

電子顯微技術應用於微生物學之新發展

曾敏南¹、陳昱初²

摘要

隨著技術的演進，已發展出多種以電子顯微鏡為基礎之新技術，供不同研究需求及目的所應用。例如，可同時對樣品成分進行定性及定量分析的能量過濾穿透式電子顯微鏡 (energy-filtered transmission electron microscope)，及可以直接觀察活體生物組織的環境掃描式電子顯微鏡 (environmental scanning electron microscope)，或是已跳脫傳統電子顯微範疇的原子力顯微鏡 (atomic force microscope) 則可以用於分析物體表面的三維 (three dimensions) 樣貌。透過諸多新技術使得吾人得以進行過去無法進行或難以分析的試驗，例如病原真菌中黑色素的構造及排列方式，或活體生物組織的觀察。本文列舉原子力顯微鏡、能量過濾穿透式電子顯微鏡及環境掃描式電子顯微鏡在微生物研究應用的例子進行說明。

關鍵語：電子顯微鏡、微生物、黑色素

前言

為了解自然界中的事物，人類嘗試以不同的方式去探索，其中，光學顯微鏡是一項可以提高人眼對於觀察微小事物之解析度的重要工具。但受制於光線波長之因素，光學顯微鏡之最佳解析度約莫為 0.5 微米，為了探索更加細微的世界，以加速電子做為基礎，並具備更高解析力的電子顯微鏡於 1931 年因應而生。經過不斷改良後電子顯微鏡的解析力大幅提昇，至 1990 年代後期，大部分的電子顯微鏡都具有 0.1 至 0.2 奈米的解析度，而球差修正透鏡 (spherical aberration-corrected lens) 的發明更是開啟了次原子的新領域，大大地降低了雜訊的比例⁽⁹⁾。受惠於電子顯微鏡不斷的改良，微生物學的研究亦隨之大幅發展。透過電子顯微鏡的高解析力，讓研究人員得以一窺病原微生物及寄主細胞之間的微細變化，並更深入解析微生物侵染寄主細胞之過程，也讓研究人員得以採取更合適及有效的方法對付病原微生物。

電子顯微鏡種類

目前，除基本的掃描式 (scanning electron microscope, SEM) 與穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 外，為因應不同的需求，更發

^{1,2} 高雄區農業改良場助理研究員及副研究員兼作物環境課長(通訊作者 E-mail: yuchu@mail.kdais.gov.tw)

展出眾多的電子顯微鏡技術可供微生物領域加以應用，以下分別進行介紹。

1. 冷凍電顯 (Cryo-EM) :

生物細胞組織中大部分組成物為水及水溶性物質。這些物質在所有細胞、組織及器官的代謝反應中扮演關鍵角色。傳統電顯技術的前處理脫水及固定程序將使得這些樣品丟失組織中的水分，於是各種細胞中的物質可能呈現非自然狀態的分布，因而提高觀察結果的不正確性。在低壓環境下使液態氮固化再將樣品冷凍，可以將樣品中所有成份的物質保留在原地(*in situ*)，並可保持含水結構的外觀及立體樣貌。於樣品觀察期間亦使用低溫氮氣維持樣品及觀察室的低溫，避免操作過程對樣品造成損傷，此方法為冷凍電顯法。該方法可改善上述缺點。由於傳統的電顯法可對樣品造成輻射傷害，並且於觀察過程中使用到真空環境也不利於樣品外觀之維持，雖然可以利用負染(negative stain)方式取代，但仍無法避免生物性樣品之結構受到脫水的影響而毀壞。冷凍是一個解決的方式，不過需克服冷凍過程中，水分子所形成的晶格對於包埋在其中的樣品之影響，於是在 1984 年，Dubochet 等學者發明速凍法(flash freezing)之後，冷凍電顯法才真正被良好應用⁽¹⁵⁾。

2. 低電壓電顯(Low-voltage EM) :

使用的電壓只有數個 keV，相較於普通的電顯，對比度明顯提升，尤其對於質量較輕的觀測物，對比更為明顯。由於大部分的生物性樣品其組成成分都屬於輕質性，以低電壓電顯觀察會比一般電顯來的清晰，因此，此方法對於研究生物性樣品是很有潛力的工具。除此之外，對比度的提高也可以省去負染的步驟，避免負染過程中酸性的環境與高濃度的重金屬離子對於蛋白質樣品或其他生物性聚合物樣品的破壞，同時也降低重金屬對人體的危害⁽³⁾。

3. 掃描共軛焦電顯 (scanning confocal EM, ScEM) :

類似掃描共軛焦光學顯微鏡，以電子束取代雷射光束作為能量來源，因為入射粒子能量較高的緣故，所以可以提供較高的解析度，而藉由共軛焦的特性，也使影像得以 3D 的形式呈現出來，對於觀察膜狀結構或其他立體構造無疑是一項利器，可以較整體的分析樣品⁽¹⁶⁾。

4. 環境掃描式電顯 (environmental SEM) :

讓樣品可以在非真空的環境下，以潮濕、未塗層(uncoating)的情況被觀察。其原理是藉由特殊的電子推進系統及偵測裝置，使電子束可以從高度真空的電子槍區域移動到相對高壓的樣品區域，藉此獲得樣品原始狀態的資訊。環境掃描式電顯的優點是可以觀察含水的樣品，不會像一般掃描式電顯需在真空環境下操作導致樣品脫水；而絕緣性的樣品也不需要塗上金粒子或石墨使其變為導電性，省去複雜且耗時的樣品製備步驟，使觀察樣品的過程

可以更快速且更容易，甚至新鮮或是活體的生物組織也可以直接觀察⁽¹⁷⁾。

5. 聚焦離子束電顯 (focused ion beam EM)：

聚焦離子束是與 SEM 類似的技術，但利用的卻是離子束，不同於利用電子束成像的 SEM。聚焦離子束技術可以與電子束技術結合，例如雙束掃描式電顯(dual-beam SEM)、環境掃描式電顯，甚至也可以應用於冷凍電顯，這些系統的結合更有助於生物性材料的研究。而近年來利用聚焦離子束來製備 TEM 樣品的技術也越來越普遍，因為一般利用超薄切片術(ultramicrotomy)製備樣品時，無法避免樣品結構在切割處受到的擠壓，導致無法觀察到切割前的型。此外超薄切片技術也無法選擇特定位點做切割，而聚焦離子束的優點在於能夠同時克服上述兩項缺點，一方面能維持樣品斷面的完整性，另一方面也能針對某目標區域做切割⁽¹⁴⁾。

6. 掃描穿透式電顯 (scanning transmission EM)：

為穿透式電顯的一種，與一般穿透式電顯的不同點在於電子除了會穿透樣品之外，電子束還會集中於一點並且對樣品進行掃描。雖然穿透式電顯對於樣品的要求較高(需要超薄的樣品)，但對於大部分觀察的樣品都是奈米等級的掃描穿透式電顯來說，這項要求並不會造成困擾。因此，在掃描穿透式電顯中使用之超薄樣品無需原先的樣品製備步驟，故可加速研究的進行。此電顯對研究生物性材料的優點在於可以在暗視野(dark-field)下獲得高度的對比，省去染色的步驟。此外，此電顯還可以搭配 X 光能量分散光譜(energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS)或是能量損失譜儀(electron energy loss spectroscopy, EELS)，不但可以對樣品進行結構分析，同時還可以對樣品的組成物進行定量^(5, 21)。

7. 能量過濾穿透式電顯 (energy-filtered TEM)：

此類電子顯微鏡搭配了能量過濾器(energy filter)，除了可以像能量損失譜儀(electron energy loss spectrum, EELS)一樣獲得高解析度的能量損失譜，藉此對樣品的成分做定量分析之外，還可以只允許帶有特定能量的電子通過，藉由分析非彈性散射粒子(Inelastic Scattered Electron)所損失的能量，以獲得樣品的成分資訊，甚至還可以知道元素種類與化學鍵結等訊息。由於未經染色的生物性樣品若以一般的穿透式電顯觀察則對比度不足，況且這些樣品通常對於電子束也極為敏感，如果操作的過程沒有特殊的處理方式，樣品很容易毀損。此外，加上生物性樣品絕大部分都由碳構成，在這樣的條件下，此些未染色的生物性樣品很適合以此種對於氫元素較敏感的電顯作分析⁽²⁰⁾。

8. 原子力顯微鏡(atomic force microscope, AFM)：

原子力顯微鏡是利用原子之間的凡得瓦力 (Van Der Waals Force) 作用來

呈現樣品的表面特性。原子力顯微鏡為掃描式探針顯微技術的一種，此類顯微技術是利用特製的微小探針，來偵測探針與樣品表面之間的某種交互作用，例如原子力、磁力或近場電磁波等。利用探針與樣品表面之間的作用力，使得探針可在樣品表面做左右前後掃描，掃描時，探針與樣品表現維持一固定距離，約為數百 Å (10^{-10}m) 之間，而只要記錄掃描面上每點的垂直微調距離，我們便能得到樣品表面的等交互作用圖像，這些資料便可用來推導出樣品表面的樣貌⁽⁶⁾。

電顯技術應用於黑色素分析

黑色素(melanin)通常為微生物所產生可避免細胞於紫外線下受到傷害的保護性色素。此色素之分子量大、結構複雜且無法溶解，至目前為止並未清楚了解其結構。黑色素所指並非一項單一物質，而是泛指一群具有類似特性的物質⁽¹²⁾，這一類物質被定義為可抗高溫的強酸及強鹼，並可被強氧化劑漂白的物質⁽⁴⁾，但由於這類物質的化學結構過於複雜及龐大且無法溶於水及有機溶劑中，因此在結構分析上倍增困難，以致於至目前為止並沒有任何自然界中黑色素的化學結構被完整分析⁽⁴⁾，目前只知道其基本組成單元為何，但是其組成單元是如何排列則不清楚。以 DOPA-melanin (即所謂的 eumelanin) 為例，DOPA-melanin 是一種咖啡色至黑色的色素，由 tyrosine 經酵素轉化為 DOPA，DOPA 再經氧化後形成 melanin。DOPA-melanin，目前的研究數據顯示，主要包含 5,6-dihydroxyindole (DHI) 及 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 這兩種 monomer。目前，一般認為這兩種 monomer 可存在不同的氧化狀態，並隨機彼此連結，或連結前趨物的分子而形成黑色素。

缺乏黑色素的結構訊息也使得黑色素與其生物功能之間的關係具有不確定性。儘管黑色素之結構及組成之訊息尚不明瞭，但有許多功能仍可歸因於黑色素，包含光保護、光敏感、吸收自由基、抗殺菌劑等。以 *Cryptococcus neoformans* 為例，黑色素位於其細胞壁與細胞膜之間，因為黑色素的存在，使得在對付 *C. neoformans* 引起的疾病時變得不容易。然而，在黑色素化(melanization)的微生物中，營養是如何通過黑色素層而進入細胞中、*C. neoformans* 如何通過細胞層而出芽生殖，以及細胞為何因為黑色素存在而具有抗殺菌劑的能力均是醫學上重要且未解決的一連串問題。為了解這個問題，需經由黑色素基本結構著手，然而黑色素因無法溶解因此無法進行其結晶之研究，因此目前有關黑色素層之結果的基本資料所知甚少。

Eisenman 等人(2005)試圖利用 AFM 配合 ScEM、TEM 及 NMR 技術了解

這個問題。經由 TEM 觀察得知黑色素聚合形成一空心球狀體，被稱為“ghost”。透過 AFM 影相，清楚顯現黑色素顆粒為表面粗糙的圓型顆粒，直徑約 40~130nm。黑色素在“ghost”顆粒上以同心層的方式堆疊成為多層之方式排列。利用 NMR cryoporometry 技術得知這些 ghost 空心顆粒表面具有直徑約 1-4 nm 的孔洞。Eisenman 等人(2005)利用 ScEM 觀察 *C. neoformans* 細胞出芽生殖後的疤痕(bud scar)位置，發現越接近疤痕中心位置，黑色素顆粒體積越大。再利用 AFM 量測得知在疤痕外圍之黑色素顆粒直徑平均為 49nm，而疤痕中心位置平均為 96nm。利用 SEM 亦或高解析度的 ScEM 觀察細胞表面的黑色素顆粒排列情形，只能得到粗糙且平面的圖象，但利用 AFM 三維成相技術則讓我們清楚得知黑色素顆粒的堆疊結果⁽⁷⁾，更得知黑色素顆粒可組裝形成類似纖維的結構⁽¹⁰⁾。Jastrzebska 等人(2010)進一步利用 AFM，試圖了解 DOPA-melanin 如何自我組裝、聚集。影像分析結果發現，黑色素顆粒聚集時，傾向聚合成奈米級大小的顆粒，此顆粒再自我組裝為類似纖維的結構。這些類似纖維的結構長度約 250 nm，高度約 50 nm。經實驗觀察，推測這些黑色素的單體可能經由凡德瓦力而彼此相互作用進而結合。

應用 AFM 觀察抑菌物質與病原微生物間的關係

AFM 與其他顯微技術相比較具有方便性及即時性的優點。SEM 及 TEM 雖可提供高解析度，但其複雜的樣品製備過程卻會大幅扭曲樣品的原貌，更可能破壞樣品組織的物質及結構。由於 AFM 透過探針直接量測樣品，因此樣品只要相當簡易的前處理或完全不需前處理即可上機。此外，AFM 可得到樣品實際的 3D 圖像。而一般電子顯微鏡只能在固定的對焦距離得到影像。更重要的是 AFM 可在緩衝液體中量測生物細胞，這代表 AFM 可即時觀察活細胞。

在微生物樣品上，AFM 最常被應用於形態觀察。AFM 可提供高解析度之影像，但為最少的扭曲，得到最接近真實的原貌。AFM 被用於評估藥物處理後，對微生物外觀形態的影響。例如，為了闡明不同分子量的殼聚糖(chitosan)的抗菌活性，Fernandes 等人(2009)利用 AFM 觀察兩種革蘭氏陽性菌 *Staphylococcus aureus* 及 *Bacillus cereus* 一種革蘭氏陰性菌 *Escherichia coli* 處理殼聚糖前後的外觀變化。其樣品置於乾淨的玻片上風乾後進行 AFM 掃描。經 AFM 觀察，發現大分子量的殼聚糖處理後，殼聚糖可圍繞於上述細菌表面並形成聚合層(polymer layer)，阻礙了細菌對養分的吸收甚至導致了細菌的死亡。由於殼聚糖的處理導致細菌的死亡，經過 AFM 的觀察發現細胞

壁的崩塌而加以證實由殼聚醣造成。此外，低分子量殼聚醣（殼寡糖, chitooligosaccharides）可能影響穿透細菌之細胞，進而引起更明顯的損壞。在殼聚醣處理 *B. cereus* 孢子後，利用 AFM 觀察可發現細胞表面更為粗糙，且出現細胞被分解之現象，但如果利用殼寡糖處理則無法造成大量細胞的崩解。此研究亦發現，細菌藉由增加棲群數量及細胞體積來抵抗殼聚醣的影響。Liu 等人(2009)評估鐵氰化鉀(ferricyanide)對 *E. coli* DH 5 alpha 細胞生長及繁殖速率的影響。當細胞處理 50 及 100um 的鐵氰化鉀後，利用 AFM 可發現細胞崩塌且表面變得更粗糙。透過此方法亦證實鐵氰化鉀可抑制微生物。

AFM 亦被用來觀察微生物的行為。Yuan 及 Pehkonen (2009)利用 AFM 研究 *Pseudomonas* NCIMB 2021 及 *Desulfovibrio desulfuricans* 在不銹鋼表面殖據(colonization)形成生物膜(biofilm)的動態過程。結果顯示在不銹鋼上，這兩種微生物形成生物膜時，隨著時間的增加，其覆蓋率、異質性(heterogeneity)及厚度亦隨之增加。經由 *D. desulfuricans* 殖據後腐蝕的凹洞比 *Pseudomonas* NCIMB 2021 所腐蝕的凹洞還要深，這主要的原因是由於 *D. desulfuricans* 產生的硫化物離子的強化腐蝕⁽²³⁾。

應用過濾穿透式電顯區別細胞胞器

Vannier-Santos 及 Lins 兩位學者以顯微技術及細胞化學技術對寄生性原蟲(protozoa)進行研究，以寄生性原生動物為模式，在細胞生物學、生物化學與分子生物學等領域的研究上，均利用顯微技術與細胞化學技術作為基礎，特稱為細胞微生物學(cellular microbiology)。然而對於細胞功能與細胞構造的了解有很大的成分是依靠顯微技術的進展，若以光學顯微鏡或是一般的穿透式電顯做觀察，常常會無法將細胞內各個胞器分辨清楚，至於構造相似但組成成分相異的不同胞器也會被歸在相同一類，這些結果均會阻礙研究的進行。幸好隨著不斷修正、改善，許多的顯微技術被創造出來以克服遭遇的阻礙，能量過濾穿透式電顯便是其中一種。能量過濾穿透式電顯除了具有高度解析力，並具有高敏感度。Vannier-Santos 及 Lins (2001) 兩位學者藉由此種電顯獲得原生動物細胞之鈣酸體(acidocalcisome)內的元素分布資訊。研究發現磷、鈣及氧三元素(原蟲細胞內較多的元素)是均質性的分布在在鈣酸體內核心，並且也因為磷及氧的存在訊息，使他們得以確認所研究的胞器的確就是鈣酸體⁽²⁰⁾。這種元素分布的資訊對於測試抗菌製劑(antimicrobial agent)效用評估實驗具有相當的幫助。對微生物以抗菌物質處理後，輕者可能使細胞內的隔間構造發生明顯的改變，重者甚至使其遭到不可恢復的破壞，導致無法以一般的觀察方式區分出來某隔間是屬於何種胞器，而使用能量過濾穿透式電

顯便可利用元素的分布，準確地判斷出所觀察的區域在未受改變之前是何種構造，不會被誤導。因而使得抗菌物質之處理成效評估的分析得以正確。

應用環境掃描式電顯觀察微生物與環境之互動

慢沙濾池(slow sand filter)是一種水質過濾裝置，具有過濾有害微生物(包括病毒、細菌、原蟲等)、硝酸鹽類、及其他污染物的功能，雖然可以被其他如快沙濾池等效率更高的過濾方式取代，但由於慢沙濾池的成本較低，操作較簡易，維護需求較少，並且能夠有效清除病原菌，因此仍常被開發中國家及農村聚落所使用。其有效的過濾效果除了歸因於緩慢的過濾速度及適當的濾沙大小之外，最上層(與水的交界處)的生物活性層也扮演重要的角色，該層是由許多不同種類的細菌、真菌、藻類、原生動物、甚至昆蟲幼蟲所組成，形成類似生物膜的構造，是清除污染物最大的功臣，因此生物活性層的形成與否便成為了慢沙濾池是否能被使用的關鍵因子。然而，對於此層內的微生物如何進行溝通，或該層形成機制的資訊卻少之又少，因此研究者們才想透過觀察生物活性層的形成以對其作更進一步的了解，由於一般掃描式電顯的樣品製備過程需經過固定、冷凍或脫水，可能破壞脆弱的樣品或改變樣品的結構，因此研究者們選擇環境掃描式電顯作為他們的觀察工具，以最低限度的處理步驟保持樣品的完整性。在 Joubert 及 Pillay 利用環境掃描式電顯進行的研究中，根據每週的觀察結果，起初是細菌先在沙粒表面開始殖據，形成生物膜，而沙粒受到微生物代謝的影響逐漸產生形變，接著矽藻也開始附著，嵌入生物膜分泌的大量胞外基質內，之後聚集的微生物越來越多，種類越來越複雜，且隨著時間的進展，優勢物種由細菌轉變為矽藻，直到觀察的最後一週，所有的沙粒表面均被微生物與其分泌物所覆蓋，即使再以較大的倍率也無法觀察到背景的沙粒了⁽¹¹⁾。

應用冷凍電顯觀察微生物分泌物

而在 2010 年，Allan-Wojtas 等學者欲研究 *Xanthomonas fragariae* 此細菌病原在草莓葉片上的侵染過程，研究人員推測該病原細菌於侵染過程可能草莓葉片上形成生物膜(biofilm)，而生物膜的組成是由微生物本身及其附著在物體表面之後，分泌出一層由醣類、蛋白質以及核酸所組成的胞外多醣(extracellular polysaccharide, EPS)所構成。EPS 除了可以保護微生物免於脫水、乾燥及植物毒素的威脅之外，還可以讓微生物可以吸附在宿主表面，更利於養分、礦物質及水分的吸收。以往在研究病原侵染的過程時，對樣品進行前處理之固定方式以及染色方式並不適合用在以生物膜作為侵染的研究

中。此乃因為 EPS 的原位(*in situ*)保存及其內部高度含水及醣類的結構常常會造成樣品製備過程的阻礙，因此必須找到一種不但可以完整地固定葉片組織，還可以保持生物膜整體構造的顯微技術。冷凍電顯便符合他們的需求，因其常被推薦用以觀察可溶於水或其他無水溶劑的樣品、脆弱而易受外力破壞的樣品、或是易受水分及固定時間影響的樣品，於是 Allan-Wojtas 等學者便利用冷凍電顯搭配不同的無水固定法(anhydrous fixation)進行研究。他們透過電顯觀察到細菌侵染 8 天至 14 天後，植物葉組織內部發生的變化，細菌會侵入葉肉當中，分泌大量的 EPS，並且逐漸填滿葉肉組織間的空隙與柵狀組織(palisade layer)，甚至到了更後期，埋在 EPS 當中的細菌細胞還會穿透整片葉片，從葉的下表皮冒出來，這些觀察結果都與以一般常溫電顯所觀察到的結果不同，常溫電顯只能看到生物膜的部分痕跡而已⁽²⁾。

結語

電子顯微鏡已經從一種單純的放大工具發展成具有許多功能，並且兼具定量特性的儀器，不只是樣品的外觀構造，就連樣品的化學性質與電性等資訊也都可以利用不同的電顯技術來獲得。某些電顯技術甚至已跳脫傳統電子顯微鏡利用電子束掃描樣品的方式，例如原子力顯微鏡是以微小探針與樣品表面所保持一定距離進行掃描而獲得影像，而且呈現出的影像也由平面轉變為立體。這些進展都不斷地帶領電顯跨越重重限制，過去傳統電顯技術難以應用的研究主題(例如含水且未鍍金的樣品)以現在的技術已能順利解決。因此在廣大的微生物世界中，種種的奇妙現象，如果選用合適的電顯技術或配合多種電顯技術，將可更深入的了解。

參考文獻

1. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. and McDowell, A. W. 1984. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308: 32-36.
2. Allan-Wojtas, P., Hildebrand, P., Braun, P., Smith-king, H., Carbyn, S. and Renderos, W. 2010. Low temperature and anhydrous electron microscopy techniques to observe the infection process of the bacterial pathogen *Xanthomonas fragariae* on strawberry leaves. *J. Microsc.* 239: 249-258.
3. Asmar, G. A., Hanson, M. A., Ward, A. B., Lasalde, J. A., Stevens, R. C., Potter, C. and Kuhn, P. 2004. Low voltage electron microscopy (LVEM) as a probe for solubilized membrane protein aggregation states. *Microsc. Microanal.* 10: 1492-1493.

4. Casadevall, A., Rosas, A. L., Nosanchuk, J. D. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 354-358.
5. Crewe, A. and Wall, J. 1970. Contrast in a high resolution scanning transmission electron microscope. *Optik* 30: 461-474.
6. Eaton, P., and West, P. 2010. Atomic force microscopy. Oxford University Press. P. 110.
7. Eisenman, H., C., Nosanchuk, J., D., Webber, J. B. W., Emerson, R. J., Camesano, T. A., and Casadevall, A. 2005. Microstructure of Cell Wall-Associated Melanin in the Human Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 44: 3683–3693.
8. Fernandes, J. C., Eaton, P., Gomes, A. M., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. 2009. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy* 109: 854-860 .
9. Haider, M., Uhlemann, S., Schwan, E., Rose, H., Kabius, B. and Urban, K. 1998. Electron microscopy image enhanced. *Nature* 392: 768-769.
10. Jastrzebska, M., Mroz, I., Barwinski, B., Wrzalik, R., and Boryczka, S. 2010. AFM investigations of self-assembled DOPA–melanin nano-aggregates. *J. Mater. Sci.* 45: 5302-5308.
11. Joubert, E. D. and Pillay, B. 2008. Visualisation of the microbial colonisation of a slow sand filter using an environmental scanning electron microscope. *Electron. J. Biotechn.* 11: 119-125.
12. Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., and Brakhage, A. A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38:143-158.
13. Liu C, Sun T, Zhai YM, Dong SJ. 2009. Evaluation of ferricyanide effects on microorganisms with multi-methods. *Talanta* 78: 613-617.
14. Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J. and Mannella, C. 2007. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 4: 215-217.
15. McCully, M. E., Shane, M. W., Baker, A. N., Huang, C. X., Ling, L. E. C., and Canny, M. J. 2000. The reliability of cryoSEM for the observation and quantification of xylem embolisms and quantitative analysis of xylem sap *in situ*. *J. Microsc.*198: 24-33.

16. Mitsuishi, K., Iakoubovskii, K., Takeguchi, M., Shimojo, M., Hashimoto, A. and Furuya, K. 2008. Bloch wave-based calculation of imaging properties of high-resolution scanning confocal electron microscopy. *Ultramicroscopy* 108: 981-988.
17. Morgan, S. W. 2005. Gaseous secondary electron detection and cascade amplification in the environmental scanning electron microscope. University of Technology Sydney.
18. Ottensmeyer, F., Schmidt, E., Jack, T. and Powell, J. 1972. Molecular architecture: The optical treatment of dark field electron micrographs of atoms. *J. Ultra. R.* 40: 546-555.
19. Ruska, E. 1987. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Bioscience Rep.* 7: 607-629.
20. Vannier-Santos, M. A. and Lins, U. 2001. Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa. *Biol. Proced. Online* 3: 8-18.
21. Wall, J. S. and Simon, M. N. 2001. Scanning transmission electron microscopy of DNA-protein complexes. *Methods Mol. Biol.* 148: 589-601.
22. Yamanaka, M., Hara, K. and Kudo, J. 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microb.* 71: 7589-7593.
23. Yuan, S. J., and Pehkonen, S. O. 2009. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas NCIMB 2021* and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. *Corrosion. Sci.* 51: 1372-1385.