

١١ . المجهر

Microscope

عقب إكتشاف شلايدن Schleiden وشفان Schwann وفيرشو Virchow فى النصف الأول من القرن التاسع عشر نظرية الخلية Cell theory ، والتي مفادها أن الخلية هى الوحدة الأساسية فى تركيب الكائنات الحية بمختلف صورها شهد العالم تطوراً هائلاً فى معرفتنا عن الخلايا، ويرجع ذلك أساساً للتقدم الملموس فى صناعة البصريات وبالتالي المجهر .

يعتمد الفحص التفصيلى الدقيق لتركيب الخلايا على ثلاثة أسس رئيسية :

(١) التكبير Magnification ويعتبر وسيلة لزيادة الحجم الظاهرى للشئ المراد فحصه حتى يمكن رؤيته .

(٢) التمييز (الإظهار) Resolution وهو القدرة على فصل الأشياء المتقاربة عن بعضها البعض .

(٣) الاختلاف (التقابل) Contrast ويقصد به إمكانية تحديد جزء ما عن آخر .

على الرغم أن للمجهر الضوئى قوة تكبير عالية نسبياً تصل إلى نحو ٥٠٠ ضعف الحجم الطبيعى، إلا أن قوة التمييز له محدودة، وغير كافية لفحص بعض التراكيب الدقيقة بالخلية. ولتحقيق الاختلاف بالعينة التى تفحص مجهرياً يتم تثبيتها وصبغها، حيث تختلف قابلية أجزاء العينة للصبغات وبالتالي يمكن إكساب الأجزاء المختلفة للعينة ألواناً متباينة يسهل معها التفرقة فيما بينها .

ولقد فتح اختراع المجهر الإلكتروني أفقاً رحبة لدراسة الخلايا ، وكما يدل الاسم يستخدم فى هذه الحالة حزمة إلكترونية بدلاً من الضوء المستخدم مع المجهر الضوئى، تمر الإلكترونات خلال العينة ثم تسقط على لوحة فوتوغرافية وتعطى صورة للعينة - يصل التكبير بالمجهر الإلكتروني إلى نحو مليون ضعف الحجم الطبيعى .

يتناول الجزء التالى شرحاً مبسطاً لأساسيات الفحص المجهرى، ثم المجهر بأنواعه المختلفة البسيط والضوئى والإلكترونى، وكذلك فائدة وكيفية استخدام كل منها .

أساسيات الفحص المجهرى

البصريات Optics

يتركب الضوء من موجات كهرومغناطيسية Electromagnetic waves ذات أبعاد محددة تتحرك فى خط مستقيم وتنكسر على هيئة زاوية (شكل ١١-١). تختلف سرعة الضوء تبعاً للوسط الذى يتحرك خلاله، ويعبر معامل انكسار الوسط عن نسبة سرعة الضوء فى الفراغ إلى سرعته فى وسط معين، ومعامل الانكسار للهواء $1,00029$ ، بينما معامل الانكسار للزجاج (العدسات والشرائح وأغطية الشرائح) $1,5$ تقريباً، فإذا ما انتقل شعاع ضوئى من وسط معامل انكساره منخفض (مثل الهواء $1,00029$) إلى وسط له معامل انكسار أكبر (مثل الزجاج $1,5$) فإن سرعته تتغير مما يؤدي إلى تغير اتجاهه وبالتالي ينكسر (أو ينعكس) الشعاع الضوئى، كما هو موضح بالشكل (١١ - ١) :

يحتوى المجهر عادة على عدسات محدبة تستفيد من خصائص انعكاس الضوء والتي تؤدي إلى تجمع أو تشتت الأشعة الضوئية تبعاً لشكل العدسة، وتعتمد صورة أى جسم يعترض مسار الضوء أثناء انتقاله خلال عدسة محدبة على شكل العدسة والمسافة بين الجسم والعدسة، فإذا ما كانت المسافة بين جسم ما وعدسة محدبة أكبر من مسافة البعد البؤرى (F) فإن الصورة المتكونة تكون حقيقية، ومقلوبة، ومكبرة، تقع على الجانب المقابل من العدسة، وتعتبر الصورة حقيقية Real إذا أمكن استقبالها على شاشة أو حاجز من الورق يتخلل مسار الضوء عند النقطة التى تتكون عندها صورة الجسم، أما إذا كانت المسافة بين الجسم والعدسة المحدبة أصغر من مسافة البعد البؤرى فإن الصورة تكون تقديرية، ومعتدلة، ومكبرة، تتكون على نفس الجانب من العدسة الموجود به الجسم، ويقصد بالصورة التقديرية Virtual image تلك التى لا يمكن استقبالها على شاشة، وهى فى واقع الأمر غير موجودة فى الفضاء لكنها صورة يكونها العقل عقب تجمع الأشعة الضوئية المشتتة بواسطة قرنية وعدسة العين. وترجع أهمية العدسة المحدبة بالمجهر إلى قدرتها على تكوين الصورة على كلا جانبي العدسة وتكبيرها فى كلتا الحالتين .

بصريات المجهر الضوئى Optics of the light microscope

ينتج حقل الضوء الساطع بالمجهر كمنحرفة لأربع عدسات حيث يقوم المكثف بتجميع

REFRACTION OF LIGHT إنعكاس الضوء

زاوية السقوط i ANGLE OF INCIDENCE
زاوية الانعكاس r ANGLE OF REFRACTION

شعاع ساقط Incident ray
شعاع منعكس Reflected ray
شعاع منكسر Refracted ray

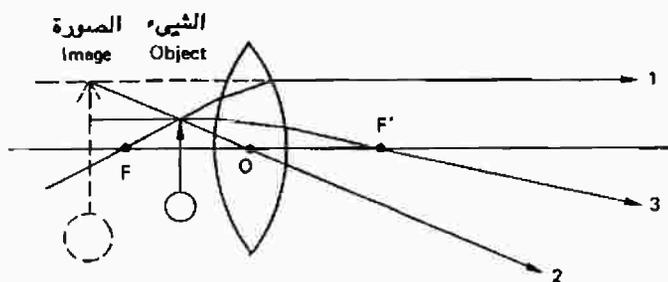
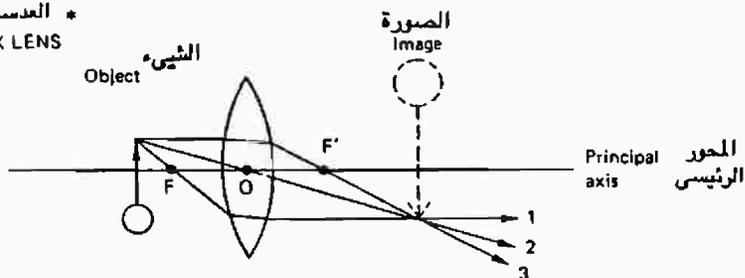
هواء AIR
زجاج GLASS

معامل الانكسار	مادة
WATER = 1.33	ماء
AIR = 1.00029	هواء
GLASS = 1.5	زجاج
PERMOUNT = 1.5	بيئة التحميل
IMMERSION OIL = 1.5	زيت الغمر

المنشور الثلاثي
PRISM DISPERSION



* العدسة المحدبة
CONVEX LENS



- * ١ - يظهر أى شعاع مار بنقطة البؤرة موازياً للمحور الرئيسى .
- ٢ - لا ينحرف أى شعاع يمر بالمركز البصرى للعدسة .
- ٣ - يمر أى شعاع موازٍ للمحور الرئيسى خلال نقطة البؤرة .

شكل (١-١١) : رسوم تخطيطية لهندسة البصريات (ويلي Willey ١٩٧١).

الضوء بإحكام على العينة فوق الشريحة، وتعطى العدسة الشيئية صورة مكبرة للعينة المراد فحصها (تتحكم جودة العينة فى نوعية الصورة النهائية التى ترى بالمجهر) وتقوم العدسة العينية بتكبير صورة العينة بشكلها النهائى الذى تنقله العين إلى المخ كما هو موضح بالشكل (٢٠١١) .

يوضع الجسم AB المطلوب فحصه وطوله L على بعد من الشيئية أكبر قليلاً من بعدها البؤرى f_{obj} فتتكون له صورة حقيقية مقلوبة مكبرة A_1B_1 وطولها L_1 ، تقع الصورة A_1B_1 على بعد من العينية أقل من بعدها البؤرى f_{α} فتتكون لها صورة أخرى تقديرية مكبرة A_2B_2 وطولها L_2 عند أصغر مدى للرؤية الواضحة، وتكون الصور النهائية مقلوبة بالنسبة للجسم الأسمى، أى أن العدسة العينية فى المجهر الضوئى تقوم بعمل المجهر البسيط بالنسبة للصورة الأولى A_1B_1 .

تحفر عادة البيانات عن الخصائص البصرية على جانب العدسة الشيئية، على سبيل المثال قد يكتب ما يلى :

Plan 40 / 0.65

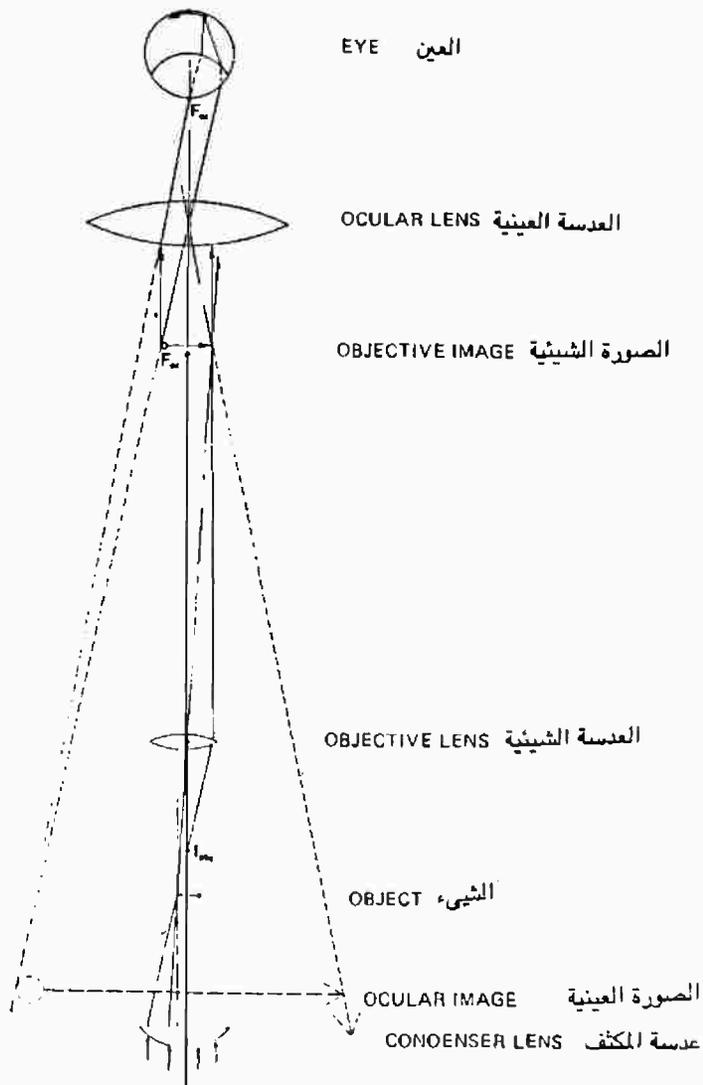
160 / 0.17

وتدل هذه الأرقام على :

المسافة العددية Numerical aperture / التكبير الأولى Initial magnification سمك غطاء الشريحة Coverslip thickness / طول أنبوبة المجهر Tube length .

ويعنى ذلك أن هذه العدسة الشيئية من النوع Planachromat تقوم بتكبير العينة ٤٠ مرة linear magnification ومسافتها العددية ٠,٦٥ ، وتصلح للمجهر الذى تبلغ طول الأنبوبة به ١٦٠ مم ومهيئة للاستخدام مع أغشية شرائح سمكها ٠,١٧ مم .

تسبب أى عيوب فى تصنيع العدسة فى عدم تكوين صورة دقيقة وخلل فى قوة تكبيرها، وتوجد عدسات شيئية أجرى بها درجة من تصحيح معين لمعالجة عيوب التصنيع .



شكل (١١-٢) : تكوين الصورة في المجهر الضوئي باستعمال نظام العدسة المفردة
(ويلي Willey ١٩٧١) .

Objectives خصائص العدسات الشيئية

(١) التكبير Magnification

تراوح قوة تكبير العدسات الشيئية ما بين $3.2 X$ حتى $100 X$ ولا تختص بالتكبيرات الأقل من $3.2 X$ بالمجهر العادى بل يقتصر استخدامها على المجهر مزدوج العدسة العينية، أما التكبيرات الأعلى من $100 X$ فقليلة ولها استخدامات محدودة مثل $120 X$ والقوة الأكثر استخداماً فى العدسات الشيئية هي $10 X$.

(٢) مسافة الشغل Working distance

هى المسافة بين غطاء الشريحة والعدسة الشيئية، وتكون هذه المسافة 7 مم فى حالة $10 X$ ، 6 ، 3 مم فى حالة $43 X$ و 3 ، 13 ، 0 مم فى حالة $95 X$. نستخلص من الأرقام المذكورة ضرورة الاحتراس عند استخدام العدسات ذات القوى الكبرى حتى لا تتعرض الشريحة للكسر لصغر المسافة بينها وبين الشيئية .

(٣) البعد البؤرى Focal length

تتضمن العدسات الشيئية ٢-٩ عدسات وكلما كثر العدد ، كان البعد البؤرى للشيئية معقداً، ويحفر عادة على الشيئية رقم معادل الرؤيا Equivalent focus فالشيئية التى لها رقم معادل للبعد البؤرى (E.F.) يساوى 16 مم تعطى صورة مساوية فى الحجم للصورة التى تعطىها عدسة بسيطة بعدها البؤرى 16 مم وكلما كبر التكبير ، صغر البعد البؤرى ويراعى عدم الخلط بين العدد الدال على البعد البؤرى ورقم مسافة الشغل الدال على المسافة بين الشيئية والغطاء .

كما سبق إذا ذكر أن قوة الشيئية 4 مم فهذا يعنى أن قوة تكبيرها $40 X$ تقريباً، وعلى وجه التحديد $43 X$ فقد درجت المصانع قديماً على أن تكتب رقم التكبير مقرباً، وحالياً يكتب الرقم الصحيح الدال على قوة التكبير حتى يسهل على الباحث حساب مقدار التكبير النهائى للعينة (قوة تكبير الشيئية \times قوة تكبير العينية) . كانت قوة التكبير تكتب قديماً 16-8-4-2mm أما الآن فنكتب $3 X - 5 - 10 - 20 - 40 - 60 - 70 - 90 - 95 - 100 - 120$.

(٤) عمق الرؤيا Depth of focus

لكل قطاع فى عينة نباتية مهما كان رقيقاً سمكاً محدداً وعند استعمال الشيئية الصغرى 10 X نجد أنه عند ضبط الرؤيا على الحافة العلوية لجدار خلية ما تظهر غالباً الحافة السفلية من قاعدة الجدار، أما إذا استعملت شيئية قوة 45 X وضبطت الرؤيا على الحافة السفلية للخلية فإن جدارها العلوى لا يرى .

يعرف هذا الامتداد الرأسى لمنطقة الرؤيا الواضحة بعمق الرؤيا Depth of focus وهى تقل كلما كبرت قوة تكبير الشيئية ولو أن قوة التكبير ليست هى العامل الوحيد لذلك .

(٥) قوة التمييز Resolving power

وهى خاصية معينة فى العدسة يمكن بها التمييز بين الأجسام بحيث تظهر مستقلة مهما كانت المسافة بينها متناهية فى الصغر كما هو الحال مع Chromomeres علي الكروموسومات Chromosomes ولو فرضنا أن هناك نجمين متجاورين فإن زاوية الرؤيا تصغر كلما بعد الإنسان عنها، فإذا نظر إليهما شخص ضعيف فى قدرة التمييز فإنه يراهما كنجم واحد ، بينما إذا نظر إليهما شخص آخر لديه قوة تمييز عالية فإنه يراهما اثنين لواحداً، فإذا قارنا ذلك بما يحدث بالمجهر فإن العدسة الضعيفة تظهر الكروموسوم الرفيع كخيوط واحد، بينما تظهر العدسات ذات القوى الكبيرة والتمييز الجيد أن الكروموسوم خيطان ملتفان على بعضهما Chromatids وذلك إذا فحص الكروموسوم أثناء عملية الانقسام .

وعلى ذلك ليس المهم أن يرى الشخص الأجزاء الصغيرة، ولكن الأهم من ذلك أصغر مسافة بين شيئين يمكن للعدسة أن تميز بينهما وتظهر كل منهما مستقلاً عن الآخر .

يعبر عن هذه القوة بمصطلح المسافة العددية (N.A.) Numerical aperture وهو العدد الدال على قوة التمييز، وكثيراً ما يكتب هذا العدد على الشيئيات، وهو صغير إذا كانت العدسة صغيرة القوة (0.25 إذا كانت قوة العدسة 10 X) ويكبر كلما كبرت قوة تكبير العدسة فيصل إلى 1.4 للعدسة التى قوتها 90 X وأعلى رقم فى العدسات الجافة هو 0.95 حيث توجد مسافة هوائية بين العدسة والغطاء أما فى العدسات الزيتية فيرتفع الرقم إلى 1.4 .

(٦) التوافق Synchronization or Parfocalization

يقصد به أنه إذا ضبطت الرؤية بواسطة العدسة الصغرى $10 \times$ فإنه عند استعمال الشيئية المتوسطة أو الكبرى عندما تأخذ مكانها يجب أن تشاهد الصورة واضحة بمجرد التغيير، وعند ذلك يسهل ضبط معالم الصورة باستعمال الضابط الدقيق، أما إذا لم تشاهد الصورة واضحة وكانت الشيئيات غير مجهزة بالدقة المطلوبة وتحتاج إلى استخدام الضابط التقريبي فإن ذلك يعرض العدسات للتلف خاصة للمبتدئ نتيجة لكثرة خدش أو تكسر الشرائح .

(٧) أنواع الشيئيات Objectives

توجد أنواع مختلفة من الشيئيات مثل :

(١) Achromatic وهي أرخص أنواع الشيئيات ثمنًا وتستعمل في الأعمال الروتينية كالتدريس، ومن خصائصها تصحيح أخطاء انجاء لونين من ألوان الطيف الناشئ عن تحليل الضوء المخترق لحواف التحضير أثناء فحصه، وكذلك لون من الألوان التي تخترق مركز التحضير .

(ب) Apochromatic وهي تصحح أخطاء ثلاثة ألوان حافية Chromatic aberrations وكذلك لونين مركزين Spherical correction وبذلك تظهر الصورة واضحة لامعة بألوانها الحقيقية ودون تغيير في شكلها، وتعطى نتائج ممتازة في التصوير الفوتوغرافي. لكل هذه المميزات فهي غالية الثمن نتيجة لتركيبها المعقد وقلة العدسات من النوع Fluorite .

(ج) Fluorite وتسمى كذلك نسبة إلى معدن الفلوريت الذي يستعمل ملتصقًا مع نوع خاص من زجاج البصريات، وهذه العدسات من خصائصها أنها ذات قدرة على تصحيح الألوان تفوق النوع Achromatic لذلك تفضل في التصوير الفوتوغرافي ولا يوجد منها سوى القوي التي تزيد عن $40 \times$.

خصائص العدسات العينية Oculars (Eyepieces)

يلزم لمن يستعمل المجهر الإلمام بخصائص العينيات حتى يستعمل منها ما يلائم

الأغراض المختلفة للفحص، ويختار من العينات ما يوافق الشبثيات المختلفة، لكل عدسة عينية بعد بؤرى خاص، ولكن المتبع حالياً هو كتابة قوة التكبير عليها والتي تتراوح ما بين $4-30 \times$.

يمكن حساب قوة العينية التي يلزم استعمالها مع شبثية معلومة القوة، وتعرف المسافة العددية لها N.A. من المعادلة التالية :

$$N.A. \times 1000 \text{ (للشبثية)}$$

قوة تكبير الشبثية

إذا فرض أن شبثية قوة تكبيرها $43 \times$ و N.A. $0,65$ تكون قوة العينية الواجب استعمالها هو :

$$10 = \frac{0,65 \times 1000}{43} \text{ تقريباً}$$

وعلى ذلك فإن استعمال الشبثية قوة $43 \times$ واستعمال عينية أعلى من $15 \times$ يصبح عديم القيمة إذا تطلب الأمر زيادة قدرة التمييز Resolving power لأنها وصلت إلى حدها الأقصى، ولكنها تفيد فى العد أو الرسم .

ويقيد استعمال المعادلة السابقة عند شراء العدسات لعمل التوافق اللازمة بين قوى العينات والشبثيات المطلوب شراؤها .

وتوجد أنواع عديدة للعينيات أهمها ما يلى :

(i) Huygenian :

وتتركب من عدستين، وهى معدة للاستعمال مع شبثيات من النوع Achromatic وتعطى صوراً ضعيفة مع الشبثيات من النوع Apochromatic .

(ب) Compensating :

وهى معدة بحيث تعوض أى نقص فى تركيب الشبثيات من النوع Apochromatic

ولذلك تستعمل كل منهما مع الأخرى بحيث تكونا من نفس الماركة ، كما يمكن استعمالها مع شبيثات من النوع Achromatic أو Fluorite أعلى من قوة 40 X .

وتوجد أنواع أخرى أقل أهمية مثل النوع Flat field ومنها صنفين تجاريين : Hyperplane و Planescopic ويؤخذ على هذا النوع أن العين يجب أن تظل في وضع ثابت لا تتحول عنه لأن أى حركة من الرأس تضيع جزءاً من حقل المجهر (جزءاً من الصورة)، كما أن العين تجهد إذا استعملت لمدة طويلة .

ويوجد أيضاً النوع Wide field الذى يعطى حقلاً متسعاً ولكن لهذا النوع نفس مشاكل النوع Flat field .

الإضاءة Illumination

تستعمل المرآة كمصدر للإضاءة وهى ذات وجه مسطح وآخر مقعر، كما يوجد فى المجهر المستخدم فى البحوث مكثف Condenser ويتركب من عدستين أو أكثر . وأنسب الأنواع ذلك الذى يتركب من عدستين مثل النوع Abbe وهذا المكثف غير مهيب لتصحیح الأخطاء الناتجة عن تحليل الضوء (الألوان) أو الميل Curvature الذى قد يوجد فى حقل المجهر، لذلك يستعمل فى الأعمال الروتينية مثل دراسة الطلبة أو البحوث الأولية، وقيمة N.A. لهذا المكثف 1.20 أو 1.25 والعدسة العليا منه يمكن حلها والاكتفاء بالعدسة السفلية وبالتالي تصوير N.A. لها 0.30 وتستعمل فى هذه الحالة مع القوة 10 X (N.A. لها ٢,٥ أو أقل) . فى المكثف Leitz تحمل العدسة العلوية عل حامل منفرد وبذلك يمكن تحريكها جانباً حتى يمكن استعمال العدسة السفلية بمفردها إن تطلب الأمر ذلك، وبالتالي يمكن ملء حقل العدسات الضعيفة بالضوء .

فى المكثف Abbe ذى الثلاث عدسات تكون المسافة العددية N.A. 1.4 ويستعمل مع الشبيثات التى N.A. لها 1.25 ويعد هذا المكثف أحياناً بحيث يمكن تحريك وإبعاد العدسة أو الاثنتين العلويتين ، وبذلك تصوير N.A. 0.70 أو 0.40 بإبعاد عدسة فى الحالة الأولى واثنين فى الحالة الثانية .

توجد أنواع أخرى من المكثفات أكثر دقة ومعدة بحيث تصحح أخطاء الألوان أو الميل فى حقل المجهر نتيجة النقص فى التركيب وبذلك تظهر الصورة على هيئة القبة، أهمها

النوع Aplanatic والنوع Achromatic ويتركب من ثلاث عدسات منفصلة تتراوح N.A. لها ما بين ٠,٢٠ إلى ١,٣ أو ١,٤ .

أعلى درجة للمسافة العددية N.A. يمكن الحصول عليها بمكثف وشيئية يفصلهما عن الشريحة فراغ هوائي تساوى ١,٠٥ ، لذلك إذا استعملت شيئية N.A. لها ١,٣٠ فإنه يجب استعمال زيت السيدر ليصل بين الشريحة والشيئية وكذلك بين المكثف والشريحة ليتمكن الحصول على الحد الأقصى لقوة التمييز Resolving power .

أحياناً بدلاً من أن تخترق الأشعة القطاع من أسفل تسلط الأشعة الضوئية على حواف العينة وبذلك تصل الإضاءة إلى العين بواسطة الانعكاس من سطح العينة ، وتعرف هذه الإضاءة باسم Dark - field illumination وبذلك تظهر العينة كأن الإضاءة صادرة منها في وسط أسود، وأبسط وسيلة لذلك استخدام قرص معدني على شكل عجلة يوضع تحت المكثف ويحجب وسطه وسط الحزمة الضوئية المنعكسة من المرآة والمتجهة إلى إضاءة العينة مخترقة المكثف ، وبذلك تضاء العينة من الأشعة الحافية المائلة للحزمة الضوئية المنعكسة من المرآة .

توجد مكثفات معدة خصيصاً لهذا الغرض ، وتستعمل هذه الطريقة من الإضاءة في دراسة الطحالب البسيطة والفطريات ، كما تستعمل في فحص القطاعات غير المصبوغة ويمكن رؤية حركة السيتوبلازم في أوراق الإلوديا ونوايات الإسبيروچيرا بوضوح تام بهذه الطريقة .

التكبير Magnification

يشار عادة لقوة التكبير على الرسم بوضع خط أسفله يعبر عن مقياس الرسم Scale line ويتم تحديد مقياس الرسم بقياس العينة بالعينية الميكرومترية Ocular micrometer أو المائدة المتحركة ذات الورنية Mechanical stage vernier ، وهي مقياس صغير منزلق على أداة مدرجة، وأقل قياس يقدره هو ٠,١ مم .

ولا شك أن تقدير قوة التكبير من خلال خط يعبر عن مقياس الرسم أدق بكثير من حساب التكبير من المعادلة التقليدية التالية :

$$\text{قوة التكبير} = \text{قوة تكبير العينة} \times \text{قوة تكبير الشيئية}$$

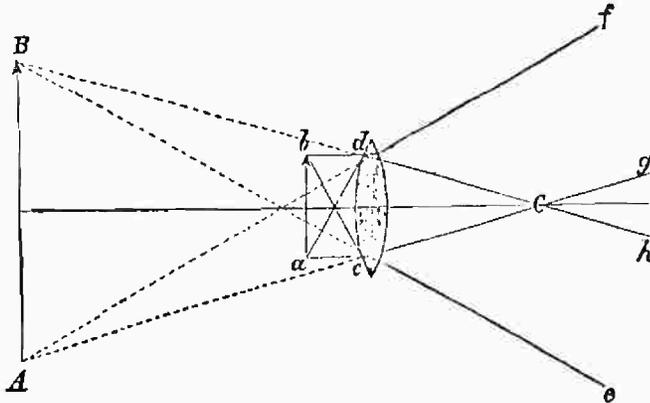
أنواع المجاهر

Microscope types

كثيراً من الكائنات الحية من الدقة بحيث يصعب مشاهدتها بالعين المجردة ، كما أن كثيراً من مكونات الكائن الحي يستحيل رؤيتها هي الأخرى بالعين المجردة، من هنا نشأت الحاجة إلى البحث عن وسيلة للتكبير حتى يمكن رؤية ودراسة الكائنات الحية ومكوناتها الدقيقة - وهذه الوسيلة هي المجهر (الميكروسكوب) .

أولاً : المجهر البسيط Simple microscope

إذا وضع شيئاً ما بين عدسة محدبة الوجهين وبؤرتها تتكون له صورة مكبرة في موضع بعيداً عن العدسة خلف هذا الشيء، في الشكل (١١ - ٣) عدسة محدبة الوجهين، و ab الشيء، و ac و bd شعاعان موازيان للمحور البصري، تنكسر الأشعة بواسطة العدسة وتتجمع في نقطة البؤرة c وتنحرف بعد ذلك إلى g و h حيث تلتقى بشبكية العين، وتنكسر الأشعة ad و bc جهة e و f ثم تلتقى هي الأخرى بشبكية العين، تشاهد العين الصورة المكبرة AB حيث تتكون الخطوط كامتداد للأشعة المنكسرة ($fA - gA$) و ($eB - hB$) .

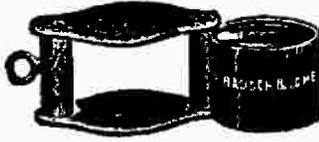


Formation of Image by a Simple Lens.

شكل (١١-٣) : كيفية تكون الصورة المكبرة في المجهر البسيط

(هانوسيك Hanausek ١٩٠٧) .

تعرف العدسة، أو مجموعة العدسات، التي تعطي هذا التكبير بالمجهر البسيط، وتوضع العدسات عادة في حامل معدني، أو مطاط قوي، وترتب بطريقة تسمح باستخدام أكثر من عدسة معاً، قد ترتب العدسات على محور متحرك داخل غطاء، وتفتح عند الاستخدام على شكل عدسة جيب Pocket lens (شكل ١١-٤) .



شكل (١١-٤) : عدسة جيب

(هانوسيك)

Hanausek

(١٩٠٧).

ويعتبر مجهر الفحص الدقيق Dissecting

microscope (شكل ١١-٥) من أكثر الأشكال

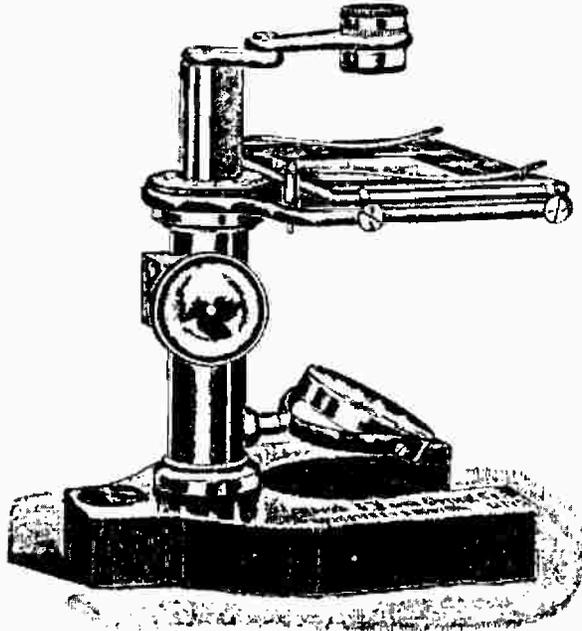
المتداولة والمقبولة حيث تحمل العدسة على ذراع

يتحرك رأسياً على ترس للحصول على صورة دقيقة

بينما يوضع الشيء المطلوب فحصه على لوحة

زجاجية على مائدة وقد يزود بمراة لتعكس الضوء

على الشيء المطلوب فحصه .



شكل (١١-٥) : مجهر الفحص الدقيق Dissecting microscope

(هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

ثانياً : المجهر المركب (الضوئي) Compound microscope

المجهر المركب (أو المجهر الضوئي Light microscope) من أهم الأجهزة العملية التي تتطلبها دراسة العلوم البيولوجية، وتتلخص الطريقة التي يعمل بها المجهر الضوئي في تخلل العينة المطلوب فحصها بحزمة من الضوء ثم مرور هذه الحزمة في نظام من العدسات المكبرة تعمل على تكبير وإيضاح أبعاد العينة المراد دراستها .

تركيب المجهر الضوئي

يتركب المجهر الضوئي (شكل ١١-٦) من الأجزاء التالية، ويجدر الإشارة إلى أن هناك عديداً من الأشكال التي يوجد عليها المجهر، ويرجع ذلك إلى التطور المستمر في صناعة المجهر، وبالتالي قد توجد بعض أجزاء المجهر التالية أو قد يوجد بديل آخر لها أكثر تطوراً.

(١) أنبوبة المجهر Body tube : وهي الجزء الرئيسي بالمجهر، يبلغ طولها ١٦ سم، ذات شكل أسطواني تحمل في طرفها العلوى العدسة العينية Ocular lens وهي واحدة، أو قد تكون اثنتين، ويوجد في الطرف السفلى لأنبوبة المجهر القطعة الأنفية Nose piece تحمل ١-٤ عدسات شئية Objective lenses مختلفة القوى، ويوجد ترس على جانب الأنبوبة يساعدها على الحركة رأسياً .

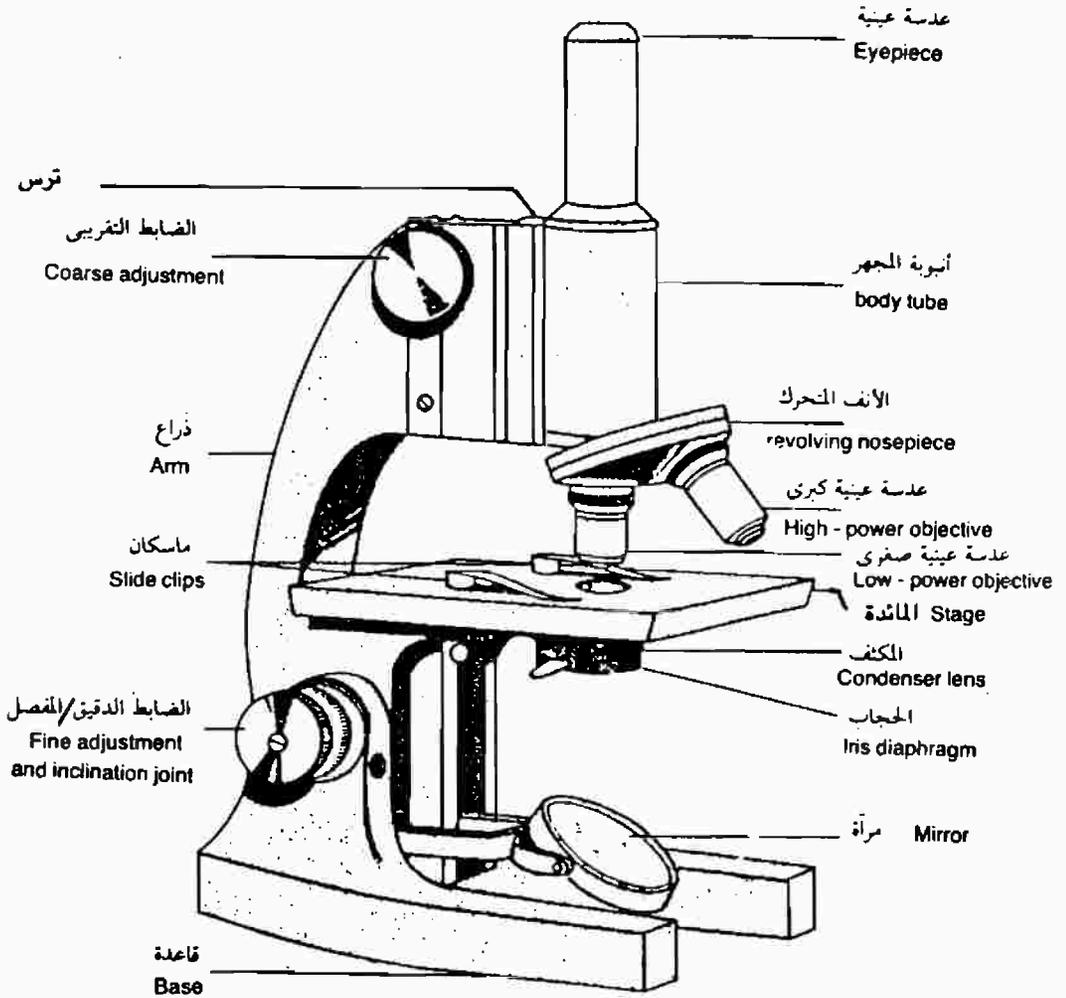
(٢) الذراع Arm : وهي الجزء الذي يحمل منه المجهر عند التداول .

(٣) القائم Standard : جزء أسطواني يقع بين المائدة والقدم .

(٤) المفصل Joint : ويستخدم في إمالة المجهر لتيسير استعماله ويقع بين القائم والذراع .

(٥) القدم Foot : ويمثل قاعدة ارتكاز المجهر (لذلك يصنع من معدن ثقيل الوزن)، ويكون على شكل حدوة الحصان أو حرف Y .

(٦) المائدة Stage : جزء مستوٍ على هيئة رف، قد تكون مربعة أو مستديرة حيث توضع الشريحة وعليها العينة المطلوب فحصها، ويوجد في منتصف المائدة ثقب مستدير يسمح بمرور حزمة الضوء خلال العينة المطلوب فحصها، والمائدة مزودة بماسكين Clips صغيرين للتحكم في وضع الشريحة عند الرغبة في إمالة المجهر، وقد يوجد ماسك واحد كبير متحرك .



شكل (١١-٦) : المجهر الضوئي (باعثن والغزاوي ١٩٨٥).

(٧) ضابط تقريبي Coarse adjustment : ويستخدم فى تحريك أنبوبة المجهر رأسياً بأبعاد ملموسة للحصول على صورة للعينة المطلوب فحصها، ويستخدم عادة مع العدسات الشيئية ذات القوة الصغيرة .

(٨) ضابط دقيق Fine adjustment : ويساعد فى تحريك أنبوبة المجهر رأسياً لمسافات صغيرة جداً، ويستخدم مع العدسات الشيئية ذات القوة الكبيرة للحصول على صورة للعينة دقيقة واضحة .

(٩) المرآة Mirror : ذات سطحين أحدهما مستوى والآخر مقعر لجمع وتوجيه الأشعة الضوئية خلال العينة أثناء فحصها، وقد يكون الضوء طبيعياً باستعمال ضوء الشمس غير المباشر أو صناعياً بواسطة لمبة كهربائية، ويستغنى عن المرآة فى حالة وجود لمبة كهربائية مثبتة أسفل مائدة المجهر وهو الأكثر شيوعاً .

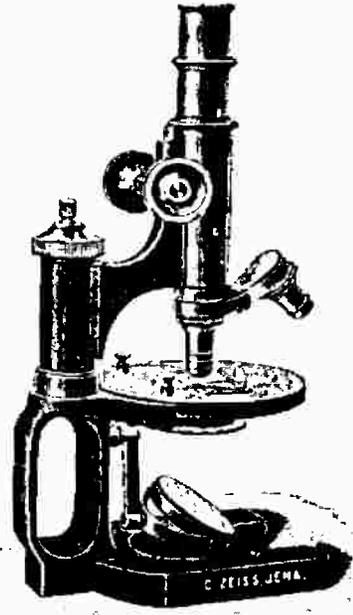
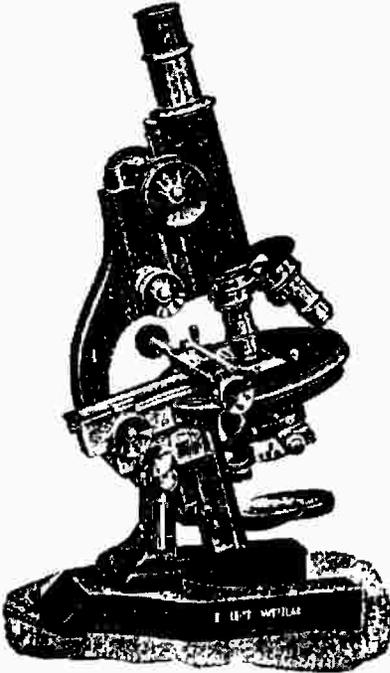
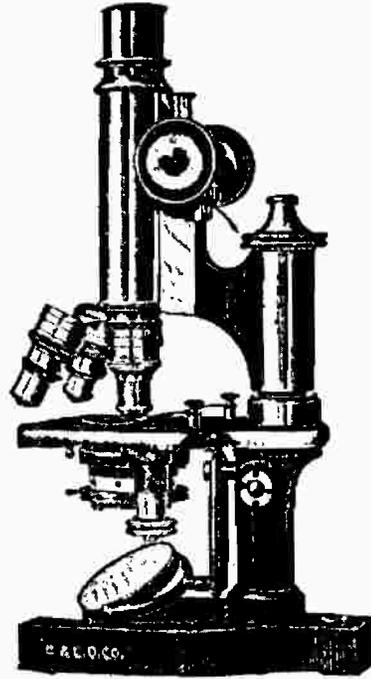
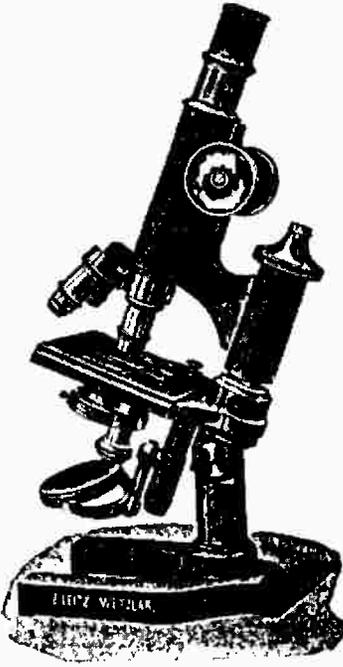
(١٠) المكثف Condenser : جهاز مثبت أسفل المائدة يقوم بتجميع الأشعة الضوئية التى تتخلل العينة وتكثيفها للحصول على أفضل إضاءة للفحص ؛ خاصة عند استخدام القوى الكبرى .

(١١) الحجاب Diaphragm : يثبت أسفل المكثف للمساعدة فى الحصول على أفضل الظروف الضوئية للفحص .

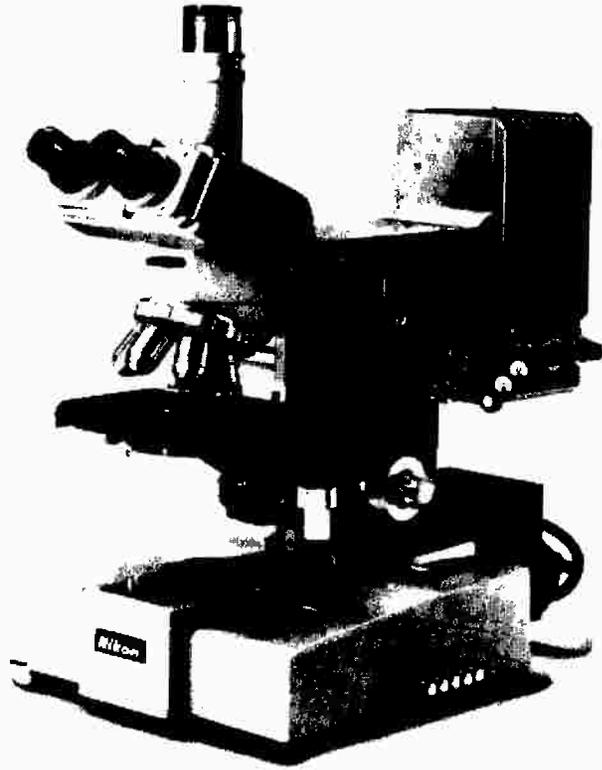
توضح النماذج (شكل ٧-١١ و ١١ - ٨) طرزاً مختلفة للمجهر فى بدايات صناعته وكذلك الطرز الحديثة منه حيث تطورت إمكانيات الفحص به بصورة مذهلة ، وتعددت أشكاله وتقدمت قدراته مما ساعد على قطع أشواط بعيدة فى تعرف التركيب التشريحي للأعضاء المختلفة للنبات وكذلك تسجيل ما يتم فحصه بكاميرات التصوير المجهرى المتقدمة الصنع .

استعمال المجهر الضوئى

- (١) تعامل مع المجهر بعناية ورقة واحذر القوة والعنف عند استخدامه .
- (٢) تأكد من نظافة العدسات العينية والشيئية وكذلك المرآة ولا تلمسها بأصابعك بطريقة خاطئة حتى لا تترك عليها أية آثار تعيق الرؤية الواضحة .



شكل (١١-٧) : بعض طرز المجهر في بدايات صناعته توضح الشكل الذي كانت عليه الموديلات المختلفة التي سادت آنذاك (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).



شكل (١١-٨) : أحد الطرز الحديثة للمجهر توضح تطور تقنية صناعته والكاميرا الملحقة به للتصوير المجهرى.

- (٣) يمكن إزالة قطرات الماء أو البصمات من على العدسات أو المرآة باستخدام قطعة من قماش نظيفة أو الورق الخاص بالتنظيف .
- (٤) يراعى أن تكون الإضاءة على أكمل وجه أثناء فحص العينة ، سواء كان مصدر الضوء مستقلاً أو مثبتاً بالمجهر - ويساعد المكثف والحجاب في تنظيم الإضاءة حتى تكون الصورة تامة الوضوح .
- (٥) عند فحص شريحة مجهزة ، تستخدم القوة الشثية الصغرى (أقل من 10 X) أولاً وتضبط الصورة في هذه الحالة بواسطة الضابط التقريبي ، وإن تطلب الأمر تستخدم بعد ذلك القوة الشثية الكبرى (أكبر من 10 X) مع استخدام الضابط الدقيق وفي هذه الحالة تأكد من وضع غطاء الشريحة فوق العينة المحضرة في المعمل .
- (٦) احذر جفاف التحضير أثناء الفحص .
- (٧) تأكد من فتح عينيك جيداً خلال الرؤية في العدستين العينيتين أثناء الفحص .
- (٨) بعد تمام الفحص ترفع الأنبوبة بعيداً عن المائدة ، ثم تسحب الشريحة وينظف المجهر جيداً .

ملحقات المجهر Microscopic accessories

يزود المجهر عادة بمجموعة من إضافات اختيارية لتعظيم قدر الاستفادة منه ، من هذه الإضافات ما يلي :

(١) الميكروميتر Micrometer

يستخدم الميكروميتر لقياس أبعاد معينة في عينة مجهرية ، ويتكون من قطعتين :

(١) القطعة العينية للميكروميتر Eyepiece micrometer

تتركب من تدريج محمل على قطعة عينية ، يمكن عند وضعها برفقة العدسة العينية مشاهدة أقسام هذا التدريج ، كما يمكن في الحال مضاهاة أي عينة مجهرية أو جزء منها بهذا التدريج ، ولما كان ما يشاهد خلال المجهر لا يمثل الحجم الطبيعي للعينة ، وإنما العينة مكبرة من خلال العدستين الشثية ثم العينية ، فإن القراءة المباشرة للقطعة العينية للميكروميتر

لا تعطى الأبعاد الحقيقية للعينة التي يجرى قياسها، لذلك لابد من تحديد عامل ثابت لكل عدسة شبيثة من عدسات المجهر، ولإجراء ذلك تتم معايرة باستخدام قطعة أخرى هي الشريحة الميكرومترية Stage micrometer .

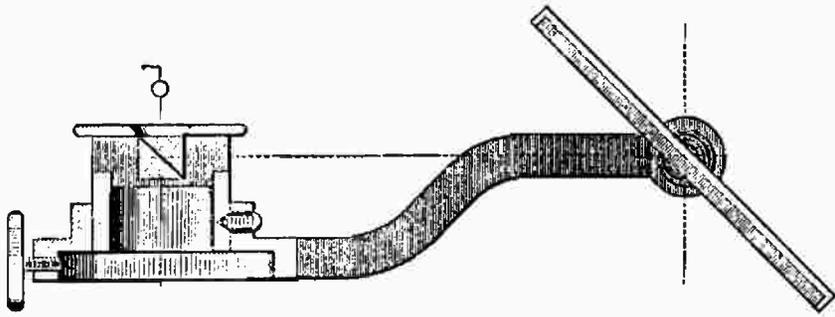
(ب) الشريحة الميكرومترية Stage micrometer

تجرى معايرة Calibration القطعة العينية للميكرومتر باستخدام شريحة ميكرومترية ذات مقياس مدرج طوله عادة ١ مم مقسم إلى ١٠٠ قسم (القسم = ١٠ ميكرون) ومن خلال الفحص المجهرى يقدر عدد الأقسام بالقطعة العينية للميكرومتر ، التي تقابل عددًا محددًا من أقسام الشريحة الميكرومترية ، وبالتالي يتم تحديد القياس الحقيقي لكل قسم بالقطعة العينية، وتكرر العملية مع كل عدسة شبيثة عند استخدامها، وبذلك يمكن حساب أبعاد أى جزء بالعينة تحت الدراسة ، من خلال تقدير عدد الأقسام المساوية لها بالقطعة العينية، وحساب الأبعاد الفعلية المطلوب تحديدها .

(٢) كاميرا لوسيدا Camera lucida

كاميرا لوسيدا جهاز على درجة كبيرة من الأهمية يساعد فى رسم العينة المجهرية، حيث يجرى بطريقة معينة نقل صورة العينة المجهرية إلى ورق الرسم، وفى حالات أخرى تعكس صورة سن القلم لتظهر فوق الصورة التى تشاهد خلال المجهر .

يجرى تثبيت حلقة الجهاز (شكل ١١-٩) بالطرف العلوى لأنبوبة المجهر بواسطة مقبض يرمى إلى اليسار وبمساعدة مسارين قلاووظ، يشتمل المكعب الزجاجى على منشورين ملتحمين معًا، يطلّى السطحان القطريان اللتحمان معًا بالفضة فيما عدا موضع صغير بالمنتصف، وتوجد مرآة تتحرك مفصليًا على ذراع بحيث تبعد النقطة الوسطية للمرآة أفقيًا عن منتصف المجهر بمسافة ٧٠ مم، يضبط المكعب الزجاجى بحيث تمر الصورة التى تظهر من خلال العدسة العينية دون أى عوائق خلال الموضع الصغير المجهز خلال السطح الفضى بحيث ترى بالعين فى الوقت الذى تنعكس صورة قلم الرسم بواسطة المرآة من خلال ثقب فى إطار نحاسى يحيط بالسطح الفضى ، والذى تنعكس بدورها وترى بالعين، تتحرك المرآة بصورة تسمح بنقل الرسم فى الموضع المطلوب على الورقة، ويزود الجهاز بقطعتين من الزجاج المدخن المتحرك توضعان بين المرآة والمكعب الزجاجى للتحكم فى كمية الإضاءة اللازمة لوضوح الصورة .



Abbe Camera Lucida. (ZEISS.)

شكل (١١-٩) : رسم تخطيطي للكاميرا لوسيدا (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

- بالإضافة إلى ما سبق قد يزود المجهر بمكثف Condenser - حجاب Diaphragm -
- جهاز ضوء مستقطب Polarization apparatus - مائدة متحركة Mechanical stage -
- آلة تصوير Camera - شاشة عرض Monitor - عدسة عينية إضافية تمكن شخصان من المشاهدة في ذات الوقت .

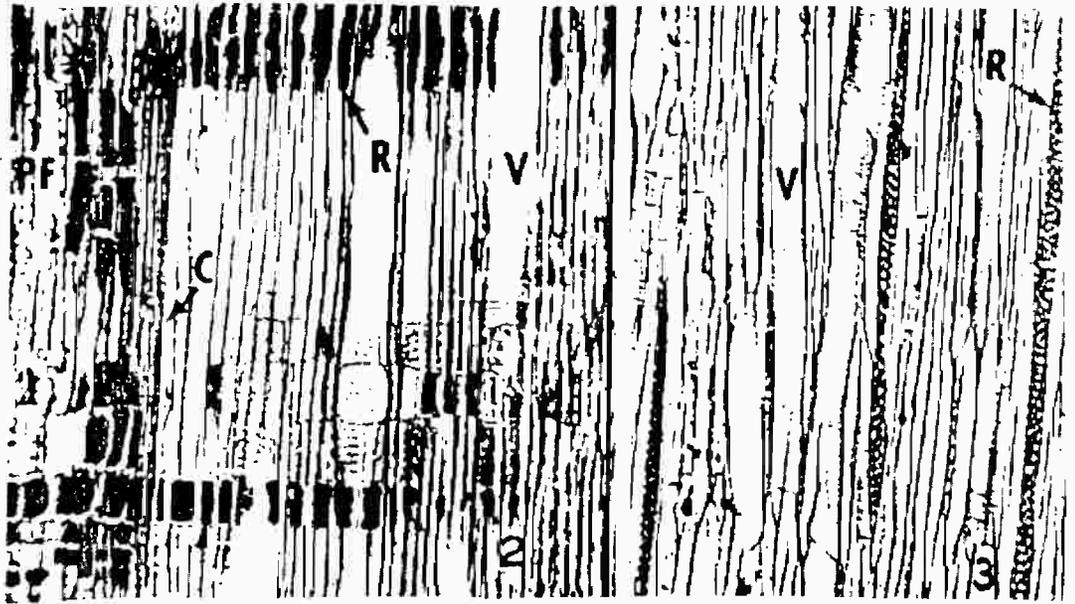
وتبارى مصانع البصريات في تقديم كل حديث من الملحقات التي تضاف إلى المجهر والتي تساعد الباحثون في الحصول على أدق وأفضل النتائج .

فحص الشرائح بالمجهر الضوئي Slide analysis by light microscope

لا يقف الأمر عند تحضير شرائح عالية الجودة، بل يلزم فحصها، وإمكانية تعرف أنواع الخلايا في الأنسجة المختلفة، وكذلك تحديد مكوناتها، وهذا يتطلب بطبيعة الحال دراسة علم تشريح النبات حتى يتمكن الدارس من قراءة الشريحة بدقة . بداية تفحص الشريحة بصورة إجمالية حتى يمكن تعرف الأنسجة المختلفة بالعينة، واستجابة الأجزاء المختلفة منها للصبغات المستخدمة، وذلك يتطلب خبرة ومهارة خاصة، وعموماً يمكن اتباع ما يلي :

- (١) تحدد المواضيع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا في كل نوع من الأنسجة، كما يلزم الإلمام بالوظائف العامة للأعضاء تحت الدراسة، ويفضل الرجوع إلى عينات مرجعية إذا كانت متاحة بالمعمل .

- (٢) تلاحظ الاستجابة النوعية لكل طرز من الخلايا للصبغات المستخدمة، فعادة ما يتطلب الأمر تحديد المعلومات التي تمدنا بها كل صبغة من مجموعة الصبغات المستخدمة، والتي قد تفيد كذلك في تحديد وظيفة هذه الخلايا .
- (٣) يحدد الارتباط بين كل من تركيب والاستجابة للصبغات وموضع كل من الخلايا الرئيسية مع وظيفة العضو الجارى دراسته .
- (٤) يراعى ما قد يوجد من اختلاف فى الاستجابة للصبغة باختلاف خطوات العمل، ومن خلال ذلك يمكن تحديد أفضل السبل الواجب اتباعها للحصول على النتائج المرجوة .
- (٥) يلزم أن يكون الدارس على وعى بكل دخيل على التحضير مثل فقاعات الهواء، وذرات التراب، وترسيبات الصبغة، وقطرات الماء، وغير ذلك - ويجب أن يفتنم الدارس هذه اللحظة للوقوف على ما قد يراه من أخطاء وعيوب فى التحضير ليتجنبه فى أبحاثه التالية، وتبدو أهمية ذلك إذا ما تناول البحث عينات على درجة كبيرة من الأهمية أو ربما تكون عينات لأنسجة لا بديل لها .
- توضح الأشكال (١١ - ١٠) و (١١ - ١١) و (١١ - ١٢) و (١١ - ١٣) و (١١ - ١٤) قطاعات فى ساق وجذر بعض نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين كما تظهر أثناء الفحص بالمجهر . لاحظ المواضع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة ، واختلاف استجابة كل منها للصبغات المستخدمة .



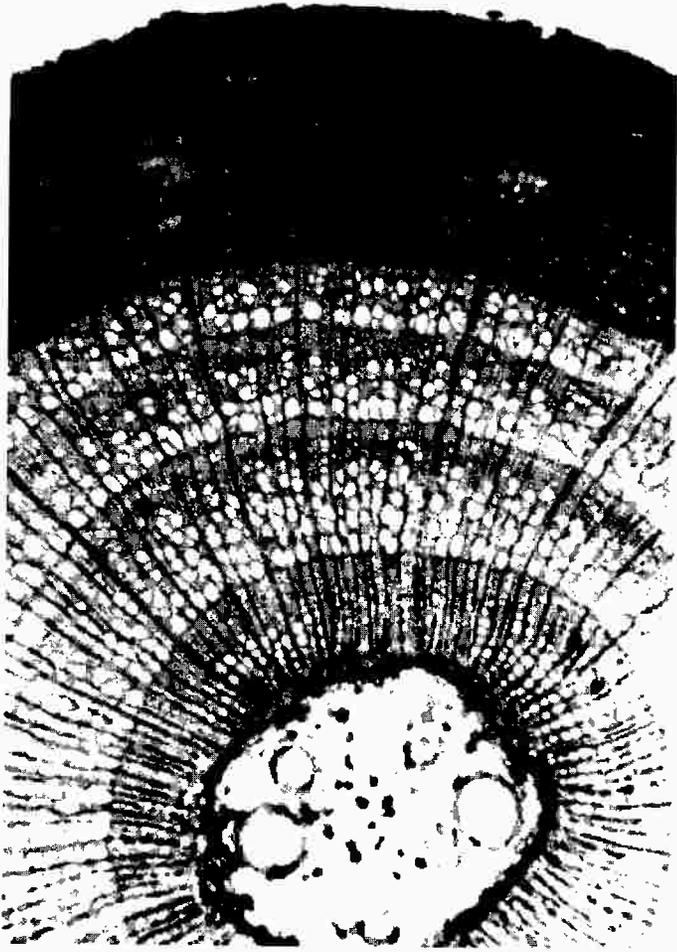
شكل (١١-١٠) : قطاعات في اتجاهات مختلفة لساق نبات التليا باستخدام F.A.A.

وسفرانين - أخضر سريع .

(١) قطاع عرضي 40 X . (2) قطاع قطري 200 X . (3) قطاع مماسي 200 X .

(C) كامبيوم - (CX) قشرة - (P) نخاع - (PF) ألياف لحاء - (PR) بريدرم -

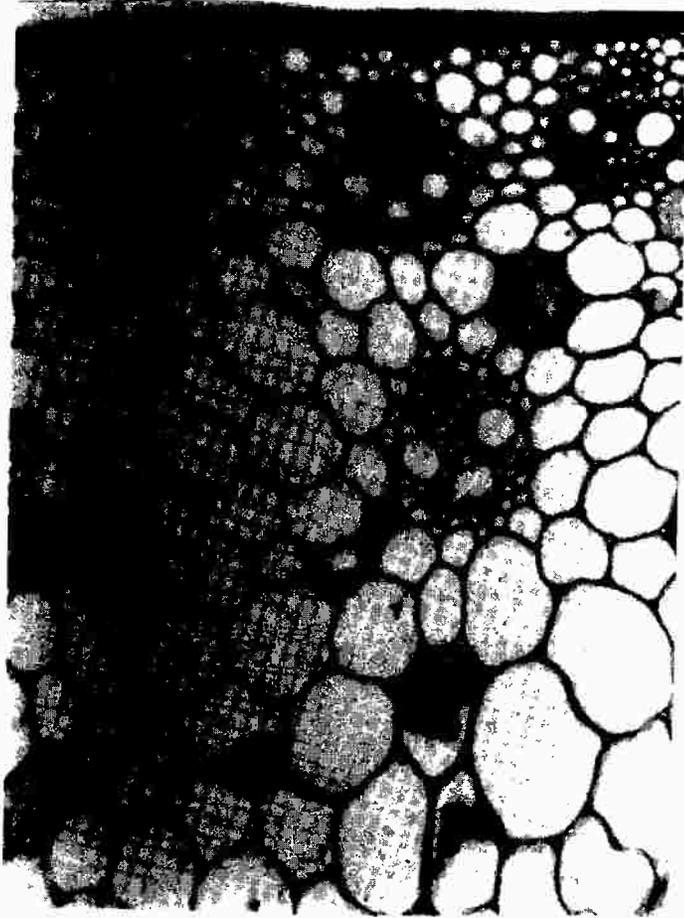
(R) شعاع وعائي - (V) وعاء خشب (ويلي Willey ١٩٧١).



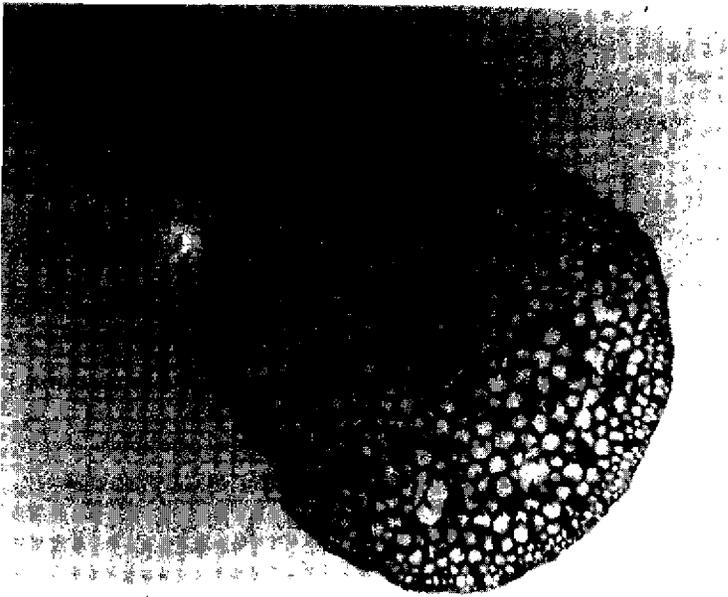
شكل (١١-١١) : قطاع عرضى فى ساق نبات التليا يوضح حلقات النمو السنوية .



شكل (١١-١٢) : قطاع عرضى فى ساق نبات اللوف من النباتات ذوات الفلقتين .



شكل (١١-١٣) : قطاع عرضى فى ساق نبات الذرة من النباتات ذوات الغلقة الواحدة.



شكل (١١-١٤) : قطاع عرضى فى جذر نبات الشقيق من النباتات ذوات الفلقتين .

ثالث : المجهر الإلكتروني Electron microscope

يمكن للعين المجردة في وجود إضاءة كافية التمييز بين نقطتين تبعدان عن بعضهما البعض بمسافة ٠,٢ مم أو أكثر كنقطتين منفصلتين ، فإذا قلت هذه المسافة عن ٠,٢ مم تشاهدان كنقطة واحدة. وتعرف هذه المسافة بقدرة التمييز Resolving power للعين .

وإذا ما نظرنا إلى مسافة صغيرة بين نقط بمساعدة عدسة، أو جهاز به عدسات (مجهر) تكون هذه المسافة أكبر، ويمكن التدليل على ذلك بفحص صورة في جريدة بعدسة مكبرة. وكلما زادت قوة التكبير ، زادت قدرتنا على مشاهدة تفاصيل أدق. وعند استخدام المجهر الضوئي (المركب) Light microscope (LM) حيث يتخلل الضوء العينة يمكن التكبير نحو ١٠٠٠ ضعف (1000 X) وبالتالي زيادة قدرة تمييز العين إلى نحو ٠,٠٠٠٢ مم .

خلال الدراسات المستمرة للحصول على تمييز أفضل اتضح أن قدرة تمييز المجهر لا تتوقف على عدد العدسات أو نوعيتها فقط ، ولكنها تعتمد أيضاً على طول موجات الضوء المستخدم في الإضاءة، حيث يمكن للمجهر الضوئي أن يكبر الأجسام الدقيقة تكبيراً يسمح برؤيتها إذا كان الجسم المطلوب تكبيره أكبر من طول موجة الضوء الساقط عليه، وهذا ينطبق أيضاً على دقائق هذا الجسم، حيث يتحتم أن تكون هذه الدقائق أكبر من طول موجة الضوء المستخدم، وهذا لا يتأتى عند فحص الفيروسات مثلاً التي تقل في أحجامها عن طول أقصر موجة من الموجات الضوئية، ولم يكن استعمال الضوء بالموجات الأقصر (الأزرق أو فوق بنفسجي) كافياً للخوض بعمق في التراكيب الدقيقة، إلى أن اكتشف الإنسان في العشرينيات من هذا القرن أن الإلكترونات النشطة (أجزاء من الذرة) تسلك في الفراغ سلوك الضوء، إلا أن طول موجاتها أصغر بنحو ١٠٠,٠٠٠ مرة عن الضوء، وأكثر من ذلك اكتشف أن للمجال المغناطيسي تأثيراً على الإلكترونات يماثل تأثير العدسات الزجاجية على الضوء المرئي.

تمكن العالم أرنست رسكا Ernst Ruska بجامعة برلين والذي نال جائزة نوبل عن أعماله عام ١٩٨٦ من الاستفادة من هذه الخصائص في تصميم أول مجهر إلكتروني متخلل عام ١٩٣١ (Transmission electron microscope (TEM) ولقد تطورت هذه الصناعة حتى أمكن حالياً استخدام خمس عدسات كهرومغناطيسية Electromagnetic lenses في

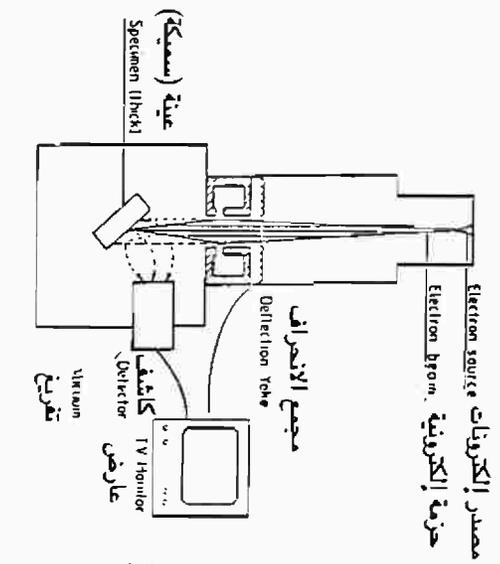
نظام التصوير تعطى قدرة تمييز تصل إلى نحو ٣,٠ نم* وقوة تكبير نحو مليون مرة. وعموماً يجب أن يتمشى نظام البصريات (الإلكترونيات) مع قدرة التمييز المطلوب توافرها للعينة، ويجب أن تكون قوة التكبير على الأقل مساوية لقدرة تمييز العين، مقسومة على قدرة تمييز النظام المستخدم. (شكل ١١ - ١٥).

يستخدم المجهر ذو الضوء المنعكس (RLM) Reflected light microscope في دراسة سطح العينة، وفي هذه الحالة أيضاً يكون طول موجة الضوء المستعمل لإضاءة العينة عائقاً للحصول على قدرة تمييز أفضل. وبالتعبية فقد اتجه التفكير إلى الإلكترونيات كبديل أفضل من الضوء. عند تحميل العينة رأسياً في المجهر الإلكتروني المتخلل TEM إذا ارتطم الشعاع الإلكتروني بالسطح بزواوية صغيرة جداً تنتج صورة لسطح العينة، ومع ذلك ولأسباب عديدة لم تستخدم هذه الطريقة بصفة عامة لدراسة الأسطح، وأمكن حديثاً فقط تطبيق هذه الطريقة بصورة مرضية في بعض الدراسات الخاصة (شكل ١١ - ١٥).

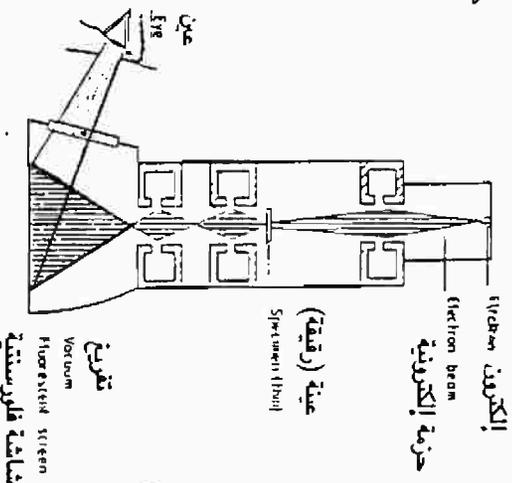
لقد أمكن بنجاح أكبر دراسة الأسطح باستخدام الشعاع المساح بدلاً من الشعاع الثابت مع نظام تصوير خاص - ويعرف في هذه الحالة بالمجهر الضوئي المساح (SEM) Scanning electron microscope، ولا يعرف على وجه الدقة من وضع الأسس الأولى للمجهر الضوئي المساح، ومع ذلك فإن أول وصف نشر لجهاز يستخدم شعاعاً إلكترونياً مساحاً للحصول على صورة للسطح قام به عالم الطبيعة الألماني ماكس نول Max Knoll عام ١٩٣٥، وتزبد حالياً قوة تكبير المجهر الضوئي المساح عن ١٦٠,٠٠٠ مرة، وتبلغ قدرة التمييز ٤ نم (شكل ١١-١٥).

تعرف مجموعة الأسس المستخدمة مع كل من TEM و SEM بالفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) ولقد وصفه أردين Mazred v. Ardenne للمرة الأولى عام ١٩٣٨، واستخدم أول جهاز تجارى جمع النوعين معاً عام ١٩٦٩، وبقوة تكبير ٦٠٠٠ إلى ١٠٠,٠٠٠ مرة، وقدرة تمييز ٢٥ نم، وحالياً تصل قدرة تمييز هذه الأجهزة المزدوجة إلى ١ نم، وقوة تكبيرها ٥٠ إلى مليون مرة.

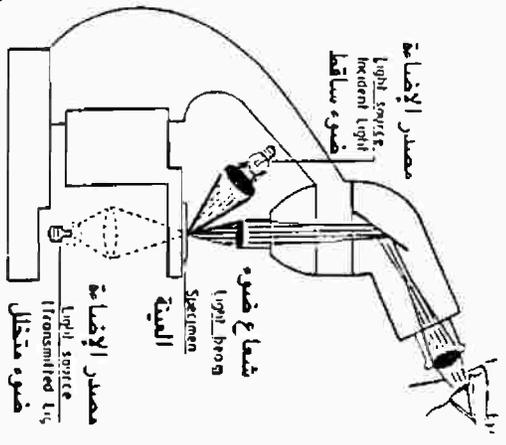
(*) ١ ميكرون (Micron) = ١ ميكرومتر (Micrometer) = ١٠^٣ مم - ١ نم (Nanometer) = ١٠^٦ مم = ١٠^٩ م.



(ج)



(ب)



(أ)

شكل (11-15) : مقارنة بين نظم التقنية المستخدمة في : (أ) المجهر الضوئي LM والمجهر ذو الضوء المنعكس RLM (قوة التكبير حوالي 1000) . (ب) المجهر الإلكتروني المتخلل TEM (قوة التكبير حوالي مليون) . (ج) المجهر الإلكتروني المساح SEM (قوة التكبير حوالي 200,000) (شوتانس Schotanus - فيليس).

المجهر الإلكتروني المتخلل (TEM) Transmission electron microscope

يتركب المجهر الإلكتروني المتخلل من ثلاثة مكونات رئيسية :

(أ) عمود بصري إلكتروني Electron optical column

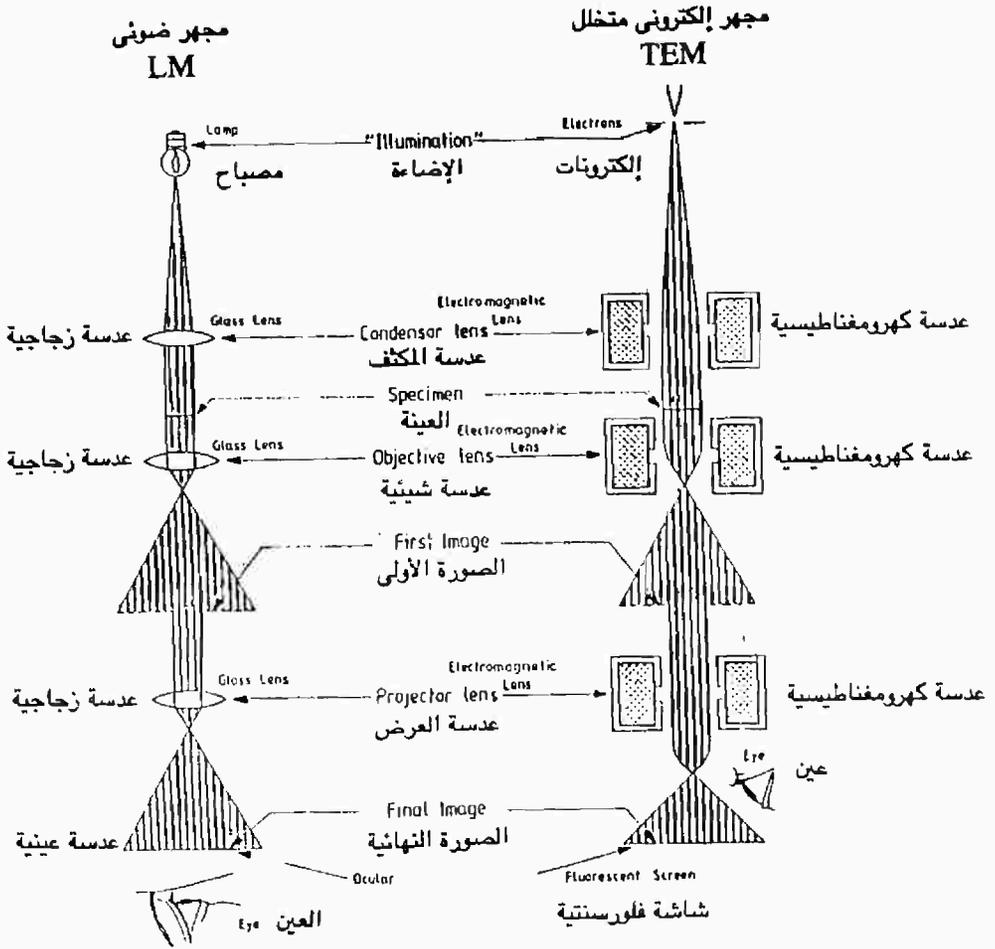
(ب) نظام تفريغ Vacuum system

(ج) الإلكترونيات اللازمة Necessary electronics

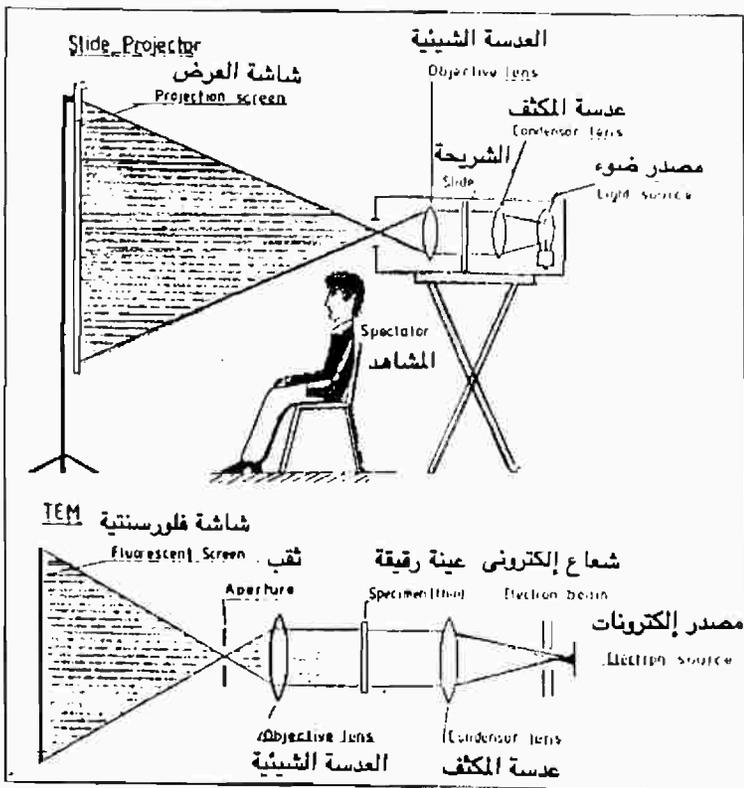
يعتبر العمود المكون الرئيسي بالمجهر الإلكتروني المتخلل ويكون على شاكلة مثيله بالمجهر الضوئي حيث تمر خلاله الإلكترونات والضوء، والفرق بينهما أن مصدر الضوء في المجهر الإلكتروني هو مدفع إلكتروني Electron gun مزود به العمود، وحيث إن الإلكترونات تكون غير مرئية يتم اعتراضها بشاشة فلورستية Fluorescent screen حتى يمكن رؤية الصورة خلال نافذة في حجرة العرض (شكل ١١-١٦) .

وثمة فرق جوهري آخر أن العدسات الكهرومغناطيسية تختلف، عكس الحال بالنسبة للعدسات الزجاجية، بتغيير التيار خلال ملف العدسات وكذلك الطول البؤري (الذي يحدد التكبير) بينما في حالة المجهر الضوئي يلزم تغيير العدسات المستخدمة للحصول على قوة تكبير مختلفة .

يمكن لإيضاح أسس عمل المجهر الإلكتروني المتخلل عقد مقارنة بينه وبين عارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شكل ١١-١٧) حيث تقابل الشريحة الفيلمية العينة التي تفحص بالمجهر الإلكتروني المتخلل .



شكل (11-17) : مسار أشعة الضوء في المجهر الضوئي LM مقارنة بالإلكترونات في المجهر الإلكتروني المتخلل TEM (شوتانوس Schotanus - فيليس).



شكل (١١-١٧) : مقارنة بين المجهر الإلكتروني المتخلل TEM وعارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شوتانوس Schotanus - فيليس).

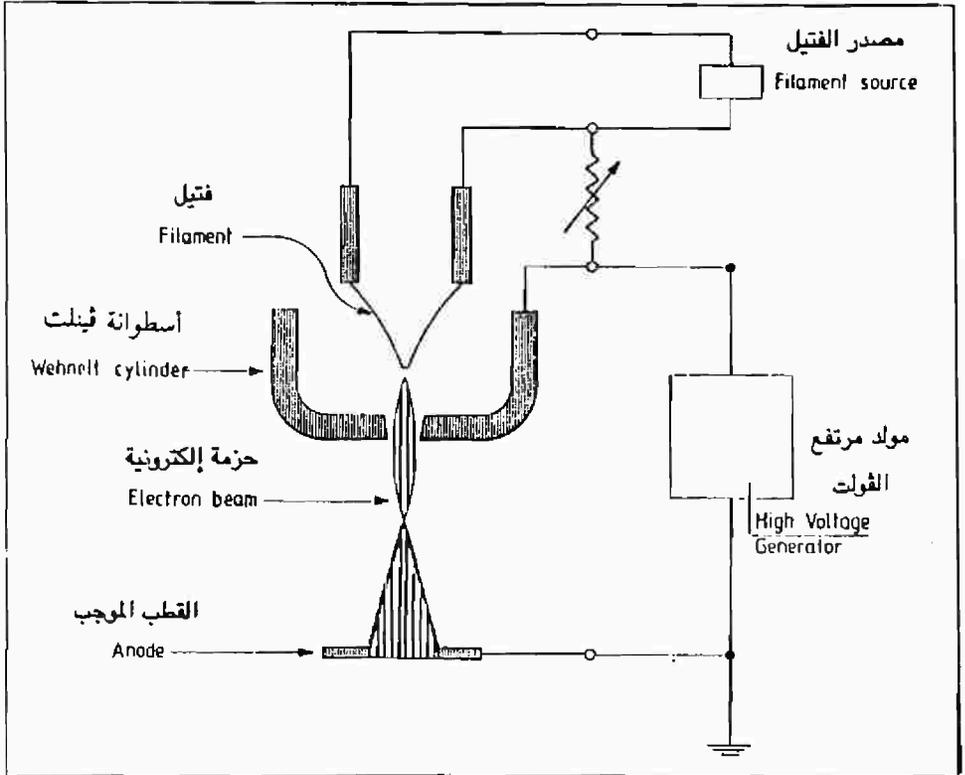
يتركب مدفع الإلكترونات (شكل ١١-١٨) من قطب سالب Cathode وفتيل Filament وما يعرف بالقطب الكهربائي فينلت Wehnelt electrode وتعرف هذه الأجزاء في مجموعها بأسطوانة فينلت، إلى جانب قطب موجب Anode يكون الفتيل تنجستين على هيئة دبوس شعر يجرى تسخينه إلى نحو 2700° م وكلما ارتفعت درجة حرارة الفتيل، زاد الناتج من الإلكترونات بواسطة مدفع الإلكترونات، ولهذا الفتيل عمر تحدده فترة زمنية معينة، وفي بعض المجاهر يستبدل الفتيل المعتاد (تنجستين على شكل دبوس الشعر) بنوع خاص من البللورات يتم تسخينها، وبصفة عامة كلما زادت كمية الإلكترونات المنبعثة من المصدر المستخدم، كان قطر الحزمة الإلكترونية صغيراً وهذا يعطى تميزاً أفضل للعينة. عند توصيل قوة محركية كهربائية موجبة عالية جداً (من $20,000$ إلى عدة مئات الألف فولت) إلى القطب الموجب يمكن الحصول على الإلكترونات من السحابة الإلكترونية حول الفتيل وبعد تجمعها على شكل حزمى بالقطب الكهربائي، تنشط إلى سرعات تصل إلى عدة مئات الألف من الكيلو مترات في الثانية، وتمر خلال ثقب بمنتصف القطب الموجب عن طريق عدسات المكثف لتتخلل العينة (الرقيقة جداً) والعدسات المكبرة لتصطدم في النهاية بالشاشة الفلوروسنتية، التي تحول الصورة الإلكترونية إلى صورة مرئية.

إذا لم تكن العينة رقيقة جداً فإن الإلكترونات تقف ولا تتكون الصورة، وعادة لا يزيد سمك العينات المختبرة بالمجهر الإلكتروني المتخلل عن نصف ميكرون، كما لا يزيد قطرها عادة عن ٣ مم، لذلك كلما زادت سرعة الإلكترونات، أو بمعنى آخر كلما زادت سرعة القوة المحركة الكهربائية، أمكن دراسة عينات أكثر سمكاً.

ماذا يحدث بالعينة أثناء قذفها بالإلكترونات ؟

عند مرور الإلكترونات خلال العينة تحدث الظواهر المتعددة التالية :

- (١) تُمتص بعض الإلكترونات بسبب سمك وتركيب العينة، وهذه تزيد من وضوح الفروق بالصورة.
- (٢) تقل سرعة بعض الإلكترونات الأخرى نتيجة لاختلاف العناصر، وهذه تعطى التقابل المظهري Phase contrast بالصورة.

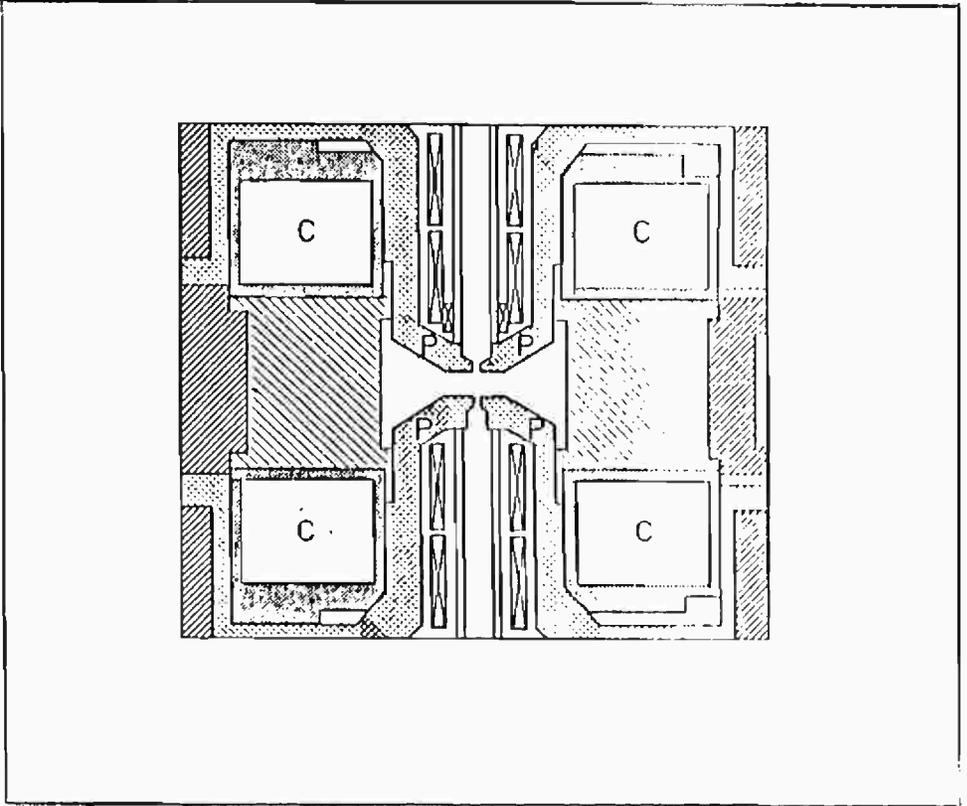


شكل (١١-١٨) : رسم تخطيطي لقطاع مستعرض لدفع الإلكترونات
(شوتانوس - Schotanus - فيليس).

- (٣) تنحرف الإلكترونات في حالة العينات البللورية في اتجاهات محددة نتيجة لترتيب الشبكي للعيينة وهذا يعطى أنماط إنحراف متميزة للعيينة .
- (٤) تنعكس بعض الإلكترونات المرتطمة بالعيينة (إلكترونات مبعثرة للخلف) .
- (٥) تقذف العينة ذاتها إلكترونات ثانوية .
- (٦) تقذف العينة أشعة سينية ذات طاقة، وطول موجة، ترتبط بتركيب العناصر بالعيينة .
- (٧) تقذف العينة فوتونات (= ضوء) Cathodo luminescence .

تعزى الظاهرة الأولى والثانية إلى تكوين الصورة المعتادة بالمجهر الإلكتروني المتخلل القياسي . ويمكن من خلال إضافة بعض المكونات إلي المجهر الاستفاد من الأربع ظواهر الأخيرة بشكل أو بآخر ؛ للحصول على أقصى قدر ممكن من المعلومات عن العينة، وعلى عكس ما قد يتوقع البعض فإن القذف الإلكتروني يمكن السيطرة عليه ، وبالتالي لا يؤثر على العينة .

يوضح شكل (١١-١٩) قطاعاً مستعرضاً لترتيب الميكانيكي لعدسة كهرومغناطيسية . عند مرور تيار كهربائي خلال الملفات الكهربائية (C) ينتج مجال كهرومغناطيسي بين ما يعرف بالقطع القطبية (أ) ، ويمكن تغيير قوة تكبير العدسة بتغيير التيار الكهربائي المار خلال الملف . ويعتبر ذلك الاختلاف الوحيد عن العدسة الزجاجية، وفيما عدا ذلك فسلوكهما متماثل ؛ حيث إن لهما نفس النمط من الزيغ (الانحراف) Aberration ويعبر الزيغ الكروي عن اختلاف التكبير في المركز عن الحواف . والزيغ اللوني اختلاف تكبير العدسة باختلاف طول موجة الإلكترونات في شعاع الإضاءة واللابؤرية Astigmatism حيث تكون صورة الدائرة ببيضاوية الشكل .



شكل (١١-١٩) : قطاع مستعرض في عدسة كهرومغناطيسية.

C : ملف كهربائي .

P : قطعة قطب

(شوتانس Schotanus - فيليس).

ويعمل نظام عدسة المكثف على ضبط الحزمة الإلكترونية (صورة الفتيل) على العينة الجارية فحصها بالقدر الذى يناسب الغرض من الدراسة. وتتكون بالعدسة الشيئية كل من الصورة الإلكترونية، ونمط الانحراف (فى حالة العينة البلورية). ويتغير تكبير العدسة التى تلى العدسة الشيئية مباشرة يمكن تكبير أى من هاتين الصورتين، وعرضها على الشاشة الفلورستية فى حجرة العرض بالعدسات الأخرى فى العمود.

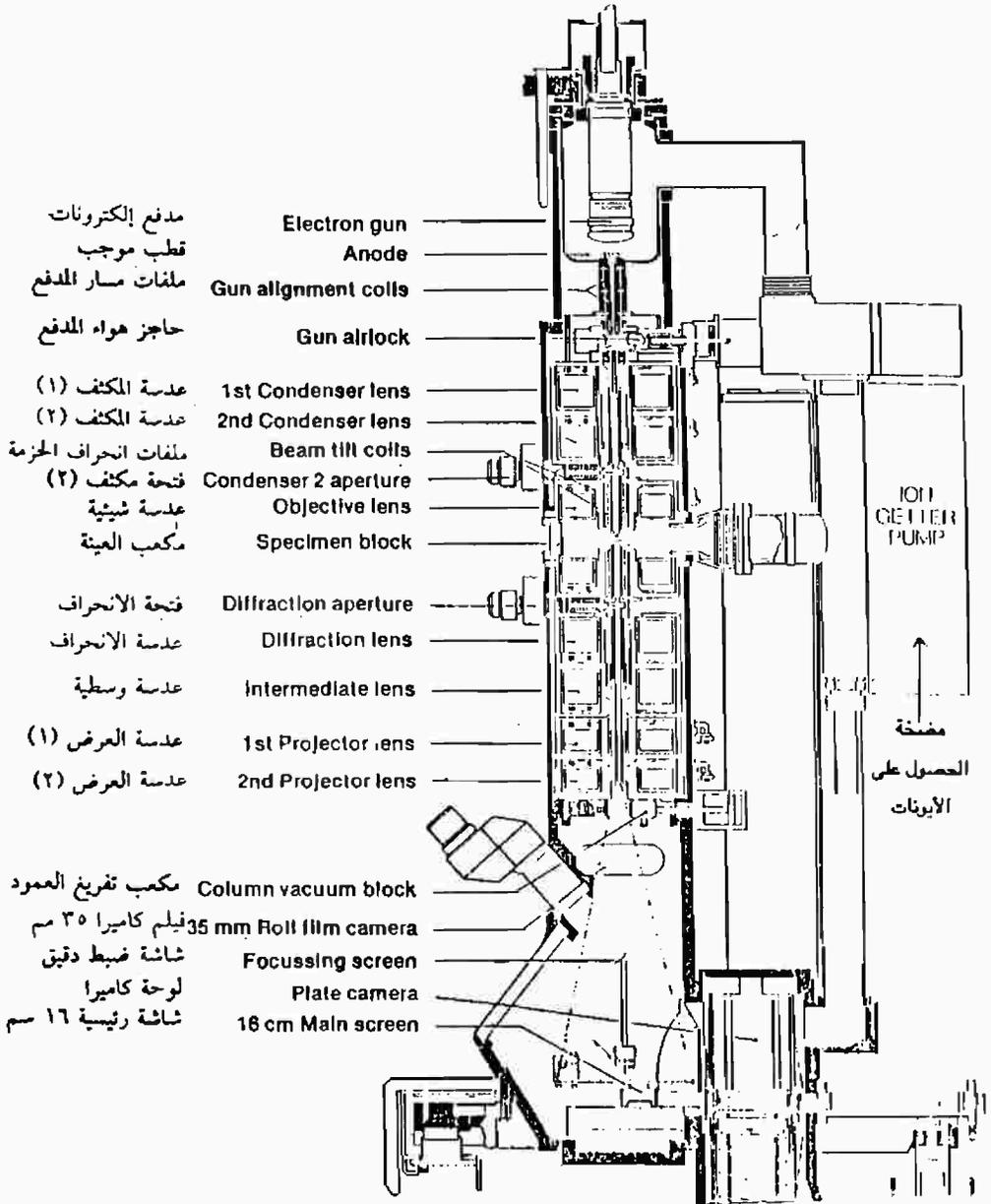
وعادة ما يعقب العدسة الشيئية أربع عدسات، وعدسة انحرافات، وعدسة وسطية، وعدستان للعرض، وقد تزود العدسات بنظام للتبريد المائى لضمان درجة مرتفعة من الثبات والحصول على أعلى تكبير ممكن.

تمر الحزمة الإلكترونية من الفتيل إلى الشاشة الفلورستية خلال سلسلة من الفتحات مختلفة الأقطار، ويجب أن تمتع مرور الإلكترونات التى لا تفيد فى عملية تكوين الصورة. ويمكن من خلال ماسك خاص يحمل أربع فتحات مختلفة التحكم من خارج العمود وتبعاً للظروف المعينة فى اختيار قطر فتحة عدسة المكثف، والعدسة الشيئية، وعدسة الانحراف.

مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يمكن مشاهدة الصورة على الشاشة الفلورستية من خلال نوافذ كبيرة فى غرفة العرض. وعند مشاهدة التفاصيل الدقيقة جداً للعينة، أو عندما تتطلب الصورة ضبطاً دقيقاً يمكن إعتراض الحزمة بشاشة ضبط خاصة ذات حبيبات دقيقة جداً، وفى هذه الحالة تشاهد الشاشة بواسطة مجهر بسيط Binocular قوة (12 X) عالية الجودة.

يفضل كما هو الحال فى أى من فروع العلوم الأخرى الاحتفاظ بسجل مستديم لما تشاهده العين، وفى واقع الأمر لا يتطلب الأمر أى حيل خاصة لإجراء هذا الأمر، فالإلكترونات لها نفس تأثير الضوء على المادة الفوتوغرافية وبالتالي للحصول على ما يعرف بالصورة الإلكترونية الدقيقة لا يتطلب الأمر سوى إعداد موضع أسفل عدسة العرض النهائية يوضع به حامله Cassette بها عدد من اللوحات أو الأفلام الفوتوغرافية، وتقع هذه الحاملة أسفل الشاشة الفلورستية. يمكن تسجيل الصورة بإمالة الشاشة بعيداً، وفى بعض أنواع المجهر المتخلل يمكن وضع فيلم ٣٥ مم بالحاملة. يوضح الشكل (١١-٢٠) قطاعاً عرضياً بالعمود لمجهر إلكترونى متخلل حديث.



شكل (١١-٢٠) : قطاع عرضي لعمود مجهر إلكتروني متخلل حديث.
 (شوتانوس Schotanus - فيليس).

المشاهدة من خلال شاشة تلفزيون Observation via T.V. screen

يمكن أيضاً مشاهدة الصورة باستعمال شاشة فلورستية شفافة (من خارج العمود المفرغ) بواسطة كاميرا تلفزيونية تنقل الصورة إلى عارض تلفزيونى T.V. monitor - وما لا شك فيه أن هذه الطريقة تكون أفضل إذا أمكن مشاهدة الشاشة الفلورستية خلال نافذة زجاجية دون إضافة كاميرا تلفزيونية .

تتضح أهمية المشاهدة التلفزيونية فى التدريس ، وكذلك لتسجيل الوظائف التى تتضمن الحركة ؛ حيث تسجل على شريط فيديو .

التفريغ Vacuum

كما سلف الذكر، يقتصر تصرف الإلكترونات مثل الضوء عند استخدامها تحت تفريغ، لذلك يلزم تفريغ كل العمود من القمة إلى القاعدة، ويتم التفريغ بكفاءة بواسطة مجموعات من المضخات المختلفة ، كذلك يتم التخلص من بخار الماء الذى ينتج دائماً بالعمود عند استبدال العينات بواسطة مضخة تبريد ، وتحاط منطقة العينة بمكعب من النيتروجين السائل المبرد .

يزود العمود بعدد من حاجز الهواء، وصمامات فصل كهرومغناطيسية محكمة لتجنب إخلاء كل العمود من وقت لآخر عقب استبدال العينة، أو الحامات الفوتوغرافية، أو الفتيل .

يكون نظام التفريغ فى المجاهر الإلكترونية المتخللة الحديثة محكماً ذاتياً ، ويمكن متابعة التفريغ على الجهاز بصورة مستمرة لتجنب أى خطأ قد يحدث خلال الفحص .

الإلكترونيات The electronics

لا جدال فى أن الحصول على النتائج الفائقة للمجهر الإلكتروني المتخلل الحالى يتطلب ثبات الفولت والتيار الكهربى المار خلال العدسات، لذلك تشتمل غرفة القوة الكهربائية للمجهر الإلكتروني المتخلل الحديث على عدد ملموس من المصادر، وتيار لا ينحرف بأكثر من جزء من المليون من القيمة المطلوبة للدراسة، من أجل ذلك لا بد من توافر دوائر متطورة يمكن من خلالها الحصول على مثل هذا الثبات، ولا شك أن التقنية الإلكترونية الرقمية

Digital المتاحة الآن والتقنية القائمة على المعالجة فائقة الدقة Microprocessor تلعب دوراً حيوياً فى هذا الصدد، ولقد ساعد ذلك على تقليل مفاتيح التحكم ، كما أتاحت فرصة الكشف عن ظروف التشغيل مثل نظام التفريغ فى أى لحظة من خلال مفاتيح خاصة .

توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

لا يكتفى من يستخدم المجهر الإلكتروني المتخلل بحركة العينة فى الاتجاه الأفقى فقط، حيث يرغب الباحث فى تكوين صورة مجسمة للعينة، لذلك فإنه يحتاج إلى إمالة ودوران العينة. عند توجيه عينة (بللورية) فى وضع معين مع الشعاع الإلكتروني للحصول على نمط انحراف معين، يتطلب الأمر توجيه آخر فى اتجاه متعامد مع التوجيه الأول، مثل ذلك وغيرها من المتطلبات كالفحص أثناء تسخين، أو تبريد، أو ضغط ممكنًا بواسطة مقياس زاوية Goniometer يوجد حول العدسة الشيئية، ويسوف مقياس الزاوية الحركة فى الاتجاه الأفقى أساساً (من خلال قضيبين على جانبي العمود يتحكمان فى حركة العينة) كما توجد مجموعة أخرى من القضبان حول العينة مصممة بطريقة تتيح الحركة فى بقية الاتجاهات .

استخدام المجهر الإلكتروني المتخلل وإعداد العينة

Application and specimen preparation

يمكن استخدام المجهر الإلكتروني المتخلل فى أي من فروع العلوم والتكنولوجيا المختلفة إذا ما تطلب الأمر دراسة التركيب الداخلى للعينات على المستوى الذرى، على فرض إمكانية إعدادها بصورة ثابتة ودقيقة (بقطر حوالى 3 مم) تسمح بوضعها فى عمود المجهر المفرغ، ورقيقة بدرجة كافية (أقل من 0.5 ميكرومتر) تسمح بمرور الإلكترونات ولها القدرة على مقاومة كل من التفريغ وتأثير الشعاع الإلكتروني، وتشير الأعداد الكبيرة من الأبحاث المنشورة التى استعانت بالمجهر الإلكتروني إلى مدى أهميته للدارسين فى المجالات البيولوجية والتكنولوجية المختلفة .

كل فرع من الدراسة له طرق متخصصة لتجهيز العينة بالصورة الملائمة للفحص بالمجهر الإلكتروني، فعلم المعادن Metallurgy له طرقه الخاصة، وفى علم البيولوجى Biology تعامل الأنسجة بطرق خاصة، ويمكن إيجاز خطوات تجهيز العينة للفحص فيما يلى :

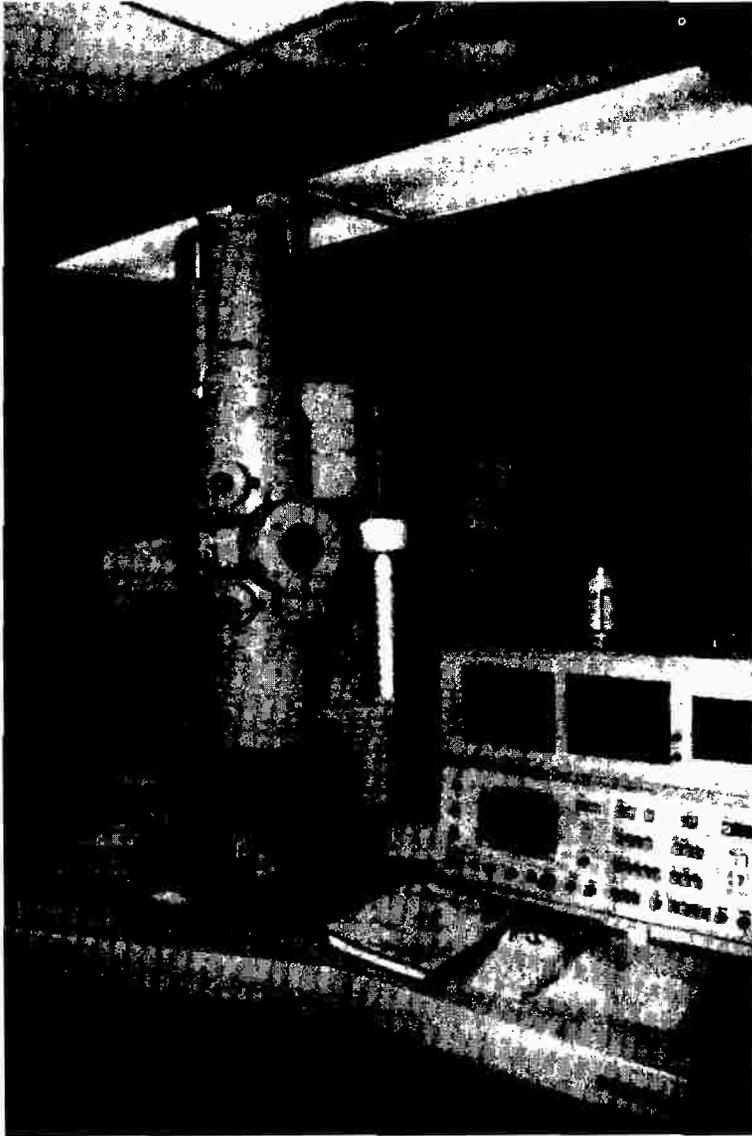
تعامل العينة بالطريقة الكيميائية المناسبة للتخلص من الماء وحفظ الأنسجة بصورة تماثل حالتها الطبيعية بقدر الإمكان، ثم توضع فى كبسولة جيلاتين (١٠ مم × ٥ مم قطر) تملأ بالراتنجات لتكتسب صلابة، تؤخذ من العينة بعد ذلك قطاعات بمتوسط سمك ٠,٥ ميكرومتر، بواسطة ميكروتوم فائق Ultra microtome مزود بسكين زجاجى أو ماسى .

توضع القطاعات الصغيرة التى يتم الحصول عليها على حامل عينة - عادة شبكة نحاسية خاصة قطرها ٣ مم، سبق طلائها بكاربون عديم التركيب بسمك ٠,١ ميكرومتر . ويوضح الشكل (١١-٢١) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكتروني المتخلل .

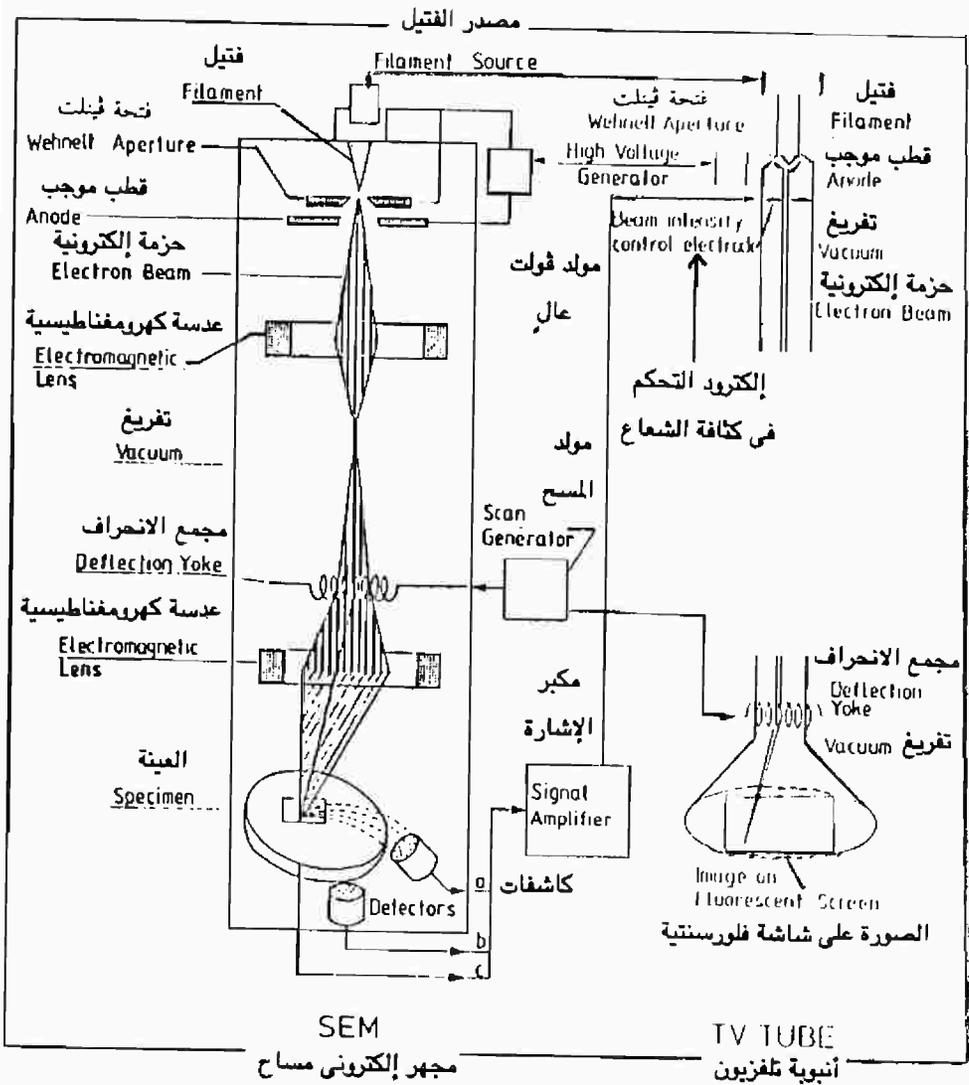
المجهر الإلكتروني المساح (SEM) Scanning electron microscope

تجتمع كافة مكونات المجهر الإلكتروني المساح عادة فى ذات الوحدة، ويوجد العمود البصرى الإلكتروني ووحدات التحكم الإلكترونية بالقمة ليسهل تداولهما ويوجد أسفل المنضدة نظام التفريغ، ومولد الفولت العالى، والمصادر الرئيسية للقوة، ومثبت التيار الكهربائى .

وكما سبق الذكر، يماثل المجهر الإلكتروني المساح مع بعض التحفظات المجهر ذو الضوء المنعكس، ويوضح شكل (١١-٢٢) مقارنة أخرى، حيث يتضح أن تشغيل المجهر الإلكتروني المساح يماثل إلى حد كبير أنبوبة التشغيل المزود بها التلفزيون، حيث يوجد فى كلا النظامين مدفع إلكترونات يماثل ذلك المزود به المجهر الإلكتروني المتخلل، الذى يعطى شعاعاً إلكترونياً، وفى حالة المجهر الإلكتروني المساح يرتطم هذا الشعاع بالعينة، وخلاف ما يحدث من ظواهر أخرى، تقذف العينة إلكترونات ثانوية، وفى حالة أنبوبة التلفزيون يرتطم الشعاع بشاشة فلورسنتية التى بدورها تقذف فوتونات (= ضوء). يسمح الشعاع الإلكتروني مساحة صغيرة من سطح العينة خطأ بعد خط، متزامناً مع الشعاع الإلكتروني فى أنبوبة التلفزيون، ويقوم الكاشف Detector بالتقاط الإلكترونات الثانوية التى تتولد خلال هذه العملية بواسطة كل نقطة من العينة على حدة، وتتحكم الإشارة الصادرة عن الكاشف فى كثافة الشعاع فى أنبوبة التلفزيون، وبالتالي تكون كمية الضوء التى تقذفها كل نقطة من شاشة التلفزيون متناسبة مع عدد الإلكترونات من النقطة المقابلة على سطح العينة، وبالتالي تظهر الصورة الممثلة لسطح العينة على شاشة التلفزيون خطأ بعد خط .



شكل (١١-٢١) : المجهر الإلكتروني المتخلل.



شكل (١١ - ٢٢) : مقارنة بين نظام التشغيل في المجهر الإلكتروني المساح وأنبوبة التليفزيون (شوتانوس Schotanus - فيليس)

يجرى التسجيل بتصوير شاشة التلفزيون، حيث يفتح غالق Shutter كاميرا عادية عندما تبدأ عملية المسح ويقفل عقب كتابة آخر خط .

وفيما يلي وصف لمختلف أجزاء المجهر الإلكتروني المساح ، وبعض أوجه التقنية الخاصة به .

مدفع الإلكترونات Electron gun

يتركب مدفع الإلكترونات من فتيل، وأسطوانة ثنلت ثمائلان نظيريهما فى المجهر الإلكتروني المتخلل، كذلك لا يختلف الأساس الذى يقوم عليه نظام الإضاءة حيث يتركب من مدفع إلكترونات + قطب موجب + عدسات المكثف، تقوم العدسة النهائية بضبط الحزمة على سطح العينة المطلوب فحصها .

وتتمثل أهم الفروق فيما يأتى :

(١) الحزمة ليست ساكنة Static كما فى المجهر الإلكتروني المتخلل ؛ حيث تقوم الحزمة بمسح جزء متناهٍ فى الصغر من سطح العينة بمساعدة مجال كهرومغناطيسى ، ناتج عن ملفات مسح يحكمها ما يعرف بمولد المسح Scan generator .

(٢) فولت التنشيط أكثر انخفاضاً فى المجهر الإلكتروني المساح عنه فى المجهر الإلكتروني المتخلل ؛ حيث يتراوح فى الأول ما بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ فولت .

والسؤال الآن، ماذا يحدث بالعينة عند انطلاق الإلكترونات ؟

سبق مناقشة الظواهر المتعددة التى تصاحب قذف العينة بالإلكترونات ، عند استخدام المجهر الإلكتروني المتخلل، وعموماً تلاحظ الظواهر الخمس التالية عند استعمال المجهر الإلكتروني المساح :

- (١) ينبعث عن العينة ذاتها ما يعرف بالإلكترونات الثانوية .
- (٢) تنعكس بعض الإلكترونات (الإلكترونات التى تشتت إلى الخلف) .
- (٣) تمتص العينة إلكترونات .
- (٤) ينبعث عن العينة أشعة سينية .

(٥) ينبعث عن العينة أحياناً فوتونات (= ضوء) .

أضف إلى ذلك ظاهرة سادسة هي إنتاج ما يعرف بالإلكترونات الثاقبة Auger electrons تحت تأثير الأشعة السينية المنبعثة .

تتداخل كل هذه الظواهر معاً ويعتمد كل منها إلى حد ما على التضاريس، والعدد الذرى، والحالة الكيميائية للعينة، ويعتمد عدد الإلكترونات التى تنشئت إلى الخلف، والإلكترونات الثانوية المنبعثة ، والإلكترونات التى تمتص عند كل نقطة بالعينة على تضاريس العينة بدرجة أكبر من أية خاصية أخرى، ولذلك السبب تستغل هذه الظواهر الثلاث بصورة أساسية لتصوير سطح العينة .

الكشف عن الإلكترونات Electron detection

تعمل كافة الكاشفات عن الإلكترونات التى تنشئت إلى الخلف والإلكترونات الثانوية التى تبعث من العينة على أسس واحدة حيث تصدم الإلكترونات شاشة فلورسنتية، ونتيجة لذلك ينبعث عن الشاشة فوتونات وهذه يتم الكشف عنها وتحويلها إلى إشارة كهربائية بواسطة أنبوبة تقوية الضوء Photomultiplier tube . عند وضع قطب كهربائى Electrode موجب الشحن على هيئة قفص حول مقدمة الكاشف فإن كفاءة الكاشف للإلكترونات الثانوية تكون أفضل .

التكبير والإظهار Magnification and resolution

يجرى تحديد التكبير فى المجهر الإلكتروني المساح بواسطة الدائرة الإلكترونية التى تسمح الحزمة فوق العينة (وفى ذات الوقت فوق الشاشة الفلورسنتية لأنبوبة التلفزيون حيث تظهر الصورة) وفوق مقطع أنبوبة التلفزيون .

طول أحد الخطوط (التي تكتبها) الحزمة الإلكترونية على

شاشة التلفزيون (عرض صورة التلفزيون)

= تكبير المجهر الإلكتروني المساح

طول أحد (مسارات) الحزمة الإلكترونية على العينة

يتحدد إظهار المجهر الإلكتروني المساح بصورة أساسية بواسطة قطر الحزمة على سطح العينة، ومع ذلك يعتمد الإظهار من الناحية العملية على خصائص العينة، وتقنية إعدادها،

وعلى عديد من القياسات الجهازية مثل كثافة الحزمة، والفولت المنشط، وسرعة المسح، والمسافة بين آخر عدسة والعينة (تعرف عادة بمسافة الشغل Working distance) وزاوية سطح العينة مع الكاشف، ويمكن تحت الظروف المثلى الحصول على إظهار قدره ٤ نم .

مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يزود المجهر الإلكتروني المساح عادة بعارضين للصورة Image monitor يشاهد الباحث الصورة من خلال أحدهما، أما الآخر ويعرف عادة بالعارض على الإظهار High resolution monitor فيزود بكاميرا تصوير عادية ذات فيلم ٣٥ مم أو ٧٠ مم أو طراز مناسب من كاميرا بولارويد Polaroid إذا تطلب الأمر الحصول على صور فورية .

معاملة الصورة Image treatment

لما كان الحصول على الصورة في المجهر الإلكتروني المساح يتم بالكامل إلكترونياً فإن من الممكن معاملتها بمختلف الأساليب الإلكترونية الحديثة، والتي تشتمل على تعظيم الاختلافات، والتعاكس (الأسود يصير أبيض) ومزج الصور من كاشفات مختلفة، وتحليل الصورة، واستخراج صورة أحد الكاشفات، وبالتالي يمكن الاستفادة من مختلف هذه التقنيات التي تناسب الحصول على أفضل البيانات الممكنة من العينة .

التفريغ Vacuum

يجرى في المجهر الإلكتروني المساح، بصفة عامة، الحصول على تفريغ منخفض ونظيف بمساعدة مضخة قبل تفريغ رحوية ومضخة انتشار زيتية أو ما يعرف بالمضخة التربينية الجزئية .

توفر هذه التوافيق أيضاً فترة كافية لتغيير العينة والفيل والفتحة بصورة مرضية (أقل من دقيقتين) دون الحاجة إلى استخدام حاجز هواء، وكما هو الحال في المجهر الإلكتروني المتخلل فإن نظم التفريغ في المجهر الإلكتروني المساح تقع تحت تحكم ذاتي تام ومؤمنة ضد أعطال التشغيل .

الإلكترونيات Electronics

من البديهي أن المجهر الإلكتروني المساح مثل المجهر الإلكتروني المتخلخل من حيث حاجته إلى ثبات الفولت والتيار اللازمين لدفع الإلكترونات وعدسات المكثف للحصول على أفضل تمييز، وبالمثل يلزم إحكام ثبات الدائرة الإلكترونية المصاحبة للكاشفات بدقة بالغة، فالحال هنا يماثل المجهر الإلكتروني المتخلخل حيث لا يسمح بالتجاوز بجزء في المليون .

توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

تعتمد نوعية الصورة بالمجهر الإلكتروني المساح على توجيه وبعد العينة بالنسبة للكاشفات الإلكترونية، لذلك يراعى في المجهر الإلكتروني المساح حاليًا حرية حركة العينة في الاتجاهين الأفقى والرأسى كذلك إمكانية دورانها وإمالتها تبعًا للحاجة، وعادة ما يكون حجم العينة في المجهر الإلكتروني المساح أكبر من تلك بالمجهر الإلكتروني المتخلخل، حيث يمكن استخدام عينات يصل حجمها إلى $65 \times 65 \times 50$ مم، وقد تضيف بعض المصانع إمكانية فحص العينة تحت تبريد أو تسخين أو تعريضها للشد .

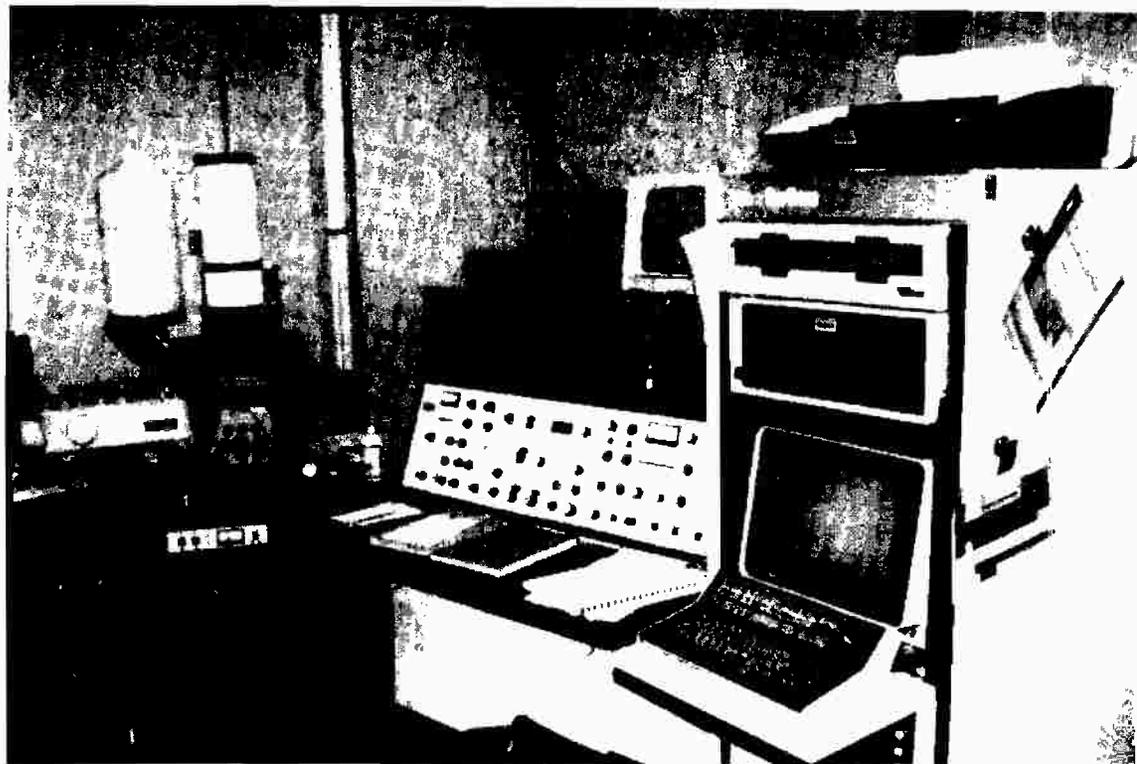
استخدام المجهر الإلكتروني المساح وإعداد العينة

Application and specimen preparation

يستخدم المجهر الإلكتروني المساح في عديد من فروع العلم والتكنولوجيا عندما تكون هناك حاجة إلى دراسة سطح العينة، وتعد القيمة الشرائية للجهاز من انتشار استخدامه .

يمكن فحص أى عينة كما هي بالمجهر الإلكتروني المساح عقب التخلص مما بها من مكونات متطايرة مثل الماء، وإمكانية فحص العينات بحالها له أهمية عظيمة فى حالات خاصة كما فى الأمور الشرعية، ومع ذلك يتطلب الحصول على ناتج أفضل من الإلكترونات وبالتبعية صورة أكثر دقة إضافة طلاء معدنى (عادة ذهب) رقيق للغاية (1 نم) وعادة ما يزيد المجهر برشاش طلاء Sputter coater لهذا الغرض .

ويوضح الشكل (١١-٢٣) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكتروني المساح .



Hitachi Scanning Electron Microscope (SEM)

شكل (١١-٢٣) : المجهر الإلكتروني المساح.

الفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل

Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)

عندما تكون العينة فى المجهر الإلكتروني المساح شفافة بدرجة تكفى للإلكترونات أن تتخللها فمن الممكن تجميع هذه الإلكترونات بكاشف إلكترونيات متخللة يوضع فى مكان مناسب، يعرف هذا الاتحاد بين أسلوبى تقنية المجهر الإلكتروني المساح والمجهر الإلكتروني المتخلل بالفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل STEM .

يمكن الحصول على نتائج مماثلة عندما يسمح للحزمة الإلكترونية فى المجهر الإلكتروني المتخلل أن تمسح العينة ويتزامن مع ذلك حزمة إلكترونية فى أنبوبة تليفزيون كما هو الحال فى المجهر الإلكتروني المساح، ويحمل أسفل عدسة العارض النهائية كاشفاً إلكترونياً متخللاً، ويمكن حالياً تزويد معظم المجاهر الإلكترونية المتخللة بهذه الإمكانية سواء كجزء إضافى أو جزء أساسى داخل المجهر، ويمكن لهذه التقنية التكبير حتى مليون ضعف بقوة تمييز 1 نم .

ولقد أمكن الاستفادة من الإلكترونات التى تشتت إلى الخلف ، وكذلك الإلكترونات الثانوية التى تنبعث أثناء قذف العينة للحصول على معلومات أكثر عن العينة التى تفحص بالمجهر الإلكتروني المتخلل ، حيث يوضع كاشف إلكترونى من النوع الرقيق جداً شبه الموصل أسفل القطب العلوى للشبيثة للحصول على صورة الإلكترونات التى تشتت للخلف لسطح العينة على عارض التليفزيون ، ويتم توجيه الإلكترونات الثانوية إلى الكاشف من خلال ثقب فى القطب أعلى العدسة الشبيثة، بإضافة فولت موجب لقطب كهربائى أمام الكاشف الإلكتروني مباشرة الذى يمكن تحميله على العمود البصرى الإلكتروني وبالتالي نكون قد أضفنا إمكانيات المجهر الإلكتروني المساح إلى المجهر الإلكتروني المتخلل ، والحصول على معلومات عن العينة تشمل دقائق تركيبها الداخلى ، وكذلك السطح .

Tissue preparation تجهيز العينات

يقتضى تجهيز النسيج للفحص بالمجهر الإلكتروني مجموعة من الخطوات المتتالية تضمن التثبيت Fixing حتى تكتسب الأنسجة صلابة وقدرة على الحفظ ثم التجفيف Dehydrating ثم التشرب Infiltrating بمادة يمكن أن تتصلب بعد ذلك لتوفر مادة مناسبة

لعمل قطاعات رقيقة. ومن الأمور ذات الأهمية القصوى الحفاظ على التفاصيل الدقيقة للنسيج فى حالة أقرب ما تكون للنسيج الحى .

الحصول على العينات Obtaining material

الحصول على العينة أولى خطوات تجهيز النسيج لفحص المجهرى، ويتطلب ذلك اختيار المصدر المناسب للدراسة المطلوبة والسائق على طبيعة المادة والخطوات المزمع إجراؤها، ومن النقاط السوابج مراعاتها سرعة إجراء عملية التثبيت بمجرد أخذ العينة بقدر الإمكان حتى لا يتأثر مظهر التركيب المجهرى للنسيج .

التثبيت Fixation

أفضل محلول تثبيت لنسيج معين هو بطبيعة الحال ذلك الذى يحفظ الأنسجة تحت الدراسة على أكمل وجه، والمشكلة هى تحديد هذا المحلول حيث إنها عملية معقدة للغاية، وتتطلب جهداً فائقاً لكثرة المتغيرات التى تحكمها مثل اختيار الجوهر المثبت، ودرجة الحموضة، ودرجة الحرارة، والفترة اللازمة وغير ذلك من الظروف المصاحبة لإجراء عملية التثبيت، ولا شك أن لنتائج الباحثين السابقين أهميتها فى هذا الصدد ولكن يبقى على الباحث ذاته تحديد الظروف اللازمة لعينته بالذات .

يستخدم رابع أكسيد الأوزميوم (OsO_4) Osmium tetroxide مع المحلول المنظم Acetate - veronal buffer بكثرة مع المجهر الإلكتروني أكثر من أى مثبت آخر، وإن تعددت المحاليل المستخدمة حديثاً وينصح عادة بمراعاة درجة الحموضة عند ٧,٣ إلى ٧,٥ حيث تؤدي حموضة الوسط إلى ظهور الشوائب فى التحضير، وقد يستخدم البعض أكثر من مثبت على التوالى كاستخدام الدهيدات معينة مثل الجلوتارالدهيد Glutaraldehyde عقب رابع أكسيد الأوزميوم حيث يعطى نتائج تثبيت أفضل .

تجرى عملية التثبيت عادة قريباً من درجة الصفر المئوى، حيث تساعد درجة الحرارة المنخفضة على زيادة حجم الجزء من العينة الذى يتم تثبيته كما تقلل من تسرب المكونات الخلوية أثناء التثبيت .

تحدّد الفترة اللازمة لإجراء التثبيت بالمواءمة بين إتمام التثبيت من جهة وتسرب المكونات الخلوية من جهة أخرى، لذلك يفضل أن تكون الفترة قصيرة ما أمكن، وعموماً تتراوح الفترة المتبعة ما بين ٣٠ دقيقة إلى ساعتين تبعاً لحجم وكثافة العينة .

المحاليل المثبتة Fixatives

(١) مثبت باليد Palade's fixative وهو عبارة عن محلول منظم من ١ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم، وقد شاع استخدامه لسنين عديدة بعد استعماله لأول مرة عام ١٩٥٢، ويعتبر الأساس لكثير من المحاليل التالية له، ويتركب من :

Buffer stock solution	(0.28 M)	
Sodium veronal (sodium barbital)		2.88 gm.
Sodium acetate (anhydrous)		1.15 gm.
Water to make		100 ml.
0.1 N HCl		
Concentrated HCl (36 % , 11.6 M)		8.6 ml.
Water to make		1 liter
Stock OsO ₄	(2 %)	
Crystalline OsO ₄		2 gm.
Water to make		100 ml.

يذوب رابع أكسيد الأوزميوم ببطء عند درجة حرارة الغرفة، لذلك يلزم تسخين الماء إلى درجة حرارة ٦٠° م أو أكثر حتى تذوب السبلورات وتسرع من تكوين المحلول، كما يساعد الرج بشدة أيضاً، وقد يتوفر رابع أكسيد الأوزميوم كمحلول ٢ ٪ فى أنابيب زجاجية (٥ مل) محكمة الغلق، يحفظ هذا المحلول على درجة حرارة الغرفة، أو عند ٤° م، وقد يتغير لون المحلول مع الوقت، عندئذ يستبدل بغيره .

لإعداد مثبت باليد تضبط درجة الحموضة بالمحلول المنظم عند المستوى المطلوب (عادة ٦,٨ - ٧,٦) بإضافة حجم من 0.1 N HCl إلى حجم من المحلول المنظم الأساسى Buffer stock مع مراعاة إضافة الكمية الأخيرة من HCl ببطء مع التأكد من

درجة الحموضة وعند تمام ضبط درجة الحموضة يضاف ماء مقطر بحيث يصبح الحجم الإجمالي $\frac{1}{4}$ ضعف حجم المحلول المنظم الأساسي، يخلط المحلول المنظم المتعادل مباشرة (حتى لا يتبلور) مع حجم مماثل من محلول ٢٪ رابع أكسيد الأوزميوم ليعطى المحلول المثبت النهائي (محلول منظم ١٪ رابع أكسيد الأوزميوم) وتركيبه بإيجاز :

Buffer stock solution	2 vol.
0.1 N HCl to desired pH	2 vol.
Distilled water to make 5 vol.	1 vol.
2 % OsO ₄ stock	<u>5 vol.</u>
Final mixture	10 vol.

(٢) رابع أكسيد الأوزميوم - كلوريد صوديوم OsO₄ - Na Cl

قد يضاف كلوريد الصوديوم لزيادة كفاءة مثبت باليد، حيث يساعد ذلك على الحد من انتفاخ المكونات السليولوزية في بعض الحالات نتيجة لزيادة الضغط الأوزموزي للمحلول، ويضاف لكل ١٠٠ مل مقدار ٠,٦ جم كلوريد صوديوم .

(٣) رابع أكسيد الأوزميوم - سكروز OsO₄ - sucrose

ينصح البعض إضافة ٤,٥ جم سكروز لكل ١٠٠ مل من المثبت، ويعمل السكر على رفع الضغط الأوزموزي للمثبت .

(٤) مثبت دالتون كروم - أوزميوم Dalton's chrome - osmium fixative

يتميز هذا المثبت بانخفاض تسرب المحتويات البروتوبلازمية ، ويتركب من :

4 % K ₂ Cr ₂ O ₇ brought to pH 7.2 with KOH	1 vol.
3.4 % Na Cl	1 vol.
2 % OsO ₄	<u>2 vol</u>
Final mixture	4 vol.

(٥) مثبت لوف كروم - فورمالين Low's chrome - formalin fixative

وينصح باستخدامه في حالة الخلايا ذات الشبكة الإندوبلازمية الكثيفة ويتركب من :

CrO ₂	3 %
Formalin	10 %
Na Cl	0.8 %

(٦) البرمنجنات Permanganate

ويتركب من :

1.2 % stock solution of KMnO ₄	1 vol
Neutralized acetate - veronal buffer	
(كما سبق في مثبت باليد)	1 vol
Final mixture	2 vol.

(٧) مثبت رابع أكسيد الأوزميوم بمحلول منظم من الكوليدين

s - Collidine buffered OsO₄ fixative

يرى البعض أن للمحلول المنظم acetate - veronal buffer بعض العيوب واقترح استعمال الكوليدين (2, 4, 6 - trimethylpyridine) s - collidine بدلاً عنه، حيث إنه أكثر ثباتاً وكفاءة، ويجهز المحلول الأساسي منه كما يلي :

Pure s - collidine	2.67 ml.
Distilled water	50 ml.
N H C l	9 ml.
Distilled water to make	100 ml.

وتبلغ درجة حموضة هذا المحلول الأساسي نحو ٤, ٧ ، ويمكن تعديله بزيادة أو نقص كمية حامض الأيدروكلوريك المستخدمة، ويحفظ المحلول لحين الحاجة ويجهز المثبت بإضافة حجم من المحلول المنظم الأساسي إلى حجمين من ٢ أو ٤ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم في ماء مقطر .

(٨) مثبت الأكرولين Acrolein fixative

يعطى مثبت الأكرولين (Acrylic aldehyde) نتائج طيبة في حالة العينات النسيجية الكبيرة نسيياً، فهو سريع التخلخل جداً، ويعمل إذا استخدم بعده مثبت يحتوى على رابع أكسيد الأوزميوم على حفظ المكونات الدقيقة بصورة جيدة . يستخدم الأكرولين بتركيز ١٠ ٪ فى محلول منظم درجة حموضته ٣,٧ إلى ٥,٧ لمدة ١٥ إلى ٤٥ دقيقة على حرارة الغرفة، ويراعى استعمال هذا المثبت بحرص بالغ لشدة سميته .

(٩) رابع أكسيد الأوزميوم مع محلول منظم فوسفاتى Phosphate buffered OsO₄

يجوز محلول منظم أساسى فوسفاتى كالتالى :

Phosphate buffer stock solution (0.15 M)

Na H ₂ PO ₄ . H ₂ O	5.85 gm.
Na ₂ HPO ₄	15.25 gm.
Water to make	1 liter

تضبط درجة الحموضة كالمطلوب ثم يذاب ١ جم رابع أكسيد الأوزميوم لكل ١٠٠ مل من المحلول المنظم .

(١٠) جليوتار ألدهيد Glutaraldehyde

تعتبر بعض الألددهيدات محاليل حفظ ممتازة للتراكيب الدقيقة، وقد أظهر الجليوتارألدهيد نتائج طيبة فى هذا الصدد، ويحضر كالتالى :

Glutaraldehyde, 25 %	2 vol.
Phosphate buffer stock (0.15 M)	5 vol.
Water	1 vol.
Final mixture	8 vol.

يحفظ المحلول فى الثلاجة، ويدل انخفاض درجة الحموضة عن ٤ إلى عدم وانتهاء صلاحية المحلول، ينصح بمعاملة العينة بعد هذا المثبت بمحلول منظم دون جليوتارألدهيد، ثم استخدام أحد أنواع المثبت رابع أكسيد الأوزميوم، أحياناً تكتسب العينة صلابة وتكون القطاعات ممزقة - فى هذه الحالة يخفض تركيز الجليوتارألدهيد إلى ٢ ٪ مع امتداد فترة التثبيت حتى يتم الحصول على أفضل النتائج .

إجراء عملية التثبيت Fixation procedure

توضع العينة بعد الحصول عليها مباشرة فى قطرة من المثبت على رقائق شمع مساحتها ٥,٧ × ١٥ سم وبسمك ٢ مم، وهى متوفرة بالمستودعات البيولوجية . تقطع العينة إلى أجزاء صغيرة بحجم ١ مم فى حالة رابع أكسيد الأوزميوم ، وتزيد إلى عدة ملليمترات إذا استخدم أحد الألدهيدات، يمكن التقاط هذه الأجزاء بملقعة صغيرة Spatula أو قطعة شريطية من الورق ، وتوضع فى زجاجة تحتوى على ١ مل أو أكثر من المثبت على درجة صفر إلى ٤° م.

التجفيف والظمر Dehydration and Embedding

يلزم بعد تمام عملية التثبيت لأنسجة العينة إجراء عمليتى التجفيف والظمر (الصب فى القالب) . ويقصد بالتجفيف تمرير الأنسجة خلال سلسلة من الكحولات يتزايد تركيزها حتى الوصول إلى الكحول المطلق، ويتم الظمر بعد ذلك خلال مواد خاصة مثل ميثاكريليت Methacrylate ، وراتنج إيكسى Epoxy resin والجيلاتين Gelatin - يؤخذ على الميثاكريليت الانكماش عندما يتبلر كما يحدث أضراراً بالتركييب الدقيقة، لكنه يتميز بقدرته على تخلل أنواع عديدة من الأنسجة كما يسهل القطع خلاله . ينكمش راتنج إيكسى بدرجة أقل ويحافظ على التراكيب الدقيقة، لكنه يتخلل بعض الأنسجة بصعوبة، وغالباً ما يكون القطع خلاله أصعب من الميثاكريليت، ويستخدم الجيلاتين عندما تكون معاملة العينة بالمذيبات العضوية غير مرغوب فيها .

المواد المستخدمة Materials

يفضل بعد التثبيت شطف العينة لفترة قصيرة للتخلص من الزائد من المثبت، فى حالة محاليل رابع أكسيد الأوزميوم (رقم ١ ، ٢ ، ٣ ، ٧ ، ٩) والبرمنجنات (رقم ٦) والأكرولين (رقم ٨) والجلوتارألدهيد (رقم ١٠) يستعمل محلول منظم متعادل مخفف لنصف التركيز بماء مقطر ، مع وجود نفس الكمية من كلوريد الصوديوم أو السكروز كما هو مستخدم مع المثبت . وفى حالة المحاليل الأخرى يستعمل إما محلول يمثّل المثبت ، لكنه خالٍ من الجوهر المثبت أو محلول كلوريد صوديوم له ذات التركيز .

سلسلة الكحولات

٥٠ - ٧٥ - ٩٥ - ١٠٠ ٪ كحول إيثايل في الماء .

يراعى خلو الكحول المطلق من الماء تماماً Anhydrous ويحفظ في زجاجات محكمة الغلق .

ميثاكريليت Methacrylates

يمكن خلط كل من Acrylic resins n-butyl مع Methyl - methacrylate بنسب مختلفة لإنتاج قوالب مختلفة الصلابة، وخصائص التقطيع؛ ومن المفضل أن تكون صلابة بيئة التشرب متناسبة مع صلابة العينة المظورة، حيث يصاحب عدم تناسبهما معاً صعوبة في الحصول على قطاعات متماثلة - ويتوفر عديد من المواد التجارية بأسماء مختلفة تستعمل كبيئة للظمر أو كمواد مساعدة لهذه العملية .

إيبون Epon

تتوفر راتنجات الإيبكسي Epoxy resins تجارياً بالاسم إيبون Epon وهي ذات كفاءة مرتفعة، توضع العينة المطلوب إجراء عملية الظمر لها على سطح مخلوط إيبون حديث معبأ داخل كبسولة جيلائين، تستقر معظم العينات بقاع الكبسولة قبل أن يتصلب الإيبون، ويتم نقل العينة بواسطة عصا خشبية دقيقة، أو ملعقة صغيرة .

يتصح باستخدام أنابيب زجاجية رخيصة عند غمر العينات في مخلوط الإيبون للتخلص منها بعد إتمام هذه العملية، فذلك أفضل من تنظيفها، وإن لزم التنظيف تغمر الزجاجيات عقب استعمالها مباشرة في الأستون وقبل أن يتصلب الإيبون، ثم تغسل بالوسائل المعتادة بعد ذلك .

عقب تصلب الكبسولة يرفع عنها الغطاء (إن وجد) وتوضع في ماء دافئ لبضعة دقائق حتى يصير الجيلاتين رخواً ويسهل التخلص منه، وتكون القوالب معدة للاستعمال، وينصح دائماً بإزالة الجيلاتين قبل حفظ القوالب مهما طاللت الفترة منعاً لنمو الفطريات على الجيلاتين إذا ما توفرت رطوبة .

صبغ قوالب العينات والقطاعات الثلجية

Staining tissue blocks and frozen sections

تعمل صبغة الأنسجة بالمعادن الثقيلة على زيادة التباين بالصور الإلكترونية، ويفضل ذلك بصفة خاصة مع التراكيب ذات اللويقات مثل شعرة القطن .

يعطى Phosphotungstic acid (PTA) نتائج طيبة فى صبغة قوالب العينات، ومن الطرق البسيطة فى هذا الصدد استخدام كحول مطلق يحتوى على ١ ٪ PTA فى المراحل الأخيرة من التجفيف ولمدة ساعة، وتستكمل الخطوات كالمعتاد .

فحص الخلية بالمجهر الإلكتروني Ultrastructure of the cell

يهدف الميكروتكنيك إلى إعداد نسيج ما متضمنًا ما تحويه خلاياه بصورة تناسب الفحص المجهرى بعد ذلك، لكن عادة ما يتطلب الأمر المزيد من المعرفة عن التركيب الدقيق لهذه الخلايا كما تشاهد بالمجهر الإلكتروني، وفى هذا المجال يبدو منطقيًا الإشارة إلى خلية نموذجية Typical cell وإن كان ذلك غير متاح عمليًا حيث يتطلب الأمر دراسة كل نمط من الخلايا على حدة - ومع ذلك فسقد أمكن مشاهدة عضيات معينة فى عديد من الخلايا وهذه تعتبر من الملامح العامة لكل الخلايا بالكائنات الحية الراقية فى مملكة النبات ومملكة الحيوان أهمها ما يلى :

The cell membrane (CM) الغشاء الخلوى

وهو الحائل الرئيسى بين كل من البيئة الداخلية والخارجية للخلية، ويتولى حماية السيتوبلازم كما يتحكم فى الاتصال بالوسط الخارجى للخلية، وغالبًا ما يرى من خلال المجهر الإلكتروني على هيئة خطين كثيفين متوازيين يغلفان فراغًا إلكترونيًا شفافًا .

The nucleus (N) النواة

تنفصل النواة عن السيتوبلازم بغشاء نووى مزدوج، بداخلها النوية Nucleolus التى تحتوى على تركيز مرتفع من RNA والنوية كبيرة جدًا فى الخلايا النشطة فى تمثيل البروتين، وتحتوى نقاط الكروماتين على تركيز مرتفع من DNA .

الشبكة الإندوبلازمية The endoplasmic reticulum

قد تكون الشبكة الإندوبلازمية ناعمة أو قد يحدها ريبوسومات Ribosomes ، تصاحب الشبكة الإندوبلازمية غير المحيية الخلايا التي تمثل الجليكوجين (فى الكبد) بينما تصاحب الشبكة الإندوبلازمية المحيية تمثيل البروتين .

أجسام جولجي Golgi apparatus (GA)

تشاهد بالخلايا التي تقوم بالإفراز .

الميتوكوندريا The mitochondria (M)

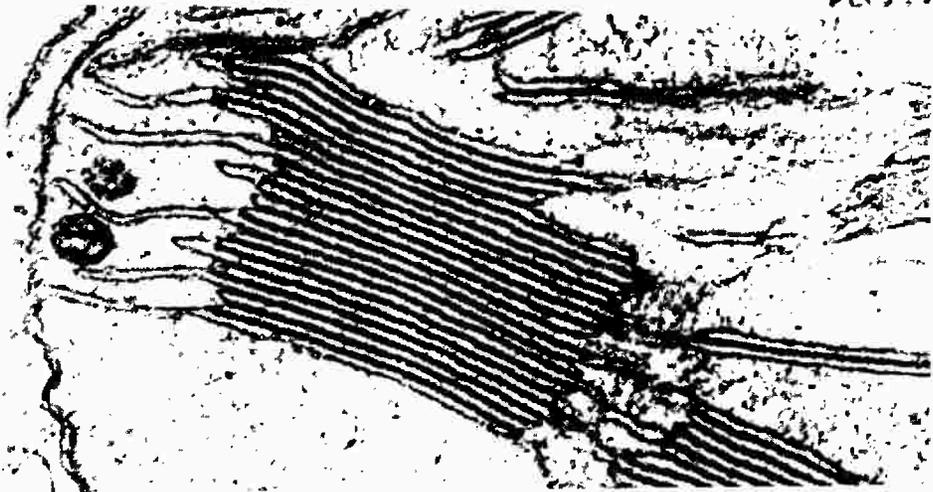
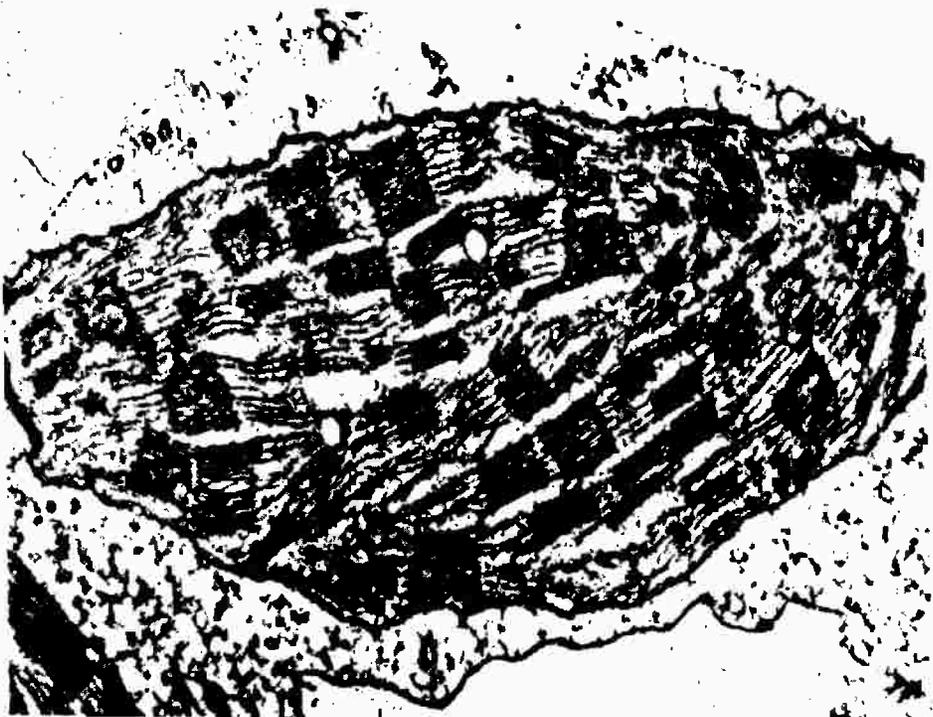
تحتوى على إنزيمات الأكسدة، وتمثل مواقع انتقال الطاقة المستخدمة ATP فى الخلية .

وبصفة عامة يتحلى كل نوع من الخلايا بخصائص تركيبية محددة تميزه عما سواه، ويلزم للدارس الإلمام بالتركيب الدقيق لمختلف أنواع الخلايا حتى يتسنى له فحص التركيب الخلوى للعينات تحت الدراسة ، كما تشاهد بالمجهر الإلكتروني .

تمثل الأشكال (٢٤-١١) و (٢٥-١١) و (٢٦-١١) و (٢٧-١١) أجزاء نباتية مختلفة ، كما تظهر عند فحصها بالمجهر الإلكتروني .

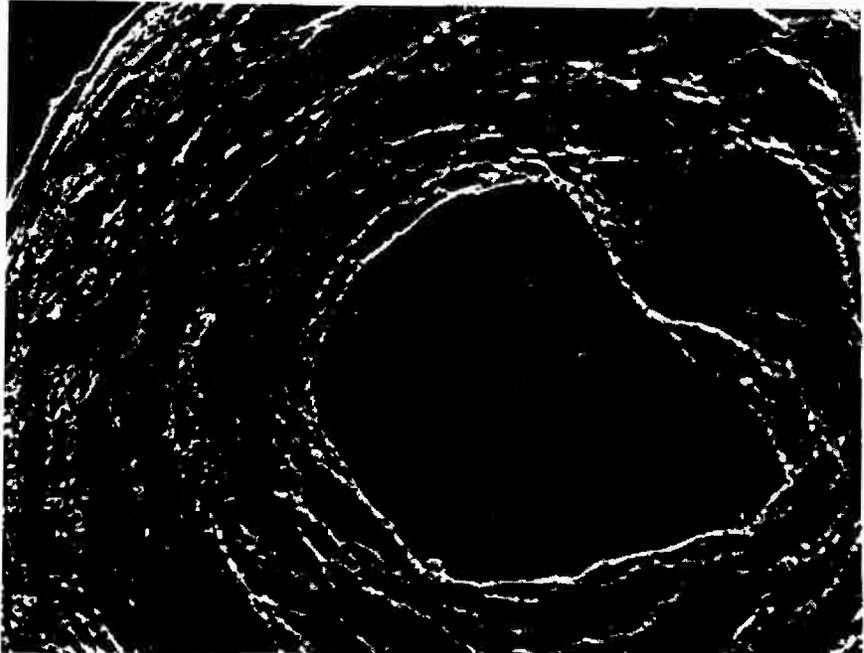
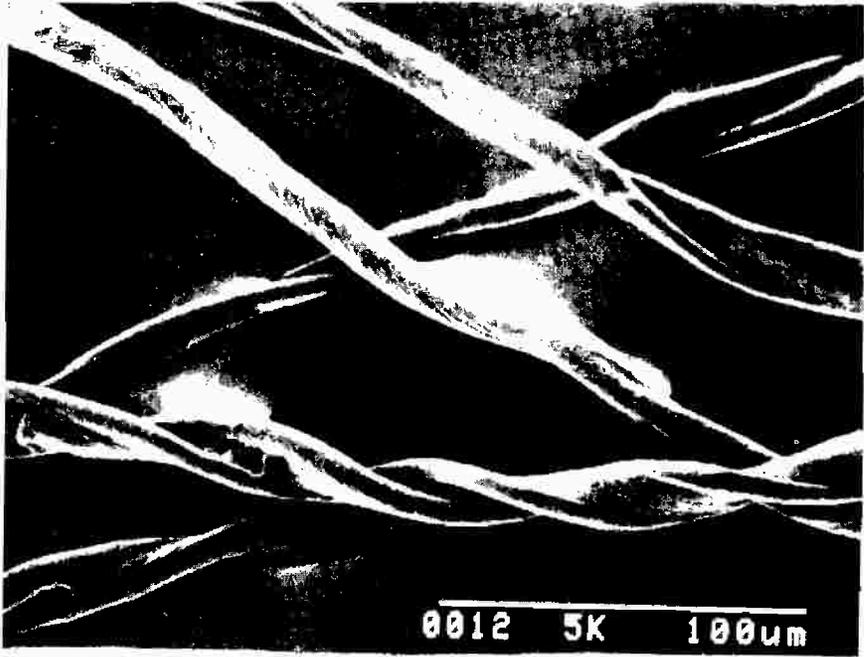


شكل (١١-٢٤) : تفاصيل تركيب خلية من قطاع عرضي في قمة الجذر كما تبدو بالمجهر الإلكتروني المتخلل حيث: (n) النواة - الشبكة الاندوبلازمية - (m) الميتوكوندريا - (ga) جسم جولجي - (a) بلاستيدة - (nd) ثقب في غشاء النواة (X 6000).

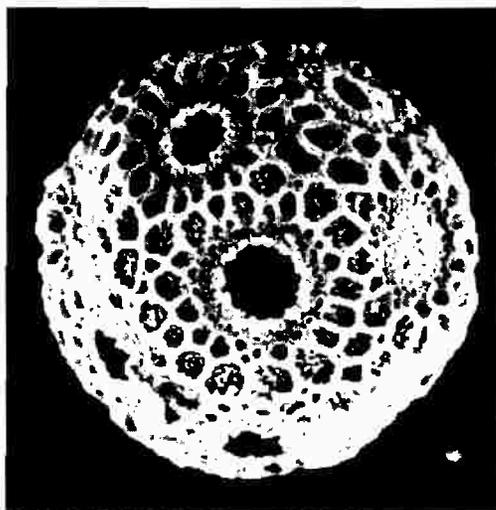


شكل (١١-٢٥) : تفاصيل تركيب البلاستيدة الخضراء ، كما تظهر عند الفحص بالمجهر الإلكتروني المتخلل.

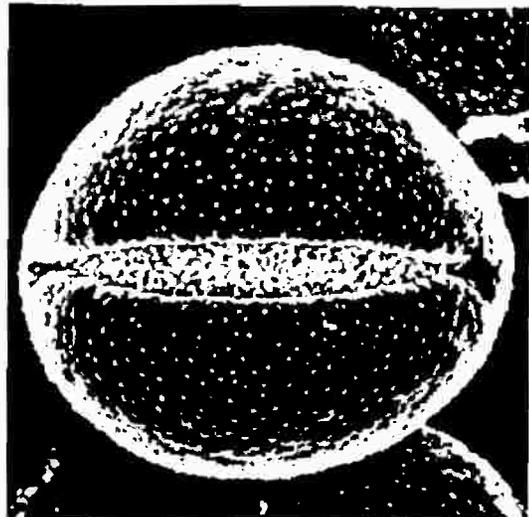
- إلى أعلى بلاستيدة كاملة تحاط بغشاء مزدوج يغلف Stroma تحوى على Grana متصل بعضها بواسطة أغشية رقيقة (X 30.000) .
- إلى أسفل جزء مكبر من البلاستيدة يوضح أغشية Thylakoids مرتبة على هيئة أسطوانة قصيرة Granum وهذه تتصل بغيرها بالأغشية الرقيقة - لاحظ القطرات الزيتية كأجسام مستديرة كثيفة (X 88000) .



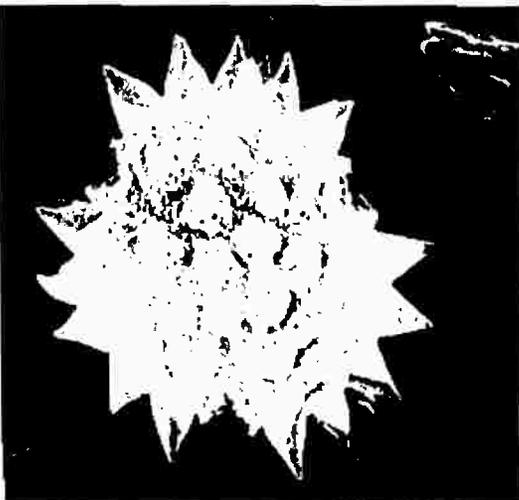
- شكل (١١-٢٦) : تفاصيل تركيب شعرة القطن ، كما تظهر عند الفحص بالمجهر الإلكتروني .
- إلى أعلى : منظر عام بالمجهر الإلكتروني المساح (X 500).
 - إلى أسفل : قطاع عرضي بالمجهر الإلكتروني المتخلل (X 3740).



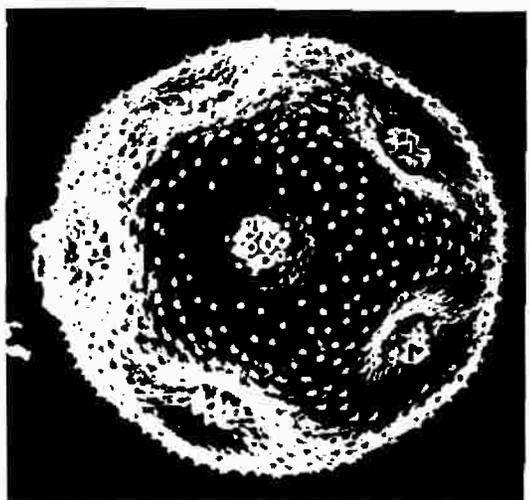
A



B



C



D

شكل (١١-٢٧) : تفاصيل تركيب جدار حبوب اللقاح لإظهار بعض أشكال زركشة الجدار، كما تبدو عند الفحص بالمجهر الإلكتروني المساح.

(بولد وآخرون. Bold et al. ١٩٨٧)

(A) *Opuntia lindheimeri* (X 1600)

(B) *Cometes surattensis* (X 2100)

(C) *Pelucha trifida* (X 2000)

(D) *Cerastium alpinum* (X 1000)

رابعاً : أنواع المجهر الحديثة

تطلق كلمة مجهر على أنواع عديدة من المجاهر دون عدسات زجاجية ، خلاف المجهر الإلكتروني المتخلل والمجهر الإلكتروني المساح واتحادهما ، وهي تستخدم لتحقيق أغراض محددة ، تضم هذه الأنواع ما يلي :

Thermal emission microscope

Field ion microscope

Mirror electron microscope

Scanning acoustic microscope

Scanning laser acoustic microscope

X - ray microscope

Scanning tunnelling microscope

الراجح

المراجع

أولاً: المراجع العربية

- محاضرات مقرر ميكرو تكتيك نباتي (دراسات عليا)
عبد المجيد زاهر - قاسم فؤاد السحار - محمد عبد العزيز نصار
قسم النبات الزراعى - كلية الزراعة - جامعة القاهرة .
مقدمة علم الحياة العملى (الجزء الأول)
نبيه عبد الرحمن باعشن و أحمد جمال الغزاوى (١٩٨٥)
كلية العلوم - جامعة الملك عبد العزيز - جدة .

ثانياً: المراجع الاجنبية

- Barnett, H.L. and B.B. Hunter (1987).
Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th. Edit.)
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 225 pp.
- Bold, H.C.; C.J. Alexopoulos and T. Delevoryas (1987).
Morphology of Plants and Fungi (5th. Edit.)
Harber & Row Publishers. 912 pp.
- Gilman J.C. (1957).
A Manual of Soil Fungi (2nd. Edit.)
Iowa State University Press. 450 pp.
- Hanausek, T.F. (1907).
The Microscopy of Technical Products.
John Wiley & Sons. London. 471 pp.
- Hanlin, R.T. (1990).
Illustrated Genera of Ascomycetes.
American Phytopathological Society. 218 pp.

-
- Jackson, G. (1926).
Crystal Violet and Erythrosin in Plant Anatomy.
Stain Tech., 1 : 33-34.
- Richards, O.W. (1959).
The Effective Use and Proper Care of the Microtome.
American Optical Co. Buffalo, U.S.A. 92 pp.
- Radford, A.E.; W.C. Dickison; J.E. Massey and C.R. Bell (1974).
Vascular Plant Systematics.
Harber & Row Publishers, 891 pp.
- Sass, J.E. (1961).
Botanical Microtechnique (3rd. Edit. Reprinted)
Iowa State University Press, Ames. 228 pp.
- Sorvall, I. (1965).
Thin Sectioning and Associated Technics for Electron
Microscopy (2nd. Edit.)
Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Connecticut, U.S.A. 113 pp.
- Stace, C.A. (1984).
Plant Taxonomy and Biosystematics.
Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 279 pp.
- Willey, R.L. (1971).
Microtechniques.
A Laboratory Guide.
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 99 pp.
- Wiese, M.V. (1977).
Compendium of Wheat Diseases.
American Phytopathological Society. 106 pp.

Ames Lab-Tek (1965).

Operating Manual, Tissue-Tek
Microtome – Cryostat.
Ames Company, Inc. Westmont, Ill. 34 pp.

Carolina Catalog 64 (1994).

Biology / Science Materials.
Carolina Biological Supply Company
2700 York Road, Burlington, N (27215 – 3398).
P.O.Box 187, Gladstone, OR 97027–0187, U.S.A.

Carl Zeiss, Germany

Geschäftsbereich Mikroskopie Marketing Service
Postfach 1369/1380
D. 7082 Oberkochen

Ernst Leitz GMBH,

D-6330 Wetzlar, Germany

Nikon, Japan.

Nippon Kogaku K.K.
Fuji Bldg. 2-3, Marunouchi 3-chome, Chiyoda Ku.
Tokyo 100.

Philips, Eindhoven – The Netherlands

Schotanus, B.: Electron Microscopy, What is it ?