

MICROSCOPUL ELECTRONIC CU BALEIAJ, UN APARAT REMARCABIL ÎN SLUJBA BIOLOGIEI

Adriana DANIELOPOL și
Dan DANIELOPOL

Recent a fost pus la punct un nou tip de microscop electronic, numit *Microscop electronic cu baleiaj*¹ sau „Stereoscan”², care are posibilitatea de a reda volumul obiectelor datorită baleierii lor cu ajutorul unui fascicul de electroni. Noul aparat mărește până la 50 000 x.

Dat fiind că numărul cercetărilor care sînt realizate cu microscopul electronic cu baleiaj este din ce în ce mai mare, rezultatele lor fiind extrem de spectaculoase, ne propunem în cele ce urmează să prezentăm principiul de funcționare a acestui microscop, precum și cîteva exemple din aplicațiile sale în biologie.

Pentru a înțelege mai bine în ce constă noutatea stereoscopului trebuie reamintit că în cercetările biologice se folosește, în mod obișnuit, microscopul optic cu lumină transmisă, microscopul optic stereoscopic cunoscut și sub numele de „lupă binoculară” și „microscopul electronic cu fascicul de electroni transmiși”.

În cazul microscopului optic cu lumină transmisă, lumina străbate preparatele ce trebuie să fie cît mai subțiri. Adîncimea cîmpului este foarte mică, de aceea cu acest microscop nu se poate observa practic decît un singur plan, sau, cu alte cuvinte, numai secțiuni la diverse nivele ale preparatului. Se obțin astfel mărimi de pînă la 2000 x.

Lupa binoculară, folosind două sisteme optice înclinate unul față de celălalt și o lumină reflectată, permite obținerea imaginii volumului obiectului examinat. Limitele sistemelor optice care dau senzația de volum nu permit însă obținerea de mărimi mai mari de 200–250 x, ceea ce este insuficient, de multe ori, pentru observații de detaliu. Lupa binoculară, redînd relieful obiectelor examinate, compensează parțial neajunsul microscopului optic cu lumină transmisă.

Microscopul electronic cu fascicul de electroni transmiși a permis obținerea de mărimi de zeci de mii de ori. Dar, ca și în cazul microscopului optic, prin transmisie nu se observă decît secțiuni, într-un singur plan al obiectului examinat. În cazul acestui tip de microscop, fasciculul de electroni străbate preparatul microscopic care trebuie să fie mult mai subțire decît preparatele destinate examinării cu microscopul optic prin transmisie.

Microscopul electronic cu baleiaj, compensează neajunsurile microscopelor optice și electronice clasice.

Principiul de funcționare a microscopului electronic cu baleiaj

De la început trebuie spus că noi vedem volumul unui obiect datorită faptului că fotonii ce cad sub un anumit unghi de incidență asupra diferitelor părți ale obiectului se reflectă în mod diferit. Unghiul de incidență și natura suprafeței fiecărei părți ale obiectului fac ca numărul fotonilor reflectați care ajung pe retina ochiului nostru să fie foarte diferit. Din recombinarea fasciculelor de fotoni reflectați apare imaginea obiectului întreg. Volumul apare sub forma unor diferențe de iluminare ale obiectului.

¹ Baleiaj — proces fizic care constă în măturarea unui spațiu cu un fascicul de electroni (fr. ballayer).

² Stereo = relief, Scan = baleiaj (lb. engleză).

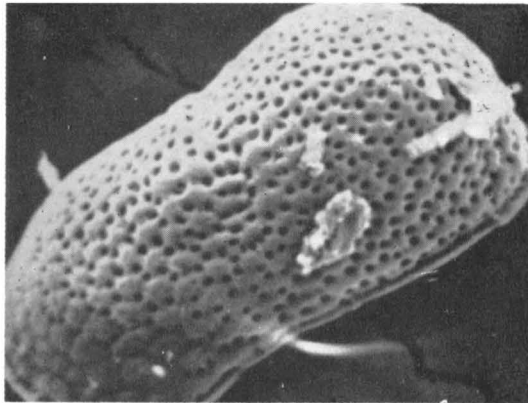
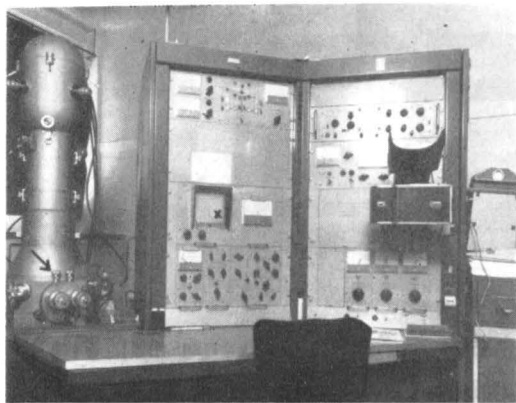


Fig. 1. Vedere de ansamblu a instalației microscopului electronic cu baleiaj. În stînga, sonda electronică care emite fasciculul primar de electroni. Săgeata indică locul unde este introdus preparatul microscopic ce urmează a fi examinat. În dreapta, panoul de comandă. Se observă un ecran al tubului catodic (X) pe care apare imaginea obiectului investigat și un aparat de fotografiat care fixează imaginile microscopice pe peliculă (Fotografia obținută prin amabilitatea Centrului de Cercetări S.N.P.A. — Pau).

Fig. 2. Valva crustaceului Ostracod *Kovalevskiella phreaticola*.

În cazul microscopului electronic cu baleiaj (fig. 1) o sondă electronică menținută la un potențial de 20 000—30 000 V emite un fascicul de electroni cu accelerații mari care baleiază preparatul microscopic; la ciocnirea cu obiectul ce trebuie investigat, fasciculul de electroni dă naștere la alte două fascicule de electroni ce se desprind de pe obiect ca un fel de reflexie. Aceste două fascicule „reflectate”, după ce trec printr-o serie de dispozitive de amplificare, sînt captate de un tub catodic, asemănător cu cel folosit la aparatul de televiziune. Ecranul fluorescent al tubului catodic, fiind baleiat în sincronism cu fasciculul primar de electroni, emis de sonda electronică, asigură formarea imaginii preparatului respectiv. Așadar, noi examinăm imaginea preparatului microscopic pe un ecran asemănător cu cel al aparatului de televiziune.

Volumul obiectului este redat datorită captării de către tubul catodic a celor două fascicule de electroni „reflectați”. Unul din fasciculele „reflectate”, numit și fascicul reflectat primar, avînd o energie mare, asemănătoare cu cea a electronilor incidenți, urmează traiectorii drepte. Datorită acestui fapt există zone ale obiectului de unde tubul catodic nu primește electroni reflectați primari, iar imaginea obiectului care se formează pe ecranul fluorescent al tubului catodic este în general întunecoasă și puțin nuanțată. Al doilea fascicul de electroni reflectați este format din electroni cu o energie mult mai scăzută. Datorită acestui fapt ei pot străbate traiectorii curbe. Tubul catodic poate primi astfel electroni și din zonele care în mod obișnuit nu sînt acoperite de fasciculul de electroni cu energie mare. Astfel sînt rediate cele mai fine denivelări ale obiectului, care ne apar, pe ecranul tubului catodic, într-o iluminare foarte nuanțată.

Principala noutate a microscopului electronic cu baleiaj constă, așadar, în folosirea fasciculului secundar de electroni reflectați, ce au energii joase.

Pentru obținerea unui flux „reflectat” de electroni este necesar ca obiectul de analizat să fie acoperit cu un strat foarte fin dintr-o substanță bună conducătoare de electricitate care să cedeze ușor electroni. De obicei se folosește un amestec de metale format din aur și paladiu. Operațiunea de depunere a metalelor pe preparatul microscopic se face, în vid, prin aducerea la incandescență a amestecului. Acesta emite vapori ce pătrund în cele mai mici anfractuozități ale obiectului ce urmează să fie examinat. Prin condensarea vaporilor de metal, preparatul microscopic se acoperă cu un strat de amestec metalic extrem de fin și uniform.

Datorită faptului că electronii accelerați emiși de sonda electronică au lungimi de undă mult mai mici decît ale fotonilor, este posibilă distingerea unor detalii ale obiectului care sînt apropiate unul de celălalt pînă la 150—300 Å³. Cu alte cuvinte, puterea de separare a microscopului electronic cu baleiaj este extrem de mare. Pentru a înțelege mai bine ce înseamnă aceasta trebuie menționat că microscopul optic cu lumină transmisă are o putere maximă de separare mult mai slabă, de numai 2 500 Å, iar lupa binoculară are o putere de separare încă mai scăzută, de 20 000 Å.

³ Å = a zecea milionime dintr-un micron.

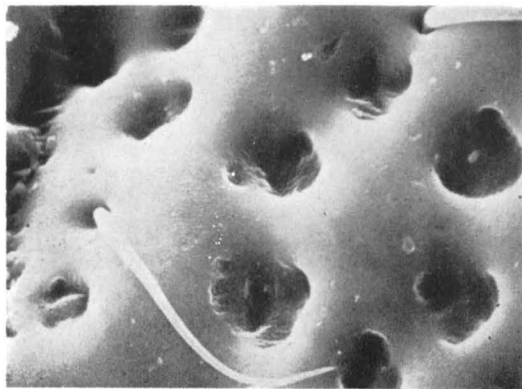


Fig. 3. Detaliu al valvei de *Kovalevskiella phreaticola* (G—2400 x).

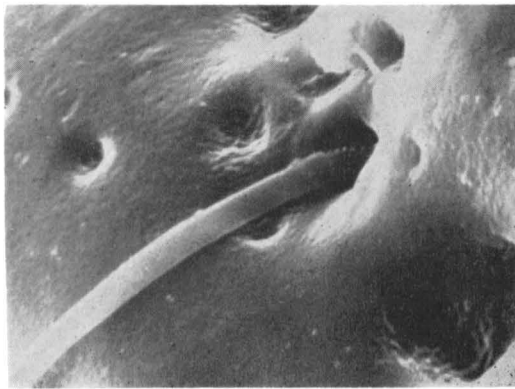


Fig. 4. Detaliu al valvei de *Kovalevskiella phreaticola* (G—5000x).

La aceeași putere de mărire, microscopul electronic cu baleiaj are profunzimea câmpului, cea care dă senzația de volum, de 300 x mai mare decât profunzimea câmpului unui microscop optic cu lumină transmisă.

Datorită tuturor acestor caracteristici, microscopul electronic cu baleiaj deschide o nouă etapă în cercetarea infinitului mic în biologie.

Cîteva din aplicațiile microscopului electronic cu baleiaj

Cele mai multe aplicații ale acestui nou tip de microscop sînt în domeniul cercetării organismelor microscopice, de exemplu alge, protozoare, crustacee, cit și în domeniul cercetării sporilor, a polenului, a unor țesuturi biologice etc.

Studiul multor microorganisme de tipul protozoarelor și al algelor a luat o dezvoltare vertiginoasă, în ultima vreme, ca urmare a descoperirii unor aplicații practice. Studiul acestor organisme era pînă în prezent extrem de greu datorită dimensiunilor lor reduse și datorită structurii în spațiu, în general foarte variată. Este știut de exemplu că unii radiolari sînt formați din sfere concentrice silicioase, fiecare sferă fiind formată la rîndul ei dintr-o rețea cu o structură ce diferă de la specie la specie. Microscopul electronic cu baleiaj redă într-o singură imagine întreaga complexitate a scheletului de radiolari.

Sistematica flagelatelor *Coccolithophoridae* ca și a algelor *Diatomee* este pe cale de a fi modificată ca urmare a datelor obținute cu ajutorul microscopului *Stereoscan*. Fotografia reprezentînd un singur plan al unui coccolit, așa cum se observă la microscopul optic, este uneori corelată cu greu la imaginile structurilor în volum, date de *Stereoscan*, care exprimă o complexitate nebănuită.

Figurile 2—4 ilustrează valva calcaroasă a unui crustaceu din subclasa Ostracodelor⁴. Această valvă are o lungime de 0,40 mm. Datorită dimensiunii reduse, ornamentația exterioară a valvei nu poate fi examinată decât la mărimi de peste 500 x ce se obțin în mod normal cu ajutorul microscopului optic cu lumină transmisă. Volumul destul de mare și structura calcaroasă a valvei împiedică însă observarea clară cu ajutorul microscopului optic a fosetelor ce acoperă întreaga suprafață a valvei. Ele apar însă extrem de bine la mărimi echivalente date de microscopul electronic cu baleiaj (fig. 2).

Pentru prima dată la mărimi de peste 2 000 x, grație *Stereoscanului*, s-a remarcat (fig. 3) că fosetele sînt la rîndul lor formate din mai multe loje. La mărimi de aproximativ 5 000 x (fig. 4) pot fi văzute clar detalii încă mai fine cum sînt de exemplu fosetele simple de diametru redus care se dispun în cerc în jurul perilor de pe valvă.

În medicină, cu ajutorul microscopului electronic cu baleiaj, au putut fi realizate imagini stereoscopice ale celulelor canceroase. Astfel în timp ce o hematie apare ca un disc, o celulă canceroasă la microscopul electronic cu baleiaj, apare ca o sferă gigantică acoperită cu numeroase prelungiri digitiforme.

Aceste cîteva exemple ilustrează din plin perspectivele pe care microscopul electronic cu baleiaj le oferă cercetărilor biologice.

⁴ Figurile 2—4 au fost realizate de autori în laboratorul de microscopie electronică a Muzeului de Științe Naturale din Stockholm. Detaliile prezentate în aceste fotografii sînt inedite.