

WYKORZYSTANIE MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ W BADANIACH ZOOTECHNICZNYCH

Anna M. Dymek^{1*}, Jakub Dymek^{2*}

¹Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli Drobego Inwentarza, 32-083 Balice k. Krakowa

²Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Zakład Biologii i Obrazowania Komórki

*E-mail: anna.dymek@iz.edu.pl; kuba.dymek@uj.edu.pl

*Anna M. Dymek i Jakub Dymek przyczynili się do powstania tego artykułu naukowego w jednakowym stopniu (równy wkład autorski).



Anna M. Dymek <https://orcid.org/0000-0002-0557-9619>

Jakub Dymek <https://orcid.org/0000-0003-1096-1908>

Abstrakt

Mikroskopia elektronowa jest jedną z najważniejszych technik badawczych, umożliwiających analizę struktur na poziomie atomowym. Jej rozwój rozpoczął się w latach 30. XX wieku, kiedy Ernst Ruska i Max Knoll skonstruowali pierwszy mikroskop elektronowy, wykorzystując wiązkę elektronów zamiast światła widzialnego. Od tego czasu technologia ta znacząco rozwinęła się, prowadząc do powstania różnych typów mikroskopów, takich jak TEM (transmisyjny), SEM (skaningowy), STEM (skaningowo-transmisyjny), SBF-SEM (ang. Serial Block-Face Scanning Electron Microscope), FIB-SEM (ang. Focused Ion Beam SEM) oraz SEM-AT (Scanning Electron Microscopy Array Tomography). Zasada działania mikroskopów elektronowych opiera się na emisji elektronów, które są przyspieszane i skupiane przez soczewki elektromagnetyczne. W przypadku TEM elektrony przechodzą przez próbkę, tworząc obraz jej struktury wewnętrznej, natomiast w SEM analizowane są elektrony odbite, co pozwala na uzyskanie trójwymiarowych obrazów powierzchni. Mikroskop STEM jest połączeniem technik TEM oraz SEM, w którym wykorzystywane są zarówno elektrony przechodzące jak i skanowanie powierzchni próbki. Dzięki temu możliwe jest nie tylko zobaczenie struktury próbki, a nawet obrazowania pojedynczych atomów, ale też analiza jej składu chemicznego. Mikroskopy SBF-SEM, FIB-SEM oraz SEM-AT umożliwiają obrazowanie przestrzenne badanego materiału, przede wszystkim na podstawie elektronów odbitych. Przygotowanie próbek do mikroskopii elektronowej wymaga specjalistycznych metod, takich jak ultracienkie cięcie, osadzanie na siatkach metalowych, kontrastowanie chemiczne oraz napylenie warstw przewodzących, co zapewnia wysoką jakość obrazowania. W zootechnice mikroskopia elektronowa znajduje zastosowanie w badaniu struktury komórek zwierzęcych, analizie składu pasz oraz diagnostyce chorób. Dzięki niej możliwe jest precyzyjne określenie mikrostruktur tkanek, identyfikacja patogenów oraz ocena jakości materiałów biologicznych wykorzystywanych w hodowli zwierząt. Technika ta wspiera również rozwój biotechnologii w zootechnice, umożliwiając badania genetyczne oraz kontrolę zdrowia

zwierząt na poziomie komórkowym. Mikroskopia elektronowa pozostaje kluczowym narzędziem w naukach przyrodniczych i technicznych, a jej dalszy rozwój otwiera nowe możliwości w badaniach biologicznych, materiałowych i zootechnicznych.

Słowa kluczowe: mikroskop elektronowy, skrawki ultracienkie, elektrony, obrazowanie w mikroskopii

Wstęp

Możliwość obserwowania obiektów w powiększeniu celem uwidocznienia trudnych dla ludzkiego oka szczegółów umożliwiła rozwój nauki, zwłaszcza w obszarach medycyny i szeroko pojętej biologii. Postęp techniczny, jaki dokonał się tutaj na przestrzeni dziejów skutkuje coraz lepszym poznawaniem świata, opisywaniem nowych organizmów, jak również odkrywaniem mechanizmów funkcjonujących w układach żywych. Nie powinno być więc wątpliwości, że pojawienie się mikroskopów stanowi jedno z najważniejszych osiągnięć ludzkości, bez których rozwój nauki nie byłby możliwy.

Pod koniec XVI wieku Holendrzy Hans i Zachariasz Janssen wykonali pierwszą konstrukcję mikroskopu, który dawał możliwość dziesięciokrotnego powiększania oglądanego obiektu. Składał się on z dwóch soczewek, z których jedna została nazwana okulem (soczewka, przez którą obserwowano się obiekt), a druga obiektywem (soczewka skierowana na preparat) (Croft, 2006; Pluta, 1982). Na początku XVII wieku Galileusz skonstruował mikroskop składający się z trzech soczewek, jednak z powodu braku źródła światła obserwacje ciemnego obrazu były niezwykle trudne (Murphy i Davidson, 2013). Robert Hook udoskonalił urządzenie, m.in. dodając źródło światła (La Berge, 1999). Dzięki obserwacjom struktury korka, która przywodziła mu na myśl układ klasztornych cel mnichów, wprowadził do nauki termin „komórka” (ang. cell). Swoje obserwacje opisał w wydanej w 1665 roku publikacji „Micrographia” (Korczyński i Gacek, 2015). Po lekturze pracy Hooka, ulepszaniem mikroskopu zajął się także Antoni van Leeuwenhoek. Dzięki zastosowaniu przez niego światła przechodzącego, a nie jak dotychczas, odbitego, możliwe stało się obserwowanie obiektów nawet w 300-krotnym powiększeniu (Croft, 2006). Umożliwiło mu to obserwację pierwotniaków, bakterii, erytrocytów i plemników. W kolejnych latach badania nad soczewkami oraz właściwościami światła przyczyniły się do poprawy rozdzielczości obserwowanych obiektów. W 1893 roku August Köhler opracował zasady oświetlania próbek, dzięki czemu wyznaczono teoretyczną granicę rozdzielczości mikroskopu świetlnego (La Berge, 1999; Croft, 2006; Bradbury i Bracegirdle, 1998; Mertz, 2009).

Odkrycia przełomu XIX i XX wieku, takie jak promienie rentgenowskie, elektrony i teoria soczewek elektronowych, przyczyniły się do wynalezienia mikroskopów elektronowych. W latach 30. XX wieku Ernst Ruska stworzył transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), za co otrzymał nagrodę Nobla (Datye, 2003). Kilka lat później Max Knoll skonstruował skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) (Barbacki, 2003). Pod koniec lat 30. ubiegłego wieku Manfred Ardenne opracował urządzenie zawierające w sobie elementy obu tych mikroskopów, tzn. skaningowy transmisyjny mikroskop elektronowy (STEM), który dawał naukowcom nowe możliwości (Haguenau i in., 2003). Na skalę komercyjną mikroskopy elektronowe zaczęły być produkowane w latach 60. XX wieku. Ze względu na możliwości obserwacji obiektów o rozmiarze poniżej 1 μm technika ta stała się kluczowym narzędziem w badaniach z wielu obszarów nauki.

Rodzaje mikroskopów elektronowych i ich zasady działania

Do głównych rodzajów mikroskopów elektronowych należą mikroskop skaningowy (SEM) i transmisyjny (TEM), natomiast modyfikacje tych mikroskopów pozwalają na wykonanie rekonstrukcji trójwymiarowych badanych tkanek czy komórek i zostały określone jako *Volume Electron Microscopy* (skrót: Volume EM lub VEM) (Collinson i in., 2023). Do tej grupy należą m.in. mikroskop skaningowy transmisyjny (STEM), SBF-SEM (ang. *Serial Block-Face Scanning Electron Microscope*), FIB-SEM (ang. *Focused Ion Beam SEM*) oraz SEM-AT (ang. *Scanning Electron Microscopy Array Tomography*) (Peddie i in., 2022). Trzy ostatnie wymienione mikroskopy nie posiadają polskich oficjalnych nazw i określa się je za pomocą skrótów pochodzących od nazw w języku angielskim. Cechą wspólną wszystkich mikroskopów elektronowych jest to, że w każdym przypadku do obrazowania wykorzystuje się przede wszystkim wiązki elektronów oraz ich oddziaływanie z materią (Kelsall i in., 2008; Zhou i in., 2012).

Właściwości elektronów determinują specyfikę budowy mikroskopu elektronowego, odmienną od mikroskopu świetlnego (tab. 1). Kluczowe jest tu zastosowanie próżni, co najmniej 10^{-4} Pa, ponieważ elektrony znacznie silniej oddziałują z materią niż fotony, czyli kwanty światła widzialnego (dlatego w przypadku mikroskopów świetlnych nie ma potrzeby stosowania próżni). Warunki wysokiej próżni zapewniają swobodne przemieszczanie się elektronów. Zdolność rozdzielcza mikroskopu elektronowego, która jest znacznie większa niż w przypadku mikroskopu świetlnego, jest wywołana znacznie mniejszą długością fali przyspieszanych elektronów w porównaniu do długości fali światła widzialnego oraz fotonów promieniowania UV. Kolejną istotną właściwością elektronów jest posiadanie przez nie ładunku, dzięki czemu można zogniskować wiązkę przy użyciu pola magnetycznego lub elektrycznego (Kelsall i in., 2008).

Tabela 1. Porównanie wybranych cech mikroskopów świetlnego i elektronowego
Table 1. Comparison of selected features of light and electron microscopes

Element	Mikroskop świetlny	Mikroskop elektronowy
Źródło promieniowania	Światło widzialne	Wiązka elektronów
Soczewki	Szklane soczewki optyczne	Soczewki elektromagnetyczne
Obraz	Bezpośrednio widoczny przez okular	Wyświetlany na ekranie lub rejestrowany cyfrowo
Środowisko pracy	Powietrze	Próżnia
Powiększenie	Do ok. 1500x	Nawet ponad 1 000 000x
Zdolność rozdzielcza	Okolo 200 nm	Nawet do 0,1 nm
Obserwowane obiekty	Komórki, tkanki, mikroorganizmy	Struktury subkomórkowe, wirusy, nanocząsteczki
Koszt i dostępność	Tani, powszechnie dostępny	Drogi, wymaga specjalistycznego laboratorium

Podstawą budowy mikroskopów elektronowych jest zastosowanie katody jako źródła elektronów (dawniej jako działło elektronowe wykorzystywało się najczęściej wolframowe włókno katodowe, obecnie jest ono zastępowane katodą z heksabromku lantanu) oraz anody, która przyciąga elektrony (Hałas i Szymański, 1965). Dlatego też w obszarze między katodą a anodą następuje rozprędkenie elektronów, a wiązka tych cząstek uzyskuje energię o wartości równej iloczynowi ładunku elektronu oraz napięcia między katodą a anodą (Van Meerssche i Feneau-Dupont, 1984). Następnie wiązka jest ogniskowana w tzw. cylindrze Wehnelta, który jest rodzajem soczewki elektrostatycznej. Zogniskowana wiązka zostaje skupiona w kondensorze i skierowana na preparat. Elektrony pierwotne (pochodzące z działła elektronowego) oddziałują z próbką, w wyniku czego emitowane są różne rodzaje elektronów, dzięki którym możliwe jest wytworzenie obrazu lub analiza składu chemicznego badanego materiału (Kelsall i in., 2008).

Mikroskop skaningowy (SEM)

W mikroskopie skaningowym obraz jest uzyskiwany poprzez ruch skokowy wiązki po powierzchni próbki (tab. 2). Elektrony, które padną na preparat, mogą być wstecznie rozpraszane, emitując sygnał elektronów odbitych (ang. *back scattered electrons*, BSE). Niesprężyste oddziaływanie pomiędzy pierwotną wiązką elektronów a próbką powoduje emisję elektronów wtórnych (ang. *secondary electron*, SE), które mają niższą energię niż elektrony rozproszone wstecznie (Barbacki, 2003; Kelsall i in., 2008). Oprócz tego, do obrazowania w mikroskopii skaningowej wykorzystuje się także dyfrakcję elektronów (EBSD), elektrony absorbowane (AE) oraz promieniowanie rentgenowskie, które może być wykrywane poprzez pomiar długości fali (WDS) lub energii (EDS) wyemitowanego promieniowania (Barbacki, 2003). Sygnał elektronów jest przetwarzany przez detektory na sygnał cyfrowy, a następnie na obraz. Najważniejszymi składowymi detektora są scyntylator, który przekształca w impulsy świetlne energię elektronów wtórnych oraz fotopowielacz, mający za zadanie wzmocnienie impulsów (Barbacki, 2003). Otrzymany obraz jest przestrzenny, dlatego też ten rodzaj mikroskopu wykorzystywany jest do analizy powierzchni (topografii) oraz – dzięki emitowanemu promieniowaniu rentgenowskiemu – składu chemicznego próbki (tab. 2). Zdolność rozdzielcza elektronowego mikroskopu skaningowego wynosi kilkaset tysięcy razy. Napięcie przyspieszające stosowane w skaningowym mikroskopie elektronowym zwykle zawiera się w przedziale 1–30 kV.

Mikroskop transmisyjny (TEM)

W mikroskopie elektronowym transmisyjnym wiązka elektronów częściowo przechodzi przez badaną próbkę (tab. 2), a częściowo ulega zagięciu na siatce dyfrakcyjnej (Egerton, 2016). Zachodzi to w warunkach wysokiej próżni, którą utrzymuje się za pomocą pompy rotacyjnej oraz dyfuzyjnej połączonych z zaworami próżniowymi.

Źródłem elektronów, podobnie jak w przypadku SEM, jest katoda. Kiedy elektrony przemieszczają się w kierunku anody, zostają przyspieszone, a następnie uformowane w wiązkę przy pomocy tzw. cylindra Wehnelta (Barbacki, 2003). Wiazka jest następnie formowana przez soczewki elektromagnetyczne. Kondensory zmieniają średnicę i skupienie wiązki, natomiast przesłona kondensora odcina elektrony rozproszone. Poniżej opisanych elementów znajduje się stolik preparatywny, a preparat jest umieszczany między soczewkami obiektywu. Umieszczona obok przesłona obiektywu odcina elektrony rozproszone i służy do zmiany kontrastu, natomiast przesłona selekcyjna ogranicza obszar poddawany dyfrakcji. Po przejściu przez układ soczewek (dyfrakcyjna, pośrednia, projekcyjna) wiązka trafia do komory projekcyjnej, gdzie powstaje obraz wyświetlany za pomocą projektora na ekranie (Egerton, 2016).

W zależności od zastosowanego w urządzeniu napięcia wyróżnia się dwa rodzaje mikroskopów transmisyjnych: niskonapięciowy, w którym napięcie przyspieszające może osiągać maksymalnie 500 kV oraz wysokonapięciowy, gdzie wartość ta osiąga do 3 MV (Reimer i Kohl, 2008). Dzięki temu w mikroskopie niskonapięciowym można obserwować obiekty o grubości poniżej 0,1 μm , natomiast w mikroskopie wysokonapięciowym grubość preparatu może wynosić nieco poniżej 10 μm . W TEM można obserwować strukturę wewnętrzną komórek, m.in. organelle i cytoszkielet komórkowy, połączenia międzykomórkowe, wirusy, bakterie, oraz strukturę materiałów technicznych, np. strukturę krystaliczną, nanocząsteczki, warstwy i powłoki.

Mikroskop skaningowy transmisyjny (STEM)

Mikroskop skaningowy transmisyjny to zaawansowany typ mikroskopu elektronowego, który łączy cechy mikroskopii transmisyjnej oraz skaningowej. Jego zasada działania opiera się na skanowaniu cienkiej próbki za pomocą skupionej wiązki elektronów, umożliwiając uzyskanie szczegółowych obrazów na poziomie atomowym (tab. 2) (Nellist, 2019).

Mikroskop STEM wykorzystuje wysokoenergetyczną wiązkę elektronów, generowaną przez działko elektronowe (np. termojonowe lub polowe). Wiązka jest skupiana za pomocą kondensorów, aby zapewnić precyzyjne bombardowanie próbki. W odróżnieniu od klasycznego TEM, gdzie elektrony przechodzą przez całą próbkę jednocześnie, w STEM wiązka jest skupiona do bardzo małego punktu i przesuwana po próbce linia po linii. Dzięki temu uzyskuje się obrazy o wysokiej rozdzielczości. Elektrony mogą wchodzić w różne interakcje z materiałem, co dzięki zastosowaniu różnych detektorów pozwala uzyskać różnorodne informacje. Elektrony przechodzące przez próbkę umożliwiają uzyskanie kontrastu masowego, strukturalnego (detektor jasnego pola), elektrony rozproszone pod dużym kątem pozwalają na uzyskanie kontrastu ciemnego pola oraz analizę składu chemicznego (detektor ciemnego pola), natomiast wydzielone promieniowanie rentgenowskie umożliwia spektroskopię EDX do identyfikacji pierwiastków w próbce (detektory rentgenowskie EDX) (Nellist, 2019).

SBF-SEM

Technika SBF-SEM to przełomowe narzędzie do obrazowania trójwymiarowej ultrastruktury tkanek biologicznych. Metoda ta pozwala na automatyczne zbieranie setek do tysięcy obrazów seryjnych, co umożliwia rekonstrukcję przestrzenną mikroanatomii z wyjątkową precyzją. Wywodzi się ona z koncepcji zaproponowanej przez Leightona w 1981 roku, który zintegrował mikrotom z mikroskopem skaningowym (Courson i in., 2021).

Budowa mikroskopu SBF-SEM to połączenie klasycznego mikroskopu skaningowego z precyzyjnym systemem mikrotomii, który umożliwia automatyczne obrazowanie kolejnych warstw próbki (tab. 2) (Courson i in., 2021). Elektrony są emitowane z katody, a następnie wiązka elektronów jest skupiana przez soczewki elektromagnetyczne i kierowana przez cewki odchylające, które nadają jej ruch skanujący po powierzchni próbki. Skupiona wiązka elektronów pada na powierzchnię próbki, która została właśnie odsłonięta przez mikrotom. Elektrony wnikają do próbki i oddziałują z jej atomami, w wyniku czego powstają elektrony wstecznie rozproszone (BSE) (Denk i Horstmann, 2004). Oznacza to, że elektrony nie przechodzą przez próbkę (jak w przypadku TEM), lecz oddziałują z jej powierzchnią. Następnie detektory rejestrują sygnały i przekształcają je w obraz cyfrowy. Po każdym skanowaniu mikrotom skrawa kolejną warstwę próbki, odsłaniając nową powierzchnię do obrazowania (Courson i in., 2021). Obraz powstaje więc dzięki elektronom wtórnym i wstecznie rozproszonym, które są rejestrowane po każdym skrawku. Seria obrazów warstwowych jest składana komputerowo w trójwymiarową rekonstrukcję struktury próbki (Denk i Horstmann, 2004).

FIB-SEM

Mikroskop FIB-SEM to zaawansowany system dwuwiazkowy, który łączy możliwości mikroskopii elektronowej z precyzyjnym skrawaniem materiału za pomocą wiązki jonowej (tab. 2) (Kizilyaprak i in., 2019). Źródłem elektronów jest najczęściej działko z emisją polową (FEG) lub wolframowe, natomiast źródłem jonów jest LMIS (Liquid Metal Ion Source), najczęściej wykonany z galu. Wiązka elektronów generowana przez kolumnę SEM skanuje powierzchnię próbki i tworzy obraz na podstawie elektronów wstecznie rozproszonych. Następnie wiązka jonów generowana przez kolumnę FIB precyzyjnie usuwa materiał z próbki, odsłaniając kolejne warstwy do obrazowania (Kizilyaprak i in., 2013). Elektrony nie przechodzą przez próbkę – oddziałują z jej powierzchnią, generując sygnały detekcyjne. Detektory elektronów rejestrują elektrony wstecznie rozproszone, dzięki czemu tworzony jest obraz (Kizilyaprak i in., 2019).

SEM-AT / FM/SEM-AT

Technika SEM-AT stanowi alternatywę dla automatycznych metod objętościowych, takich jak SBF-SEM czy FIB-SEM, oferując większą elastyczność w analizie. W tym przypadku wykonuje się ultracienkie seryjne skrawki w sposób manualny (analogicznie jak w przypadku TEM)

i te umieszcza się w mikroskopie elektronowym (Burel i in., 2018). Technika ta może być łączona z fluorescencją (FM/SEM-AT), by uzyskać dodatkową informację funkcjonalną. FM/SEM-AT wykorzystuje więc dwa typy mikroskopów – fluorescencyjny i elektronowy (tab. 2) (Burel i in., 2018; Koike i Yamada, 2019; Micheva i in., 2024). Próbką jest wtedy obrazowana w obu systemach, często na tych samych skrawkach. W takim przypadku technika SEM-AT jest drugim etapem analizy badanego materiału, natomiast pierwszy etap odnosi się do fluorescencji. Na początku próbka (skrawek) jest znakowana fluoroforami. Następnie źródło światła (LED lub laser) emituje światło o określonej długości fali, które to trafia na próbkę powodując emisję światła przez fluorofory. Filtry wzbudzające i emisyjne selekcjonują długości fal dla konkretnego fluoroforu, a detektor rejestruje obraz fluorescencyjny, który wskazuje lokalizację wybranych cząsteczek (np. białek) (Koike i Yamada, 2019; Micheva i in., 2024). Po przejściu przez etap drugi, w którym te same skrawki są przenoszone do mikroskopu elektronowego, gdzie są obrazowane w SEM (zwykle przy użyciu elektronów wstecznie rozproszonych, co zapewnia wysoki kontrast ultrastrukturalny), obrazy fluorescencyjne i elektronowe są nakładane cyfrowo. Dzięki korelacji dwóch typów mikroskopów możliwa jest identyfikacja struktur molekularnych w kontekście ultrastrukturalnym (np. receptor w synapsie, białko w mitochondrium), co znacząco zwiększa wartość analityczną danych (Burel i in., 2018; Micheva i in., 2024).

Tabela 2. Porównanie wybranych cech różnych rodzajów mikroskopów elektronowych
Table 2. Comparison of selected features of different types of electron microscopes

Technika	Zasada działania	Typ próbki	Przykłady zastosowania
SEM (skaningowy mikroskop elektronowy)	Elektrony skanują powierzchnię próbki, rejestrowane są elektrony wtórne	Przewodząca lub pokryta warstwą przewodnika, np. złota	Topografia powierzchni, skład chemiczny
TEM (transmisyjny mikroskop elektronowy)	Elektrony przechodzą przez bardzo cienką próbkę	Zatopiona w żywicy, skrawki ultracienkie	Struktura wewnętrzna organelli, wirusów, nanocząsteczek
STEM (skaningowy transmisyjny mikroskop elektronowy)	Skanowanie punktowe wiązką elektronów przez próbkę	Zatopiona w żywicy, skrawki ultracienkie	Analiza struktury i morfologii, ilościowa i jakościowa analiza pierwiastków chemicznych
SBF-SEM (serial block-face SEM)	Automatyczne skrawanie bloczka i obrazowanie powierzchni po każdej warstwie	Zatopiona w żywicy	Trójwymiarowe obrazowanie struktur biologicznych
FIB-SEM (focused ion beam SEM)	Wiązka jonów usuwa materiał, SEM rejestruje obraz warstw	Zatopiona w żywicy	Rekonstrukcje trójwymiarowe, badanie półprzewodników
SEM-AT (scanning electron microscopy array tomography)	Seryjne obrazowanie ultracienkich skrawków	Zatopiona w żywicy, seryjne skrawki ultracienkie	Wizualizacja szczegółów ultrastruktury materii, badanie lokalizacji i dystrybucji składników komórkowych, analiza porowatości i deformacji materiałów
FM/SEM-AT (fluorescence/scanning electron microscopy array tomography)	Seryjne obrazowanie ultracienkich skrawków znakowanych fluorescencyjnie	Zatopiona w żywicy, seryjne skrawki ultracienkie znakowane fluorescencyjnie	Lokalizacja białek w kontekście ultrastruktury komórkowej

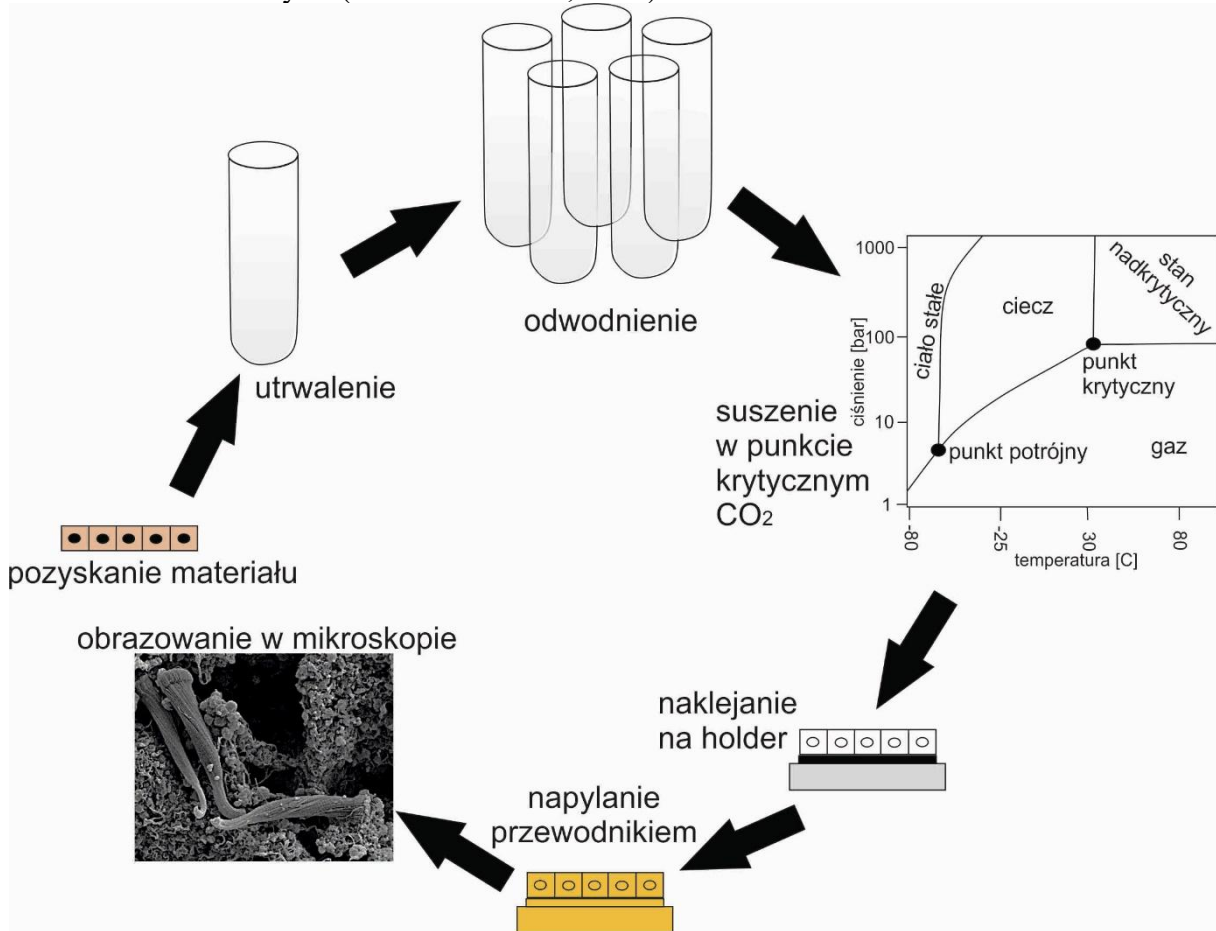
Proces przygotowywania próbek do mikroskopii elektronowej

Fragmenty pobranych tkanek, przeznaczonych do analizy w SEM, należy poddać procesowi utrwalania w celu zachowania ich strukturalnej integralności oraz ochrony przed degradacją (rys. 1). Standardową metodą utrwalania jest inkubacja w 3% roztworze glutaraldehydu w buforze fosforanowym (pH 7,4) lub formalinie, choć w zależności od specyfiki badanej próbki możliwe jest także zastosowanie acetonu, alkoholi o różnym stężeniu bądź czterotlenku osmu, który zwiększa kontrast w obrazowaniu (Mehdizadeh i in., 2014).

Po etapie utrwalania próbki poddaje się procesowi odwodnienia w szeregu alkoholowym o rosnącym stężeniu (25%, 50%, 75%, 96%, 100%), co zapewnia stopniowe usunięcie wody i minimalizuje ryzyko zmian morfologicznych (rys. 1). Następnie próbki umieszcza się w acetonie w celu dalszej eliminacji resztkowej wilgoci oraz przygotowania ich do kolejnych etapów analizy (Boyde i Wood, 1969; Mehdizadeh i in., 2014).

Odwodnione próbki, umieszczone w dedykowanych uchwytach, należy poddać procesowi suszenia w punkcie krytycznym z zastosowaniem dwutlenku węgla (CO_2), co pozwala na eliminację cieczy bez powodowania zmian morfologicznych (rys. 1). W przypadku konieczności analizy mniejszych fragmentów próbki można poddać kontrolowanej fragmentacji poprzez rozłupywanie lub rozkruszanie, dostosowując ich wielkość do specyficznych wymagań badawczych (Jones, 2012). Następnie próbki mocuje się na specjalistycznych holderach (rys. 1) pokrytych przewodzącą taśmą węglową lub krążkami węglowymi, zapewniając stabilność i odpowiednie warunki do dalszej analizy (Boyde i Wood, 1969).

Aby umożliwić przewodzenie elektronów przez badaną próbkę, jej powierzchnia zostaje pokryta cienką warstwą metalu szlachetnego (rys. 1), najczęściej złota, platyny lub paladu, co znacząco poprawia jakość obrazowania w TEM. Gotowe preparaty, przeznaczone do analizy, przechowuje się w ekssykatorze, co chroni je przed wpływem wilgoci i potencjalnymi zmianami strukturalnymi (Mehdizadeh i in., 2014).



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania próbki do analizy w mikroskopie elektronowym skaningowym

Figure 1. Schematic representation of the stages of sample preparation for analysis in a scanning electron microscope

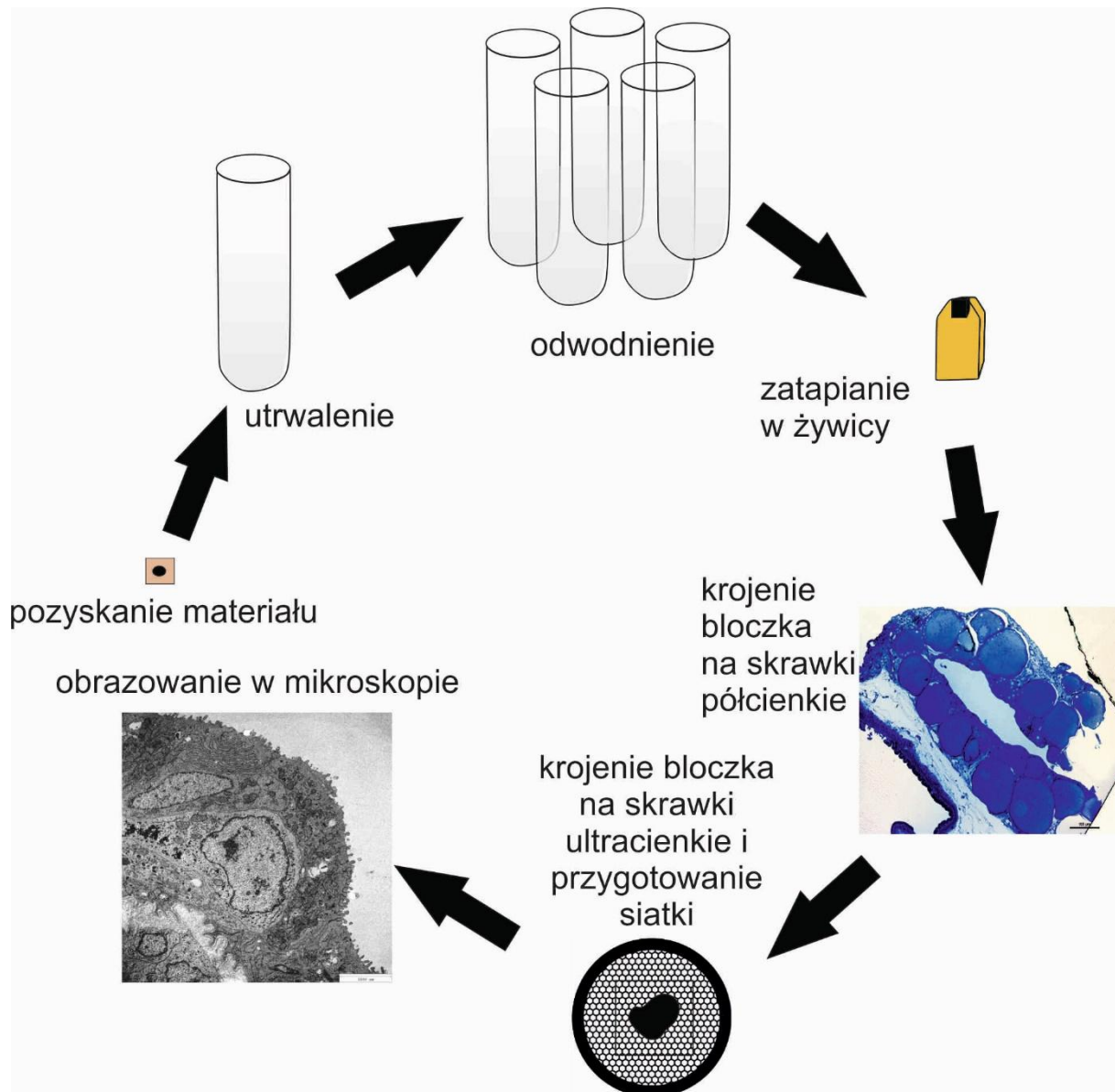
Próbki wykorzystywane do analizy pierwiastkowej w SEM poddaje się procesowi oczyszczania w rozpuszczalniku, takim jak aceton, w celu usunięcia zanieczyszczeń powierzch-

niowych. W przypadku materiałów o większej twardości konieczne jest ich uprzednie przycięcie i wypolerowanie (Goldstein i in., 2003). Próbki nieprzewodzące mogą wymagać zastosowania dodatkowej warstwy przewodzącej, zazwyczaj w postaci napyłonego złota, w celu poprawy jakości sygnału elektronowego. W trakcie analizy kluczowe jest odpowiednie dostosowanie parametrów detekcji oraz wyboru rodzaju detektorów do specyfiki analizowanego materiału (Ali i in., 2023).

Próbki tkankowe przeznaczone do obrazowania w TEM, SBF-SEM, FIB-SEM oraz SEM-AT należy podzielić na niewielkie fragmenty o maksymalnej średnicy około 3 mm, a następnie poddać utrwaleniu w celu zachowania ich strukturalnej integralności (rys. 2). Standardową procedurą jest inkubacja próbek przez 24 godziny w 3% roztworze glutaraldehydu w buforze fosforanowym (pH 7,4). Po zakończeniu tego etapu tkanki przepłukuje się w buforze fosforanowym (pH 7,4), po czym umieszcza w 1% roztworze czterotlenku osmu w tym samym buforze, co zapewnia dalsze utrwalenie oraz wzrost kontrastu (Tizro i in., 2019).

Po utrwaleniu materiał poddaje się odwodnieniu w gradiencie alkoholi o narastających stężeniach (25%, 50%, 75%, 96%, 100%), a następnie umieszcza w tlenku propylenu, który przygotowuje próbkę do procesu zatapiania w żywicy epoksydowej (rys. 2). Optymalnym rozwiązaniem przy zatapianiu tkanki w żywicy jest zastosowanie specjalistycznych silikonowych foremek, które umożliwiają precyzyjne formowanie bloczków (Graham i Orenstein, 2007). W analogiczny sposób przygotowuje się próbki do SBF-SEM oraz FIB-SEM, a dokładne protokoły dedykowane tym technikom są wciąż optymalizowane celem jak najlepszego uwidocznienia różnego rodzaju struktur (Denk i Horstmann, 2004; Kizilyaprak i in., 2013; Kizilyaprak i in., 2019; McClain i Nowotarski, 2024; Sall i in., 2024). Tak przygotowane bloczki tkankowe są gotowe do umieszczenia w komorze mikroskopu SBF-SEM oraz FIB-SEM, natomiast celem analizy w TEM i SEM-AT należy poddać je dalszemu przygotowaniu, tzn. m.in. procesowi trymowania, polegającemu na mechanicznym przycinaniu nadmiaru żywicy przy użyciu szlifierek, pilników oraz żyłek. Ostateczna wielkość szczytowej części bloczka powinna obejmować wyłącznie obszar zatopionej tkanki i mieścić się w granicach kilku milimetrów średnicy (Mielńczyk i in., 2015).

Przed rozpoczęciem obrazowania w mikroskopie wykonuje się skrawki półcienkie, które umożliwiają wstępną analizę próbki w mikroskopie świetlnym (rys. 2). Taki etap pozwala na ocenę przekroju tkanki, który będzie następnie poddany bardziej szczegółowej analizie ultrastrukturalnej. Skrawki półcienkie przygotowuje się za pomocą ultramikrotomu wyposażonego w noże szklane. Fragmenty tkanki o grubości 0,5 μm po umieszczeniu na szkiełkach podstawowych poddaje się barwieniu roztworem azur II – błękit metylenu (1:1). Po wysuszeniu preparaty są gotowe do obserwacji w mikroskopie świetlnym. Jeżeli analiza skrawka półcienkiego dostarcza satysfakcjonujących wyników i umożliwia identyfikację struktur przeznaczonych do obrazowania w TEM lub SEM-AT, bloczek zostaje poddany dalszej obróbce. W kolejnym etapie wykorzystuje się nóż diamentowy do wykonania skrawków ultracienkich o grubości 20–60 nm, które następnie umieszcza się na specjalistycznych siatkach mikroskopowych (rys. 2). W zależności od charakterystyki próbek stosuje się różne typy siatek dostosowane do specyficznych wymagań badawczych. Tak przygotowane skrawki poddaje się kontrastowaniu przy użyciu octanu uranylu i cytrynianu ołowiu, co zwiększa widoczność struktur komórkowych. Po zakończeniu tych procesów próbka jest gotowa do obrazowania w TEM lub SEM-AT (Graham i Orenstein, 2007; Hayat, 2012; Mielńczyk i in., 2015).



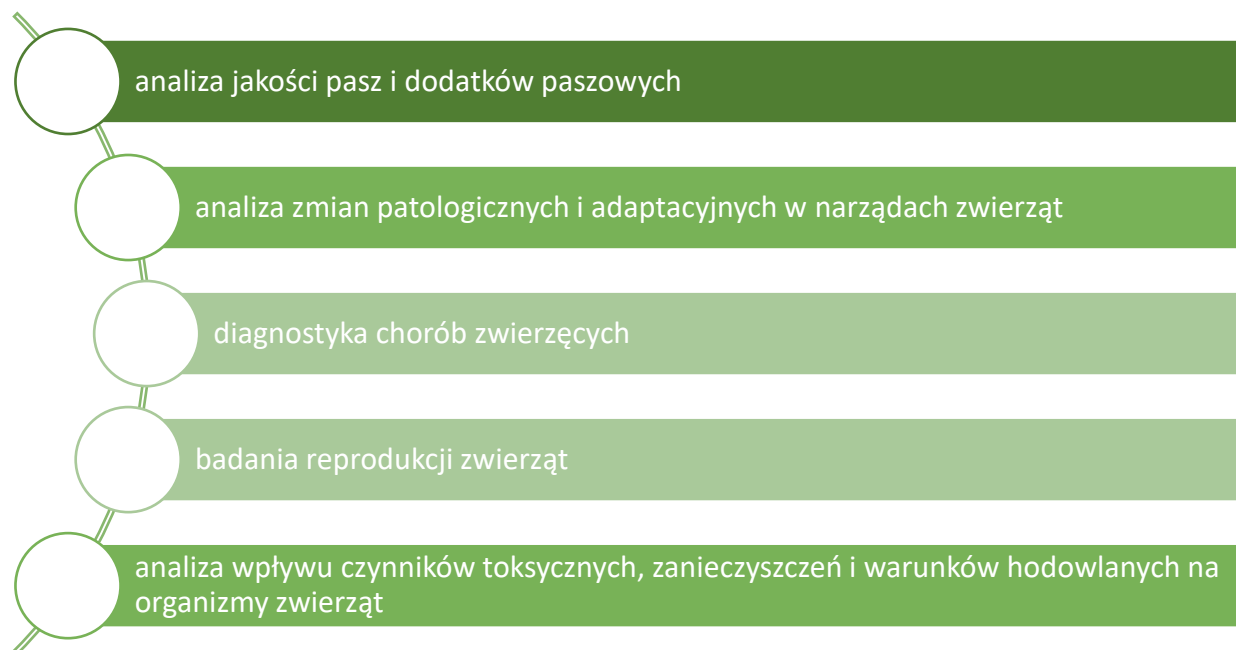
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania próbki do analizy na przykładzie mikroskopu elektronowego transmisyjnego

Figure 2. Schematic representation of the stages of sample preparation for analysis using a transmission electron microscope as an example

Wykorzystanie mikroskopii elektronowej w badaniach zootechnicznych

Mikroskopia elektronowa jest niezwykle cennym narzędziem w badaniach zootechnicznych, umożliwiającym szczegółowe analizy struktur komórkowych oraz mikroorganizmów występujących w organizmach zwierząt hodowlanych. Wśród kluczowych zastosowań wyróżnić można: 1) analizę jakości pasz i dodatków paszowych; 2) badania ultrastrukturalne komórek i tkanek celem analizy zmian patologicznych i adaptacyjnych w narządach zwierząt, zwłaszcza w kontekście chorób lub skutków działania różnych czynników środowiskowych; 3) diagnostykę chorób zwierzęcych – mikroskopia elektronowa umożliwia identyfikację patogenów, takich jak wirusy, bakterie i pasożyty, które mogą wpływać na zdrowie zwierząt hodowlanych; 4) badania reprodukcji zwierząt – analiza jakości plemników oraz komórek jajowych, jest istotna dla programów hodowlanych i sztucznego zapłodnienia; 5) ocenę skutków środowisko-

wych – umożliwia analizę wpływu czynników toksycznych, zanieczyszczeń i warunków hodowlanych na organizmy zwierząt (rys. 3) (Mebus i Underdahl, 1977; Graham i Orenstein, 2007; Orlova i Saibil, 2011; Sharma i Bhardwaj, 2019; Curry, 2000).



Rysunek 3. Kluczowe zastosowania mikroskopii elektronowej w zootechnice
Figure 3. Key applications of electron microscopy in animal science

Analiza jakości pasz i dodatków paszowych przy użyciu mikroskopii elektronowej jest niezwykle precyzyjną metodą, pozwalającą na ocenę zarówno składu chemicznego, jak i struktury cząsteczkowej komponentów używanych w żywieniu zwierząt hodowlanych. Mikroskopia elektronowa umożliwia szczegółowe badanie struktury cząsteczkowej pasz, co jest istotne dla ich przyswajalności i strawności (Sharma i Bhardwaj, 2019). Można analizować m.in. wielkość i kształt cząstek, które wpływają na procesy trawienne u zwierząt oraz obecność niepożądanych struktur, takich jak zanieczyszczenia czy mykotoksyny. Badania przy pomocy mikroskopii elektronowej pozwalają także na ocenę jakości białek (denaturacja i wpływ procesów technologicznych na ich wartość biologiczną) i tłuszczów (utlenienie oraz obecność niepożądanych substancji) (Orlova i Saibil, 2011). Mikroskopia elektronowa pozwala także na identyfikację mikroorganizmów i patogenów, które mogą znajdować się paszy, takich jak bakterie chorobotwórcze (np. *Salmonella* czy *Escherichia coli*), grzyby i pleśnie, wirusy (Curry, 2000). Dzięki mikroskopii elektronowej można także analizować, jak procesy technologiczne, takie jak ekstrudowanie, suszenie czy granulowanie, wpływają na mikrostrukturę paszy, co jest kluczowe dla oceny stabilności składników odżywczych oraz ich biodostępności.

Badania ultrastrukturalne komórek i tkanek przy użyciu mikroskopii elektronowej odgrywają kluczową rolę w diagnostyce chorób oraz analizie adaptacyjnych mechanizmów organizmów zwierzęcych w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Technika ta pozwala na szczegółowe zbadanie mikrostruktur, które nie są widoczne w tradycyjnej mikroskopii świetlnej. Zidentyfikować można m.in. zwyrodnienie i nekrozę komórek, uszkodzenia błony komórkowej, nagromadzenie patologicznych substancji, zmiany w strukturze mitochondriów czy też zmiany w komórkach odpornościowych (Graham i Orenstein, 2007).

Mikroskopia elektronowa jest niezwykle precyzyjną metodą diagnostyki chorób zwierzęcych, pozwalającą na szczegółową analizę struktury komórkowej i identyfikację patogenów na poziomie ultrastrukturalnym (Mebus i Underdahl, 1977). Szczególnym zastosowaniem mi-

roskopii elektronowej jest analiza próbek pobranych od zwierząt w celu monitorowania epidemii oraz badań nad nowymi terapiami. Dzięki swojej precyzji i niezawodności mikroskopia elektronowa stanowi fundament współczesnej diagnostyki weterynaryjnej, przyczyniając się do skuteczniejszego leczenia oraz ochrony zdrowia zwierząt (Graham i Orenstein, 2007).

Mikroskopia elektronowa odgrywa kluczową rolę w badaniach nad reprodukcją zwierząt, szczególnie w ocenie jakości plemników oraz komórek jajowych. Dzięki niezwykle wysokiej rozdzielczości pozwala na szczegółową analizę struktury i morfologii gamet, co ma ogromne znaczenie dla programów hodowlanych i technologii sztucznego zapłodnienia. Mikroskopia elektronowa umożliwia ocenę wielu parametrów wpływających na płodność samców (m.in. morfologia plemników, integralność akrosomu, stan błony komórkowej czy też stan mitochondriów) oraz samic (struktura osłonki przejrzystej, stan cytoplazmy oraz organelli komórkowych) (Baylor i in., 1943; Sotelo i Porter, 1959; Van Der Horst i in., 1991; Suzuki i in., 1996; Pesch i in., 2006). Dzięki tak dokładnej analizie hodowcy mogą selekcjonować najwyższej jakości gamety do zabiegów sztucznego zapłodnienia, co zwiększa szanse na zdrowe potomstwo i poprawia efektywność programów hodowlanych. Mikroskopia elektronowa jest także używana do badań nad wpływem czynników środowiskowych na płodność oraz do monitorowania skuteczności metod kriokonserwacji gamet (Khalil i in., 2018).

Mikroskopia elektronowa jest niezwykle cennym narzędziem w badaniach nad wpływem środowiska na organizmy zwierząt, pozwalając na precyzyjną analizę skutków działania toksycznych substancji, zanieczyszczeń oraz warunków hodowlanych na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Za pomocą mikroskopii elektronowej można analizować nagromadzenie metali ciężkich w tkankach powodujące uszkodzenia organelli komórkowych i zaburzenia funkcji komórek, uszkodzenia DNA wynikające z ekspozycji na mutageny środowiskowe, prowadzące do zmian nowotworowych lub problemów reprodukcyjnych czy też zmiany w strukturze błon komórkowych spowodowane działaniem pestycydów lub innych substancji chemicznych, a także analizować obecność mikro- i nanoplastiku w tkankach i komórkach wszelakich zwierząt i roślin i ich wpływu na metabolizm komórkowy (Soyer i Bayram, 2007; Bell i in., 2012; Mankos i in., 2014; Miserli i in., 2023).

Podsumowanie

Mikroskopia elektronowa to jedno z najważniejszych narzędzi badawczych współczesnej nauki, umożliwiające analizę struktur na poziomie atomowym. Dzięki różnym typom mikroskopów elektronowych – TEM, SEM i STEM – możliwe jest szczegółowe badanie materiałów biologicznych, nanotechnologicznych i inżynierskich. Technika ta znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach, od medycyny po przemysł, przyczyniając się do rozwoju nowych technologii i odkryć naukowych.

W zootechnice mikroskopia elektronowa odgrywa istotną rolę w badaniu struktury komórek zwierzęcych, analizy składu pasz oraz oceny jakości materiałów biologicznych wykorzystywanych w hodowli. Dzięki niej można dokładnie analizować mikroorganizmy wpływające na zdrowie zwierząt, a także badać ultrastrukturę tkanek w celu lepszego zrozumienia procesów fizjologicznych i patologicznych. Mikroskopia elektronowa wspiera również rozwój biotechnologii w hodowli zwierząt, umożliwiając precyzyjne badania genetyczne i diagnostykę chorób. Postęp w tej dziedzinie nieustannie poprawia rozdzielczość obrazowania i możliwości analizy, otwierając nowe perspektywy dla przyszłych badań. Nowoczesne techniki, takie jak SBF-SEM, SEM-AT i FIB-SEM, umożliwiają wykonanie rekonstrukcji trójwymiarowych badanych tkanek czy komórek. Mikroskopia elektronowa pozostaje więc kluczowym narzędziem w zrozumieniu mikro- i nanostruktur, prowadząc do dalszego rozwoju nauki i technologii.

Piśmiennictwo

- Ali A., Zhang N., Santos R.M. (2023). Mineral characterization using scanning electron microscopy (SEM): A review of the fundamentals, advancements, and research directions. *Appl. Sci.*, 13: 12600.
- Barbacki A. (2003). *Mikroskopia elektronowa*. Poznań, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej.
- Baylor M.R.B., Nalbiov A., Clark G.L. (1943). Electron microscope study of sperm. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 229–232.
- Bell D.C., Thomas W.K., Murtagh K.M., Dionne C. A., Graham A. C., Ierson J.E., Glover W.R. (2012). DNA base identification by electron microscopy. *Microscop. Microanal.*, 18: 1049–1053.
- Boyde A., Wood C. (1969). Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *J. Microsc.*, 90: 221–249.
- Bradbury S., Bracegirdle B., (1998). *Introduction to Light Microscopy* (Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks). Oxford, BIOS Scientific Publishers.
- Burel A., Lavault M.T., Chevalier C., Gnaegi H., Prigent S., Mucciolo A., Kolotuev I. (2018). A targeted 3D EM and correlative microscopy method using SEM array tomography. *Dev.*, 145(12): dev160879.
- Collinson L.M., Bosch C., Bullen A., Burden J.J., Carzaniga R., Cheng C., Verkade P. (2023). Volume EM: a quiet revolution takes shape. *Nat. Methods*, 20(6): 777–782.
- Courson J.A., Landry P.T., Do T., Spehlmann E., Lafontant P.J., Patel N., Burns A.R. (2021). Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) of biological tissue samples. *J. Vis. Exp.*, 169, Doi: 10.3791/62045
- Croft W.J. (2006). *Under the Microscope: A Brief History of Microscopy* (Vol. 5). Hackensack, NJ, World Scientific.
- Curry A. (2000). Electron microscopy as a tool for identifying new pathogens. *J. Infect.*, 40: 107–115.
- Datye A.K. (2003). Electron microscopy of catalysts: recent achievements and future prospects. *J. Catal.*, 216: 144–154.
- Denk W., Horstmann H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol.*, 2(11): e329.
- Egerton R.F. (2016). *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. New York, Springer.
- Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Lyman C.E., Lifshin E., Sawyer L., Michael J.R. (2003). *Specimen Preparation of Hard Materials: Metals, Ceramics, Rocks, Minerals, Microelectronic and Packaged Devices, Particles, and Fibers. Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. W: *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Lyman Ch.E., Lifshin E., Sawyer L., Michael J.R. (red.). New York, Springer, ss. 537–564.
- Graham L., Orenstein J.M. (2007). Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nat. Protoc.*, 2: 2439–2450.
- Haguenau F., Hawkes P.W., Hutchison J.L., Satiat-Jeunemaître B., Simon G.T., Williams, D.B. (2003). Key events in the history of electron microscopy. *Microscop. Microanal.*, 9: 96–138.
- Hałas A., Szymański H. (1965). *Mikroskopy elektronowe*. Warszawa, Wydawnictwa Komunikacji i Łączności.
- Hayat M.E. (2012). *Fixation for electron microscopy*. New York, Elsevier.

- Jones C.G. (2012). Scanning electron microscopy: preparation and imaging for SEM. W: Forensic microscopy for skeletal tissues: Methods and protocols. Bell L.S. (red.). Totowa, NJ: Humana Press, ss. 1–20.
- Kelsall R.W., Hamley I.W., Geoghegan M. (2008). Nanotechnologie. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Khalil W.A., El-Hairiry M.A., Zeidan A.E., Hassan M.A., Mohey-Elsaeed O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int. J. Vet. Sci. Med.*, 6: 49–56.
- Kizilyaprak C., Bittermann A.G., Daraspe J., Humbel B.M. (2013). FIB-SEM tomography in biology. W: Electron microscopy: methods and protocols, Kuo J. (red.). Totowa, NJ, Humana Press, ss. 541–558.
- Kizilyaprak C., Stierhof Y.D., Humbel B.M. (2019). Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. *Tissue Cell*, 57: 123–128.
- Koike T., Yamada H. (2019). Methods for array tomography with correlative light and electron microscopy. *Med. Mol. Morphol.*, 52(1): 8–14.
- Korczyński J., Gacek G. (2015). Mikroskopia świetlna. *Prz. Hod.*, 2: 37–41.
- La Berge A.E.F. (1999). The history of science and the history of microscopy. *Perspect. Sci.*, 7: 111–142.
- Mankos M., Shadman K., Persson H.H.J., N'Diaye A.T., Schmid A.K., Davis R.W. (2014). A novel low energy electron microscope for DNA sequencing and surface analysis. *Ultra-microscopy*, 145: 36–49.
- McClain M.L., Nowotarski S.H. (2024). Challenges and opportunities of volume electron microscopy. *Microsc. Microanal.*, 30(1): 990.
- Mebus C.A., Underdahl N.R. (1977). Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1249–1254.
- Mehdizadeh K.A., Tahermanesh K., Chaichian S., Joghataei M.T., Moradi F., Tavangar S.M., Najafabadi A.S.M., Lotfibakhshaiesh N., Beyranvand S.P., Anvari-Yazdi A.F., Abed S.M. (2014). How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy (SEM). *GMJR*, 3: 63–80.
- Mertz J. (2009). Introduction to Optical Microscopy. Greenwood Village, USA, Roberts and Company Publishers.
- Micheva K.D., Burden J.J., Schifferer M. (2024). Array tomography: trails to discovery. *Methods Microsc.*, 1(1): 9–17.
- Mielańczyk, Ł., Matysiak, N., Klymenko, O., Wojnicz, R. (2015). Transmission electron microscopy of biological samples. W: The Transmission Electron Microscope – Theory and Applications, Maaz K. (red.). Rijeka, ss. 193–236.
- Miserli K., Lykos C., Kalampounias A.G., Konstantinou, I. (2023). Screening of microplastics in aquaculture systems (fish, mussel, and water samples) by FTIR, scanning electron microscopy–energy dispersive spectroscopy and micro-Raman spectroscopies. *Appl. Sci.*, 13: 9705.
- Murphy D.B., Davidson M.W. (2013). Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Hoboken, USA, John Wiley & Sons.
- Nellist P.D. (2019). Scanning Transmission Electron Microscopy. W: Springer Handbook of Microscopy. Hawkes P.W., Spence J.C.H. (red.). Springer Handbooks, Springer, Cham, ss. 819–904.
- Orlova E.V., Saibil H.R. (2011). Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chem. Rev.*, 111: 7710–7748.
- Peddie C.J., Genoud C., Kreshuk A., Meechan K., Micheva K.D., Narayan K., Collinson L.M. (2022). Volume electron microscopy. *Nat. Rev. Methods Primers*, 2(1): 51.

- Pesch S., Bostedt H., Failing K., Bergmann M. (2006). Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim. Reprod. Sci.*, 91: 285–298.
- Pluta M. (1982). *Mikroskopia optyczna*. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Reimer L., Kohl H. (2008). *Transmission electron microscopy. Physics of image formation*, 5th edition. Berlin, Springer.
- Sall J., Petzold C., Liang A.F.X. (2024). Practical protocol and parameter optimizations for SBF-SEM imaging. *Microsc. Microanal.*, 30(1): 990.
- Sharma V., Bhardwaj A. (2019). Scanning electron microscopy (SEM) in food quality evaluation. W: *Evaluation technologies for food quality*. Zhong J., Wang X. (red.). Woodhead Publishing, ss. 743–761.
- Sotelo J.R., Porter K.R. (1959). An electron microscope study of the rat ovum. *J. Cell Biol.*, 5: 327–342.
- Soyer C., Bayram M. (2007). Analysis of heavy metals in the endometrial tissue using electron microscope. *Environ. Monit. Assess.*, 130: 141–147.
- Suzuki H., Presicce G.A., Yang X. (1996). Analysis of bovine oocytes matured *in vitro* vs. *in vivo* by scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 45: 271.
- Tizro P., Choi C., Khanlou N. (2019). Sample preparation for transmission electron microscopy. *Methods Mol. Biol.*, 1897: 417–424.
- Van Der Horst G., Curry P.T., Kitchin R.M., Burgess W., Thorne E.T., Kwiatkowski D., Parker M., Atherton R.W. (1991). Quantitative light and scanning electron microscopy of ferret sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 30: 232–240.
- Van Meerssche M., Feneau-Dupont J. (1984). *Krystalografia i chemia strukturalna*. Warszawa, Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Zhou W., Wachs I.E., Kiely C.J. (2012). Nanostructural and chemical characterization of supported metal oxide catalysts by aberration corrected analytical electron microscopy. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 16: 10–22.

Zatwierdzono do druku: 25 IX 2025

ELECTRON MICROSCOPY IMAGING METHODS IN ZOOTECHNICAL RESEARCH

Anna M. Dymek, Jakub Dymek

SUMMARY

Electron microscopy is a seminal research technique that facilitates analysis of structures at the atomic level. The development of the electron microscope can be traced back to the 1930s, when Ernst Ruska and Max Knoll constructed the first such instrument, utilizing a beam of electrons in lieu of visible light. Since that time, significant advancements have been made in the field, resulting in the development of a variety of microscopes, including TEM (transmission), SEM (scanning), STEM (scanning-transmission), SBF-SEM (serial block-face scanning electron microscope), FIB-SEM (focused ion beam SEM), and SEM-AT (scanning electron microscopy array tomography). The operating principle of electron microscopes is based on the emission of electrons, which are accelerated and focused by electromagnetic lenses. In the transmission electron microscope (TEM), electrons are permitted to pass through the specimen, thereby creating an image of its internal structure. In the scanning electron microscope (SEM), reflected electrons are analyzed, thus enabling the generation of three-dimensional images of the surface. A STEM microscope is a sophisticated instrument that integrates the capabilities

of a transmission electron microscope (TEM) and a scanning electron microscope (SEM), employing both transmitted electron and scanning of the sample surface techniques. This approach enables not only the observation of the sample's structural arrangement and the imaging of individual atoms, but also the analysis of its chemical composition. SBF-SEM, FIB-SEM, and SEM-AT microscopes facilitate the spatial imaging of the material under examination, predominantly based on the principle of electron reflection. The preparation of samples for electron microscopy is an exacting process that requires the application of specialized methodologies. These include ultrathin sectioning, deposition on metal grids, chemical contrasting and sputtering of conductive layers. The implementation of these techniques is essential to ensure the acquisition of high-quality imaging data. In the field of animal science, electron microscopy is employed in the study of the structure of animal cells, the analysis of the composition of feed, and the diagnosis of diseases. The technology under discussion enables the precise determination of tissue microstructures, the identification of pathogens, and the assessment of the quality of biological materials utilized in the context of animal breeding. This technique also supports the development of biotechnology in animal science, enabling genetic research and control of animal health at the cellular level. Electron microscopy remains a pivotal instrument in both natural and technical sciences, with its ongoing development generating new possibilities in the domains of biological, material and animal science research.

Keywords: electron microscope, ultrathin sections, electrons, microscopic imaging