

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
FAKULTET ZA FIZIKU**

Studijski program Fizika

Mihaela Ištvanic Brzica

**PRETRAŽNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP U
MIKROBIOLOGIJI I DIJAGNOSTICI
ZARAZNIH BOLESTI**

Završna preddiplomska radnja

izv. prof. dr. sc. Ivna Kavre Piltaver

Rijeka, 2024.

ZAHVALA

Želim izraziti posebnu zahvalnost svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivni Kavre Piltaver, na podršci, strpljenju i vodstvu tijekom pisanja ove završne radnje. Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivani Gobini s Medicinskog fakulteta u Rijeci na ljubaznom doniranju uzoraka te izv. prof. dr. sc. Ivi Šarić Janković i izv. prof. dr. sc. Ivni Kavre Piltaver na snimanju slika bakterija i dopuštenju za njihovo korištenje u ovoj radnji.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PRETRAŽNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)	2
2.1. Povijest mikroskopije	2
2.2. Građa i princip rada SEM-a	4
2.2.1. Elektronski top	5
2.2.1.1. Elektronski top s hladnom emisijom polja.....	5
2.2.2. Sustav elektromagnetskih leća	6
2.2.3. Detektori	8
2.2.4. Usmjeravajuća zavojnica	8
2.2.5. Komora za uzorke	9
2.2.6. Vakuumski sustav	9
2.2.7. Računalo i operacijski sustav	9
2.3. Nastajanje slike	9
2.3.1. Obujam međudjelovanja	10
2.3.2. Međudjelovanje elektrona s uzorkom	10
2.3.3. Sekundarni elektroni	11
2.3.4. Povratno raspršeni elektroni	12
2.3.5. Karakteristične rendgenske zrake	12
2.3.6. Transmitirani elektroni	13
2.4. Učinak nabijanja	14
2.4.1. Utjecaj učinka nabijanja na SEM sliku	14
2.4.2. Naprašivanje uzorka	15
2.5. Prednosti i nedostaci SEM-a	15
3. MIKROBIOLOŠKI UZORCI	17
3.1. Priprema mikrobioloških uzoraka za SEM analizu	17
3.1.1. Rezanje i čišćenje.....	17
3.1.2. Fiksacija.....	17
3.1.3. Dehidracija i sušenje	17
3.1.4. Kontrastiranje.....	18
3.1.5. Montiranje.....	19
3.1.6. Naprašivanje	19
3.2. Napredci u pripremi uzoraka i upotreba SEM-a u mikrobiologiji	20
4. ANALIZA MIKROBIOLOŠKIH UZORAKA NA JEOL FEG SEM-U JSM-7800F	23
4.1. Pretražni elektronski mikroskop JEOL FEG SEM JSM-7800F	23
4.2. Pseudomonas fluorescens	24
4.3. Klebsiella pneumoniae	25
5. ZAKLJUČAK	27
LITERATURA	28

SAŽETAK

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) koristi snop elektrona za pretraživanje površine uzorka. SEM omogućuje analizu površinske strukture mikroorganizama, a fokus ovog rada je njegova upotreba u mikrobiologiji i dijagnostici zaraznih bolesti. U radu je opisan povijesni razvoj mikroskopije, građa i rad pojedinih dijelova mikroskopa, proces nastanka slike i učinci koji utječu na njezinu kvalitetu. Objašnjen je proces međudjelovanja elektrona s uzorkom te nastanak različitih vrsta signala koji pružaju informacije o građi i sastavu uzoraka. Naglasak ovog rada je na opisu procesa pripreme mikrobioloških uzoraka za SEM analizu te problemima koji se javljaju tijekom tog procesa. Inovacije u pripremi uzoraka predstavljene su kroz aktualna istraživanja koja pokazuju potencijal za korištenje SEM-a u kliničkoj dijagnostici zaraznih bolesti. Rad SEM-a opisan je na praktičnom primjeru analize bakterija *Pseudomonas fluorescens* i *Klebsiella pneumoniae*, snimljenih na FEG SEM-u JSM-7800F u Laboratoriju za pretražnu elektronsku mikroskopiju Sveučilišta u Rijeci.

Ključne riječi: pretražni elektronski mikroskop, mikrobiološki uzorci, priprema uzoraka, zarazne bolesti, klinička dijagnostika

1. UVOD

Pretražni elektronski mikroskop (eng. *Scanning Electron Microscope*, SEM) vrsta je elektronskog mikroskopa koji koristi snop elektrona za pretraživanje površine uzorka. SEM se koristi u mnogim znanstvenim disciplinama zbog sposobnosti stvaranja visokorazlučivih slika materijala na mikro i nano skali. SEM omogućuje vizualizaciju površinskih struktura mikroorganizama uključujući bakterije, viruse, gljivice i druge mikroorganizme te je zato važan alat u području mikrobiologije. Proučavanje morfologije mikroorganizama ključno je za njihovu identifikaciju i klasifikaciju te razumijevanje njihovog razvoja, a brza identifikacija patogenih mikroorganizama omogućava pravovremenu dijagnozu i liječenje zaraznih bolesti, posebno u slučajevima gdje su tradicionalne metode prespore.

U ovoj se radnji kroz četiri poglavlja opisuje rad i upotreba SEM-a. U drugom poglavlju dan je kratak povijesni pregled mikroskopije koji je doveo do razvoja i upotrebe SEM-a u današnje vrijeme. Zatim su razrađeni dijelovi SEM-a, fizikalni principi koji stoje iza njegovog rada, proces nastanka slike i efekti koji se u tom procesu pojavljuju. Treće poglavlje bavi se metodama pripreme mikrobioloških uzoraka i napretkom u tim metodama. Analiza mikrobioloških uzoraka na JEOL FEG SEM-u JSM-7800F opisana je u četvrtom poglavlju. Na kraju radnje iznesen je zaključak koji sažima sve ključne pojmove i obrađene rezultate.

2. PRETRAŽNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)

Pretražni elektronski mikroskop sofisticirani je uređaj koji se ističe svojom sposobnošću stvaranja visokorazlučivih slika površine uzoraka. Njegova građa uključuje elektronski top, magnetske leće, usmjeravajuću zavojnicu, vakuumski sustav te različite detektore, od kojih svaki ima određenu ulogu u procesu stvaranja slike. U nastavku ovog poglavlja prikazan je kratak pregled povijesnog razvoja mikroskopije, a nakon toga su predstavljeni ključni dijelovi mikroskopa, pri čemu je posebna pažnja posvećena objašnjenju njihovog načina rada.

2.1. Povijest mikroskopije

Mikroskopija je znanstvena disciplina koja proučava objekte na mikroskopskoj razini, omogućujući vizualizaciju i istraživanje objekata koji nisu vidljivi ljudskom oku. Njezina bogata povijest datira stoljećima unatrag. U nastavku slijede ključne godine i prekretnice u povijesti ove znanstvene discipline.

- ~4000. pr. Kr.: Dostupni dokazi ukazuju na to da su drevne kineske civilizacije prije više od 4000 godina primjenjivale tehnike povećanja, razvijajući razne instrumente.
- ~300. pr. Kr.: Euklid je zabilježio pojavu uvećanja pomoću staklene leće, dok je Seneka proširio koncept povećanja povezujući ga s lomom svjetlosnih zraka.
- ~1000. godina: Izum leća za čitanje predstavljao je revolucionarni korak u optici, omogućujući povećanje teksta radi poboljšane čitljivosti.
- ~1284. godina: Salvino D'Armate zaslužan je za izum prvih naočala.
- 1609. godine Galileo Galilei samostalno je razvio svoj vlastiti mikroskop, predstavljajući unapređenje u odnosu na dotadašnje jednostavne mikroskope s jednom lećom. Njegovo postignuće bilo je značajno jer je kombinirao leće kako bi postigao veće povećanje. Galilejev prijatelj, Giovanni Faber, zaslužan je za naziv instrumenta „mikroskop“, izraz koji potječe od grčkih riječi *micron*, što znači „malen“ i *skopein* što znači „promatrati“ [1].
- 1655. godine Robert Hooke uveo je znanstveni pojam „stanica“ nakon promatranja plutajućeg tijela pod mikroskopom. Svoje otkriće objavio je u knjizi *Micrographia*.
- 1729. godine Chester Moore izumio je akromatsku leću koja služi za ispravljanje kromatske aberacije.

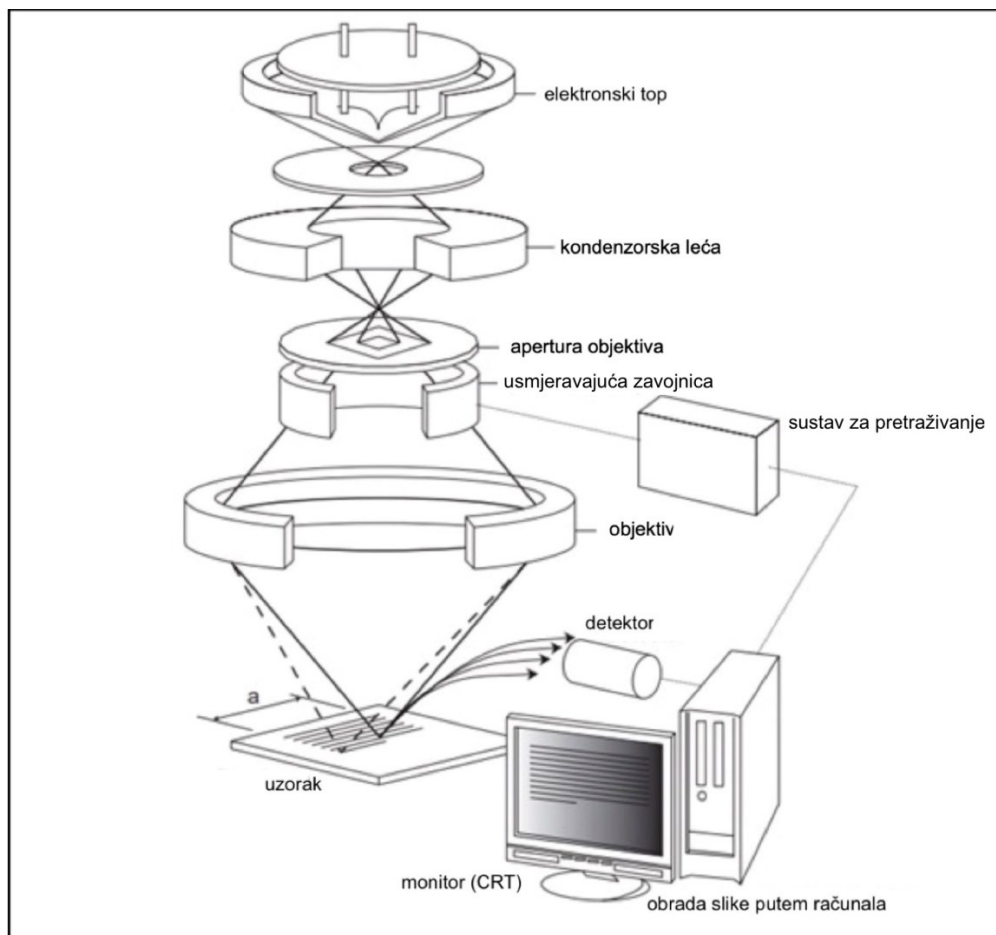
- 1676. godine Antonie van Leeuwenhoek, poznat kao „otac mikroskopije“, izumio je mikroskop s dovoljno velikim povećanjem za promatranje bakterija.
- 1942. godine Ernst Ruska konstruirao je prvi elektronski mikroskop, koji koristi snop elektrona za stvaranje slike.
- 1978. godine Thomas i Christoph Cremer razvili su prvi konfokalni laserski pretražni mikroskop, koristeći fokusiranu lasersku zraku za pretraživanje objekata.
- 1900. - danas: Znanstveni napredci tijekom 20. stoljeća omogućili su liječenje mnogih bolesti zahvaljujući sposobnostima vizualizacije mikroskopa. U 20. stoljeću, zabilježeno je masovno širenje tržišta mikroskopa, praćeno značajnim poboljšanjima u povećanju, osvjetljavanju uzoraka i izvorima svjetlosti [2].

U suvremenom svijetu, pretražni elektronski mikroskop ima širok spektar primjena u znanosti i industriji. SEM je vrsta elektronskog mikroskopa koji koristi fokusirani snop elektrona za pretraživanje površine uzorka. Prednost SEM-a je njegova sposobnost stvaranja slika iznimno visoke razlučivosti i dubine polja te mogućnost znatno većeg povećanja u usporedbi s optičkim mikroskopima.

2.2. Građa i princip rada SEM-a

Građu pretražnog elektronskog mikroskopa karakterizira pažljivo usklađen postav koji omogućuje precizno usmjeravanje elektronskog snopa i pretraživanje površine uzorka, kao što je prikazano na slici 2.1. Osnovni dijelovi SEM-a su:

- elektronski top,
- sustav elektromagnetskih leća,
- detektori,
- usmjeravajuća zavojnica,
- komora za uzorke,
- vakuumski sustav,
- računalo i operacijski sustav te
- odgovarajući softver za slikanje.



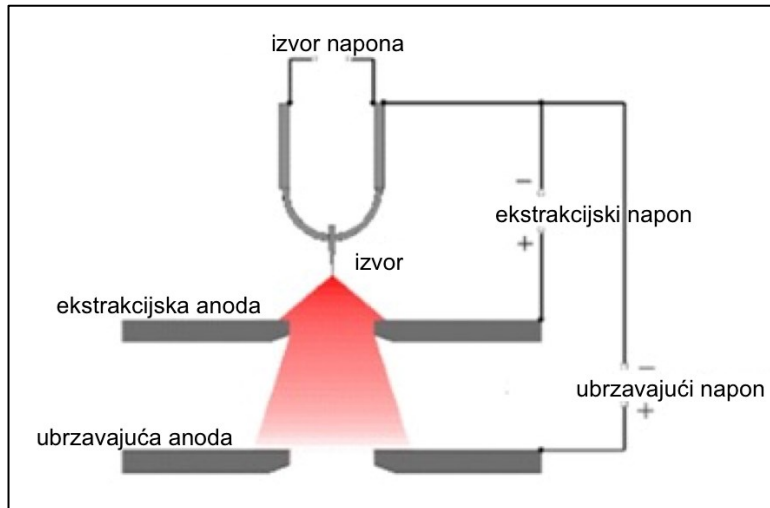
Slika 2.1. Shematski prikaz SEM-a [3]

2.2.1. Elektronski top

Elektronski top je komponenta elektronskog mikroskopa koja služi kao izvor elektrona. Pozicioniran je na samom vrhu mikroskopske kolone, a svrha mu je emisija i ubrzanje elektrona, odnosno stvaranje visokoenergetskog snopa elektrona nužnog za snimanje uzorka. Postoje dvije glavne podjele elektronskih topova: top s termičkom emisijom (*eng. Thermal Emission, TE*) gdje su najznačajniji izvori elektrona volframova nit, CeB_6 i LaB_6 te top s emisijom polja (*eng. Field Emission Gun, FEG*), gdje se kao izvor koristi volframov šiljak, a dijelimo ih na Schottky FEG i hladni FEG. Osim u elektronskim mikroskopima, elektronski topovi koriste se u raznim znanstvenim i tehnološkim područjima uključujući ubrzivače čestica, katodne cijevi i tehniku zavarivanja elektronima (*eng. Electron Beam Welding, EBW*). U daljnjem tekstu, detaljno je opisan elektronski top s emisijom polja, jer je SEM koji je korišten za analizu uzoraka u završnom dijelu radnje Jeolov pretražni elektronski mikroskop s hladnom emisijom polja JSM-7800F.

2.2.1.1. Elektronski top s hladnom emisijom polja

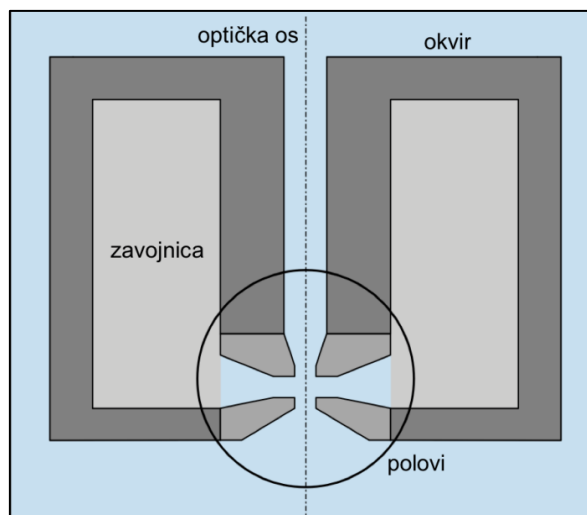
FEG vrsta elektronskog topa koristi efekt emisije elektrona poljem. Do efekta dolazi kada se katoda postavi u jako električno polje. Umjesto povećanja energije elektrona, kod emisije elektrona poljem smanjuje se potencijalna barijera unutar materijala katode kako bi se omogućio efekt tuneliranja [4]. Građa ove vrste elektronskog topa prikazana je na slici 2.2. Katoda je sastavljena od tanke volframove žice na koju je zavaren volframov kristal polumjera 100 nm [5]. Da bi se izbjeglo međudjelovanje s atomima plinova te da bi se uspješno uspostavila emisija elektrona, ovaj je sustav potrebno držati pod visokim vakuumom od približno 10^{-8} Pa. Kristal, koji čini izvor elektrona, smješten je u jako električno polje. Ekstrakcijska anoda spojena je na pozitivan pol izvora i nalazi se na visokom potencijalu što omogućuje efekt tuneliranja elektrona iz izvora. Ona u svojem središtu ima pukotinu koja propušta samo elektrone bliske središnjoj osi. Ispod nje se nalazi ubrzavajuća anoda kojom je moguće kontrolirati energiju emitiranih elektrona. Dobivena zraka elektrona ponaša se kao mali izvor promjera 5 do 10 nm [5]. Usporedbom s TE vrstom topova, ovaj elektronski top proizvodi puno užu zraku što u konačnici omogućuje višu razlučivost dobivenih slika, dok Schottky FEG pruža stabilniju emisiju elektrona, ali i nižu razlučivost.



Slika 2.2. Građa elektronskog topa s emisijom polja [6]

2.2.2. Sustav elektromagnetskih leća

U SEM-u, leće imaju ključnu ulogu u kontroli i usmjeravanju elektronskog snopa. U elektronskim mikroskopima koriste se magnetske leće, za razliku od optičkih mikroskopa gdje se koriste optičke leće.

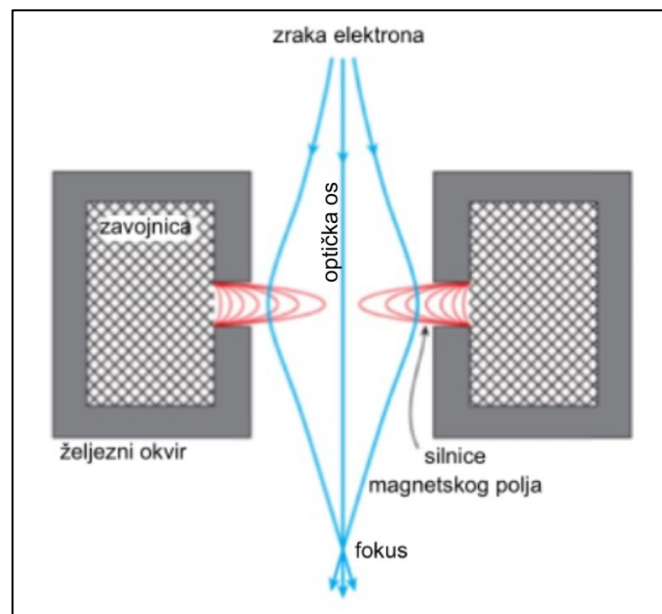


Slika 2.3. Konstrukcija magnetske leće [5]

Na slici 2.3. nalazi se shema magnetske leće. Sastoji se od zavojnice i metalnog okvira. Kada zavojnicom protječe električna struja, oko nje se stvara magnetsko polje prema Ampèrovu zakonu:

$$\oint_C \mathbf{B} \cdot d\mathbf{l} = \mu_0 I \quad (2-1)$$

gdje B označava magnetsku indukciju, $d\mathbf{l}$ infinitezimalni element duž putanje integracije, μ_0 permeabilnost vakuuma, a I ukupnu struju koja prolazi kroz površinu omeđenu krivuljom C . Nastalo magnetsko polje služi za usmjeravanje elektrona, odnosno zaslužno je za efekt leće. Ključno svojstvo magnetske leće jest mogućnost prilagodbe njezine jačine, a provodi se promjenom struje kroz zavojnicu prema relaciji (2-1). Na metalnom okviru nalazi se mali otvor koji propušta magnetsko polje prema optičkoj osi mikroskopa. Na slici 2.4. prikazane su silnice induciranog magnetskog polja. Na elektrone koji prolaze bliže optičkoj osi mikroskopa, magnetsko polje djeluje slabije što je karakterizirano manjom gustoćom magnetskih silnica, dok na one elektrone koji su udaljeniji od osi djeluje snažnije, odnosno nastoji ih usmjeriti natrag prema osi.



Slika 2.4. Utjecaj magnetskog polja na snop elektrona [7]

Unutar SEM-a postoji sustav magnetskih leća koji se sastoji od kondenzorske leće i objektivna. Nakon što elektroni napuste područje elektronskog topa, ubrzani su naponom kao što je opisano u poglavlju 2.2.1.1. Prolaze kondenzorskom lećom, koja služi za konvergiranje upadne divergentne elektronske zrake, elektromagnetom za usmjeravanje elektronskog snopa te objektivom, koji fokusira snop u što manju točku na površini uzorka (sl. 2.1).

2.2.3. Detektori

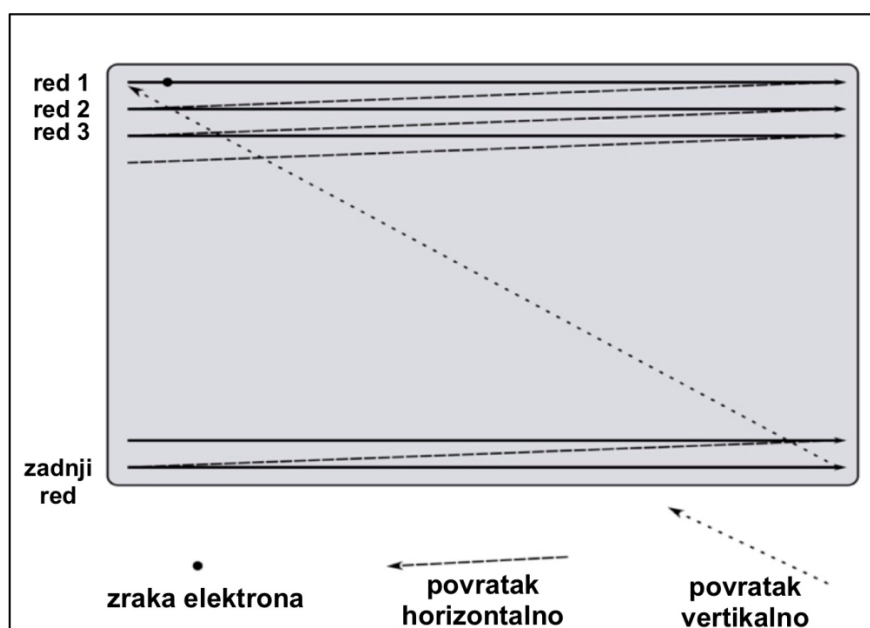
Detektori su uređaji koji služe za prikupljanje različitih vrsta signala koji nastaju kao posljedica međudjelovanja primarnih elektrona (elektroni koji dolaze iz izvora) s uzorkom. Svaki od nastalih signala zahtjeva određenu vrstu detektora pa tako, između ostalih, postoje:

- detektor za sekundarne elektrone (eng. *Secondary electron detector*, SED),
- detektor za povratno-raspršene elektrone (eng. *Backscattered electron detector*, BED),
- detektor za karakteristične rendgenske zrake (eng. *Energy dispersive spectroscopy*, EDS),
- detektor za Augerove elektrone (eng. *Auger electron spectroscopy*, AES),
- detektor katodoluminiscencije (eng. *Cathodoluminescence*, CL) i
- detektor za transmitirane elektrone (eng. *Transmission electron detector*, TED).

Različiti detektori pružaju nam različite informacije istog uzorka.

2.2.4. Usmjeravajuća zavojnica

Usmjeravajuća zavojnica ima ulogu usmjeravanja fokusiranog elektronskog snopa preko površine uzorka. Elektronski snop prelazi po površini uzorka u horizontalnom i vertikalnom smjeru. Moguće su varijacije u konfiguraciji i broju korištenih zavojnica, no većina mikroskopa koristi dva para zavojnica za kontrolu snopa u dva smjera. Promjenom struje kroz zavojnice, snop se kreće red po red od vrha do dna uzorka stvarajući rasterski uzorak snimanja prikazan na slici 2.5.



Slika 2.5. Rasterski uzorak snimanja [8]

2.2.5. Komora za uzorke

Komora za uzorke nalazi se na dnu mikroskopa. Tijekom snimanja, komora je održavana pod vakuumom. Unutar komore nalaze se: stalak za uzorke, držač uzoraka i detektori. Komora za uzorke opremljena je i vratima koja omogućavaju korisniku umetanje i uklanjanje uzoraka. Vrata su dizajnirana tako da se mogu hermetički zatvoriti što je bitno za održavanje vakuuma unutar komore.

2.2.6. Vakuumski sustav

Tijekom snimanja, kolona i komora za uzorke moraju biti pod visokim vakuumom kako bi se elektroni slobodno kretali bez sudara s molekulama zraka. Vakuum je potreban za sprječavanje oksidacijskog oštećenja unutar elektronskog topa. U koloni SEM-a, koji za izvor elektrona koristi elektronski top s emisijom polja, održava se izuzetno nizak tlak, postižući vrijednosti do 10^{-6} Pa, dok se u komori za uzorke tlak održava na razini od 10^{-5} Pa.

2.2.7. Računalo i operacijski sustav

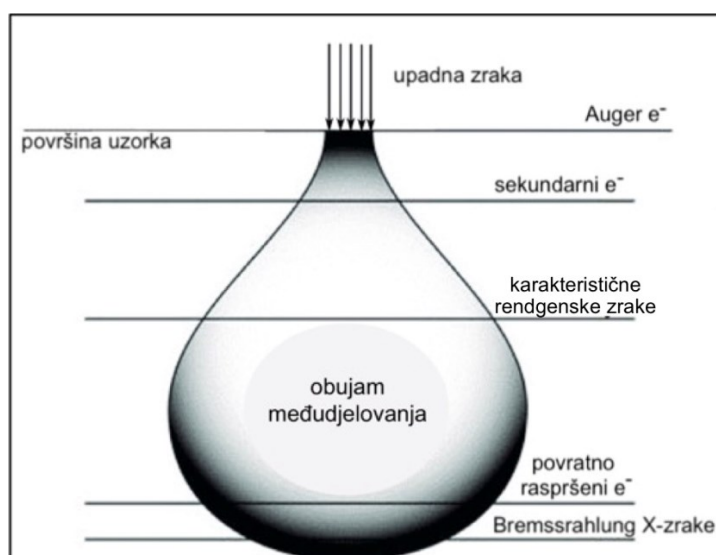
Pretražni elektronski mikroskopi u današnje se vrijeme upravljaju putem računala opremljenim odgovarajućim softverskim sustavima. Korisnicima mikroskopa omogućeno je lako pristupanje i širok spektar kontrola koje uključuju gotovo sve segmente rada mikroskopa. Neke od mogućnosti su: prilagodba parametara elektronskog snopa, precizno pozicioniranje uzoraka u komori, odabir i prilagodba detektora za specifične potrebe snimanja, upravljanje vakuumskim sustavom i mnoge druge. Postoje razni softveri koji sadrže alate za obradu slika u stvarnom vremenu, analizu i interpretaciju podataka te njihovo spremanje i organizaciju.

2.3. Nastajanje slike

Proces nastajanja slike putem SEM-a temelji se na međudjelovanju primarnih elektrona s uzorkom. Kad primarni elektroni pogode površinu promatranog uzorka, dolazi do međudjelovanja koje rezultira različitim signalima potrebnim za stvaranje slike. U nastavku je opisano međudjelovanje elektrona s uzorkom, obujam međudjelovanja te neke vrste signala koji nastaju kao posljedica tih međudjelovanja.

2.3.1. Obujam međudjelovanja

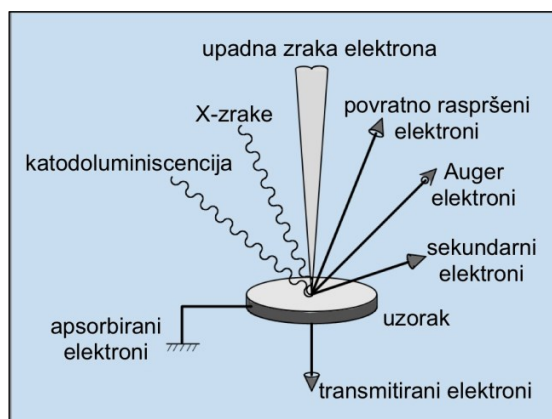
Elektroni koji uđu u uzorak ne slijede linearnu putanju, već se višestruko raspršuju uslijed međudjelovanja s atomima uzorka. Obujam međudjelovanja definira se kao obujam unutar kojeg primarni elektroni međudjeluju s atomima uzorka, a ovisi o energiji primarnih elektrona te atomskom broju i gustoći materijala uzorka. Slika 2.6. prikazuje skicu koja ilustrira obujam međudjelovanja za različite vrste signala. Veća energija upadnih elektrona uzrokuje veći obujam međudjelovanja zato što omogućava elektronima dublje prodiranje u materijal prije nego što izgube energiju i apsorbiraju se. S druge strane, veći atomski broj i gustoća uzorka povećavaju vjerojatnost međudjelovanja elektrona s atomima uzorka što dovodi do većeg gubitka energije unutar manjeg obujma.



Slika 2.6. Obujam međudjelovanja [9]

2.3.2. Međudjelovanje elektrona s uzorkom

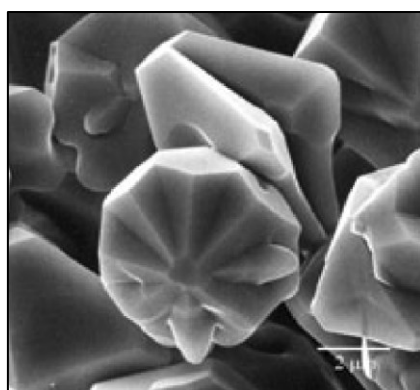
Primarni elektroni mogu na više načina međudjelovati s atomima uzorka. Može doći do elastičnog i neelastičnog raspršenja što u konačnici dovodi do stvaranja raznih vrsta signala koji su prikazani na slici 2.7. Svaki od prikazanih rezultata međudjelovanja pruža različite informacije o svojstvima uzorka.



Slika 2.7. Vrste signala koje nastaju kao posljedica međudjelovanja [5]

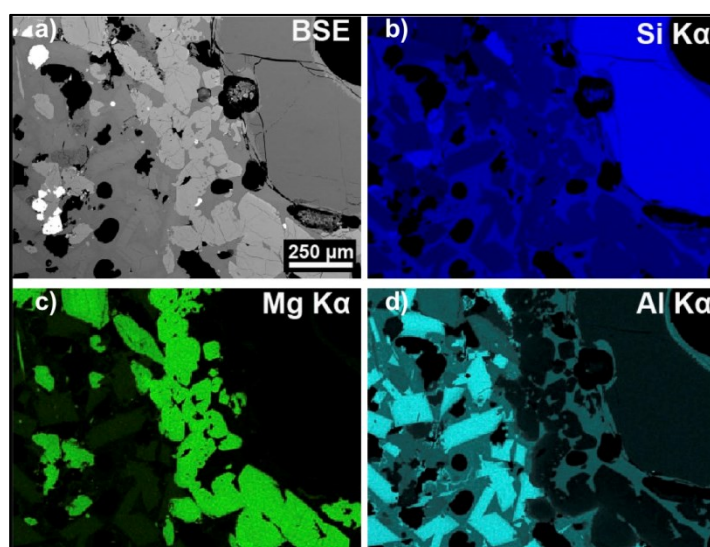
2.3.3. Sekundarni elektroni

Sekundarni elektroni nastaju putem neelastičnih sudara primarnih elektrona s valentnim elektronima atoma uzorka i imaju relativno niske energije, do 50 eV. Broj detektiranih sekundarnih elektrona ovisi o kutu upadne zrake; okomita zraka rezultira manjim brojem detektiranih sekundarnih elektrona jer prodire dublje u uzorak, što smanjuje vjerojatnost da će emitirani elektroni doseći površinu. S druge strane, kada snop elektrona upada pod oštrijim kutom, sekundarni elektroni se emitiraju bliže površini uzorka što omogućuje detekciju većeg broja sekundarnih elektrona. Slika 2.8., nastala pomoću sekundarnih elektrona, prikazuje razliku u osvjetljenju površine kristala volframovog oksida. Veći broj sekundarnih elektrona detektira se iz područja s upadnim kutom manjim od 90° , što je prikazano svjetlijim dijelovima na slici, dok su područja s okomitim upadom tamnija zbog manjeg broja detektiranih sekundarnih elektrona. Zbog navedenog svojstva, sekundarni elektroni koriste se za promatranje topografije površine uzorka.



Slika 2.8. Slika kristala volframovog oksida nastala pomoću sekundarnih elektrona [5]

stanja zatim popunjavaju „prazninu“ pri čemu se emitira energija u obliku fotona rendgenske zrake. Karakteristične rendgenske zrake povoljne su za analizu sastava uzorka putem energo disperzivne spektroskopije (eng. *Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) ili spektroskopije disperzije valne duljine (eng. *Wavelength Dispersive Spectroscopy*, WDS). EDS je metoda kojom se mjeri energijski spektar karakterističnih rendgenskih zraka pomoću poluvodičkog detektora, a zatim identificira sastavne elemente uzorka (kvalitativna analiza) iz vrijednosti energije spektra te određuje koncentracije identificiranih sastavnih elemenata iz intenziteta spektra (kvantitativna analiza) [11]. Također, moguće je dobiti dvodimenzionalnu raspodjelu elemenata u uzorku, poznatu kao „mapiranje“, a primjer takve analize prikazan je na slici 2.10.



Slika 2.10. a) SEM slika nastala pomoću BSE detektora, mape kristalnih i staklastih faza unutar vulkanske stijene nastale pomoću EDS detektora rendgenskih zraka: b) kvarc, c) piroksen i d) plagioklas [12].

2.3.6. Transmitirani elektroni

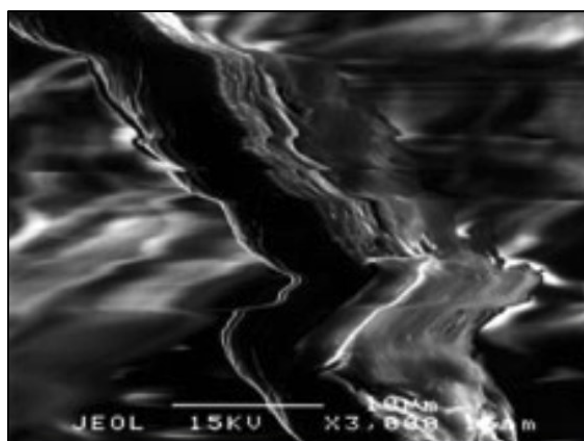
Elektroni koji prolaze kroz uzorak nazivaju se transmitiranim elektronima. Broj transmitiranih elektrona obrnuto je proporcionalan debljini uzorka. Deblji dijelovi uzorka će propustiti manje elektrona pa će to područje na slici biti tamnije, dok će tanji dijelovi uzorka propustiti više elektrona pa će to područje izgledati svjetlije. Za razliku od detektora za sekundarne elektrone, povratno raspršene elektrone te rendgenske zrake, koji se nalaze iznad uzorka, detektor za transmitirane elektrone se nalazi ispod uzorka. Ovaj detektor, zbog navedenih svojstava transmitiranih elektrona, omogućuje analizu unutrašnje strukture uzorka.

2.4. Učinak nabijanja

Učinak nabijanja javlja se tijekom promatranja nevodljivih uzoraka. Kad primarni elektroni iz snopa uđu u uzorak, gube energiju i nakon nekog vremena apsorbiraju se u njemu. U slučaju vodljivih uzoraka, elektroni mogu proći kroz uzorak i naposljetku se uzemljiti putem stalka za uzorke, čime se sprječava nakupljanje negativnog naboja. Kod nevodljivih uzoraka, elektroni ne mogu proći kroz uzorak, već dolazi do nakupljanja negativnog naboja. Ako je broj elektrona koji ulaze u uzorak veći od broja elektrona koji izlaze iz uzorka, dolazi do negativnog nabijanja uzorka, odnosno do učinka nabijanja.

2.4.1. Utjecaj učinka nabijanja na SEM sliku

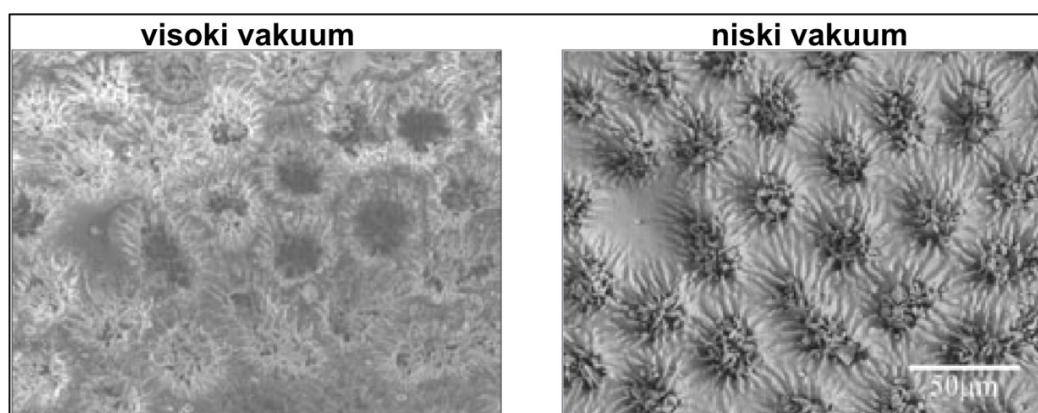
Učinak nabijanja značajno utječe na kvalitetu slike. Ako negativnim nabijanjem nastane dovoljno visoki (negativni) potencijal, on utječe na snop primarnih elektrona koji dolaze do uzorka i skreće njegovu putanju zbog odbojne Coulombove sile. Također, ako dođe do naglog pražnjenja, snop se na trenutak vraća na svoju prvotnu poziciju. Takav utjecaj uzrokuje izobličenje slike kao što je slučaj prikazan na slici 2.11.



Slika 2.11. Izobličenje slike nastalo zbog učinka nabijanja [5]

Kod promatranja nevodljivih uzoraka, efekt nabijanja se može izbjeći primjerice korištenjem niskog vakuuma (eng. *Low Vacuum SEM*, LVSEM). Smanjenjem vakuuma, plin u komori međudjeluje s elektronskim snopom i dolazi do ionizacije. Pozitivni ioni plina neutraliziraju uzorak i time suzbijaju učinak nabijanja. Bitno je napomenuti da se LVSEM koristi kod

promatranja uzoraka s manjim povećanjima. Na slici 2.12. vidljivo je da korištenje niskog vakuuma rezultira većom kvalitetom slike kod snimanja nevodljivih uzoraka.



Slika 2.12. Primjer slika nevodljivog uzorka nastalih upotrebom visokog i niskog vakuuma tijekom snimanja [5]

2.4.2. Naprašivanje uzorka

Postoji više metoda kojima se sprječava ili smanjuje utjecaj učinka nabijanja, a najčešće se koristi metoda naprašivanja uzorka. U tom se slučaju nevodljivi uzorak prekriva tankim slojem visokovodljivog metala, kao što je zlato, platina ili legure zlata i paladija te platine i paladija [5]. Debljina vodljivog sloja obično iznosi nekoliko nanometara. Naprašivanje uzorka omogućuje vodljivost površine uzorka i time sprječava neželjeno nakupljanje naboja.

2.5. Prednosti i nedostaci SEM-a

Razumijevanje prednosti i nedostataka SEM-a ključno je za njegovu učinkovitu upotrebu i procjenu prikladnosti za specifična istraživanja.

Budući da su valne duljine elektrona do sto tisuća puta manje od valnih duljina vidljive svjetlosti, SEM može razlučiti detalje stotine tisuća puta manje od optičkih mikroskopa [13]. Osim toga, kontrast i velika dubina fokusa omogućuju trodimenzionalnu analizu koja je u mikrobiologiji bitna za proučavanje složenih struktura mikroorganizama. Također, zbog mogućnosti korištenja raznih vrsta detektora, SEM pruža širok raspon informacija o uzorku kao što su struktura površine, elementarni sastav uzorka i raspodjela elemenata te gustoća i debljina uzorka. Mnoge vrste SEM-a pružaju mogućnost promatranja uzoraka u stvarnom vremenu i time omogućuju brzu analizu uzoraka i prilagodbe tijekom snimanja.

Jedan od glavnih nedostataka SEM-a je visoka cijena opreme i održavanja. Da bi SEM ispravno radio, potrebno je često održavanje, uključujući periodičnu zamjenu potrošnih dijelova, kao što su filament u elektronskom topu, te redovitu kalibraciju elektroničkih komponenti [14]. Drugi nedostatak SEM-a je zahtjevan proces pripreme uzoraka za snimanje, koji je detaljnije opisan u poglavlju 3.1. Ovaj proces može biti dugotrajan i zahtijevati dodatnu opremu. Korištenje SEM-a također donosi određena ograničenja. Budući da se snimanje odvija u uvjetima visokog vakuuma, određene vrste uzoraka, uključujući neke biološke materijale, ne mogu biti analizirane s visokovakuumskim SEM-om. Osim toga, neki osjetljivi uzorci mogu biti oštećeni tijekom snimanja.

3. MIKROBIOLOŠKI UZORCI

Mikrobiologija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem mikroorganizama i njihovog međudjelovanja s okolinom i drugim organizmima. Prema području istraživanja dijeli se na bakteriologiju, virologiju, mikologiju i parazitologiju, a prema namjeni na medicinsku, veterinarsku, poljoprivrednu i tehničku mikrobiologiju; medicinska mikrobiologija dijeli se na opću, kliničku i sanitarnu [15]. U ovom su poglavlju opisane metode pripreme mikrobioloških uzoraka za SEM analizu te napredci u procesu pripreme i primjena SEM-a u kliničkoj mikrobiologiji.

3.1. Priprema mikrobioloških uzoraka za SEM analizu

Prije analize željenog uzorka, potrebno ga je provesti kroz proces pripreme. Taj se proces razlikuje ovisno o vrsti promatranog uzorka, a osjetljivi materijali zahtijevaju posebnu brigu i dulje vrijeme pripreme. Cilj ovog procesa je pripremiti uzorak na uvjete snimanja unutar mikroskopa kako bi se dobili kvalitetni i vjerodostojni podatci. Proces pripreme mikrobioloških uzoraka dijeli se na nekoliko koraka.

3.1.1. Rezanje i čišćenje

Prvi korak u pripremi čini rezanje uzoraka na odgovarajuću veličinu prikladnu za snimanje. Za rezanje se koriste precizne pile. Zatim je potrebno očistiti površinu uzorka od nepoželjnih slojeva. Kod organizama koji stvaraju sluz, kao što su neki paraziti, potrebno je maknuti sluz putem centrifuge ili korištenjem određenih enzima i kemikalija.

3.1.2. Fiksacija

Zatim na red dolazi fiksiranje uzoraka čiji je cilj očuvanje strukture. Budući da tkivo počinje mijenjati svoju strukturu nakon smrti, kako bi se spriječila ta promjena, ono se kemijski fiksira kemikalijama poput glutaraldehida, formaldehida i osmij tetroksida [5].

3.1.3. Dehidracija i sušenje

Nakon fiksiranja slijedi dehidracija i sušenje uzorka. Rad SEM-a zahtijeva nizak tlak što predstavlja nepovoljan uvjet za gotovo sve biološke uzorke zbog visokog udjela vode u njihovom sastavu. Dehidracija mikrobioloških uzoraka stoga je jedan od najvažnijih koraka u pripremi. Cilj je osušiti uzorke, a istovremeno izbjeći deformacije u njihovoj strukturi pa se ovaj proces može izvesti na nekoliko načina. U procesu dehidracije, uzorak se u nekoliko koraka uranja u otopine etanola, čija se koncentracija svakim korakom povećava kako bi se

naposljetku voda zamijenila sa stopostotnim etanolom. Nakon dehidracije slijedi sušenje. Mikrobiološki uzorci nisu povoljni za sušenje na zraku zbog mogućnosti deformacije uslijed djelovanja površinske napetosti. Zbog toga, često se koristi metoda za sušenje na principu kritične točke ili metoda sušenja zamrzavanjem.

Sušenje na principu kritične točke (eng. *Critical Point Drying*, CPD) je metoda sušenja osjetljivih uzoraka, a provodi se dovođenjem tekućine u uzorku do kritične točke. Dehidrirani uzorak uranja se u tekući CO₂, koji kritičnu točku postiže na temperaturi od 31 °C i tlaku od 73,8 bar. Pomoću uređaja koji je prikazan na slici 3.1., CO₂ se dovodi do kritične točke i pretvara u plinovito stanje smanjenjem tlaka pri konstantnoj temperaturi.



Slika 3.1. Uređaj za sušenje koji radi na principu kritične točke (Quorum K 850) u sklopu Laboratorija za pretražnu elektronsku mikroskopiju [16]

Druga mogućnost sušenja je metoda sušenja zamrzavanjem, poznata pod nazivom *liofilizacija*. Ova se metoda temelji na sublimaciji tekućine unutar uzorka, pri čemu se prvo uzorak na odgovarajući način zamrzava te zatim, izravno prelazi iz čvrstog stanja u plinovito, sprječavajući utjecaj površinskih sila koje su značajne tijekom fazne promjene iz tekućine u plin.

3.1.4. Kontrastiranje

Ako se za snimanje koristi detektor za transmitirane elektrone (TED), tada je uzorke potrebno pripremiti na nešto drugačiji način. Nakon fiksiranja i dehidriranja, biološki uzorci se kontrastiraju metodama pozitivnog ili negativnog kontrasta. Pozitivno se kontrastiranje koristi za pojačanje kontrasta bioloških uzoraka vezanjem teških metala na molekule uzorka, povećavajući time vjerojatnost raspršenja elektrona unutar uzorka. Najčešće se koriste kemikalije uranil acetat ili olovni citrat [17]. Negativno se kontrastiranje koristi za biološke

strukture manje od 100 nm. Kontrastno sredstvo se u tom slučaju nakuplja oko bioloških struktura, naglašavajući njihov oblik. Uzorci se suspendiraju u kapljici boje i zatim nanose na mrežicu. U ovom slučaju, uzorci se mogu promatrati izravno bez seciranja [17].

3.1.5. Montiranje

Zatim na red dolazi montiranje uzoraka na postolje. Veći uzorci pričvršćuju se na nosač pomoću vodljive paste ili dvostrane ljepljive ugljikove vrpce. Ako su u pitanju uzorci u obliku praška, moguće ih je staviti u otapalo koje se kapa na nosač uzorka te kad otapalo ispari, na nosaču ostaju čestice praška. U slučaju snimanja putem TED-a, uzorci se postavljaju na mrežice od nemagnetičnih materijala kao što su bakar, zlato i platina. Mrežice imaju različite uzorke rupica kroz koje se dijelovi uzorka snimaju. Tanka sekcija uzorka postavlja se na površinu vode, a ispod nje se uranja mrežica koja se zatim pažljivo podiže zajedno s uzorkom i suši [17].

3.1.6. Naprašivanje

Biološki uzorci su nevodljivi pa ih je potrebno prekriti slojem metala kako bi njihova površina postala vodljiva. Za to se koristi uređaj za naprašivanje, a primjer takvog uređaja prikazan je na slici 3.2. Unutar komore ovakvog uređaja nalaze se dva ionska topa za naprašivanje uzoraka, pločica metala kojim se želi prekriti uzorak i uzorak. Nisko-energetski Ar^+ ioni (raspona energija 0.1 – 8 keV) udaraju pločicu metala, izbijajući atome s njene površine. Raspršeni atomi metala se zatim talože na površinu uzorka stvarajući tanki sloj. Debljina sloja obično iznosi oko 10 nm [5].

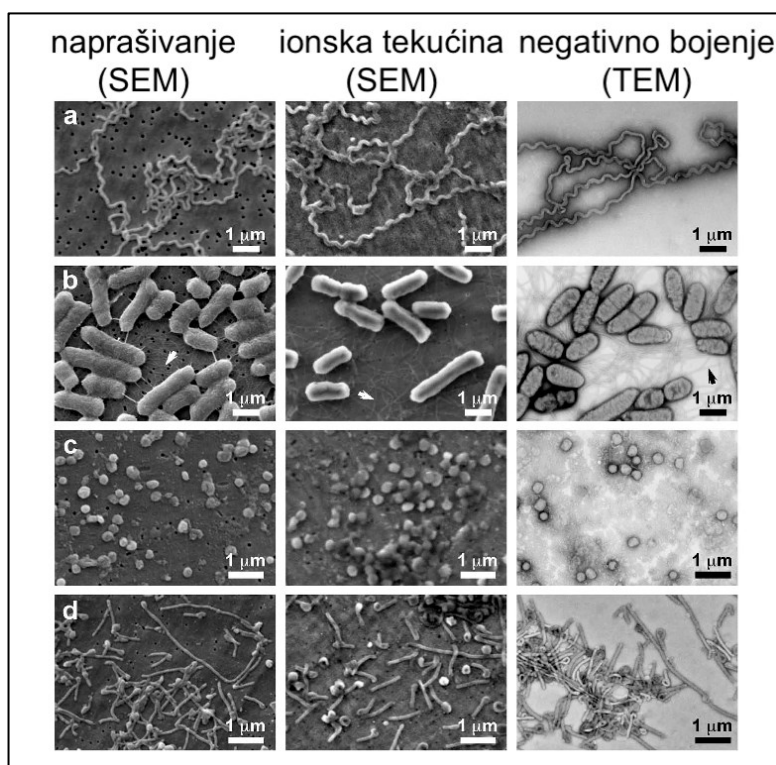


Slika 3.2. Uređaj za naprašivanje (Gatan PECS II Model 685) u sklopu Laboratorija za pretražnu elektronsku mikroskopiju [16]

3.2. Napredci u pripremi uzoraka i upotreba SEM-a u mikrobiologiji

Tijekom posljednjih godina, postignuti su značajni napredci u pripremi uzoraka za SEM analizu s naglaskom na ubrzanje procesa pripreme. Osim toga, istražene su pogodnosti upotrebe SEM-a u području dijagnostike zaraznih bolesti. U nastavku slijedi nekoliko primjera nedavno provedenih istraživanja, čiji rezultati ukazuju na napretke u pripremi uzoraka i prednosti SEM analize nad rutinskim postupcima.

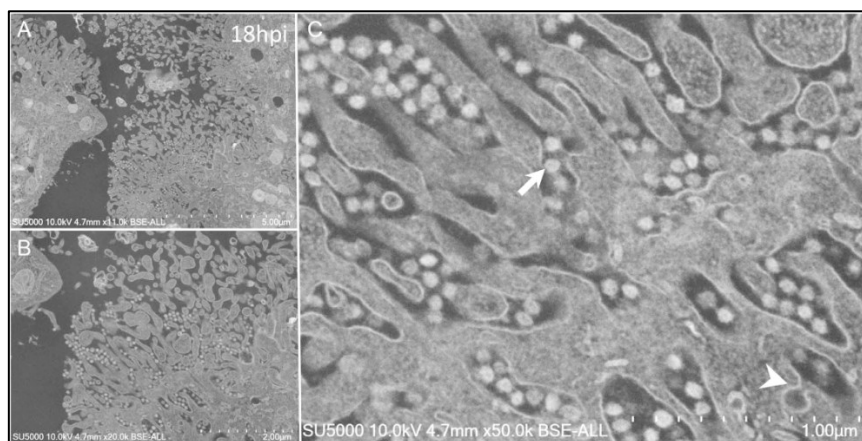
Golding i sur. [18] pokazali su da primjena ionskih tekućina na metalno premazanim filterima omogućava bolju očuvanost ultrastrukture mikroorganizama u usporedbi s klasičnim metodama pripreme. U ovoj se tehnici zamjenjuju klasični koraci u pripremi uzoraka poput dehidracije i sušenja u kritičnoj točki, čime se omogućava brža analiza. Uzorci tretirani ionskim tekućinama pokazuju minimalno skupljanje i očuvanje površinskih detalja, poput bakterijskih flagela, dok metoda naprašivanja uzrokuje skupljanje i gubitak površinskih detalja kao što je vidljivo na slici 3.3. Još jedna prednost ove metode je ta što omogućuje identifikaciju virusa s malim brojem čestica (5000 po uzorku), što je znatno niže od zahtjeva standardnih metoda.



Slika 3.3. Usporedba metoda pripreme uzoraka u slučajevima SEM i TEM analize: (a) *Leptospira biflexa*, (b) *Salmonella senftenberg*, (c) *Vaccinia virus* i (d) *Ebola virus* [18]

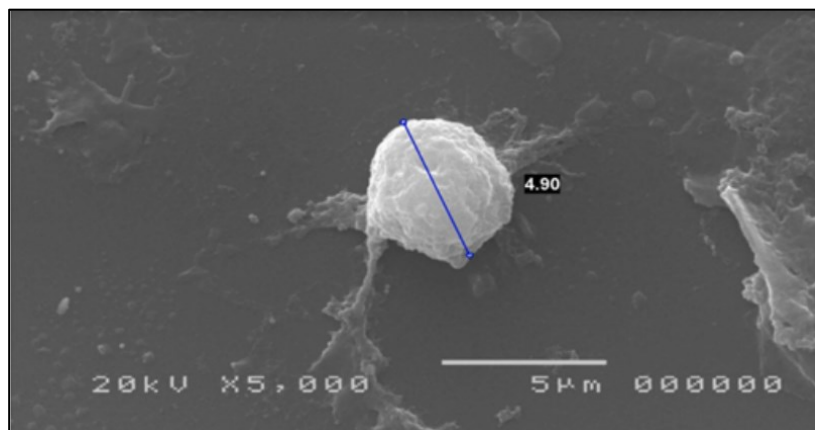
Haddad i sur. [19] pokazali su da SEM može zamijeniti bojenje po Gramu za preliminarnu identifikaciju mikroorganizama izravno iz krvnih kultura. Prema rezultatima njihovog rada, SEM je omogućio brzu identifikaciju bakterija i kvasaca unutar sat vremena od detekcije pozitivne krvne kulture. Usporedbom s bojenjem po Gramu, SEM je pokazao točnost od 96.6% i omogućio razlikovanje različitih rodova bakterija poput *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteria* i *Acinetobacter sp.* Osim toga, ukupni troškovi pripreme uzoraka za SEM bili su niži u usporedbi s metodom bojenja po Gramu, što čini ovu metodu prikladnom za kliničku primjenu. Ovi rezultati pokazuju da bi SEM mogao unaprijediti hitnu mikrobiološku dijagnostiku zaraznih bolesti [19].

Belhaouari i sur. [20] koristili su SEM za proučavanje infektivnog ciklusa SARS-CoV-2 u Vero E6 stanicama. SEM je omogućio brzu i detaljnu analizu strukturnih promjena u stanicama tijekom zaraze virusom. Pokazali su da SARS-CoV-2 ulazi u stanice putem fuzije membrana te da se čestice virusa stvaraju u perinuklearnom području, pupanjem iz endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tijela. SEM je također otkrio promjene u strukturi staničnih organela, uključujući endoplazmatski retikulum i Golgijevo tijelo. Slika 3.4. dobivena je putem SEM-a, a na njoj su vidljive zrele čestice SARS-CoV-2 smještene između staničnih mikroresica. U usporedbi s TEM-om, analiza cjelokupnog infektivnog ciklusa SARS-CoV-2 pomoću SEM-a bila je dostupna unutar 4,5 sati promatranja, dok je za istu analizu putem TEM-a bilo potrebno 8 sati [20].



Slika 3.4. SEM slika zrelih čestica SARS-CoV-2, 18–36 sati nakon infekcije, smještenih između staničnih mikroresica [20]

Infektivni keratitis je upala rožnice uzrokovana raznim mikroorganizmima, koja može dovesti do ozbiljnog oštećenja vida i peti je vodeći uzrok sljepoće u svijetu [21]. Primjenu SEM-a za dijagnostiku mikrobnog keratokonjuktivitisa, koji ne reagira na širokospektralne antibiotike, istražili su Troisi i sur. [21]. SEM je omogućio identifikaciju patogenih mikroorganizama u 86.7% slučajeva. Terapija prilagođena nalazu SEM-a, rezultirala je kliničkim poboljšanjem kod svih pacijenata u roku od 1 do 7 tjedana. SEM je omogućio detekciju patogenih mikroorganizama poput *Candide* (sl. 5.5.), *Akantamebe* i dr., koji mogu biti uzročnici bolesti, ali nisu otkriveni standardnim metodama detekcije [21].



Slika 3.5. *Candida Albicans* [21]

Analiza urina jedna je od najčešće naručenih pretraga u kliničkoj laboratorijskoj praksi. Tradicionalna analiza urina uključuje makroskopsku, kemijsku i mikroskopsku analizu. Međutim, optička mikroskopija često ne pruža dovoljnu razlučivost i dubinu polja za točnu identifikaciju komponenti sedimenta urina. Yacouba i sur. [22] proveli su istraživanje o primjeni SEM-a u analizi uzoraka urina. Analizirano je 206 uzoraka urina pacijenata sa i bez urinarnih infekcija [22]. Različiti mikroorganizmi identificirani su pomoću SEM-a i klasificirani kao gram negativni bacili, lančani koki, klaster koki, gram pozitivni bacili i kvasci. Clue stanice i skvamozne epitelne stanice prekrivene bakterijama također su otkrivene u analizi urina. U usporedbi s rutinskim kliničkim laboratorijskim rezultatima, rezultati SEM-a su se podudarali u 83% slučajeva, pružajući veću razlučivost slike i detaljnu ultrastrukturu [22].

4. ANALIZA MIKROBIOLOŠKIH UZORAKA NA JEOL FEG SEM-U JSM-7800F

Na FEG SEM-u JSM-7800F u Laboratoriju za pretražnu elektronsku mikroskopiju Sveučilišta u Rijeci, analizirane su dvije vrste bakterija i to *Pseudomonas fluorescens* i *Klebsiella pneumoniae*. Uzorke je ljubazno donirala izv. prof. dr. sc. Ivana Gobina s Medicinskog fakulteta u Rijeci. U nastavku su kratko opisane osnovne karakteristike Jeolovog SEM-a JSM-7800F te navedene bakterije uz prikaz SEM slika i odgovarajuću analizu.

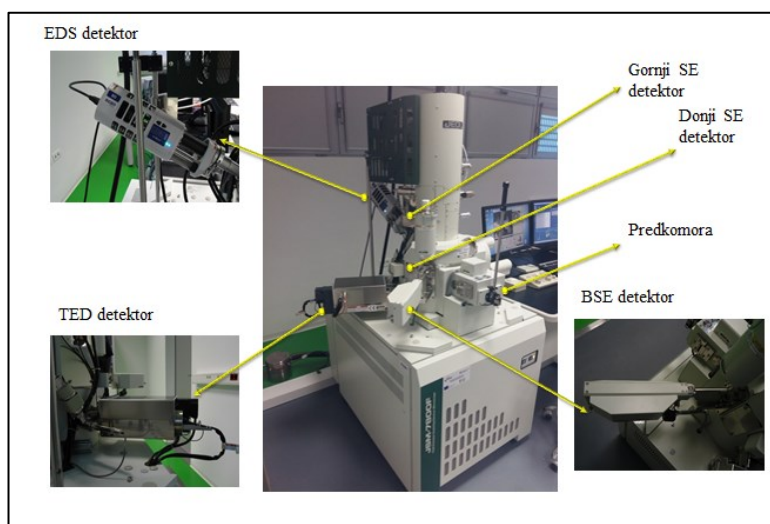
4.1. Pretražni elektronski mikroskop JEOL FEG SEM JSM-7800F

U laboratoriju za pretražnu elektronsku mikroskopiju, zajedničkog laboratorija Fakulteta za fiziku i Centra za mikro- i nanoznanosti i tehnologije (NANORI) nalazi se pretražni elektronski mikroskop JEOL FEG JSM-7800F prikazan na slici 4.1.



Slika 4.1. Pretražni elektronski mikroskop JEOL FEG JSM-7800F u Laboratoriju za pretražnu elektronsku mikroskopiju na Sveučilištu u Rijeci [23]

Ovaj mikroskop sadrži nekoliko vrsta detektora: donji detektor za sekundarne elektrone, gornji detektor za sekundarne elektrone, detektor za povratno-raspršene elektrone, detektor za transmitirane elektrone i energo-disperzivni detektor rendgenskih zraka, a njihov položaj prikazan je na slici 4.2.



Slika 4.2. Položaj detektora na JEOL FEG JSM-7800F [23]

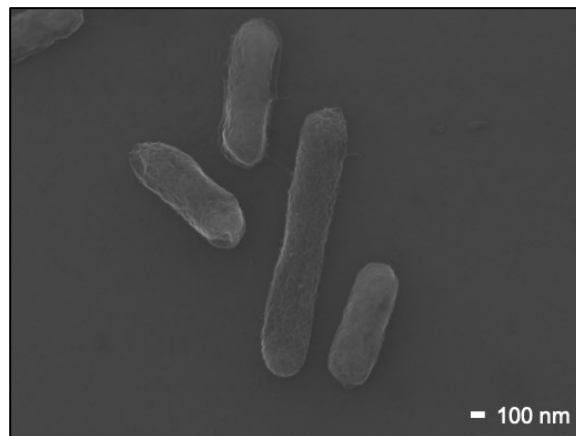
Ovaj model SEM-a koristi elektronski top s emisijom polja (FE), maksimalna razlučivost je 0.8 nm, a raspon povećanja 25-1.000.000 puta.

Kao glavni alat istraživanja Laboratorija za pretražnu elektronsku mikroskopiju, ovaj se mikroskop koristi u sklopu istraživanja kao što su: istraživanje morfologije i debljine različitih poluvodičkih ili izolatorskih filmova dobivenih tehnikom depozicijom atomskih slojeva, istraživanje slatkovodnih i morskih dijatomeja ili algi kremenjašica, istraživanje zeolitnih materijala, analiza i proučavanje različitih uzoraka koji sadrže bakterije i još mnogih drugih. [24].

4.2. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens je gram-negativna bakterija koja se obično nalazi u vlažnim staništima poput tla, lišća i vode. Iako je manje virulentna od drugih vrsta iz roda *Pseudomonas*, može uzrokovati ozbiljne infekcije, uključujući upalu pluća, posebno kod imunokompromitiranih bolesnika. Prema radu Liu i sur. [25], *Pseudomonas fluorescens* je prvi put identificirana iz biopsije plućnog tkiva pacijenta s pneumonijom, a prilagodba terapije prema testu osjetljivosti na antibiotike (ciprofloksacin) dovela je do poboljšanja simptoma. Zaključeno je da pravovremeno prepoznavanje i liječenje infekcija uzrokovanih *P. fluorescens* može značajno poboljšati ishode liječenja [25]. Slika 4.3. prikazuje SEM sliku *Pseudomonas fluorescens* snimljenu na SEM-u iz Laboratorija za pretražnu elektronsku mikroskopiju. Tijekom pripreme za analizu, uzorak je prekriven slojem Au-Pd (zlatopaladij) debljine 5 nm

kako bi postao vodljiv. Slika je dobivena sakupljanjem sekundarnih elektrona pomoću donjeg detektora za sekundarne elektrone, pri čemu su radni parametri bili energija elektrona od 10 keV i radna udaljenost od 10 mm. Na slici je lijepo definiran štapićasti oblik ove bakterije koja pripada skupini bacila. Veličina bakterijskih stanica sa slike kreće se u rasponu 1 – 2.5 μm . Bakterije su uglavnom dobro očuvane tijekom snimanja, nisu vidljive značajne deformacije u strukturi, no površina bakterije ne izgleda glatko što je posljedica sušenja na zraku tijekom pripreme uzoraka za snimanje.

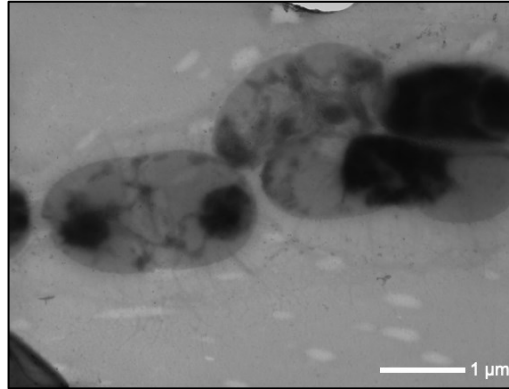


Slika 4.3. *Pseudomonas fluorescens*; snimila: izv. prof. dr. sc. Iva Šarić Janković

4.3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je gram-negativna bakterija koja živi u crijevima ljudi. Infekcije tom bakterijom često se dobivaju u bolnicama i ustanovama za dugotrajnu skrb. Rijetko, *Klebsiella* bakterije uzrokuju upalu pluća kod ljudi koji žive izvan zdravstvenih ustanova (u zajednici), obično kod alkoholičara, starijih osoba, osoba s dijabetesom ili osoba s oslabljenim imunološkim sustavom [26]. Ova bakterija pokazuje otpornost na većinu širokospektralnih antibiotika, što dodatno otežava liječenje. Slika 4.4. dobivena je putem transmitiranih elektrona pomoću detektora za transmitirane elektrone (TED), pri čemu su radni parametri uključivali energiju elektrona od 30 keV i radnu udaljenost od 6 mm. Za pripremu uzorka za analizu TED detektorom, kapljica bakterijske suspenzije dodana je na bakrene mrežice koje se koriste kod transmisijske analize. Višak tekućine je zatim uklonjen filter papirom, a bakterije na mrežicama obojene su kontrastnim sredstvom na bazi volframa. Višak kontrastnog sredstva je zatim uklonjen filter papirom, a mrežice su ostavljene da se suše na zraku nekoliko minuta. Bakterije na slici su ovalnog, pomalo izduženog oblika veličine oko 1 – 2 μm . Tamni dijelovi unutar

stanica posljedica su veće apsorpcije kontrastnog sredstva, što uzrokuje tamniji izgled pojedinih područja. Oko stanica je vidljiva prozirna opna koja predstavlja izlazak stanične tekućine i upućuje na proces razgradnje bakterijskih stanica tijekom snimanja.



Slika 4.4. *Klebsiella pneumoniae*; snimila: izv. prof. dr. sc. Ivna Kavre Piltaver

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti SEM-a i njegovu upotrebu u području mikrobiologije i dijagnostike zaraznih bolesti. SEM omogućuje stvaranje slika visoke razlučivosti i promatranje objekata koji su i do sto tisuća puta manji nego što to omogućuju optički mikroskopi. U svojem sastavu, SEM može imati različite vrste detektora koji pružaju širok raspon informacija o uzorku. Sekundarni elektroni pružaju informacije o topografiji površine uzorka, dok svojstva povratno-raspršenih elektrona omogućuju dobivanje informacija o sastavu uzorka. Karakteristične rendgenske zrake, putem EDS metode, omogućuju identifikaciju sastavnih elemenata uzorka i njihovu koncentraciju te dvodimenzionalnu raspodjelu elemenata u uzorku. U svojem sastavu, SEM može imati i detektor za transmitirane elektrone koji omogućuje analizu unutrašnje strukture uzorka. Mikrobiološki uzorci predstavljaju izazov za SEM analizu zbog visokog sadržaja vode te su stoga nepovoljni za rad u uvjetima visokog vakuuma koje zahtijeva SEM. Osim toga, mikrobiološki uzorci su nevodljivi što dovodi do učinka nabijanja i izobličenja slike. Zbog toga, mikrobiološki uzorci prolaze kroz proces pripreme za snimanje koji zahtijeva preciznost, a sastoji se od čišćenja, fiksiranja, kontrastiranja, naprašivanja i drugih koraka, što ga čini prilično dugotrajnim. To se smatra glavnim nedostatkom ovog mikroskopa te se stoga mikrobiolozi često odlučuju za druge metode analize koje iziskuju manje vremena. U ovom su radu prikazane inovacije u pripremi uzoraka koje bi mogle potaknuti upotrebu SEM-a u kliničkoj mikrobiologiji. Jedna od njih je primjena ionskih tekućina, koja omogućava bolju očuvanost ultrastrukture mikroorganizama i zahtijeva manji broj čestica za identifikaciju od standardnih metoda pripreme. SEM se pokazao i kao povoljan alat za identifikaciju mikroorganizama iz krvnih kultura, koji iziskuje manje troškove te bi mogao zamijeniti klasičnu metodu bojenja po Gramu. Tijekom pandemije virusa SARS-CoV-2, SEM je korišten za analizu njegovog infektivnog ciklusa, a rezultati su bili temelj za daljnja istraživanja. Osim toga, SEM se u dijagnostici pokazao i kao precizan alat na primjeru identifikacije mikroorganizama u urinu te patogenih mikroorganizama koji uzrokuju infektivni keratitis. Praktičan primjer SEM analize u ovom radu je analiza bakterija *Pseudomonas fluorescens* i *Klebsiella pneumoniae* snimljenih na FEG SEM-u JSM-7800F u Laboratoriju za pretražnu elektronsku mikroskopiju Sveučilišta u Rijeci. Opisan je proces pripreme bakterija za snimanje, a na slikama je bilo moguće analizirati veličine, oblike, strukture i promjene na bakterijama.

LITERATURA

1. M. Wilson, How History Shaped Modern Optical Microscopes, Part One: Simple and Compound Microscopes, 2021.
<<https://bitesizebio.com/43796/simple-and-compound-microscopes/>> (Posljednji pristup: 5.1.2024.)
2. D. Madhavan, The First Microscope to Modern Microscopes: Evolution and History of Microscopes,
<<https://microscopeclarity.com/the-first-microscope-to-modern-microscopes-evolution-and-history-of-microscopes/>> (Posljednji pristup: 5.1.2024.)
3. SEM Q&A, JEOL USA,
<https://jeolusa.s3.amazonaws.com/resources_eo/JEOL%20SEM%20Q%26A%20e.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAQJOI4KIAZPDULHNL&Expires=2145934800&Signature=jDxkmXN9StnJyiPWDMhka3Tkxzc%3> (Posljednji pristup: 5.10.2023.)
4. L. J. Tegan, Thermionic emission vs. Field emission for non-relativistic electron guns, 2019.
<<https://uspas.fnal.gov/programs/masters-degree/JohnsonThesis.pdf>> (Posljednji pristup: 22.6.2023.)
5. Scanning Electron Microscope A To Z, JEOL Ltd,
<<https://admin.jeol.com.cn/admin/static/uploadfiles/20170419/680fb98a-edd2-4e2b-80a9-8dcaecbb3dde.pdf>> (Posljednji pristup: 22.5.2023.)
6. FE electron gun, JEOL Ltd,
<<https://www.jeol.com/words/semterms/20121024.062458.php#gsc.tab=0>>
(Posljednji pristup: 22.6.2023.)
7. M. S. Hunt, Scanning Electron Microscopy: Principles, Techniques & Applications, 2019.
<<https://caltech.app.box.com/s/cs0wj4dn89am3fof8ox0vqetaad8ylg8/file/415145691200>> (Posljednji pristup: 26.5.2022.)
8. Raster scan, Wikipedia,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Raster_scan#> (Posljednji pristup: 22.4.2024.)
9. N. Marturi, Vision and visual servoing for nanomanipulation and nanocharacterization in scanning electron microscope, ResearchGate, 2013.
<https://www.researchgate.net/figure/Interaction-volume-and-signal-emission_fig13_281534044> (Posljednji pristup: 22.4.2024.)

10. Different Types of SEM Imaging – BSE and Secondary Electron Imaging, Thermo Fisher Scientific Phenom-World BV,
<<https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=14309>> (Posljednji pristup: 4.6.2024.)
11. Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS, JEOL Ltd,
<<https://www.jeol.com/words/semterms/20121024.013500.php#gsc.tab=0>>
(Posljednji pristup: 26.5.2024.)
12. EDS Mapping, Scanning Electron Microscope Facility, Stanford University,
<https://semfe.stanford.edu/applications/EDS_Map> (Posljednji pristup: 26.5.2024.)
13. N. Inoue, JEOL USA Blog, JEOL,
<<https://www.jeolusa.com/NEWS-EVENTS/Blog/choosing-the-right-scanning-electron-microscope-for-your-laboratory>> (Posljednji pristup: 14.5.2024.)
14. SEM Disadvantages: Understanding Common Issue, ElementPi,
<<https://elementpi.com/sem-disadvantages/>> (Posljednji pristup: 22.4.2024.)
15. Mikrobiologija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024.
<<https://www.enciklopedija.hr/clanak/mikrobiologija>> (Posljednji pristup: 20.6.2024.)
16. Oprema za pripremu SEM uzoraka, Fakultet za fiziku, Sveučilište u Rijeci,
<<https://www.phy.uniri.hr/hr/ustroj/29-hr/ustroj/laboratoriji/794-laboratorij-za-pripremu-sem-uzoraka.html>> (Posljednji pristup: 15.5.2024.)
17. E. Dumančić, L. Vojta, H. Fulgosi, Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy, 1-2, Periodicum Biologorum, Vol. 125. 0031-5362, 2023.
18. C. G. Golding, L. L. Lamboo, D. R. Beniac, T. F. Booth, The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease, Scientific Reports, sv. 6, br. 26516, str. 1-9, svibanj 2016.
19. G. Haddad, S. Bellali, T. Takakura, A. Fontanini, Y. Ominami, J. Bou Khalil, D. Raoult, Scanning Electron Microscope: A New Potential Tool to Replace Gram Staining for Microbe Identification in Blood Cultures, Microorganisms, br. 9, sv. 6, str. 1170, svibanj 2021.
20. D. B. Belhaouari, A. Fontanini, J.-P. Baudoin, G. Haddad, M. L. Bideau, J. Y. Bou Khalil, D. Raoult, B. La Scola, The Strengths of Scanning Electron Microscopy in

- Deciphering SARS-CoV-2 Infectious Cycle, *Frontiers in Microbiology*, No. 11, Vol. 11, pp. 1-11, kolovoz 2020.
21. M. Troisi, S. Del Prete, S. Troisi, M. V. Turco, V. Turco, A. Del Prete, A. Gravina, A. Gravina, D. Marasco, Utility of Scanning Electron Microscopy (SEM) for Suspected Microbial Keratoconjunctivitis Unresponsive to Broad-Spectrum Antibiotic Therapy. *Journal of Clinical Studies and Medical Case Reports*, br. 10, sv. 1, pp. 1-7, svibanj 2023.
 22. Yacouba, S. Bellali, G. Haddad, N. Mavros, A. Fontanini, G. Dubourg, J.-C. Lagier, D. Raoult, J. Bou Khalil, Use of scanning electron microscopy and energy dispersive X- ray for urine analysis: A preliminary investigation, *Microscopy Research and Technique*, 86(10), str. 1249-1257, veljača 2023.
 23. Pretražni elektronski mikroskop (SEM), Fakultet za fiziku, Sveučilište u Rijeci, <<https://www.phy.uniri.hr/hr/znanstveno-istrazivacki-rad/29-hr/ustroj/laboratoriji/800-pretrazni-elektronski-mikroskop.html>> (Posljednji pristup: 10.5.2024.)
 24. Istraživanja Laboratorija za pretražnu elektronsku mikroskopiju, Fakultet za fiziku, Sveučilište u Rijeci, <<https://www.phy.uniri.hr/hr/ustroj/laboratoriji/29-hr/ustroj/laboratoriji/1291-laboratorij-za-pretraznu-elektronsku-mikroskopiju.html>> (Posljednji pristup: 15.5.2024.)
 25. X. Liu, L. Xiang, Y. Yin, H. Li, D. Ma, Y. Qu, Pneumonia caused by *Pseudomonas fluorescens*: a case report. *BMC Pulmonary Medicine*, br. 21, sv. 1, str. 212, lipanj 2021.
 26. L. M. Bush, *Klebsiella*, *Enterobacter*, i *Serratia* infekcije, *HeMED*, <<https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=18022>> (Posljednji pristup: 20.6.2024.)