobené nábojem má za následek zkreslení obrazu. V poslední době přitahují pozornost metody zkoumající nevodivé vzorky bez vrstvy pokovení, a tedy bez ztráty důležité informace.

V klasických elektronových mikroskopech se tlak v komoře vzorku pohybuje v řádu 10^{-2} až 10^{-3} Pa a níže a odvod náboje zde probíhá prostřednictvím vybíjecího proudu anebo neprobíhá. Řada mikroskopů s vysokým ($10^2 - 10^3$) nebo proměnným tlakem v oblasti komory využívá ke kompenzaci povrchového náboje ionty okolního plynu. Tyto metody označujeme jako LV SEM (low vacuum SEM); zvláštním případem je tzv. environmentální mikroskopie (ESEM) se značně vyšším tlakem a přítomností vodní páry v komoře vzorku. Přístroje jsou velmi perspektivní a umožňují zobrazení vlhkých biologických vzorků. V těchto typech mikroskopů v každém případě ztrácíme významný podíl primárních i signálních elektronů, rozptýlených na molekulách plynu.

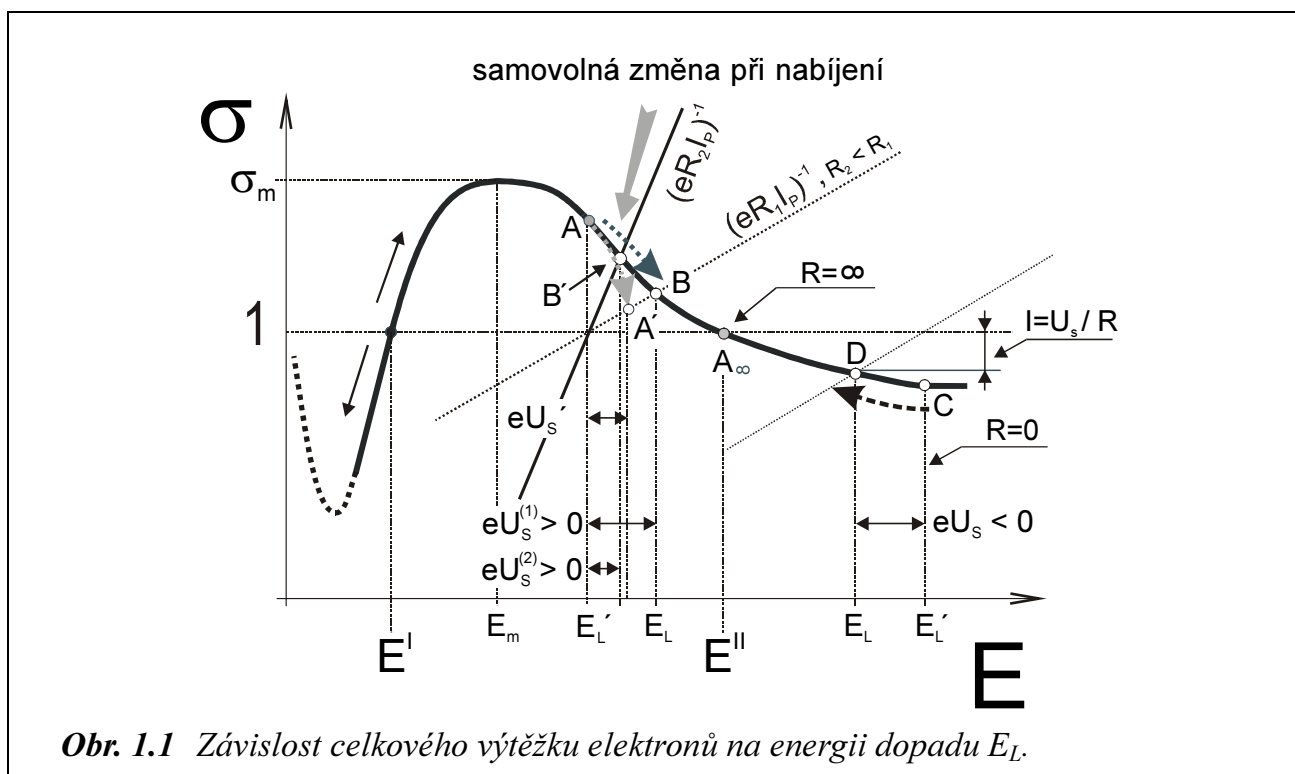
Velkou předností nízkoenergiové mikroskopie vůbec je možnost studia skutečné topografie vzorku. Při nízkých energiích dopadu elektronů navíc významně narůstá úroveň detekovaného signálu a zlepšuje se poměr signálu k šumu v obraze. Pro většinu vzorků existují dvě hodnoty dopadající energie, pro které nastane stabilizací povrchového potenciálu nábojová rovnováha. Tuto skutečnost vysvětluje tvar křivky závislosti celkového výtěžku elektronů ($\sigma = \delta + \eta$) na dopadající energii, který je naznačen na obr. 1.1. Křivka překračuje jednotkovou úroveň pro mnohé vodiče a prakticky pro všechny nevodivé, u nichž výtěžek δ dosahuje standardně vysokých hodnot. Sledováním průběhu křivky celkového výtěžku se změnou dopadající energie si můžeme objasnit změny nabíjení vzorku.

Sledujme nabíjení vzorku v závislosti na dopadající energii podle obr. 1.1. Energie dopadajících elektronů E_L' je $E^I < E_L' < E^{II}$. Interval (E^I, E^{II}) je ten, ve kterém platí $\delta > 1 - \eta$. Předpokládáme, že povrchový potenciál U_S bude kladný. Povrch vzorku tedy přitahuje dopadající elektrony, zvyšuje jejich energii, pracovní bod A se posouvá k vyšším energiím do bodu B a vzniká $U_S > 0$, $U_S = (E_{LB} - E_L')/e$. Při energii E_{LB} je maximální povrchový potenciál závislý na svodovém odporu vzorku a při velmi vysokém odporu může dosáhnout hodnoty $U_{S_{max}} = (E^{II} - E_L')/e$, kdy se pracovní bod nachází v bodě A_∞ .

Na křivku celkového výtěžku je možno pohlížet jako na druh „voltampérové“ charakteristiky, umožňující graficky vyhodnotit povrchový potenciál U_S podle

průsečíku přímky $I_s = U_s / R$ s křivkou celkového výtěžku. Sklon této přímky je charakterizován směrnici $(eRI_s)^{-1}$.

Vliv neohmického charakteru odporu vzorku může vést ke stanovení chybných hodnot povrchového potenciálu. Je ovšem třeba si uvědomit, že v případě vzorku izolantu není při automatizovaném měření možné zjišťovat indukovaný náboj měřením proudu vzorkem a změnou dopadající energie nastavovat jeho nulovou hodnotu. Zbývají tedy pouze nepřímé metody zjišťování stavu nenabíjení.



Obr. 1.1 Závislost celkového výtěžku elektronů na energii dopadu E_L .

Pro velikost povrchového kladného náboje je důležitá skutečnost, že elektrony s kinetickou energií menší než eU_s , tj. především sekundární elektrony, jsou přitahovány zpět ke vzorku. Výsledkem je snížení celkové emise a nastolení nábojové rovnováhy při snížené hodnotě U_s . Z obr. 1.1 je patrné, že v tom případě se pracovní bod posouvá do bodu A' . Jev zpětného přitažení sekundárních elektronů a dosažení rovnováhy při malém povrchovém potenciálu je výhodou nízkonapěťové mikroskopie v oblasti energií $E^I < E_L' < E^{II}$.

Jev zpětného přitažení sekundárních elektronů je velmi přehledný v případě, že se vzorek nenachází v blízkosti silného extrakčního pole detektoru. Pokud tento předpoklad není splněn nebo je na vzorek přiložen potenciál vůči zemi, jako je tomu v katodové čočce, situace se stává složitější. V případě katodové čočky silné osové pole v prostoru mezi anodou a katodou působí jako extraktor sekundárních elektronů ze vzorku, zatímco mezi záporně nabitým preparátem a kladně nabitým zorným polem se vytvoří radiální pole. Kombinace obou polí se pak uplatňuje při postupném ustálení konečného kladného potenciálu U_s .

Při energii primárního svazku $E'_L > E''$ se vzorek nabíjí záporně a dopadající elektrony jsou potenciálem povrchu bržděny. Povrchový potenciál může dosáhnout velmi vysokých hodnot, pokud je energie E'_L vysoká, maximálně pak $U_{S\max} = (E'' - E'_L)/e$. Pro vzorky s nižším svodovým odporem se pracovní bod posouvá do bodu D, protékající svodový proud má hodnotu $I = U_S/R$ a povrchový potenciál je $U_S = (E_{LD} - E'_L)/e$. Pouze pro vzorky s nekonečně velkým svodovým odporem se pracovní bod C po křivce posune k hodnotě kritické energie E'' do bodu A_∞ . Při nulovém svodovém odporu je $U_S = 0$, na křivce celkového výtěžku to odpovídá bodu C a k žádnému posuvu nedochází.

Z měření časové závislosti celkového výtěžku signálních elektronů $\sigma(t)$, emitovaných z bodu vzorku poprvé osvětleného elektrony určité energie, vychází metoda nenabíjecí mikroskopie. Jedná se o původní metodu vzniklou v ÚPT [3], která byla v následujících letech implementována v upraveném SEM BS 343 [4] a publikována, především v rozsáhlém článku Franka a kol. v roce 2001 [5].

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Model rozložení náboje uvnitř vzorku a jeho časové změny v průběhu nabíjení preparátu lze vypracovat jen rámcově. Pro skutečný vzorek určíme spolehlivě povrchový potenciál pouze měřením emitovaného proudu, tj. signálu z výstupu fotonásobiče. Vyhodnocením změn působení povrchového potenciálu na obraz se snažíme nalézt optimální hodnotu kritické energie způsobem naznačeným na obr. 2.1.

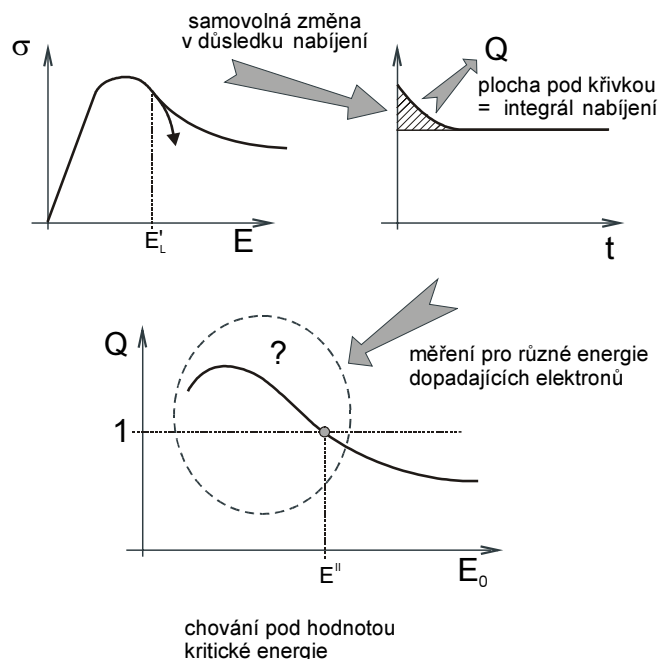
Během nabíjecího procesu se energie dopadajících elektronů samovolně mění směrem k vyšší z kritických energií E_{II} při současném ustavování povrchového potenciálu. Celková změna detekovaného signálu, způsobená tímto přízpusobením, slouží jako měřítko odchylky energie primárního svazku od kritické energie. Procedura nastavení hodnoty energie dopadu elektronů primárního svazku jejich zbržděním v katodové čočce může být automatizována v řídicí smyčce spolu s kvantifikací signálu.

Procedura nastavení kritické energie, realizovaná v počítačově řízeném SEM Tesla BS 343, zahrnuje [4]:

1. Smyčku měření závislosti signálu na čase v řadě bodů, které dosud nebyly osvětleny.
2. Zpracování a interpretace křivek a získání hodnoty celkové změny signálu.
3. Určení nové hodnoty dopadající energie a její automatické nastavení.
4. Vyhodnocení závislosti celkové změny signálu na energii a určení optimální energie.
5. Sejmутí obrazu při zjištěné kritické energii.

Ad 1.

- a) Rastrování probíhá jen v části zorného pole (ZP). Po mechanickém posuvu vzorku na nové zorné pole je jeho část rezervována pro měření.
- b) Energie dopadu je nastavena na předem zvolenou hodnotu E_L' , paprsek se zastaví v prvním z měřených bodů a je změřena a uložena závislost signálu $S(t)$. Měření se opakuje pro libovolný počet bodů, obvykle $N = 50$.
- c) Následuje zpracování naměřených křivek $S(t)$.



Obr. 2.1 Princip metody nenabíjející mikroskopie.

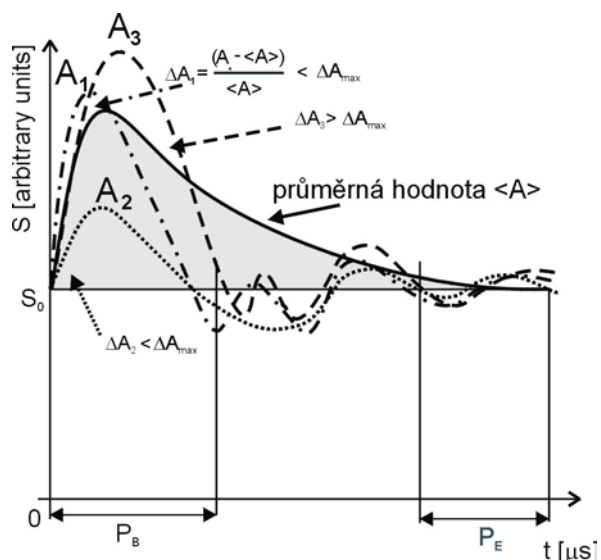
Ad 2.

Algoritmus zpracování křivek je sestaven následovně:

- Je určen průměr z hodnot signálu v bodech úseku P_E každé křivky a stanovena ustálená hodnota signálu S_0 .
- Křivky jsou vynásobeny faktorem $\langle S_0 \rangle / S_0$; tato operace zaručí konvergenci k jediné hodnotě signálu.
- V rozmezí úseku P_B každé křivky se sčítají odchylky dat vzhledem k hodnotě $\langle S_0 \rangle$ s cílem získat plochu A , kterou křivka vymezuje.
- Je vypočtena průměrná plocha $\langle A \rangle$ a křivkám jsou přiřazeny odchylky $\Delta A = (A - \langle A \rangle) / \langle A \rangle$.
- Jsou vyřazeny křivky s $\Delta A > \Delta A_{\max}$.

Kroky d) a e) se opakují, dokud plocha kterékoli křivky přesahuje maximální povolenou odchylku ΔA_{\max} od aktuálního průměru a pokud není překročen maximální povolený počet vyřazených křivek.

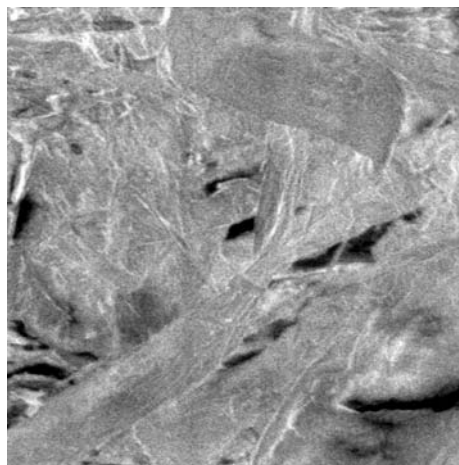
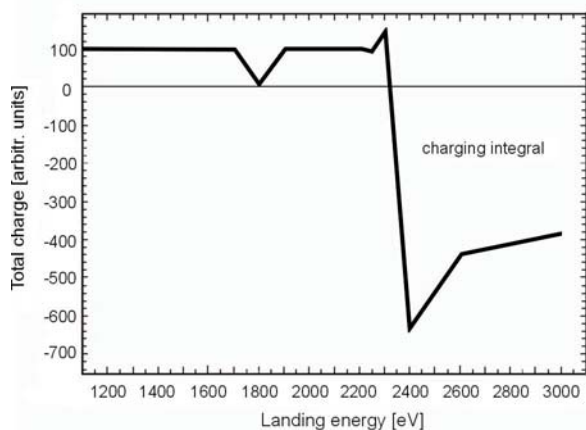
Krok měření časové závislosti signálu pro rychlý přeběh = 2 μ s



Obr. 2.2 Postup snímání časové závislosti signálu z obrazového bodu a kriteria pro výběr naměřených křivek $S(t)$.

Ad 3.

Hodnoty nastavované energie dopadajících elektronů jsou v předem připraveném souboru, který je volen operátorem. Plynulé nastavení aktuální energie je řešeno pomocí elektronicky řízeného vysokonapěťového zdroje.



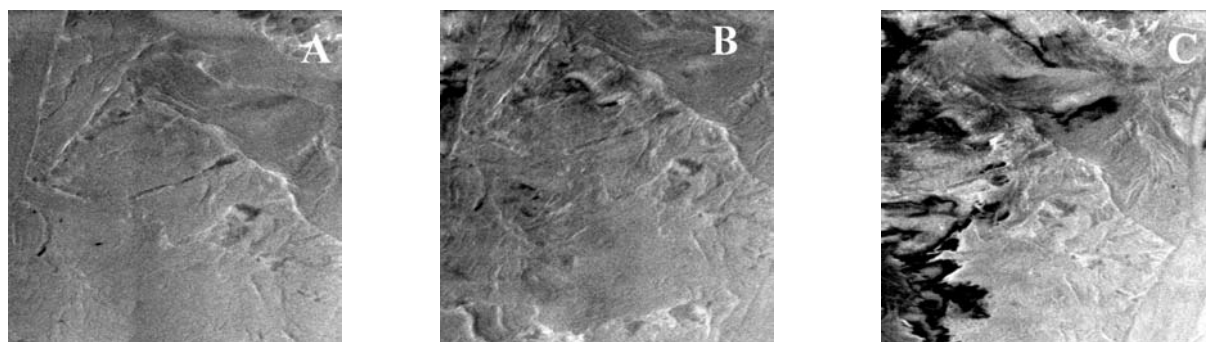
Obr. 2.3 Závislost velikosti integrálu nabíjení na energii; povrch papíru sejmutý při energii $E_L = 2460$ eV.

Ad 4.

Konečný výsledek zpracování křivek poté, kdy proběhlo měření pro všechny předem vybrané hodnoty energie dopadu, udává hodnotu kritické energie E^H . Ta je určena průsečíkem křivky s vodorovnou osou, viz. obr. 2.3.

Ad 5.

Po potvrzení operátora je nastavena nalezená kritická energie a sejmout snímek. Je vhodné předem vzorek mechanicky posunout na dosud nezasažené zorné pole. Snímky nevodivého vzorku papíru na obr. 2.4 jsou sejmuty v rozmezí energií dopadu elektronů primárního svazku 1800 eV až 2680 eV. Hodnota, vyplývající z měření a odečtená z grafu na obr. 2.3 jako kritická, 2310 eV, se ukázala být správnou. Nabíjení v oblasti pod kritickou energií je méně významné než nad touto hodnotou, jak potvrzují snímky sejmuté v okolí kritické energie. Obraz pro energii dopadu 1800 eV vykazuje jen minimální stopy nabíjení, zatímco snímek při 2680 eV je již poškozen přítomností záporného náboje na povrchu vzorku.



Obr. 2.4 Vzorek papíru při prvním přerastrování zorného pole, energie dopadu je **a)** 1800 eV, **b)** 2310 eV, **c)** 2680 eV, zorné pole pro všechny snímky 90 μm .

Metoda je nyní dostupná v plně automatizované verzi metody nastavování kritické energie dopadajícího svazku v mikroskopu TESLA BS 343 (viz obr. 2.5) a je připravována zdokonalená verze pro řídicí software mikroskopu TS 5130 Vega. V obou přístrojích se pro nastavení energie dopadajících elektronů používá katodová čočka. Elektrony v tomto uspořádání opouštějí anodu s vysokou energií a při dopadu na vzorek se jejich energie sníží na

$$E_L = E_p + eU_b \quad (2.1)$$

kde $U_b < 0$ je velikost předpětí vzorku, který se nachází v silném elektrostatickém poli. Brzdná konfigurace má příznivý vliv na rozlišení. K dosažení co nejlepšího rozlišení při nízkých a velmi nízkých energiích by imerní poměr k , daný vztahem

$$k = (E_p / E_L) \quad (2.2)$$

měl být co nejvyšší [2].

Mezi výhody použití metody nenabíjející mikroskopie v uspořádání mikroskopu s katodovou čočkou patří především:

- vysoké rozlišení obrazu při energii dopadajících elektronů $1 - 2 \text{ keV}$;
- minimální zásahy při změně energie dopadu elektronů (mírné doostření, případně korekce astigmatismu);
- emitované elektrony SE i BSE jsou urychleny v poli katodové čočky a soustředěny kolem optické osy, takže signál, snímaný detektorem BSE, reprezentuje celkovou emisi elektronů (velmi vysoký signál v celém rozsahu energií).

Předpoklady pro zavedení metody zahrnují:

- počítačové řízení VN zdroje pro potenciál katody katodové čočky (tj. preparátu);
- počítačové řízení polohy svazku a sběru obrazových dat; žádoucí je odběr vzorků signálu v periodě jednotek μs ;
- počítačové zpracování obrazových dat;
- žádoucí je možnost sestavení makro-programů z dílčích kroků, představujících jednotlivé funkce nastavení a seřízení mikroskopu a sběru dávek dat.;

K omezením metody patří:

- i malý náklon vzorku vytváří příčné elektrické pole jako příspěvek k homogennímu osovému brzděnému a současně urychlujícímu poli katodové čočky. To způsobuje značné změny v úhlu dopadu primárního svazku a je obtížné nastavit tyto úhly přesně pro jednotlivé hodnoty dopadajících energií. Při změně úhlu dopadu se mění emise elektronů i kritická energie $E(\Theta)$, pro niž Joy odvodil vzorec [11]

$$E_{II}(\Theta) = E_{II}(0)(\cos\Theta)^{-2} \quad (2.3)$$

- platí podmínka malého kolísání lokální hodnoty kritické energie předpokládající dostatečnou homogennost preparátů;
- dále platí podmínka „jemné“ struktury vzorku s malou velikostí zrn vykazujících odlišné nabíjecí vlastnosti.

Praktická zkušenost prokázala vhodnost metody ke zkoumání širokého rejstříku nevodivých struktur živé i neživé hmoty bez pokovení vzorků.

3 CÍLE PRÁCE

Náplní práce je rozvoj původní metody rastrovací elektronové mikroskopie nevodivých vzorků. Klade si za cíl přispět k přesnějšímu vymezení hranic použitelnosti metody mikroskopie při nenabíjecím režimu, kdy je energie dopadu elektronů zvolena tak, že vzniklý povrchový náboj je minimální. V teoretické části je zkoumána závislost detekční účinnosti přístroje a velikosti vzniklého povrchového potenciálu v závislosti na energii dopadu elektronů a uspořádání vzorku a jeho okolí. Možnosti metody byly ověřeny při studiu struktury střevních parazitů a distribuce těžkých kovů ve vzorcích dřevokazných hub.

4 METODY A ZPRACOVÁNÍ

4.1 Elektronově-optické vlastnosti katodové čočky

4.1.1 Simulace vlivu nabíjení zorného pole

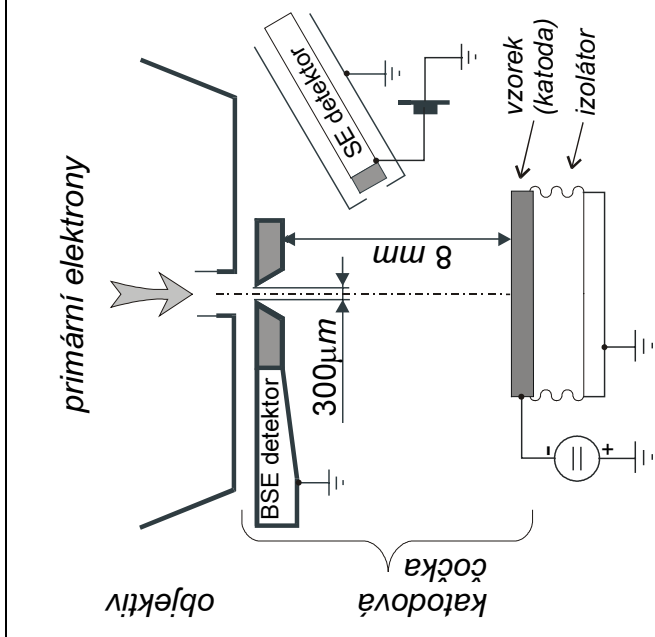
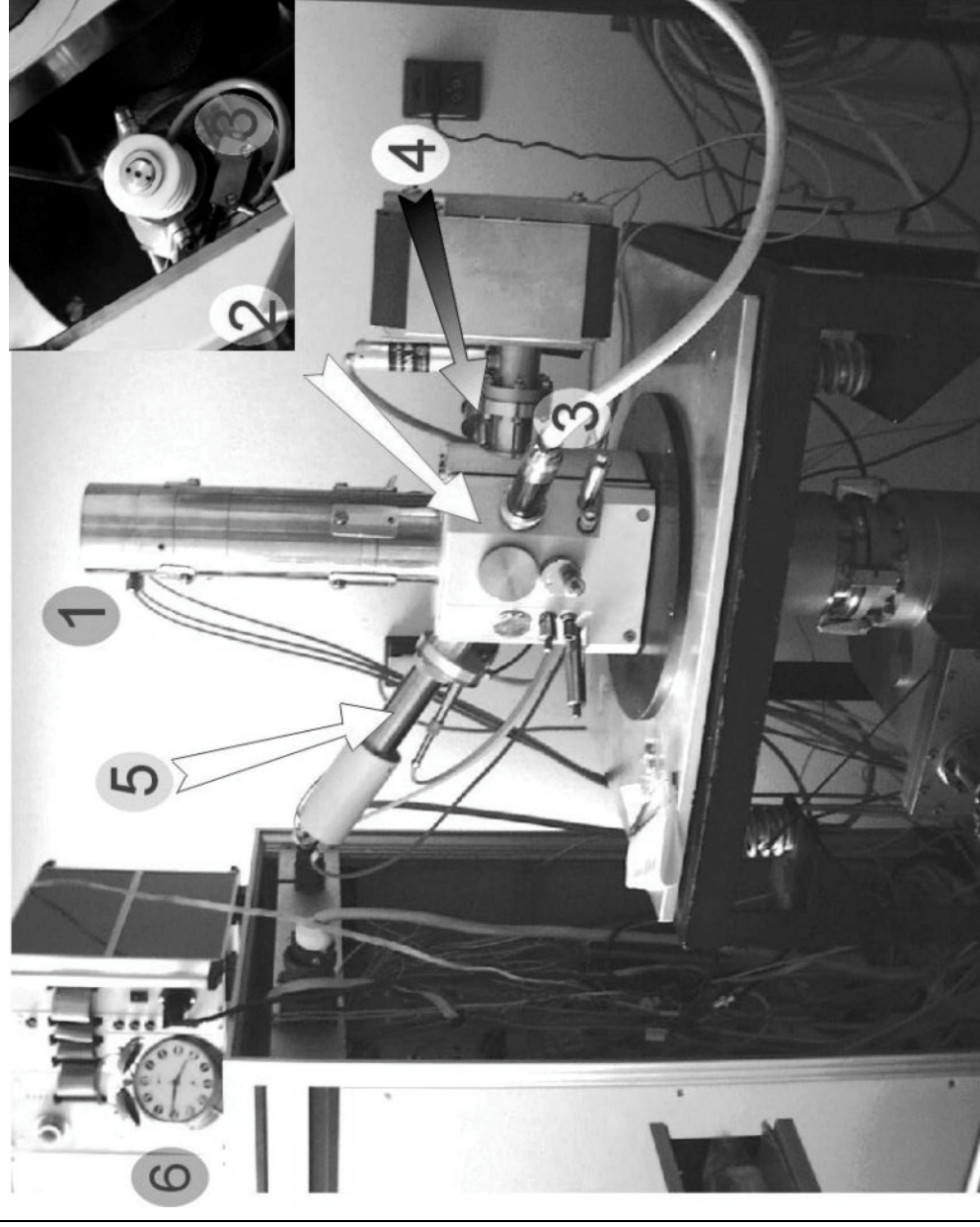
Odhad kritické energie se provádí na základě měření časové závislosti celkové detekované emise elektronů ze vzorku. Podstatným problémem je měření v konkrétním zorném poli reálného vzorku, neboť výsledek závisí na složení a topografii povrchu. Průběh nabíjecí křivky ukazuje velikost změny signálu $\sigma(E)$ během nabíjení a tím i velikost vzniklého povrchového potenciálu. Pokusně lze takto zjistit i energii minimálního nabíjení, tj. kritickou energii. Měření je závislé na způsobu a účinnosti detekce a proto bylo přikročeno k počítačové simulaci trajektorií signálních elektronů během procesu nabíjení zorného pole pro energii dopadajících elektronů nad a pod hodnotou energie kritické.

Studium vlastností katodové čočky s katodou netvořící ekvipotenciální plochu (tj. sestávající z nenabitě a nabitě části na různých potenciálech) je hlavním přínosem této práce k teorii metody. K počítačovým simulacím byly použity komerční programové soubory SIMION [6], ELD a TRASYS [7].

4.1.2 Trajektorie signálních elektronů v poli katodové čočky s nabitým preparátem

Veškeré dosavadní studie vlastností katodové čočky byly prováděny za přirozeného předpokladu, že katodou (tedy preparátem) je rovinná ekvipotenciální plocha. Tento předpoklad samozřejmě není splněn v případě nevodivého preparátu, jehož část osvětlená elektrony je nabitá na nenulový povrchový potenciál vůči zvenčí přivedenému potenciálu vodivé části držáku vzorku a tedy i vůči okolí zorného pole.

Konfigurace katodové čočky a detektoru pro simulaci odpovídala schématu uspořádání uvedeném v obr. 2.5 s průměrem anody/scintilátoru $D = 0,3 \text{ mm}$ a délkou brzdného pole $L = 8 \text{ mm}$. V tomto uspořádání byl zkoumán průběh trajektorií signálních elektronů v prostoru pole katodové čočky. Simulace byly prováděny v osově symetrickém uspořádání. To znamená, že za nabitě zorné pole na povrchu preparátu byla pokládána kruhová oblast o potenciálu, lišícím se o hodnotu povrchového potenciálu (vzniklého nabitím) od předpětí vzorku vůči zemi.



- 1 primární elektrony
- 2 komora vzorku
- 3 průchodka kabelu VN zdroje pro předpětí vzorku
- 4 detektor BSE
- 5 detektor SE
- 6 VN mikroskopu

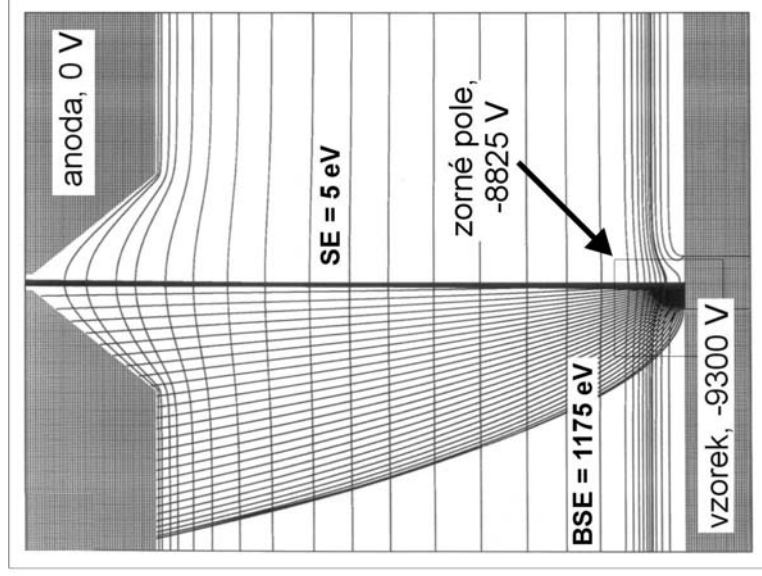
Obr. 2.5 Experimentální zařízení: mikroskop TESLA BS 343, adaptovaný pro metodu mikroskopie při nízkých energiích (SLEEM), vnější vzhled a uspořádání komory vzorku. Pracovní vakuum v komoře mikroskopu $5 \cdot 10^{-5}$ Pa, behanitová komora vzorku, koaxiální vrtaný monokrystalický scintilátor pro SLEEM detektor, plně počítačově řízená elektronika.

Pro průběh trajektorií signálních elektronů je samozřejmě rozhodující jejich počáteční energie. Sekundární elektrony o energii emise E_0 , jejíž nejpravděpodobnější hodnota je přibližně 5 eV a maximální hodnota dle definice činí 50 eV , mají po průchodu polem katodové čočky v rovině scintilátoru energii $-eU_b + E_0 \approx -eU_b$ ($U_b < 0$). Zpětně odražené elektrony zaplňují interval mezi 50 eV a E_L , takže po urychlení mají energie mezi $-eU_b + 50\text{ eV}$ a E_p . Je-li předpětí vzorku $-U_b$ vyšší než cca $2 - 3\text{ keV}$, jsou SE i BSE detekovány s podobnou účinností, nedochází k žádné diskriminaci signálu (obvyklé u standardních SE a BSE detektorů) a získaný signál odpovídá celkové emisi σ .

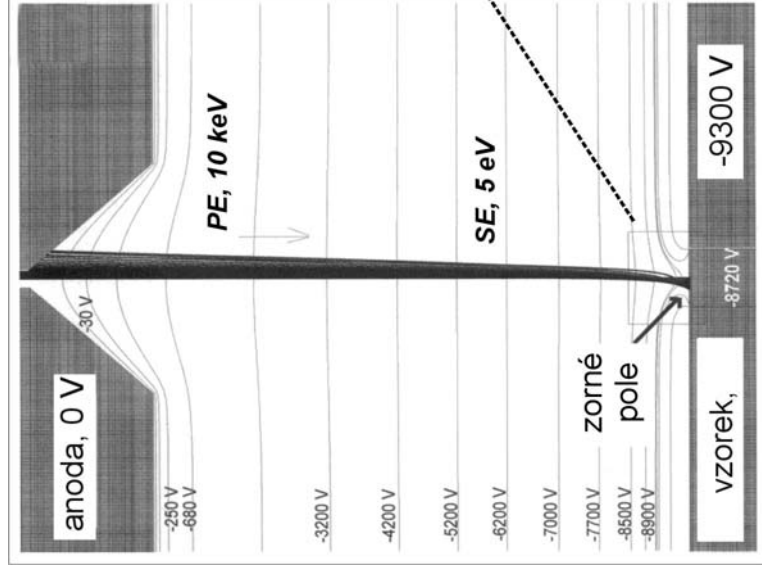
Taková úvaha má sice smysl z hlediska nábojové bilance a detekční účinnosti, nicméně v první fázi musíme simulaci provést zvlášť pro každou hodnotu energie a směru emise. Konkrétně byly simulovány svazky trajektorií pro úhel emise měnící se po nevelkých krocích, a to vždy pro jednu hodnotu energie v intervalu $(0, E_L)$. Zvláštní pozornost byla věnována energii 5 eV (jako typické poloze maxima křivky energiového rozdělení SE) a energii E_L pružně odražených elektronů. Na obr. 4.1 a) je příklad svazku simulovaných trajektorií pro částečně nabitý povrch uprostřed procesu nabíjení. Je vidět, že zatímco BSE (o energii E_L) vesměs dopadají na detektor, jsou SE (o energii 5 eV) polem nad vzorkem fokusovány do otvoru detektoru. Na obr. 4.1 b) a c) je pak znázorněna situace, kdy alespoň část SE dopadá na detektor kolem centrálního otvoru. Zároveň je v obr. 4.1 c) znázorněna příčina tohoto jevu – radiální pole mezi nabitou a nenabitou částí preparátu se kombinuje s polem osovým a vytváří tak elektrostatickou čočku, schopnou silně ovlivnit dráhy elektronů emitovaných s velmi nízkou energií (tj. SE). Nejvíce jsou ovlivněny elektrony emitované pod vysokými úhly.

Na obr. 4.2 jsou další příklady trajektorií SE, tentokrát pro ustálený stav na konci simulovaného nabíjení pro různé velikosti zorného pole.

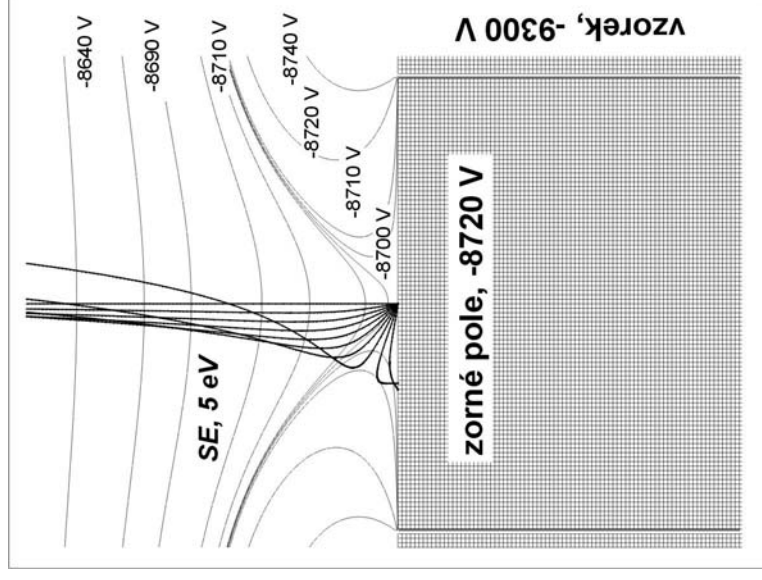
Simulace se soustředily na oblast energií pod E^{II} . V konvenčním SEM dochází při těchto energiích, kdy se zorné pole nabíjí kladně, ke zpětnému přitažení části SE, takže nábojová rovnováha se ustaví při nevelikém povrchovém potenciálu. Jeho velikost závisí na celkovém uspořádání vodičů a polí a může se pohybovat v jednotkách až desítkách voltů. Pro preparát v katodové čočce nastává odlišná situace v tom smyslu, že SE jsou odsávány směrem k anodě a přichází tedy v úvahu vytvoření plného (kladného) povrchového potenciálu $U_s^{max} = (E^{II} - E_L) / e$. Z obr. 4.1 a 4.2 je nicméně vidět, že značná část SE, emitovaná pod vyššími úhly k optické ose, je polem pronikajícím z okolí zorného pole směřována zpět k povrchu a tedy i v tomto případě zřejmě bude kladný povrchový potenciál redukován.



a)

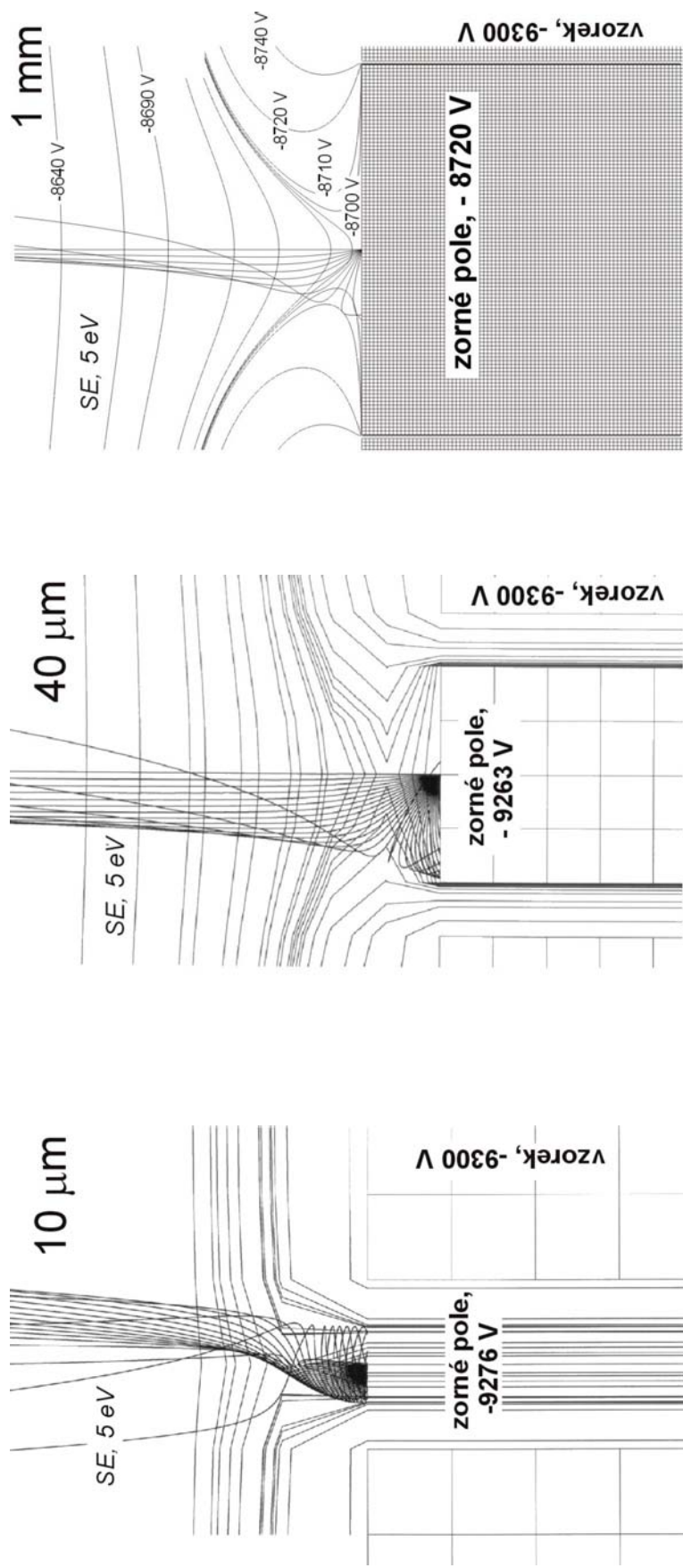


b)



c)

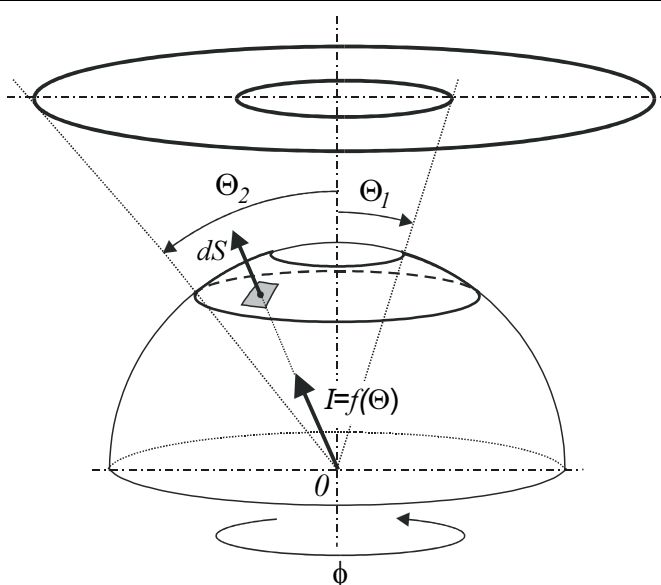
Obz. 4.1 Trajektorie SE nad vzorkem: **a)** trajektorie elektroni pro situaci v průběhu nabíjení s $E_L = 1175 \text{ eV}$ ($U_V = 475 \text{ V}$), kdy je $\varepsilon = 0$.
b), c) trajektorie SE v ustáleném stavu ($U_V = 580 \text{ V}$). Simulace provedeny pomocí programu SIMION [53].



Obr. 4.2 Příklady průběhů trajektorií SE o nepravděpodobnější energii 5 eV pro tři velikosti zorného pole při ustáleném (tj. maximálním) kladném povrchovém potenciálu zorného pole. Simulace prováděny pomocí programu SIMION [53].

4.1.3 Účinnost detekce a obrazový signál

Počítačové simulace, popsané v předcházejícím odstavci, poskytly, jako jeden ze svých hlavních výsledků, údaje o míře zpětného zachycování SE polem nad nabitou oblastí preparátu. Odtud bylo možné stanovit, při jakém povrchovém potenciálu zorného pole klesne efektivní výtěžek σ na jednotkovou úroveň a nabíjení se zastaví. Současně však je možné stanovit i průběh energiové závislosti veličin, charakterizujících účinnost detekce a velikost signálu v uspořádání katodové čočky s katodou (preparátem) obsahujícím nabitě zorné pole, jak bylo popsáno v předchozích odstavcích. Poznamenejme, že pro jednoduchost byl opět uvažován osově symetrický případ s kruhovým zorným polem.



Obr. 4.3 K výpočtu detekční účinnosti.

Detekční účinnost ε byla vypočítávána jako relativní podíl počtu emitovaných elektronů, který dopadne na povrch scintilátoru detektoru kolem jeho centrálního otvoru. Úhlové rozložení emise SE i BSE bylo aproximováno Lambertovým zákonem

$$I(\Theta) = \frac{1}{\pi} \cos \Theta \quad (4.1)$$

ve tvaru vyhovujícím podmínce

$$I_{celk} = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi/2} I(\Theta) \sin \Theta d\Theta = 1 \quad (4.2)$$

Jak je patrné z obr. 4.3, můžeme výše definovanou detekční účinnost vypočíst ze vztahu

$$I_{\text{det}} = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_{\Theta_1}^{\Theta_2} I(\Theta) \sin \Theta d\Theta = \sin^2 \Theta_2 - \sin^2 \Theta_1 \quad (4.3)$$

Jako modelový nevodivý vzorek byl zvolen fiktivní materiál, definovaný průběhem energiové závislosti emise SE v tabulce 4.1. a konstantním výtěžkem BSE o velikosti $\eta=0,2$ pro všechny energie. Mezi tabelovanými body byly výtěžky SE interpolovány. Zpětně odražené elektrony byly považovány za pružně odražené s energií dopadu primárních elektronů, sekundární elektrony byly brány s energií $5 eV$.

Energie dopadu [eV]	500	700	1000	1300	1500	2800
Koeficient SE δ [-]	1,7	1,51	1,26	0,98	0,8	0,3

Tab. 4.1 Výtěžky SE (hodnoty δ) pro modelový materiál při různých energiích dopadu elektronů.

Při simulaci trajektorií SE v každém jednotlivém uspořádání byl především zjišťován mezní úhel emise elektronu Θ_m vůči optické ose, tvořící rozhraní mezi SE emitovanými směrem k detektoru a mezi SE vracejícími se zpět ke vzorku (viz obr. 4.1 a 4.2). Poté byl koeficient výtěžku sekundárních elektronů δ , zjištěný z tab. 4.1, upraven na „efektivní“ hodnotu

$$\delta' = \delta \sin^2 \Theta_m \quad (4.4)$$

a pomocí ní pak stanoven výtěžek celkové emise

$$\sigma = \eta + \delta' \quad (4.5)$$

pro danou energii dopadu elektronů $E_L = E_L' + eU_V$. Výsledný obrazový signál, představující veličinu měřenou při hledání optimální energie pro sejmutí obrazu nepoškozeného nabíjením, byl pak počítán jednoduše jako

$$S = \varepsilon_{SE} \delta' + \varepsilon_{BSE} \eta \quad (4.6)$$

kde ε_{SE} resp. ε_{BSE} jsou detekční účinnosti pro oba příspěvky k signálu, stanovované ze vztahu (4.3) pro úhly Θ_1, Θ_2 zjištěné ze simulací trajektorií.

4.1.4 Závislost povrchového potenciálu na velikosti nabitého zorného pole

Jak jsme se již zmínili, jsou nabíjecí jevy odlišné v oblasti kladného nabíjení pod kritickou energií E^H a v oblasti záporného nabíjení nad E^H . Hlavní rozdíl spočívá v tom, že kladně nabitě zorné pole přitahuje zpět část pomalých sekundárních elektronů, takže nábojová rovnováha se ustaví při sníženém povrchovém potenciálu (viz obr. 1.1).

Simulace byla prováděna pro různě velké nabitě plochy a pro modelový preparát popsany v předchozím odstavci. Všimněme si odděleně situace při kladném a záporném nabíjení zorného pole.

Uvažujme svazek elektronů zbrzděný na energii dopadu $E_L' = 700 \text{ eV}$, tedy energii pod energií kritickou ($E^H = 1500 \text{ eV}$). Primární svazek dopadá na ještě nenabitý ($U_V = 0$), zcela nevodivý vzorek. Potenciál elektrody E_1 , představující zorné pole a později nabitou plošku povrchu vzorku (viz obr. 4.1 a 4.2), bude na počátku souhlasit s potenciálem vzorku, tedy $U_{E_1} = U_B = -9300 \text{ eV}$. V následujícím okamžiku se zorné pole nabije a vytvoří se na něm potenciál $U_V > 0$ vůči okolnímu povrchu. Potenciál elektrody E_1 se tedy změní na $U_{E_1} = U_B + U_V$ a průběh pole nad vzorkem se rovněž modifikuje. V důsledku toho se mění tvar trajektorií signálních elektronů, především SE. Postupně dochází k fokusaci svazku signálních elektronů do otvoru detektoru, k jejich odchylování mimo detektor a také ke zpětnému dopadu SE na vzorek. Tyto jevy vedou ke změnám účinnosti detekce sekundárních elektronů ε (definované jako relativní podíl množství sekundárních elektronů o energii 5 eV , který dopadne z kosinově zářícího bodu zdroje na detektor), celkové emise σ (opravené o podíl zpětně zachycených SE) a detekovaného signálu $S = \sigma\varepsilon$. V situaci, kdy nastává nejdokonalejší fokusace SE do otvoru detektoru, klesá účinnost detekce prakticky k nule, avšak při dalším růstu povrchového potenciálu zorného pole se svazek SE opět rozostří a začne znovu zasahovat detektor. Mimoto s rostoucím U_V roste podíl zpětně zachycených SE, takže postupně dojde k poklesu celkového výtěžku elektronů na úroveň $\sigma = 1$ a proces nabíjení se zastaví.

Na obr. 4.4 jsou uvedené závislosti vyneseny pro dvě hodnoty počáteční energie dopadu. Dále je na obr. 4.4 c) znázorněn posuv „pracovního bodu“ do ustáleného stavu A' . Obr. 4.4 a) a c) tedy odpovídá průběhu nabíjení při počáteční energii dopadu $E_L' = 700 \text{ eV}$, kdy povrchový potenciál naroste na $U_V = +24 \text{ V}$. Při počáteční energii $E_L' = 1300 \text{ eV}$ dosáhne povrchový potenciál pouze $+22 \text{ V}$ (viz obr. 4.4 b).

Výsledky obdobných simulací, provedených tentokrát pro velké zorné pole o rozměru 1 mm , jsou na obr. 4.5. V tomto případě je střední „elektroda“ E_1 vzorku rozměrově podstatně větší a stejné gradienty potenciálu na jejích okrajích vznikají při vyšších potenciálových rozdílech. Průběh funkcí $\sigma(E)$, $\varepsilon(E)$ a $S(E)$ je kvalitativně podobný jako v předcházejícím případě, avšak mezní povrchový potenciál

dosahuje 580 V při počáteční energii dopadu $E_L' = 700 \text{ eV}$ a při $E_L' = 1300 \text{ eV}$ naroste na celý rozdíl 200 V, odpovídající vzdálenosti počáteční energie dopadu od energie kritické.

Popsaný postup získání maximální hodnoty U_V při kladném nabíjení, odpovídající poklesu celkové emise na $\sigma = 1$, byl zopakován pro řadu rozměrů zorných polí na modelovém preparátu. Výsledkem je graf na obr. 4.6.

Z grafu 4.6, shrnujícího nejdůležitější výsledek této kapitoly, je patrné, že kladný povrchový potenciál zorného pole, vznikající při dopadu elektronů o energii nižší než E_{II} , nabývá ustálených hodnot lineárně závislých na velikosti zorného pole. Konkrétní průběh závislosti na obr. 4.6 je sice vázán na modelový vzorek, avšak charakter této závislosti je univerzální. Rovněž platí, že pro velká zvětšení obrazu, tj. malá zorná pole do průměru jednotek až desítek μm , nepřevyšuje povrchový potenciál nízké hodnoty kladného nabíjení v klasickém SEM. Nepotvrdila se tedy obava z toho, že za výhody použití katodové čočky je třeba platit vysokým kladným potenciálem na povrchu vzorku.

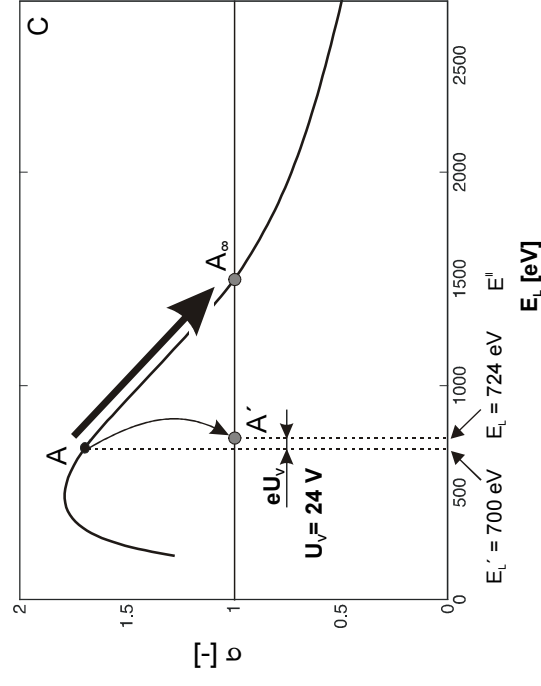
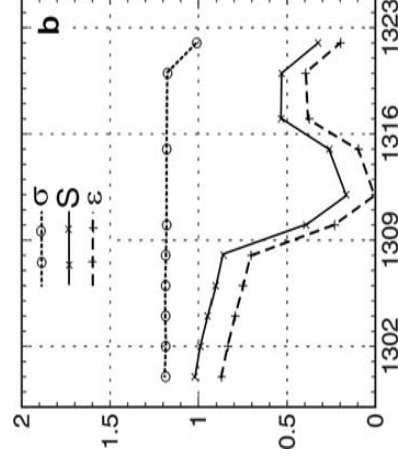
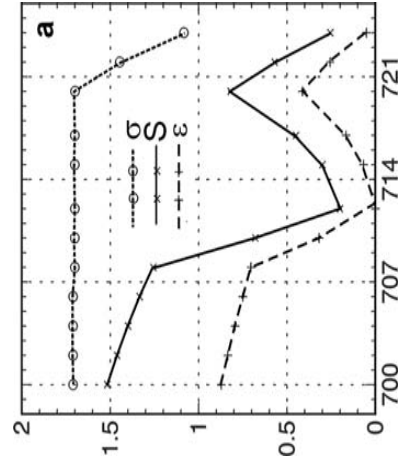
Průběh záporného nabíjení preparátu, které nastává při počáteční energii dopadu $E_L' > E_{II}$, je zachycen na obr. 4.7. Je zřejmé, že tento jev nevykazuje žádné zvláštnosti a konečný povrchový potenciál je jednoduše dán vztahem $U_V = (E_{II} - E_L')/e$.

4.1.5 Závěry plynoucí ze simulací

Simulace rozložení elektrostatického pole v prostoru katodové čočky nad nevodivým vzorkem s nabitou oblastí uprostřed, trajektorií emitovaných elektronů v tomto poli a bilance dopadu elektronů na scintilátor detektoru poskytly dva soubory důležitých výsledků.

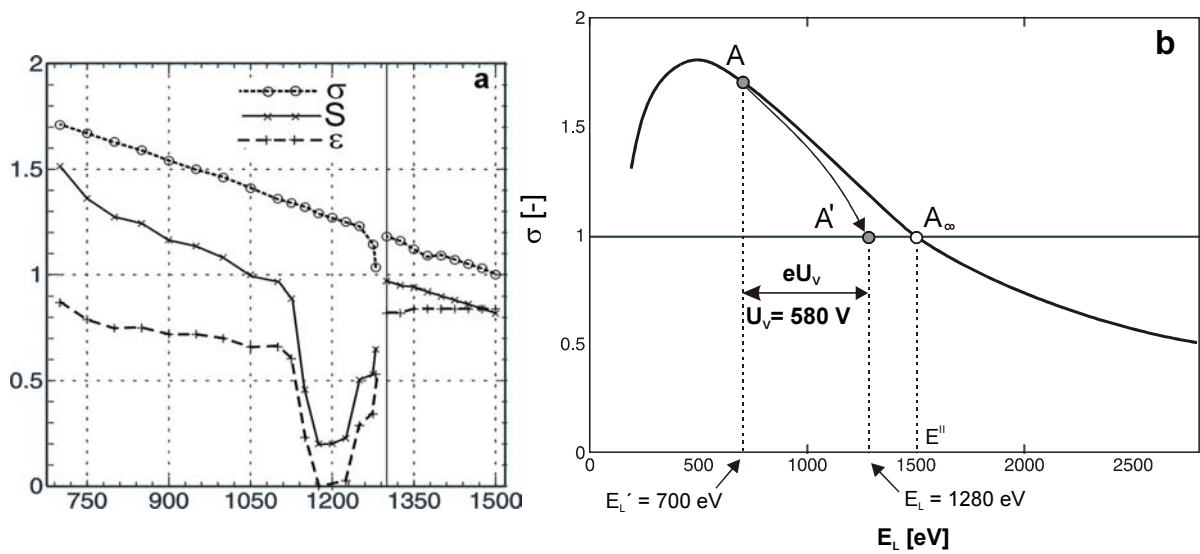
Především bylo zjištěno, že příčné pole mezi nabitou a nenabitou oblastí preparátu významně napomáhá redukci konečného kladného povrchového potenciálu při práci pod kritickou energií. Připomeňme, že v konvenčním SEM se předpokládá ustavení nábojové rovnováhy zpětným přitažením SE při nabití povrchu na pouhých „několik“ voltů (přesné hodnoty závisí na konkrétním uspořádání komory mikroskopu). Naopak u konfigurace s katodovou čočkou panovala obava, že pole mezi anodou a katodou všechny elektrony odsaje a ustaví se tak maximální povrchový potenciál $E_{II} - E_L'$ i při kladném nabíjení.

Výsledky zachycené v obr. 4.6 jsou z tohoto hlediska velmi příznivé: maximální kladný povrchový potenciál je lineárně závislý na rozměru zorného pole a pro malá zorná pole klesá až na 20 – 30 V, což je hodnota přijatelná pro zobrazování nevodičů s pouze mírnými nabíjecími efekty v obraze. Tyto výsledky byly již publikovány v [5, 8].

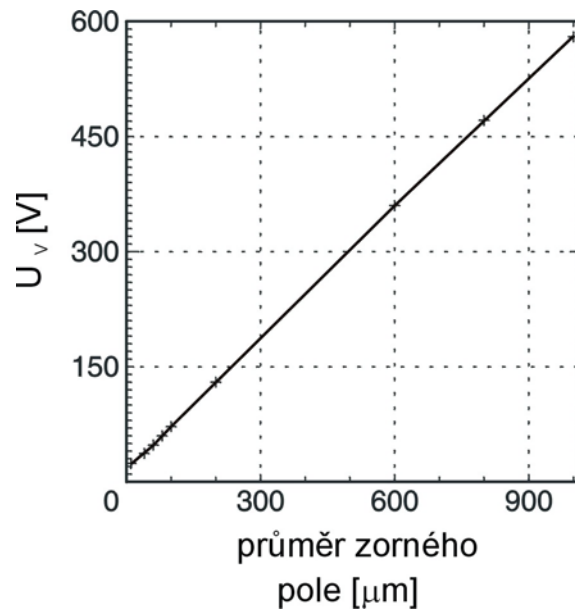


Obr. 4.4 Simulace procesu nabíjení pro velikost zorného pole $10 \mu\text{m}$ – „nabitý bod“

a), b): energiové závislosti celkové elektronové emise σ , detekční účinnosti ε a signálu $S = \sigma\varepsilon$ pro počáteční energii dopadu elektronů **a)** 700 eV a **b)** 1300 eV; **c)** schéma posuvu „pracovního bodu“ po modelové křivce emise $\sigma(E)$ pro případ **a)**. Výpočty provedeny na základě simulací programem SIMION [6].

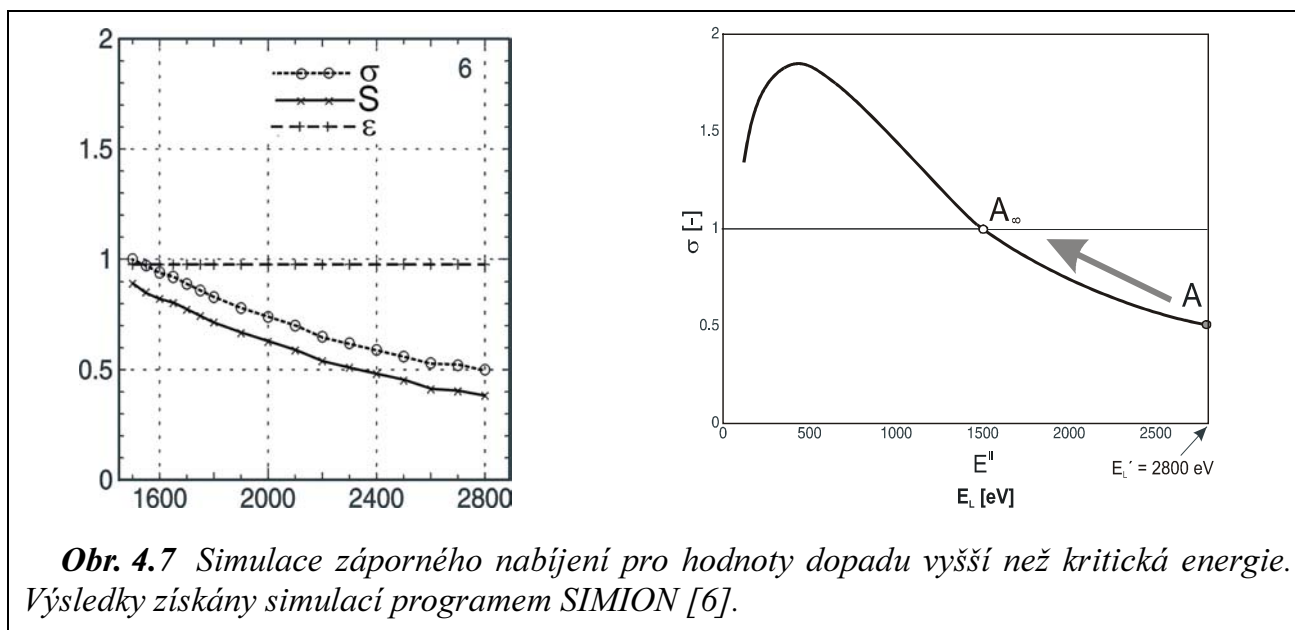


Obr. 4.5 Simulace procesu nabíjení pro velikost zorného pole $1000 \mu\text{m}$: **a)** energiová závislost σ , S a ϵ pro počáteční energie dopadu $E_L' = 700 \text{ eV}$ a $E_L' = 1300 \text{ eV}$ **b)** posuv „pracovního bodu“ po křivce $\sigma(E)$ pro $E_L' = 700 \text{ eV}$; simulace programem SIMION [6].



Obr. 4.6 Závislost konečné hodnoty kladného povrchového potenciálu zorného pole na zcela nevodivém vzorku na průměru zorného pole; výsledky získány simulací programem SIMION [6].

Druhý soubor výsledků tvoří zjištěné závislosti $\varepsilon(E)$, $\sigma(E)$ a $S(E)$. Zde je podstatné zjištění, že pro dané zorné pole (včetně jednotlivého pixelu jako měřicího bodu) je integrál funkce $S(E)$ za celý proces nabíjení použitelným měřítkem velikosti nabíjení. Pokles $S(E)$ v jisté oblasti energií má sice vliv na průběh nabíjecí křivky $Q(E)$ (stlačuje ji dolů v oblasti nalevo od E^{II} – viz obr. 4.4 a 4.5), avšak nemá vliv na polohu průsečíku křivky s vodorovnou osou. Nesmíme sice zapomenout, že v algoritmu metody nenabíjející mikroskopie integrujeme signál v čase a je tedy třeba vzít v úvahu i průběh změny energie dopadu elektronů $E_L(t)$, avšak tato závislost je monotónní a neovlivňuje tedy kvalitativní relace mezi hodnotami signálu S.

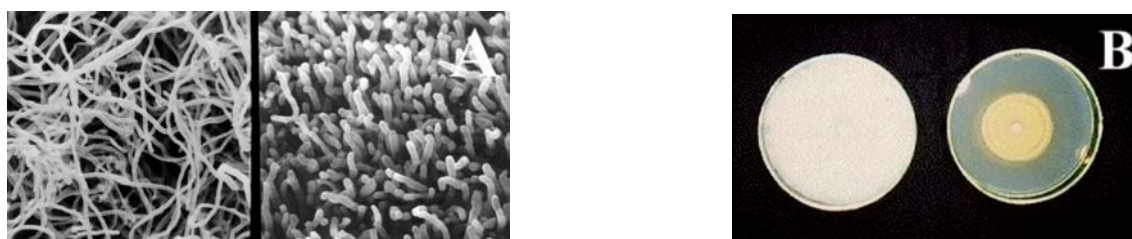


V oblasti tvorby záporného náboje nad E^{II} je situace jednoduchá – integrál funkce $S(E)$ monotónně roste s rostoucí odchylkou E_L' od E^{II} . V oblasti kladného nabíjení platí, že velikost konečného povrchového potenciálu je téměř nezávislá na počáteční energii dopadu. Znamená to, že integrace $S(E)$ probíhá podél přibližně stejně velkého intervalu energií, zatímco při záporném nabíjení se tento interval se vzdáleností od E_{II} prodlužuje. Navíc se při větší odchylce od E^{II} k nižším energiím objevuje minimum funkce $\varepsilon(E)$ (viz obr. 4.4 a,b a obr. 4.5 a), které hodnotu integrálu $S(E)$ snižuje. Tím je vysvětlen pozorovaný fakt [20], že nabíjecí křivky pod kritickou energií rostou na jistou úroveň, ale poté se jejich růst zastavuje a někdy se objeví i pokles. Provedené simulace prokázaly, že tento jev souvisí s optikou katodové čočky a není na závadu vyhodnocování plochy pod křivkou $S(t)$ jakožto míry nabíjení.

4.2 Použití metody pro studium nevodivých vzorků živé hmoty

4.2.1 Studium přítomnosti těžkého kovu v dřevokazných houbách

V živé přírodě lze najít množství biosorbentů, které se sice dokáží vyrovnat s ekologickou zátěží, nicméně akumulují těžké kovy ve svých organismech a mohou tak sloužit ke sledování čistoty životního prostředí. Jedním z těchto ukazatelů jsou houby, saprofytické i mykorrhizní. V experimentech, provedených v MBÚ AV ČR s dřevokaznou houbou sítkovcem dubovým, byla pozorována vlákna kultivovaná v roztocích obsahujících kadmium. Ve srovnání s vlákny z kontrolních roztoků byla kontaminovaná vlákna kratší a silnější s jednotnou orientací, jak je patrné z obr. 4.8 a). Autoři práce [9] přisuzují zvýšenou hustotu vláken i jednotnou orientaci působení kadmia (při koncentraci 1 mmol / L roztoku). Při koncentracích kadmia vyšších než 5 mmol / L roztoku houby hynou.



Obr. 4.8 Změny morfologie houby vyvolané kadmíem: **a)** vlevo kontrolní vzorek sítkovce dubového, vpravo kontaminovaný vzorek, kde je patrné zhuštění hyf a sjednocení orientace; **b)** změna barvy kultury pevníku chlupatého, kultivované na agarové půdě. Vlevo kontrolní vzorek, vpravo vzorek s kadmíem. Snímky pořízeny v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze [10].

A. Příprava vzorků

Pro účely mikroskopické studie vláken hub, směřující ke stanovení přítomnosti těžkých kovů v jednotlivých druzích hub, byly provedeny experimenty s kultivací několika kultur v roztocích bez kontaminace a v roztocích kontaminovaných kadmíem. V tekutém mediu byla koncentrace kadmia 1 mmol / L.

Odpověď na otázku, jaká je koncentrace kadmia v myceliu, kultivovaném v takto koncentrovaném kontaminovaném roztoku, přináší např. práce [9]. Podle výsledků zde uvedených submersní kultivace s koncentrací Cd 1 mmol / L roztoku vede k obsahu 400 ppm kadmia v sušině mycelia. Tato hodnota mnohokrát převyšuje obsah Cd ve vzorcích, sbíraných v silně znečištěných oblastech.

Dvě skupiny vzorků (kontrolní a kontaminované) pro vybrané čtyři druhy dřevokazných hub byly dále zpracovány třemi způsoby:

- sušení na vzduchu
- fixování oxidem osmičelým
- fixování glutaraldehydem a vysoušení metodou kritického bodu

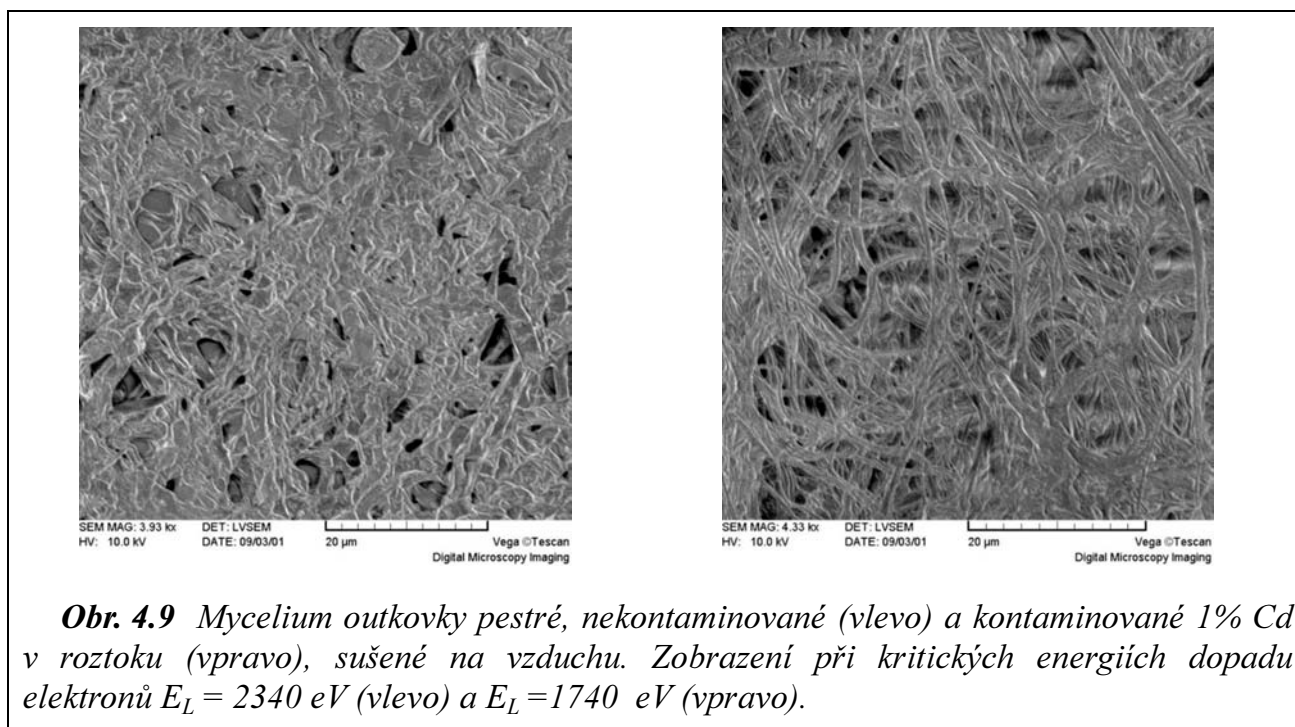
Sledujme vývoj povrchového náboje na obrázcích nepokoveného vzorku nekontaminovaných a kontaminovaných hub v rozsahu uvedených energií dopadu. Z obrázků 4.9 – 4.11 je patrné, že existuje optimální energie, pro niž je povrchové nabíjení nejmenší. Její hodnota byla získána pomocí metody popsané v kapitole 2. Kritické energie byly zjišťovány na upraveném mikroskopu Tesla BS 343 v ÚPT, zatímco „konečné“ snímky při těchto energiích byly pořizovány ve firmě Tescan Brno na upraveném mikroskopu VEGA TS 5130, pro nějž je programové vybavení, realizující metodu nenabíjející mikroskopie, teprve připravováno (mikroskop je nicméně vybaven katodovou čočkou).

B. Výsledky studia dřevokazných hub při kritické energii

Pro detailní mikroskopický rozbor (viz. obr. 4.9 až 4.11) byla vybrána dřevokazná houba outkovka pestrá. Morfologie ostatních druhů hub je velmi podobná.

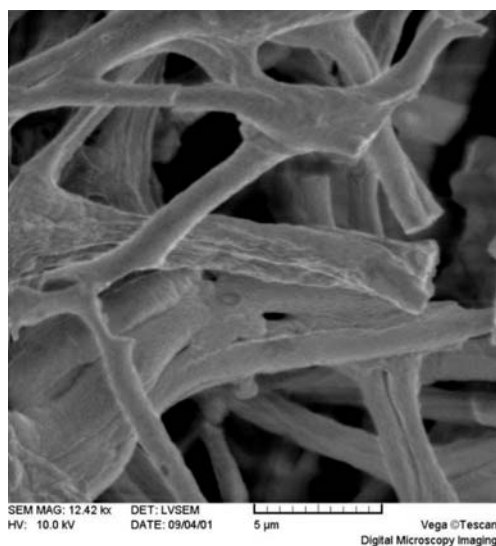
Studium prokázalo vliv kontaminace na posun kritické energie směrem k nižším hodnotám ve srovnání s optimální energií zobrazení vzorků nekontaminovaných. Toto je zásadní zjištění, otevírající cestu k využití mikroskopie při kritické energii pro sledování obsahu těžkých kovů v houbách. Je také patrná menší míra nabíjení pro vzorky kontaminované. Hodnota kritických energií se neliší u vzorků kontaminovaných od kontrolních v případě mycelií fixovaných oxidem osmičelým, kdy je v obou případech rovna 1500 eV. Tato okolnost je podpurným argumentem

Vzorky suché depozice, nekontaminované a kontaminované:



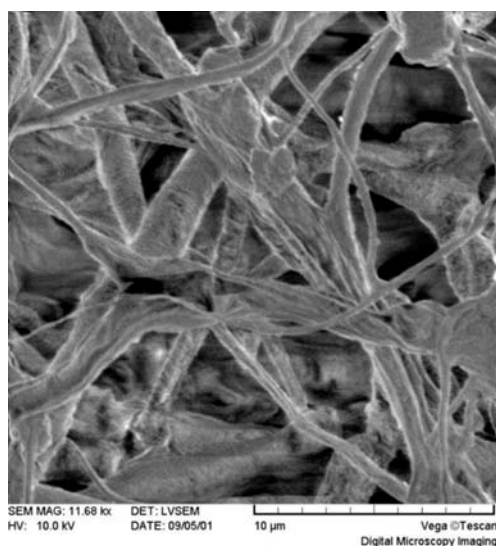
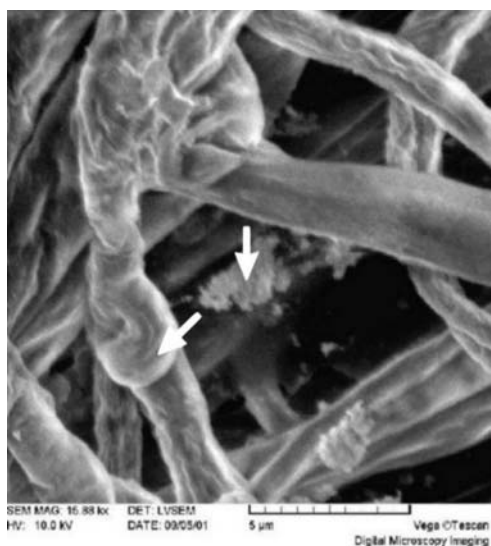
Obr. 4.9 Mycelium outkovky pestré, nekontaminované (vlevo) a kontaminované 1% Cd v roztoku (vpravo), sušené na vzduchu. Zobrazení při kritických energiích dopadu elektronů $E_L = 2340$ eV (vlevo) a $E_L = 1740$ eV (vpravo).

Vzorky fixované oxidem osmičelým, nekontaminované a kontaminované:

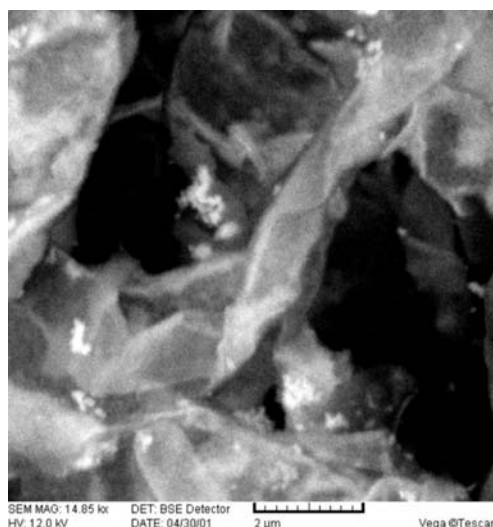
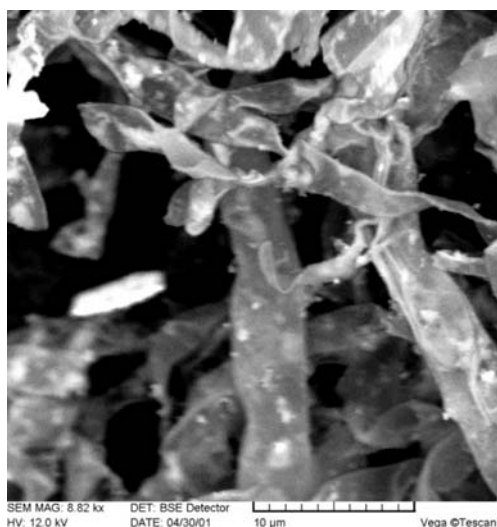


Obr. 4.10 Mycelium outkovky pestré, nekontaminované (vlevo) a kontaminované 1% Cd v kulturačním roztoku (vpravo), fixované oxidem osmičelým, při kritické energii dopadu elektronů $E_L = 1500$ eV (vlevo i vpravo).

Vzorky fixované glutaraldehydem (GA), vysoušené metodou krit. bodu, nekontaminované a kontaminované:



Obr. 4.11 Mycelium outkovky pestré, nekontaminované (vlevo) a kontaminované 1% Cd v kulturačním roztoku (vpravo), fixované GA. Snímek při kritické energii dopadu $E_L = 3200$ eV (vlevo); šipkami jsou vyznačeny 'přezky' na myceliu a artefakty, způsobené špatným vymytím pufry; pro kontaminovaný vzorek snímek při kritické energii $E_L = 1500$ eV (vpravo).



Obr. 4.12 Mycelium klanolístky kontaminované 1% Cd při energii dopadu elektronů 1750 eV s pigmentovými skvrnami na vláknech houby.



Obr. 4.13 Vzorek klanolístky, kultivovaný v mediu obsahujícím 1% kadmia. Analýza byla provedena v místě plaku s průměrem analyzované oblasti vyznačeným v obrázku.

z hlediska naznačené závislosti hodnoty kritické energie na obsahu těžkého kovu – výrazný pokles kritické energie zde zřejmě odráží přítomnost osmia. Fixace oxidem osmičelým zpevňuje buněčnou stěnu vláken. Díky přítomnosti osmia se zvýší kontrast obrazu, může ale dojít ke ztrátě některých povrchových detailů.

Ve vzorcích klanolístky, kultivované na kontaminovaném mediu, byly kromě kontrastních plaků nalezeny skvrny, velmi dobře patrné především na stěně vláken na obr. 4.12 a 4.13. Zde se patrně jedná o změnu morfologie houby vlivem kadmia; přítomnost kadmia v místě těchto skvrn potvrdila rtg analýza. Ta byla provedena v mikroskopu vybaveném energiově-disperzním rentgenovým spektrometrem při energii primárního svazku $E_p = 10 \text{ keV}$ a při tlaku v komoře vzorku $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}$,

který je srovnatelný s pracovním tlakem v adaptovaném mikroskopu s katodovou čočkou.

```

=====
EDAX ZAF Quantification          HOUBY_Cd    18.7. 2001 (10: 5)
(Standardless)
=====
Eo: 10 keV (TO:34.9 TI: 0.0)

*** PUzaf results ***
elem/line  P/B      Z      F      Wt(%)  At(%)  Inte.error
C  K-ser   @ 261.41  1.0504  1.0001  63.93  80.79  +- 1.32
O  K-ser   @  33.85  1.0268  1.0000  15.69  15.69  +- 2.80
Na K-ser   @   2.95  0.9543  1.0004   1.71   1.13  +- 7.36
Zr L-ser   @   5.78  0.7529  1.0039   5.05   0.84  +- 6.08
S  K-ser   @   3.96  0.9541  1.0049   1.53   0.72  +- 8.39
Cd L-ser   @   7.58  0.7075  1.0000  12.10   1.63  +- 5.51
-----
Total                                100.00  100.00

```

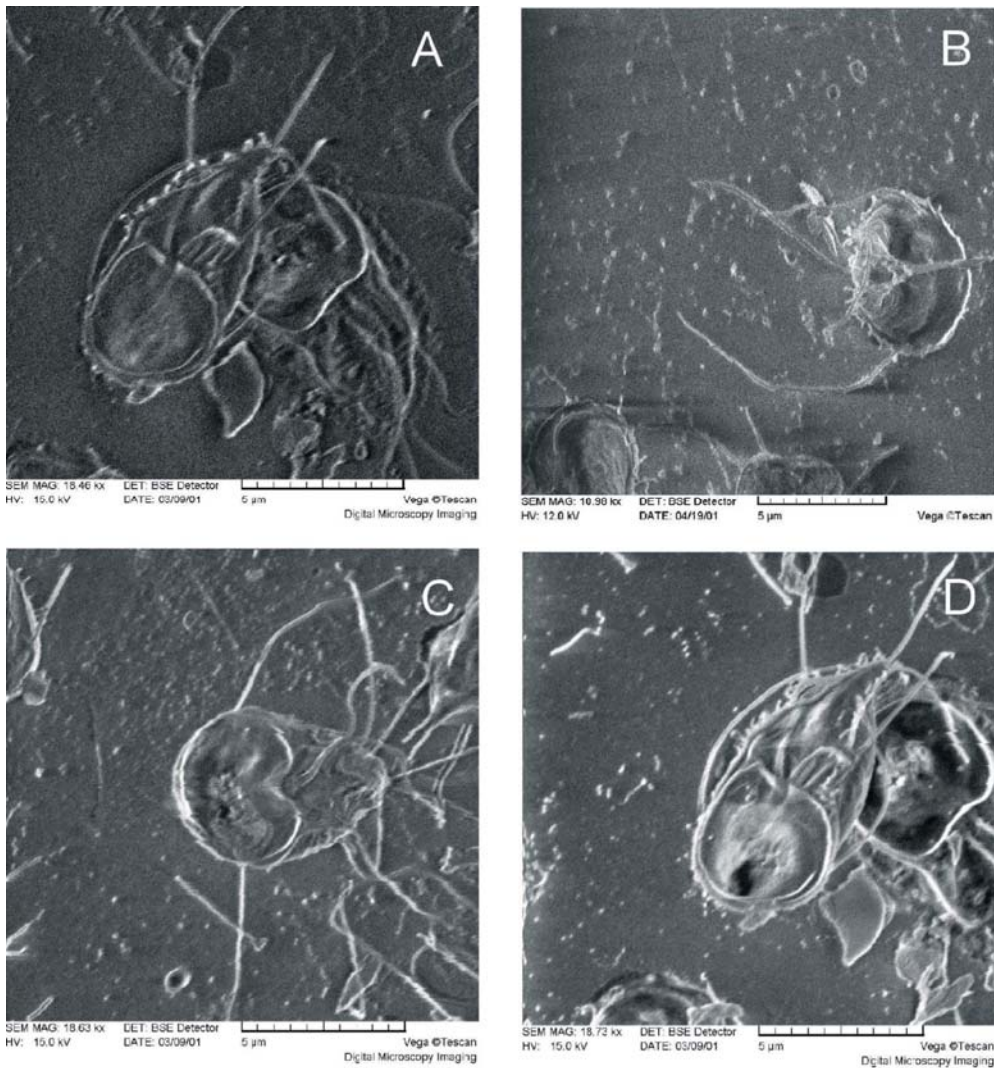
Tab. 4.2 Výsledek rentgenové mikroanalýzy v myceliu klanolístky, kultivované v mediu s 1% kadmia; kvantitativní složení v atomových % je uvedeno ve sloupci At (%).

4.2.2 Výsledky pozorování buněk parazitů při kritické energii elektronů

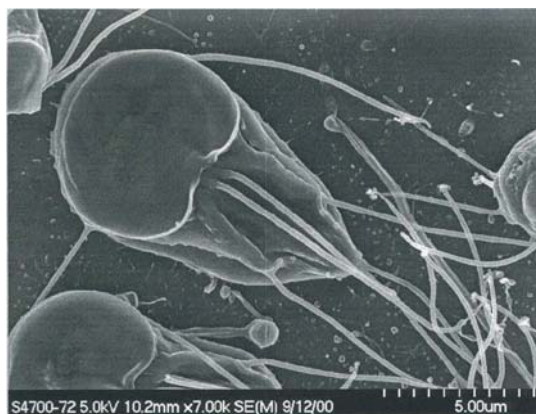
Prvok s rozměry kapkovitého těla 10 – 15 μm se ukázal být příkladem nehomogenního preparátu, u kterého celkový náboj na povrchu, vzniklý rozdílným nabíjením různých částí vzorku, již není zanedbatelný. Příklady snímků nepokovených buněk jsou uvedeny na obr. 4.14. Změna znaménka povrchového náboje při přechodu přes kritickou energii je patrná ze změny kontrastu, pozorované na snímcích stejného zorného pole v obr. 4.14 a) a d). Nejvhodnější energie elektronů pro zobrazení struktury leží v širokém intervalu 2100 – 2500 eV.

Je třeba zdůraznit, že i když se nepodařilo získat snímky zcela prosté přítomnosti lokálních nábojů, byly na druhé straně na nepokovených vzorcích zobrazeny morfologické detaily, které nejsou patrné na snímcích, pořízených v přístroji nejvyšší cenové kategorie. Je to například dobře patrná břišní rýha na povrchu těla *Giardie* na obr. 4.14 d) ve srovnání s pokoveným jedincem, zobrazeným na obr. 4.15 ve stejné pozici.

Meze použitelnosti předkládané metody, související s výskytem větších oblastí o rozdílné kritické energii, byly již zkoumány na vzorcích keramiky o různé zrnitosti [4]. Důležitý je zřejmě poměr typických rozměrů „zrn“ materiálu, tj. oblastí o navzájem odlišné nenabíjející energii, k rozměru zorného pole.



Obr. 4.14 Nepokovené buňky *Giardií* při energiích dopadu **a)** 2000 eV, **b)** 2080 eV, **c)** 2500 eV a **d)** 3000 eV. Až na jednoho (b), jsou všichni jedinci ve ventrální pozici.



Obr. 4.15 Pokovená buňka *Giardie*, obrázek pořízen mikroskopem Hitachi FESEM S-4700 při urychlovacím napětí 5 kV. Jedinec je zachycen ve ventrální pozici. Snímek z univerzity v Minnesotě, USA.

5 ZÁVĚR

V práci je diskutován režim zobrazení při jedné ze dvou kritických energií elektronů v mikroskopu vybaveném katodovou čočkou. Pro zobrazení se využívá většinou vyšší z obou kritických energií, při kterých nastává rovnováha mezi množstvím dopadnuvších a emitovaných elektronů. V oblasti mezi kritickými energiemi se vzorek nabíjí kladně, ale část pomalých sekundárních elektronů je přitažena zpět ke vzorku. Nábojová rovnováha může být dosažena již při povrchovém potenciálu sníženém na několik desítek voltů. Příčinou je silný vliv radiálního elektrického pole mezi nabitou a nenabitou částí preparátu, který převládá nad působením urychlujícího pole katodové čočky. I přesto, že část sekundárních elektronů dopadá zpět na vzorek, je úroveň detekovaného signálu vyšší než v environmentálním mikroskopu. Další příznivou okolností, mluvící pro uspořádání s katodovou čočkou, je téměř konstantní hodnota rozlišení pro celý pracovní rozsah energií dopadu elektronů.

Jako argument proti použití katodové čočky je někdy uváděna přítomnost vysokého potenciálu na vzorku. Pomocí předpětí vzorku je zajištěno zpomalení elektronů na požadovanou hodnotu energie dopadu. Rozbor situace však ukázal, že pole na povrchu vzorku mj. nepřekračuje hodnoty obvyklé v polovodičových strukturách za provozu. Navíc praktická zkušenost potvrdila bezproblémové použití metody i pro relativně tlusté nevodivé vzorky.

Na otázku o velikosti povrchového náboje, vznikajícího v procesu nabíjení, odpověděly simulace, provedené v této práci pro různé velikosti zorného pole. Bylo potvrzeno, že limitní kladný potenciál závisí na rozměru zorného pole a při velkých zvětšeních zpravidla nepřekračuje hodnotu 20 – 30 V. To je z hlediska provozu mikroskopu pozitivní zjištění, neboť vznik velkého kladného potenciálu by zamezil práci v oblasti pod kritickou energií. Výsledky potvrdily pozorovanou skutečnost, že nabíjení pod kritickou energií je méně významné než nabíjení při vysokých energiích elektronů.

Modelování trajektorií elektronů v prostoru mezi preparátem a katodovou čočkou přineslo informace o změnách detekční účinnosti v průběhu nabíjení preparátu při měření kritické energie. Dále se potvrdilo, že detekční účinnost systému nemá vliv na výsledek tohoto měření, tj. na nalezenou kritickou energii.

Nevýhodou zobrazení při kritické energii je skutečnost, že se nacházíme v oblasti, ve které jsou výtěžky sekundární i celkové emise a hodnoty kritické energie pro většinu materiálů závislé na lokálním náklonu povrchu vzorku. Další omezení vzniká u heterogenních vzorků s místními rozdíly kritické energie. V případě preparátů s oblastmi o rozdílném složení není možné stanovit jednu optimální energii pro sejmutí celého nábojem nepoškozeného obrazu. Modelováním rozptylu

elektronů nebylo možné stanovit maximální přípustnou velikost heterogenních oblastí pro jednotlivé typy preparátů z důvodu absence simulačních programů pro částečně nabitý vzorek. V předkládané práci je studovaným příkladem vzorku s takto složitou strukturou střevní parazit *Giardia*.

Metoda se ukázala být vhodným nástrojem pro zobrazení materiálů s „mírnou heterogenitou“, u kterých povrchový náboj fluktuuje s nízkou amplitudou a příčné pole, vzniklé jeho přítomností na povrchu vzorku, je zanedbatelné. Mezi preparáty splňující toto kritérium patří například dřevo a papír a z oblasti živé hmoty pak mj. listy rostlin a vlákna dřevokazných hub. U vybraných druhů dřevokazných hub byla zkoumána možnost zobrazení míst s koncentrací těžkých kovů, vázaných houbami kultivovanými v modelových roztocích. Bylo zjištěno, že při kritické energii dopadu elektronů je možno odlišit kontrolní vzorky nekontaminovaných hub od vzorků kontaminovaných těžkým kovem. Kontrolní vzorky hub se nabíjejí více než houby kontaminované. Posun kritické energie, související s přítomností kovu, odráží i přítomnost osmia v buněčné stěně ve vláknech mycelií. Tak je tomu v případě, kdy je vzorek kontaminovaných i nekontaminovaných hub připraven způsobem obvyklým pro zkoumání v rastrovacím elektronovém mikroskopu, například fixací oxidem osmičelým. Hodnota kritické energie je u obou vzorků stejná a nižší než pro osmiem nefixované kontrolní vzorky. Fixace oxidem osmičelým však může skrýt některé důležité informace o povrchu vzorku. Příkladem je přítomnost skvrn na povrchu vláken, pozorovaných při kritické energii 1750 eV v preparátu klanolístky obecné, fixované glutaraldehydem a vysoušené metodou kritického bodu, kultivované v roztoku s přítomností kadmia.

Přínosem metody je tedy nejen vysoká úroveň obrazového signálu s možností kontrastního zobrazení všech povrchových detailů, ale i možnost pozorování vzorků bez pokovení. V rámci diplomových projektů byla mikroskopie nevodivých nepokovených vzorků při kritické energii uplatněna nejen při studiu vzorků živé hmoty, ale i v potravinářství (vzorky sušeného mléka) či ve stavebnictví (vzorky cementového prášku). Výsledky studia dřevokazných hub a parazitů byly autorkou prezentovány v ústním příspěvku na 5. Mnohonárodním kongresu elektronové mikroskopie v italském Lecce v roce 2001.

Další vývoj metody bude směřovat ke začlenění programového vybavení pro řízení polohy svazku, snímání signálu a vyhodnocení dat do komerčně vyráběného mikroskopu VEGA TS5130 s rozlišením 3,5 nm při provozu s termoemisní katodou. Mikroskop byl v úpravě na režim SLEEM s katodovou čočkou použit pro zhotovení snímků publikovaných v práci. Tento krok je nejdůležitějším pro zavedení principiálně ověřené a experimentálně realizovatelné metody do mikroskopické praxe.

SUMMARY

Electron microscopists often face the problem of imaging of uncoated, non-conductive specimens. The perfection of instruments helps minimising or even avoiding necessary preparation techniques, which are, namely for life-science specimens, time-consuming and difficult. What is more, covering the specimen with a conductive layer can lose the fine details on the surface. The surface charge results from unbalance between the amount of incoming and emitted electrons. The most up-to-date and widespread solution for imaging of non-conductive specimens are low-vacuum microscopes, where the charge is compensated by the impact of ions from surrounding gaseous atmosphere in the specimen chamber. The environmental microscope, which also belongs to this group of instruments, can even prevent the specimen from drying up.

The energy dependence of the total electron emission $\sigma(E)$ can give the explanation of the surface charge formation. For most specimens the curve crosses two times the unit level at so called „critical energies“, at which the specimen exhibits minimum charging. The positive charge develops at energy below the critical level, while at energy above the critical value the negative charging occurs. The higher of both critical energies can be located within 550 – 3000 eV for materials important in the semiconductor technologies. In this way the charging process can be understood as the surface located phenomenon, which gives rise to the surface field. Via this field the landing energy of electrons is changed. The movement of the „working point“ along the energy axis corresponds to a change of the total emitted signal. This value is contemporarily being measured in other non-destructive method, intended for observation of insulators. The procedure of determination of critical energy based on measurement of $\sigma(E)$ dependence is dealt with this work.

The motivation for low energy working range (units of keV and less) thus consists in strong suppression of charge for non-conductive specimens. The basic device – cathode lens – enables varying the energy of electrons, landing onto the specimen surface with nearly constant resolution for broad range of energies. The beam energy can be adjusted by means of negative bias of the specimen. In a conventional SEM, the positive charging is reduced via recapturing of a portion of slow secondary electrons. This is sufficient to re-establish the charge balance at a low surface potential. In a device equipped with cathode lens the axial field extracts the signal electrons. The secondary electrons (SE) would not be recaptured, if only axial field was present and the positive potential could fully develop. Fortunately in real configuration the part of a non-conductive specimen surface is charged-up (the viewfield), but the rest remains uncharged and radial electrostatic field is

created. The field combines itself with the cathode lens field in forming the signal electron beam. The examination of the surface charge in dependence on the viewfield size and landing electron energy, carried out in the scope of this work, has brought the answer to the question to which extent the positive surface potential can develop. It was found out that the recapturing of slow SE emitted under higher angles significantly lowers the positive potential. Ultimate positive surface potential depends on the size of the viewfield, on the axial field of the cathode lens and on the emission characteristic of the specimen. In the theoretical example, chosen in this work as a model one, defined by the maximum axial field $1,25 \text{ kVmm}^{-1}$ of the cathode lens, the specimen is characterised by the coefficient of the secondary emission $\delta=1,7$ at $E_L=500 \text{ eV}$ and $\eta=0,2$, which is constant in the investigated energy range. The critical energy of material is 1500 eV . The positive surface potential does not exceed the value of $20 - 30 \text{ eV}$ for high magnification. This fact seems to be convenient with respect to operation of the cathode lens equipped SEM in the working range below the critical energy.

The applicators of the cathode lens equipped devices in semiconductor technology have been afraid about the electric strength due to the cathode lens field. Nevertheless, the field on the specimen surface was found not exceeding the value, usual in semiconductor devices during operation. Even the investigation of relatively thick non-conductive specimens in the microscope at critical energy does not bring any problems in general.

The simulation of the signal beam trajectories in order to give information about the change in detection efficiency during measurement was carried out as the final step of this particular study. The conclusion is that the detection efficiency has no impact on results of critical energy determination.

The important limiting factor is the dependence of the total electron yield on the beam impact angle with respect to the surface normal. This causes the amplitude of local fluctuations of the critical energy related to the specimen topography. Another limitation arises in case of imaging of the coarse-grained specimen, composed of large pieces of different materials. Then the E'' variations can spread over the whole viewfield and the surface field above the specimen does not stay negligible. Owing to structure complexity it is extremely difficult to set any value of critical energy. For the prediction of applicability of this method there was done the investigation of uncoated, non-conductive specimens of biostructures.

The examples of life-science specimens, discussed in this work, are wood rotting fungi and small intestinal parasite *Giardia*.

The mycelia of wood rotting fungi can absorb heavy metals from the surrounding and can be utilised for bio-monitoring. They serve as the subject of study in Institute of Microbiology AS, where the observed examples, *Schizophyllum commune* and

Trametes versicolor come from. The mycelia could absorb the element cadmium in cultivation solutions with presence of this heavy metal. The investigation with use of microscopy at critical energies should reveal the distribution of the metal in the fungus body.

The result of the microscopic observation differed according to both the presence of contamination in the mycelia and the way of preparation (air drying, fixation with osmium tetroxide and fixation with glutaraldehyde together with critical point drying). The rate of charging is higher in the case of uncontaminated specimens, which project itself into the shift of critical energies to higher values. The direct effect of cadmium on mycelia can be seen in the morphological changes of the fungi. The presence of so-called „clamps“ (places, where the exchange of nuclei between the mycelia fibres occurs) indicates the specimen, cultivated in solution free of contamination. The clamps are absent in the contaminated specimens.

The images of contaminated specimen *Schizophyllum commune* at the energy of 1750 eV indicate the influence of the cadmium on pigmentation of mycelia. More sophisticated microscopic study with respect to real distribution of heavy metals could be performed in transmission electron microscope equipped with an electron energy loss spectrometer.

The surface charge, mostly present at every landing energy, can be observed in the micrographs of intestinal parasite *Giardia*. This is caused by its complex structure of cytoskeleton and flagella with different values of critical energy. Any variation of thickness or density results in variation of critical energy. Setting of the most appropriate value is then difficult, thus the specimen serves as an example of the material, where the observation by the method brings certain problems. Still the picture of an uncoated cell of the parasite imaged at critical energy reveals more details than the micrograph of the cell coated with platinum, taken in the instrument with much better ultimate resolution.

The conclusion, which can be drawn from this work, is obvious. In most cases the optimum energy for imaging of uncoated, non-conductive specimens does exist and brings better results than low energy in general.

LITERATURA

- [1] Frank, L.: Advances in the scanning electron microscopy. Adv. Imaging and El. Phys., v tisku.
- [2] Müllerová, I.: Rastrovací mikroskopie pomalými elektrony. Disertační práce k doktorátu věd, ČVUT Praha (2001).
- [3] Frank, L. - Müllerová, I.: Zero-charging electron microscopy in a cathode lens equipped SEM. In: Proc. 13th Internat. Congr. El. Microsc., Paris 1994, vol. I, 139–140.
- [4] Zadražil, M.: Zobrazování nevodivých preparátů metodou nenabíjecí elektronové mikroskopie. Doktorská disertační práce, VUT Brno (2001).
- [5] Frank, L. - Zadražil, M. - Müllerová, I.: Scanning electron microscopy of non-conductive specimens at critical energies in a cathode lens system. Scanning 23 (2001) 36–50.
- [6] Dahl, D.A.: Simion 3D, Version 6.0. In: Proc. 43rd ASMA Conf. on Mass Spectrom. and Allied Topics. Atlanta 1996, 717.
- [7] Lencová, B. - Wisselink, G: Program package for the computation of lenses and deflectors. Nucl. Instrum. Meth. A 298 (1990) 56–66.
- [8] Káňová, J. - Frank, L: Signal detection near the critical energy of non-charging illumination in a low-energy SEM equipped with a cathode lens. In: Proc. 12th Eur. Congr. El. Microsc., Brno 2000, vol. III, 203–204.
- [9] Gabriel, J. - Kofroňová, O. - Rychlovský, P. - Krenželok, M.: Accumulation and effect of cadmium in the wood-rotting basidiomycete *Daedalea quercina*. Bul. Environ. Contam. Toxicol. 57 (1996) 383–390.
- [10] <http://www.biomed.cas.cz/mbu/gabriel/fungi.htm> (MBÚ AV ČR, Praha).
- [11] Joy, D.C.: Control of charging in low-voltage SEM. Scanning 11 (1989) 1–4.

Seznam publikací

Káňová, Jitka

Scintilační detektor sekundárních elektronů s brzdícím polem

In: Sborník vyzvaných přednášek a posterových příspěvků Transfer '99, (Ed.: VUT, ISBN: 80 – 214 – 1341 – 7). - Vysoké učení technické v Brně, Brno 1999, C15 – C16.

[Transfer '99 – konference konaná v roce oslav 100. výročí založení VUT. Brno (CZ) 2000.06.7 – 2000.06.8]

Káňová, Jitka - Müllerová, Ilona - Frank, Luděk - Hutař, Otakar

Measurement of the critical energy in the SEM equipped with cathode lens

In: Proc. 4th EMAS Regional Workshop on Electron Probe Microanalysis, (Ed.: Starý, V. -Mašek, K. - Horák, K). - Třešť 2000, 209
[EMAS 2000 – Regional Workshop on Electron Probe Microanalysis of Materials Today. Třešť (CZ) 2000.05.17 – 2000.05.20]

Hutař, Otakar - Müllerová, Ilona - Romanovský, Vladimír - Káňová, Jitka
Recent trends in low voltage scanning electron microscopy for the imaging of semiconductor devices

In: Proc. 4th EMAS Regional Workshop on Electron Probe Microanalysis, (Ed.: Starý, V. - Mašek, K. - Horák, K). - Třešť 2000, 205
[EMAS 2000 – Regional Workshop on Electron Probe Microanalysis of Materials Today. Třešť (CZ) 2000.05.17 – 2000.05.20]

Káňová, Jitka - Frank, Luděk

Signal detection near the critical energy of non-charging illumination in a low-energy SEM
equipped with a cathode lens.

In: Proc. 12th European Congress on Electron Microscopy, (Ed.: Čiampor, F. - Frank, L). – Brno 2000, vol. III, 203 – 204
[EUREM 12 – European Congress on Electron Microscopy. Brno, 2000.07.9 – 2000.07.14]

Káňová, Jitka - Müllerová, Ilona - Frank, Luděk, Srnánek, Rudolf - Kováč, Jaroslav - Barna, Árpád

Examination of nanostructured multilayers by the scanning low energy microscopy

In: Proc. Autumn school 2000 on material Science and Electron microscopy, (Ed.: Su, D.S. - Wrabetz, S.). – Berlin 2000, 45 – 46
[Autumn school 2000 on Material Science and Electron Microscopy. Berlin – Dahlem (GE), 2000.10.10 – 2000.10.15]

Káňová, Jitka - Müllerová, Ilona - Frank, Luděk

Imaging of uncoated biostructures in a conventional SEM adapted to very low energy microscopy

In: Proc. 5th Multinational Congress on Electron Microscopy, (Ed.: Dini, L. - Catalano, M.).–University of Lecce, Lecce 2001, 527 – 528
[MCEM 2001 – Multinational Congress on Electron Microscopy. Lecce (IT), 2001.09.20 – 2001.09.25]

Curriculum vitae

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Jitka Káňová

Datum narození: 13.6.1971

Vzdělání:

1989 – 1994 Fakulta elektrotechniky a informatiky, VUT Brno

Obor mikroelektronika, zaměření elektronické součástky a systémy, téma diplomové práce: Evaluation of Test Pattern Generation Software, roční pobyt v zahraničí (Belgie) v rámci projektu TEMPUS.

1994 – 1997 odborná asistentka, Fakulta elektrotechniky a informatiky, VUT Brno

Praxe:

1997 – dosud zaměstnána v Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně

pokračování postgraduálního studia, rigorózní zkouška úspěšně složena v roce 1999. Pracovní náplň – návrh detektoru pro nízkoenergiový elektronový rastrovací mikroskop, nyní zobrazování nevodivých vzorků v nízkoenergiovém rastrovacím mikroskopu.

Počítačové programy:

programy PSpice (analýza elektronických obvodů a systémů), SIMION (programový prostředek pro simulaci pohybu nabitých částic) a MS Windows 95/98

Jazykové znalosti:

angličtina, němčina – plynně