١١ . المجهر
Microscope

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

يعتمد الفحص التفصيلى الدقيق لتركيب الخلايا على ثلاثة أسس رئيسية :

(١) التكبير Magnification ويعتبر وسيلة لزيادة الحجم الظاهرى للشىء 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 نسبيًا 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 مجهريًا يتم تثبيتها وصبغها، حيث تختلف قابلية أجزاء العينة للصبغات وبالتالى يمكن إكساب الأجزاء المختلفة للعينة ألوانًا متباينة يسهل معها التفرقة فيما بينها .

ولقد فتح اختراع المجهر الإلكترونى أفاقًا 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 الإلكترونى إلى نحو مليون ضعف الحجم الطبيعى .

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

أساسيات الفحص المجهرى

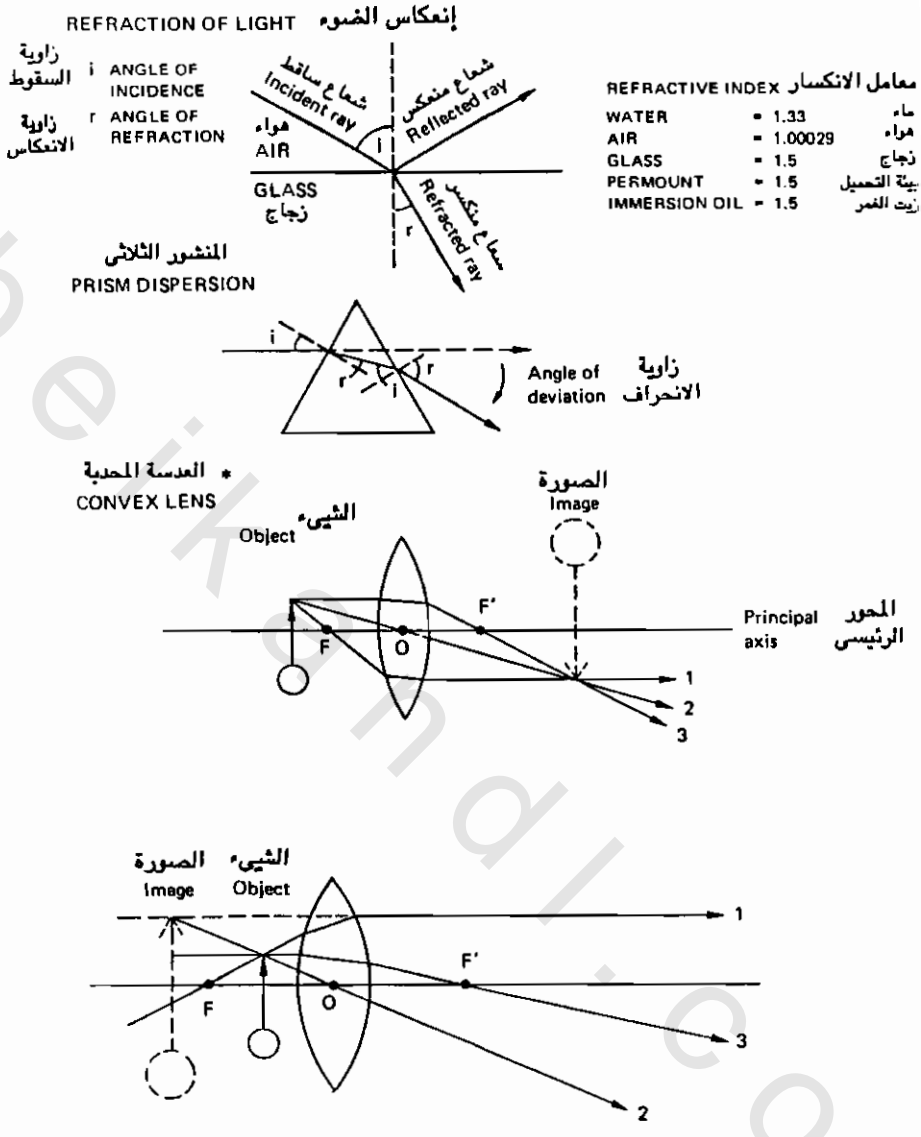
البصريات Optics

يتركب الضوء من موجات كهرومغناطيسية Electromagnetic waves ذات أبعاد محددة تتحرك فى خط مستقيم وتنكسر على هيئة زاوية (شكل ١١-١) . تختلف سرعة الضوء تبعًا للوسط الذى يتحرك خلاله، ويعبر معامل انكسار الوسط عن نسبة سرعة الضوء فى الفراغ إلى سرعته فى وسط معين، ومعامل الانكسار للهواء ١,٠٠٠٢٩ بينما معامل الانكسار للزجاج (العدسات والشرائح وأغطية الشرائح) ١,٥ تقريبًا، فإذا ما انتقل شعاع ضوئى من وسط معامل انكساره منخفض (مثل الهواء ١,٠٠٠٢٩) إلى وسط له معامل انكسار أكبر (مثل الزجاج ١,٥) فإن سرعته تتغير مما يؤدى إلى تغيّر اتجاهه وبالتالى ينكسر (أو ينعكس) الشعاع الضوئى، كما هو موضح بالشكل (١١ - ١) .

يحتوى المجهر عادة على عدسات محدبة تستفيد من خصائص انعكاس الضوء والتى تؤدى إلى تجمع أو تشتت الأشعة الضوئية تبعًا 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 المشتته بواسطة قرنية وعدسة العين. وترجع أهمية العدسة المحدبة بالمجهر إلى قدرتها على تكوين الصورة على كلا جانبى العدسة وتكبيرها فى كلتا الحالتين .

بصريات المجهر الضوئى Optics of the light microscope

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



* ١ - يظهر أى شعاع مار بنقطة البؤرة موازيًا للمحور الرئيسى.

٢ - لا ينحرف أى شعاع يمر بالمركز البصرى للعدسة .

٣ - يمر أي شعاع موازٍ للمحور الرئيسى خلال نقطة البؤرة .

شكل (١١-١) : رسوم تخطيطية لهندسة البصريات (ويلى 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 (١١-٢) .

يوضع الجسم AB المطلوب فحصه وطوله L على بعد من الشيئية أكبر قليلاً من بعدها البؤرى fobj 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 الأصلى، 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

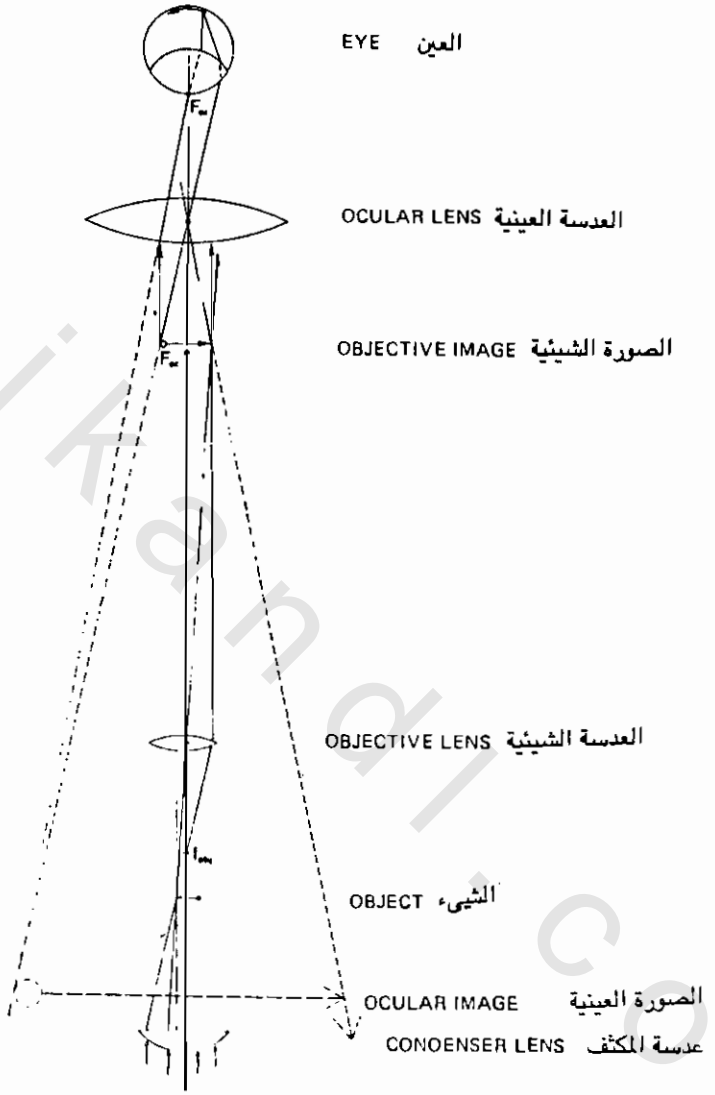
160 / 0.17

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 أغطية شرائح سمكها ٠,١٧ مم .

تتسبب 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 فى المجهر الضوئى باستعمال نظام العدسة المفردة (ويلى Willey ١٩٧١) .

خصائص العدسات الشيئية Objectives

(١) التكبير Magnification

تتراوح قوة تكبير العدسات الشيئية ما بين 3.2 X حتى 100 X ولاتختص 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 Xوالقوة الأكثر استخدامًا فى العدسات الشيئية هى 10 X .

(٢) مسافة الشغل Working distance

هى المسافة بين غطاء الشريحة والعدسة الشيئية، وتكون هذه المسافة ٧ مم فى حالة 10 X و ٠,٦ مم فى حالة 43 X و ٠,٣ مم فى حالة 45 X و ٠,١٣ مم فى حالة 95X.

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 معقدًا، ويحفر عادة على الشيئية رقم معادل الرؤيا Equivalent focus فالشيئية التى لها رقم معادل للبعد البؤرى (E.F.) يساوى ١٦ مم تعطى صورة مساوية فى الحجم للصورة التى تعطيها عدسة بسيطة بعدها البؤرى ١٦ 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 .

مما سبق إذا ذكر أن قوة الشيئية ٤ مم فهذا يعنى أن قوة تكبيرها 40 X تقريبًا، وعلى وجه التحديد 43 X فقد درجت المصانع قديمًا على أن تكتب رقم التكبير مقربًا، وحاليًا يكتب الرقم الصحيح الدال على قوة التكبير حتى يسهل على الباحث حساب مقدار التكبير النهائى للعينة (قوة تكبير الشيئية × قوة تكبير العينية) . كانت قوة التكبير تكتب قديمًا 16-8-4-2mm أما الآن فتكتب 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 رفيعًا سمكًا محددًا وعند استعمال الشيئية الصغرى 10 X نجد أنه عند ضبط الرؤيا على الحافة العلوية لجدار خلية ما تظهر غالبًا 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 لاواحدًا، فإذا قارننا ذلك بما يحدث بالمجهر فإن العدسة الضعيفة تظهر الكروموسوم الرفيع كخيط 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 Numerical aperture (N.A.) وهو العدد الدال على قوة التمييز، وكثيرًا 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 بـه أنه إذا ضبطت الرؤيـة بواسطة العدسـة الصغرى 10 X فإنه عند استعمال الشيئيـة المتوسطة أو الكبرى عـندما تأخذ مكانهـا يجب أن تشاهد الصورة واضـحة بمجرد التغيير، وعند ذلك يسهل ضبط معالم الصـورة باستعمال الضابط الدقيق، أما إذا لم تشاهد الصورة واضحة وكانـت الشيئيات غير مجهزة بـالدقة المطلوبة وتحتاج إلى اسـتخدام الضابط التقريبـى فإن ذلك يعرض العدسات لـلتلف خاصة للمبـتدئ نتيجة لكثـرة خدش أو تكسر الشرائح .

(٧) انواع الشيئيات Objectives

توجد أنواع مختلفة من الشيئيات مثل :

(أ) Achromatic وهى أرخص أنـواع الشيئيات ثـمنًا وتستعمـل فى الأعمال الروتيـنية كالتدريس، ومن خصائـصها تصحيح أخطاء اتجاه لونين من ألوان الـطيف الناشئ عن تحليل الـضوء المخترق لحواف التـحضير أثناء فـحصه ، وكذلك لون مـن الألوان التى تخترق مركز التحضير .

(ب) Apochromatic وهى تصحح أخطاء ثلاثة ألوان حافية Chromatic aberrations وكذلك لونين مركزين Spherical correction وبذلك تظهر الـصورة واضحة لامعة بألـوانها الحـقيقيـة ودون تغيـير فـى شكلـها ، وتعـطى نتائـج ممتازة فـى التصـوير الفوتوغرافى. لكل هذه المميزات فهى غالية الثمـن نتيجة لتركيبها المعقد وقلة العدسات من النوع Fluorite .

(جـ) Fluorite وتسمى كذلك نسـبة إلى معدن الفلوريت الذى يستعمـل ملتحمًا مع نوع خاص مـن زجاج البصـريات، وهذه العـدسات من خـصائصهـا أنها ذات قدرة عـلى تصحـيح الألوان تفـوق النوع Achromatic لذلك تفـضل فى التصوير الفـوتوغرافى ولايوجد منها سوى القوى التى تزيد عن 40 X .

خصائص العدسات العينية Oculars (Eyepieces)

يلزم لمـن يستعمـل المجهر الإلمام بـخصائص العـينيات حتـى يستعـمل منها مـا يلائم

الأغراض المختلفة لـلفحص، ويختار من العينيـات ما يوافق الشيئيات المختلـفة، لكل عدسة عينية بعـد بـؤرى خاص، ولكن المتبع حاليًا هو كتابة قوة التكبير عـليها والـتى تتراوح ما بين 4-30 X .

يمكن حساب قوة العينيـة التى يلزم استعمالها مع شيئية معلـومة القوة ، وتعرف المسافة العددية لها N.A. من المعادلة التالية :

$$\frac{\text{(للشيئية) N.A.} \times ١٠٠٠}{\text{قوة تكبير الشيئية}}$$

فإذا فرض أن شيئية قـوة تكبيرها 43 X و N.A. ٠,٦٥ تكون قوة العيـنية الواجب استعمالها هو :

$$\frac{٠,٦٥ \times ١٠٠٠}{٤٣} = ١٥ \text{ تقريبًا}$$

وعلى ذلك فإن استعمـال الشيئية قوة 43 X واستعمال عيـنية أعلى من 15 X يصبح عديم القيمة إذا تطلب الأمر زيادة قدرة التمييز Resolving power لأنها وصلت إلى حدها الأقصى، ولكنها تفيد فى العد أو الرسم .

ويفيد اسـتعمال المعادلة السـابقة عند شراء العدسـات لعمل التوافيق الـلازمة بين قوى العينيات والشيئات المطلوب شراؤها .

وتوجد أنواع عديدة للعينيات أهمها ما يلى :

(أ) Huygenian :

وتتركـب من عدستين، وهى مـعدة للاستعمـال مع شيئيات مـن النوع Achromatic وتعطى صورًا ضعيفة مع الشيئيات من النوع Apochromatic .

(ب) Compensating :

وهى معدة بحيـث تعوض أى نقص فى تركيب الشيـئيات من النوع Apochromatic

ولذلك تستعمل كل منهما مع الأخرى بحيث تكونا من نفس الماركة ، كما يمكن استعمالها مع شيئيات 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 فى 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 متسعًا 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 مهيئ لتصحيح 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 وبالتالى تصير 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 جانبًا حتى يمكن استعمال العدسة السفلية بمفردها إن تطلب الأمر ذلك، وبالتالى يمكن ملء حقل العدسات الضعيفة بالضوء .

فى المكثف Abbe ذى الثلاث عدسات تكون المسافة العددية N.A. 1.4 ويستعمل مع الشيئيات التى N.A. لها 1.25 ويعد هذا المكثف أحيانًا بحيث يمكن تحريك وإبعاد العدسة أو الاثنتين العلويتين ، وبذلك تصير N.A. 0.70 أو 0.40 بإبعاد عدسة فى الحالة الأولى واثنتين 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 هوائى تساوى ١٠٥، لذلك إذا استعملت شيئية N.A. لها ١,٣٠ فإنه يجب استعمال زيت السيدر ليصل بين الشريحة والشيئية وكذلك بين المكثف والشريحة ليمكن الحصول على الحد الأقصى لقوة التمييز Resolving power .

أحيانًا 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 فى وسط أسود، وأبسط وسيلة لذلك استخدام قرص معدنى 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 خصيصًا لهذا الغرض، وتستعمل هذه الطريقة من الإضاءة فى دراسة الطحالب البسيطة والفطريات، كما تستعمل فى فحص القطاعات غير المصبوغة ويمكن رؤية حركة السيتوبلازم فى 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 ، وهى مقياس صغير منزلق على أداة مدرجة، وأقل قياس يقدره هو ١,٠ مم .

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

قوة التكبير = قوة تكبير العينية × قوة تكبير الشيئية

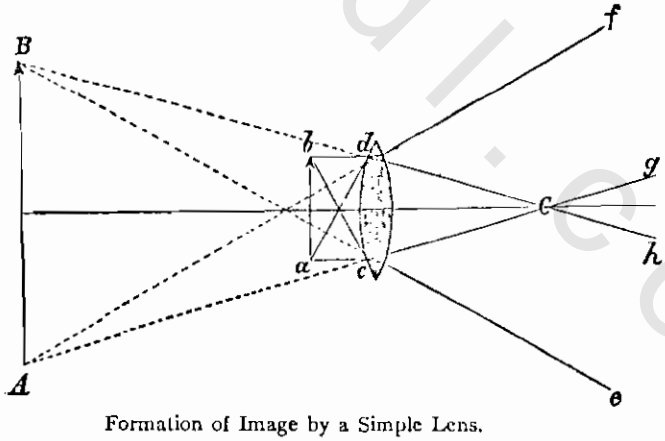
أنواع المجاهر

Microscope types

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

أولا : المجهر البسيط Simple microscope

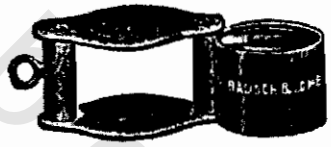
إذا وضع شيئًا ما بين عدسة محدبة الوجهين وبؤرتها تتكون له صورة مكبرة فى موضع بعيداً عن العدسة خلف هذا الشيء، فى الشكل (١١ - ٣) dc عدسة محدبة الوجهين، و ab الشيء، و bd و ac شعاعان موازيان للمحور البصرى، تنكسر الأشعة بواسطة العدسة وتتجمع فى نقطة البؤرة c وتنحرف بعد ذلك إلى g و h حيث تلتقى بشبكية العين، وتنكسر الأشعة ad و bc جهة f و e ثم تلتقى هى 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.

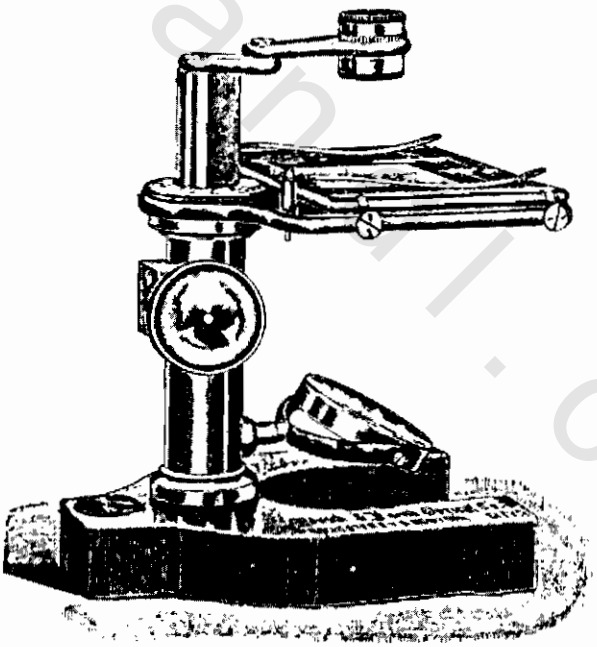
شكل (١١-٣) : كيفية تكون الصورة المكبرة فى المجهر البسيط (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧) .

تعرف العدسة، أو مجموعة العدسات، التى تعطى هذا التكبير بالمجهر البسيط، وتوضع العدسات عادة فى حامل معدنى، أو مطاط قوى، وترتب بطريقة تسمح باستخدام أكثر من عدسة معًا، 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 رأسيًا على ترس للحصول على صورة دقيقة بينما يوضع الشئ المطلوب فحصه على لوحة زجاجية على مائدة وقد يزود بمرآة لتعكس الضوء على الشئ المطلوب فحصه .



شكل (١١-٥): مجهر الفحص الدقيق Dissecting microscope (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

ثانيا : المجهر المركب (الضوئى) Compound microscope

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

تركيب المجهر الضوئى

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

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

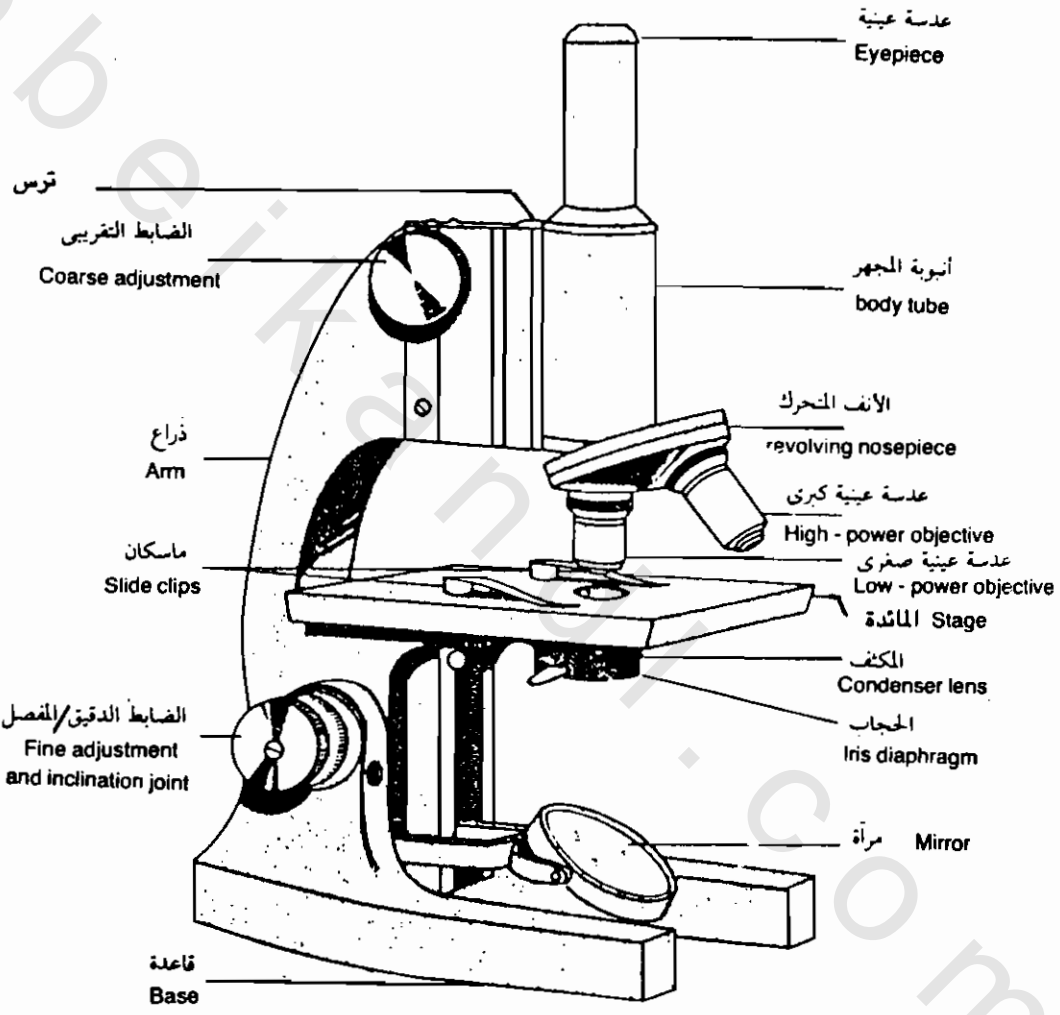
(٢) الذراع Arm : وهى الجزء الذى يحمل منه المجهر عند التداول .

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

(٤) المفصل Joint : ويستخدم فى 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 فى منتصف المائدة ثقب مستدير يسمح بمرور حزمة الضوء خلال العينة المطلوب فحصها، والمائدة مزودة بماسكين Clips صغيرين للتحكم فى وضع الشريحة عند الرغبة فى إمالة المجهر، وقد يوجد ماسك واحد كبير متحرك .



شكل (١١-٦) : المجهر الضوئى (باعشن والغزاوى ١٩٨٥).

(٧) ضابط تقريبى Coarse adjustment : ويستخدم فى تحريك أنبوبة المجهر رأسيًا 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 رأسيًا لمسافات صغيرة جدًا، 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 طبيعيًا باستعمال ضوء الشمس غير المباشر أو صناعيًا بواسطة لمبة كهربائية، ويستغنى عن المرآة فى حالة وجود لمبة كهربائية مثبتة أسفل مائدة المجهر وهو الأكثر شيوعًا .

(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 .

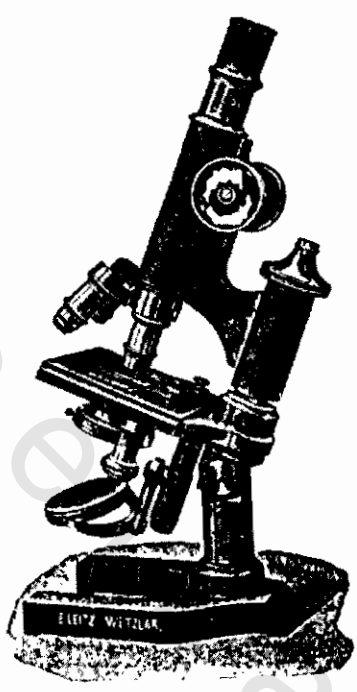
(١١) الحجاب Diaphragm : يثبت أسفل المكثف للمساعدة فى الحصول على أفضل الظروف الضوئية للفحص .

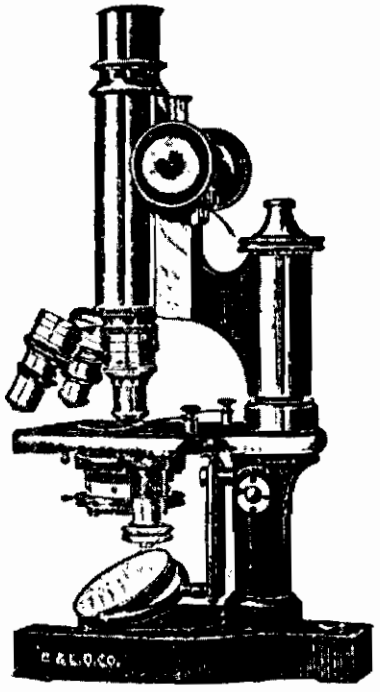
توضح النماذج (شكل ١١-٧ و ١١ - ٨) طرزًا مختلفة للمجهر فى بدايات صناعته وكذلك الطرز الحديثة منه حيث تطورت إمكانيات الفحص به بصورة مذهلة ، وتعددت أشكاله وتقدمت قدراته مما ساعد على قطع أشواط بعيدة فى تعرف التركيب التشريحى للأعضاء المختلفة للنبات وكذلك تسجيل ما يتم فحصه بكاميرات التصوير المجهرى المتقدمة الصنع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

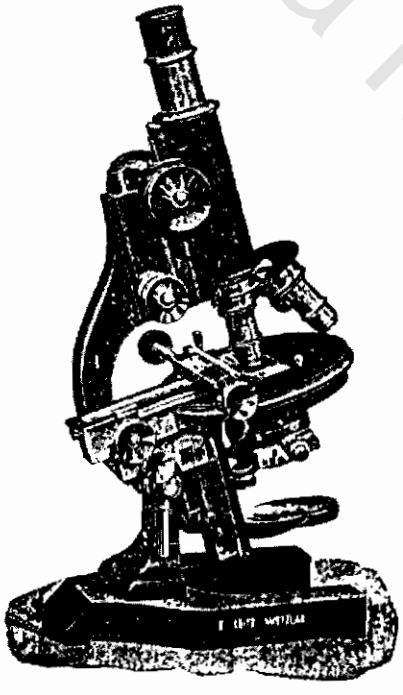
استعمال المجهر الضوئى

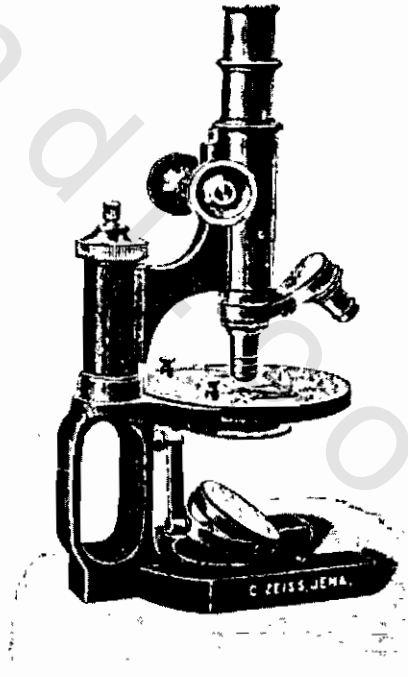
(١) تعامل مع المجهر بعناية ورقة واحذر القوة والعنف عند استخدامه .

(٢) تأكد من نظافة العدسات العينية والشيئية وكذلك المرآة ولا تلمسها بأصابعك بطريقة خاطئة حتى لا تترك عليها أية آثار تعيق الرؤية الواضحة .

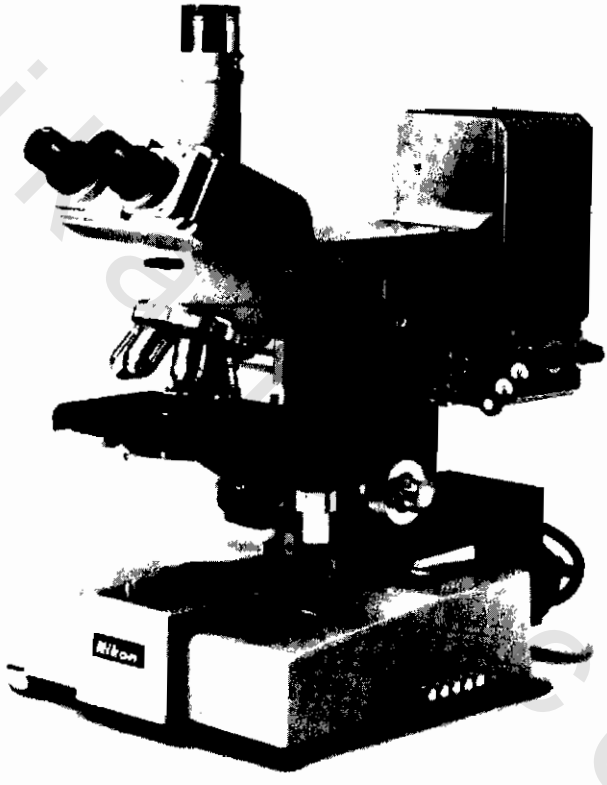








شكل (١١-٧) : بعض طرز المجهر فى بدايات صناعته توضح الشكل الذى كانت عليه الموديلات المختلفة التى سادت آنذاك (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).



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 مثبتًا بالمجهر - ويساعد المكثف والحجاب فى تنظيم الإضاءة حتى تكون الصورة تامة الوضوح .

(٥) عند فحص شريحة مجهزة، تستخدم القوة الشيئية الصغرى (أقل من 10 X) أولاً وتضبط الصورة فى هذه الحالة بواسطة الضابط التقريبى، وإن تطلب الأمر تستخدم بعد ذلك القوة الشيئية الكبرى (أكبر من 10 X) مع استخدام الضابط الدقيق وفى هذه الحالة تأكد من وضع غطاء الشريحة فوق العينة المحضرة فى المعمل .

(٦) احذر جفاف التحضير أثناء الفحص .

(٧) تأكد من فتح عينيك جيدًا خلال الرؤية فى العدستين العينيتين أثناء الفحص .

(٨) بعد تمام الفحص ترفع الأنبوبة بعيدًا عن المائدة ، ثم تسحب الشريحة وينظف المجهر جيدًا .

ملحقات المجهر Microscopic accessories

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

(١) الميكروميتر Micrometer

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

(أ) القطعة العينية للميكروميتر Eyepiece micrometer

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

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

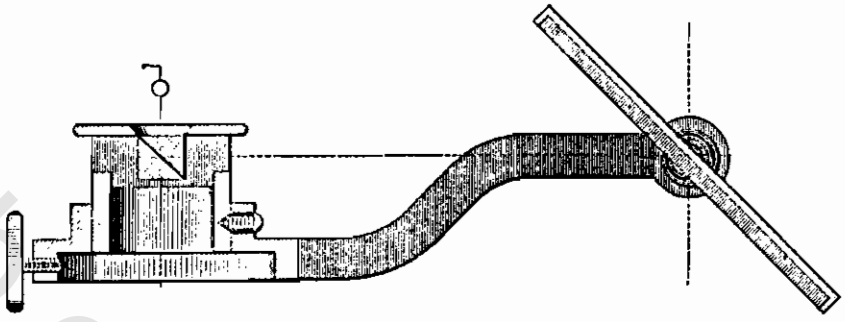
(ب) الشريحة الميكرومترية Stage micrometer

تجرى معايرة Calibration القطعة العينية للميكروميتر 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 للميكروميتر ، التى تقابل عددًا محددًا من أقسام الشريحة الميكرومترية ، وبالتالى يتم تحديد القياس الحقيقى لكل قسم بالقطعة العينية، وتكرر العملية مع كل عدسة شيئية 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 بريمى إلى اليسار وبمساعدة مسمارين قلاووظ، يشتمل المكعب الزجاجى على منشورين ملتحمين معًا، يطلى السطحان القطريان الملتحمان 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 ، والتى 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 .



Abbé Camera Lucida. (ZEISS.)

شكل (١١-٩) : رسم تخطيطى 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 فى ذات الوقت .

وتتبارى مصانع البصريات فى تقديم كل حديث من الملحقات التى تضاف إلى المجهر والتى تساعد الباحثون فى الحصول على أدق وأفضل النتائج .

فحص الشرائح بالمجهر الضوئى Slide analysis by light microscope

لا يقف الأمر عند تحضير شرائح عالية الجودة، بل يلزم فحصها، وإمكانية تعرف أنواع الخلايا فى 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، وعمومًا يمكن اتباع ما يلى :

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

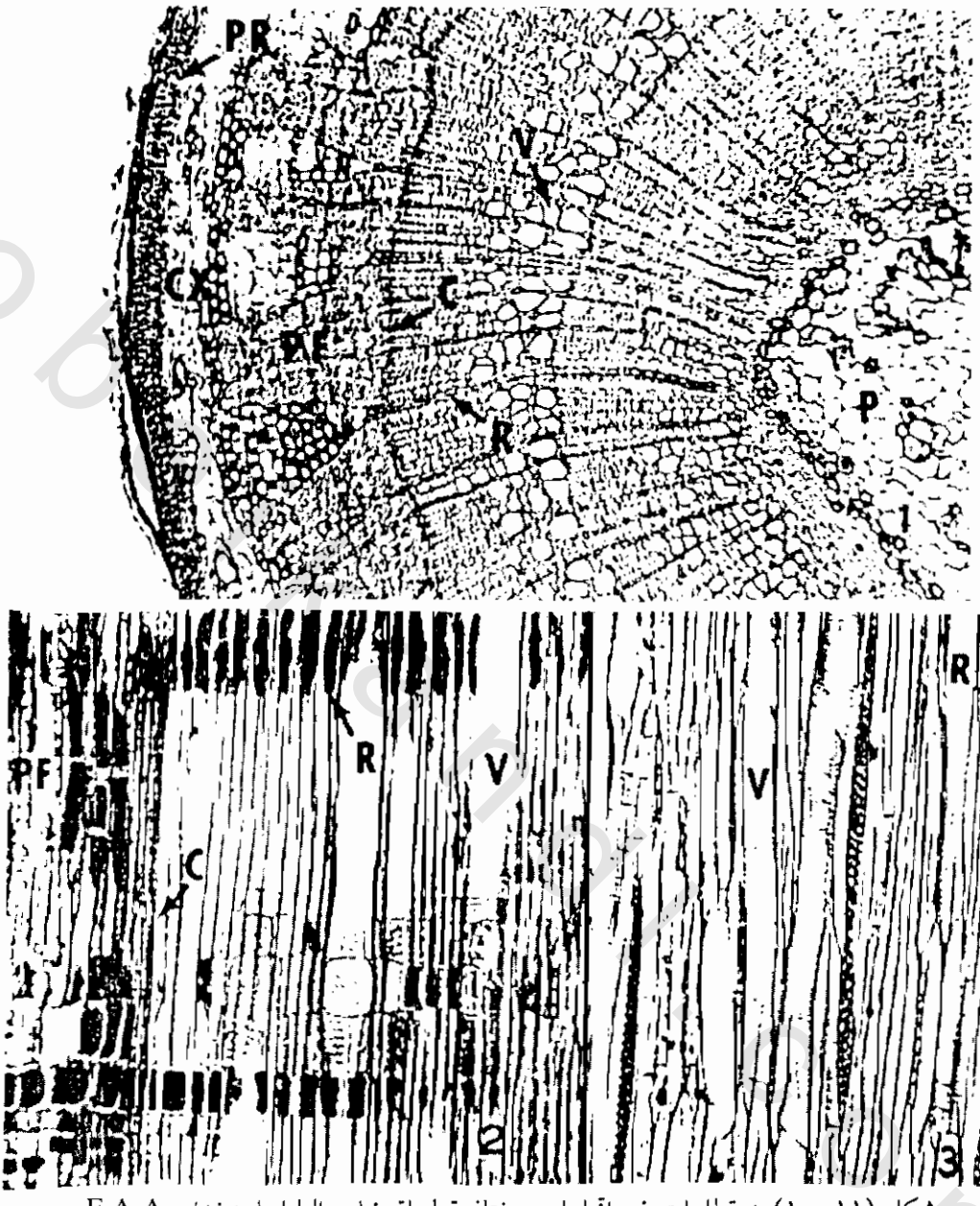
(٢) تلاحظ الاستجابة النوعية لكل طرز من الخلايا لـلصبغات المستخدمة، فعادة ما يتطلب الأمر تحديد المعلومات التى تمدنا بها كل صبغة من مجموعة الصبغات المستخدمة، والتى قد تفيد كذلك فى تحديد وظيفة هذه الخلايا .

(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 لـلصبغة 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 يغتنم الدارس هذه اللحظة لـلوقوف 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 .

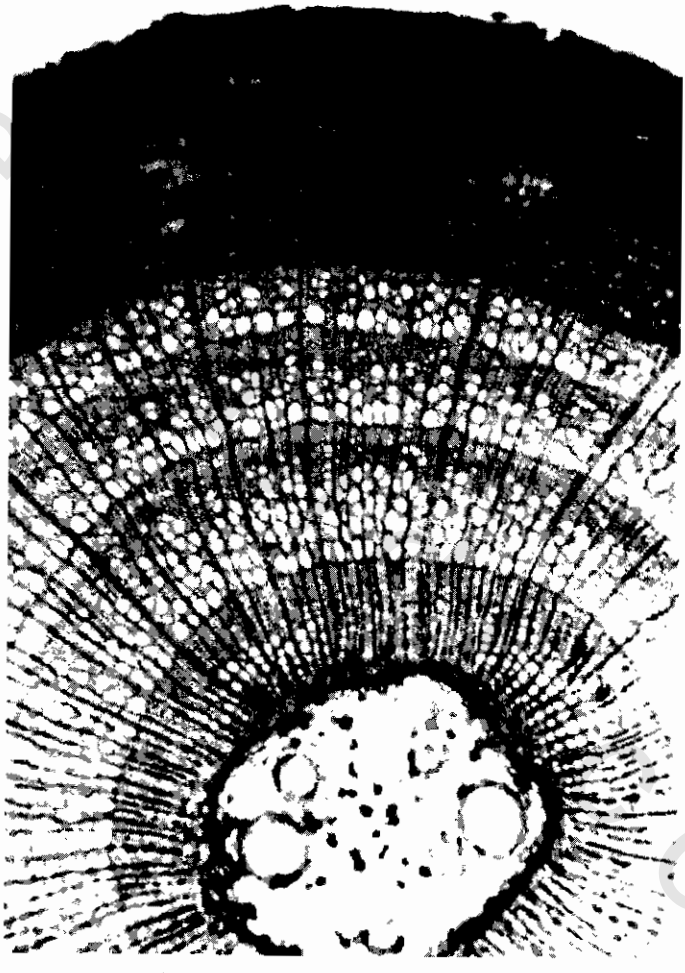
توضح الأشكال (١١ - ١٠) و (١١ - ١١) و (١١ - ١٢) و (١١ - ١٣) و(١١ - ١٤) قطاعات فى ساق وجذر بعض نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين كما تظهر أثناء الفحص بالمجهر . لاحظ المواضع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة ، واختلاف استجابة كل منها للصبغات المستخدمة .



شكل (١١-١٠) : قطاعات فى اتجاهات مختلفة لساق نبات التليا باستخدام F.A.A. وسفرانين - أخضر سريع .

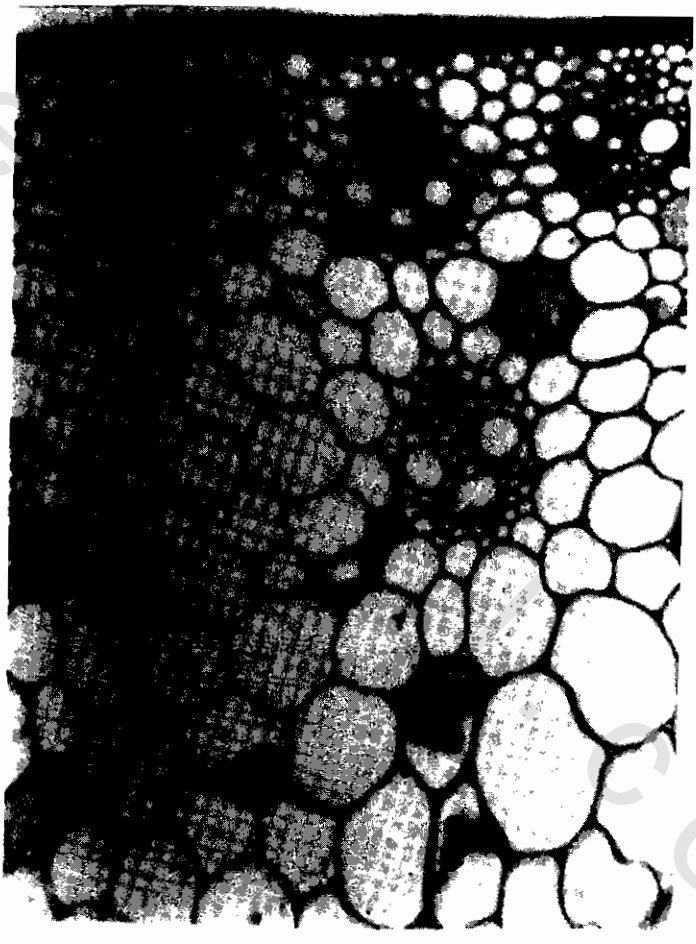
(1) قطاع عرضى X 40. (2) قطاع قطرى X 200 . (3) قطاع مماسى X 200.

(C) كامبيوم - (CX) قشرة - (P) نخاع - (PF) ألياف لحاء - (PR) بريدرم - (R) شعاع وعائى - (V) وعاء خشب (ويلى Willey ١٩٧١).

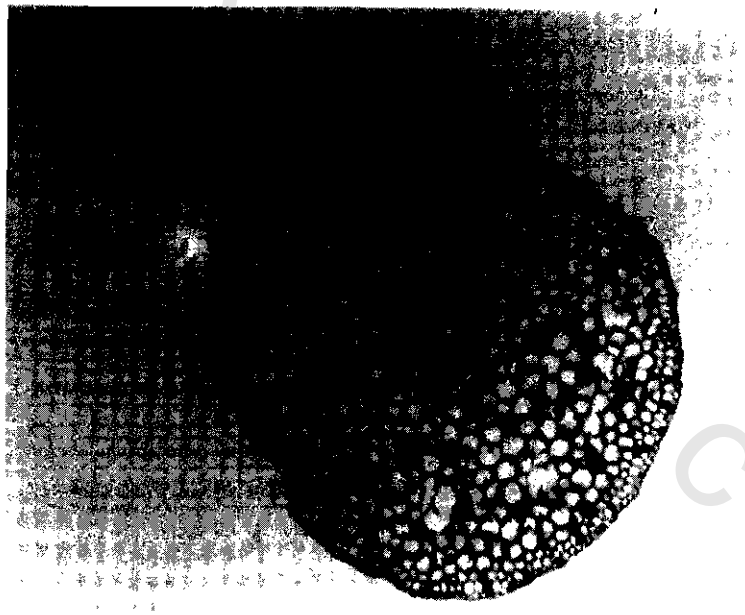


شكل (١١-١١) : قطاع عرضى فى ساق نبات التليا يوضح حلقات النمو السنوية .

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 الفلقة الواحدة.



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

ثالثا : المجهر الإلكترونى
Electron microscope

يمكن للعين المجردة فى وجود إضاءة كافية التمييز بين نقطتين تبعدان عن بعضهما البعض بمسافة ٠,٢ مم أو أكثر كنقطتين منفصلتين ، فإذا قلت هذه المسافة عن٠,٢ 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 فى جريدة بعدسة مكبرة. وكلما زادت قوة التكبير ، زادت قدرتنا على مشاهدة تفاصيل أدق. وعند استخدام المجهر الضوئى (المركب) Light microscope (LM) حيث يتخلل الضوء العينة يمكن التكبير نحو ١٠٠٠ ضعف (1000 X) وبالتالى 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 أيضًا على طول موجات الضوء المستخدم فى الإضاءة، حيث يمكن للمجهر الضوئى أن يكبر الأجسام الدقيقة تكبيرًا يسمح برؤيتها إذا كان الجسم المطلوب تكبيره أكبر من طول موجة الضوء الساقط عليه، وهذا ينطبق أيضًا على دقائق هذا الجسم، حيث يتحتم أن تكون هذه الدقائق أكبر من طول موجة الضوء المستخدم، وهذا لا يتأتى عند فحص الفيروسات مثلاً التى تقل فى أحجامها عن طول أقصر موجة من الموجات الضوئية، ولم يكن استعمال الضوء بالموجات الأقصر (الأزرق أو الفوق بنفسجى) كافيًا للخوض بعمق فى التراكيب الدقيقة، إلى أن اكتشف الإنسان فى العشرينيات من هذا القرن أن الإلكترونات النشطة (أجزاء من الذرة) تسلك فى الفراغ سلوك الضوء، إلا أن طول موجاتها أصغر بنحو ١٠٠,٠٠٠ مرة عن الضوء، وأكثر من ذلك اكتشف أن للمجال المغناطيسى تأثيرًا على الإلكترونات يماثل تأثير العدسات الزجاجية على الضوء المرئى.

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

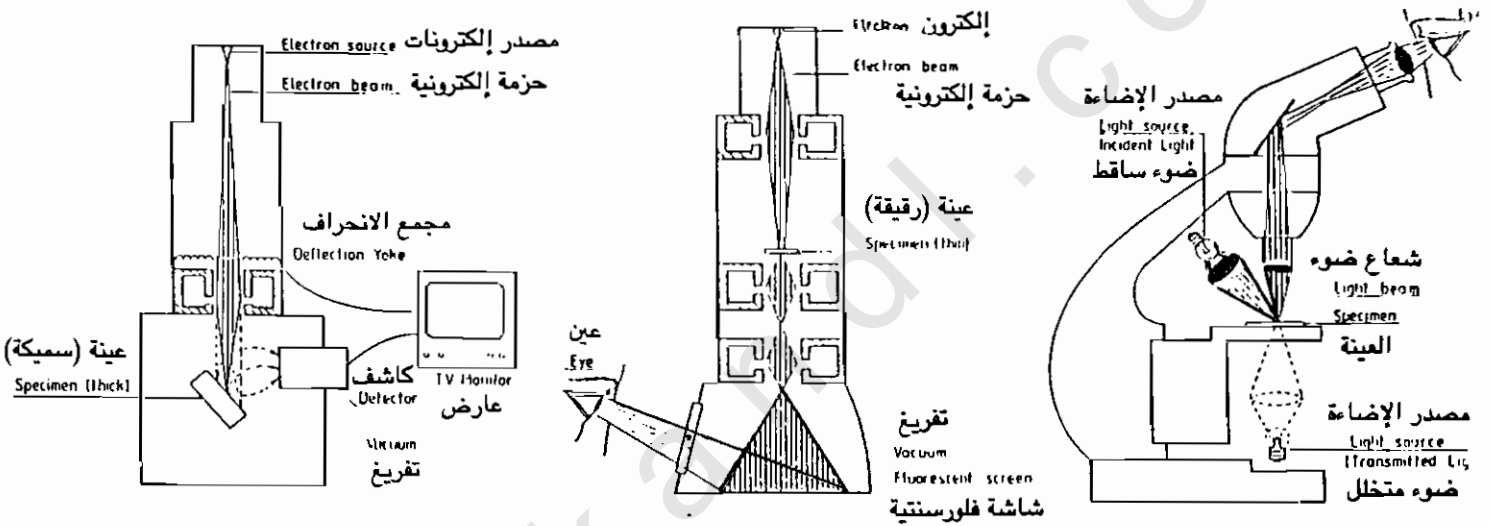
نظام التصوير تعطى قدرة تمييز تصل إلى نحو ٠,٣ نم* وقوة تكبير نحو مليون مرة. وعمومًا يجب أن يتمشى نظام البصريات (الإلكترونات) مع قدرة التمييز المطلوب توافرها للعينة، ويجب أن تكون قوة التكبير على الأقل مساوية لقدرة تمييز العين ، مقسومة على قدرة تمييز النظام المستخدم . (شكل ١١ - ١٥).

يستخدم المجهر ذو الضوء المنعكس Reflected light microscope (RLM) فى دراسة سطح العينة، وفى هذه الحالة أيضًا يكون طول موجة الضوء المستعمل لإضاءة العينة عائقًا للحصول على قدرة تمييزأفضل. وبالتبعية فقد اتجه التفكير إلى الإلكترونات كبديل أفضل من الضوء. عند تحميل العينة رأسيًا فى المجهر الإلكترونى المتخلل TEM إذا ارتطم الشعاع الإلكترونى بالسطح بزاوية صغيرة جدًا تنتج صورة لسطح العينة، ومع ذلك ولأسباب عديدة لم تستخدم هذه الطريقة بصفة عامة لدراسة الأسطح، وأمكن حديثًا فقط تطبيق هذه الطريقة بصورة مرضية فى بعض الدراسات الخاصة (شكل ١١ - ١٥) .

لقد أمكن بنجاح أكبر دراسة الأسطح باستخدام الشعاع المساح بدلاً من الشعاع الثابت مع نظام تصوير خاص - ويعرف فى هذه الحالة بالمجهر الضوئى المساح Scanning electron microscope (SEM) ، ولا يعرف على وجه الدقة من وضع الأسس الأولى للمجهر الضوئى المساح ، ومع ذلك فإن أول وصف نشر لجهاز يستخدم شعاعًا إلكترونيًا مساحًا للحصول على صورة للسطح قام به عالم الطبيعة الألمانى ماكس نول Max Knoll عام ١٩٣٥ ، وتزيد حاليًا قوة تكبير المجهر الضوئى 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 الإلكترونى المساح المتخلل Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) ولقد وصفه أردين Mazred v. Ardenne للمرة الأولى عام ١٩٣٨ ، واستخدم أول جهاز تجارى جمع النوعين معًا عام ١٩٦٩ ، وبقوة تكبير ٦٠٠٠ إلى ١٠٠,٠٠٠ مرة ، وقدرة تمييز ٢٥ نم، وحاليًا 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 .



(جـ) (ب) (أ)

شكل (١١-١٥) : مقارنة بين نظم التقنية المستخدمة فى : (أ) المجهر الضوئى LM والمجهر ذو الضوء المنعكس RLM (قوة التكبير حوالى ١٠٠٠) . (ب) المجهر الإلكترونى المتخلل TEM (قوة التكبير حوالى مليون) . (جـ) المجهر الإلكترونى المساح SEM (قوة التكبير حوالى ٢٠٠,٠٠٠) (شوتانس Schotanus - فيليبس).

المجهر الإلكترونى المتخلل Transmission electron microscope (TEM)

يتركب المجهر الإلكترونى المتخلل من ثلاثة مكونات رئيسية :

(أ) عمود بصرى إلكترونى Electron optical column

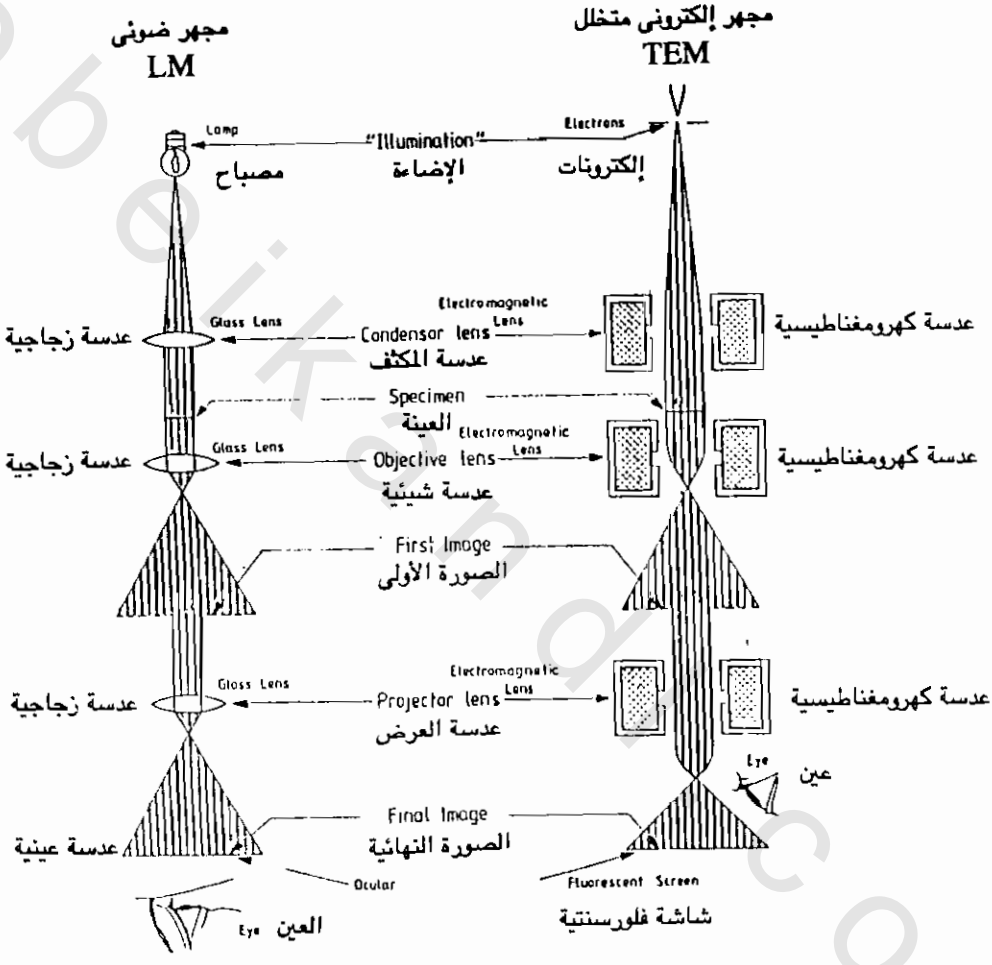
(ب) نظام تفريغ Vacuum system

(جـ) الإلكترونات اللازمة Necessary electronics

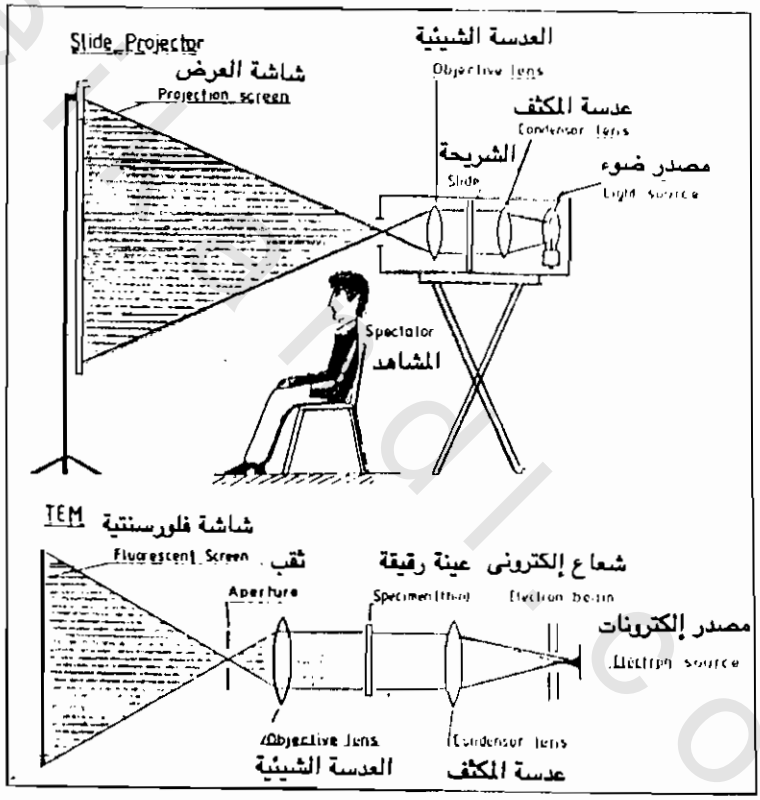
يعتبر العمود المكون الرئيسى بالمجهر الإلكترونى المتخلل ويكون على شاكلة مثيله بالمجهر الضوئى حيث تمر خلاله الإلكترونات والضوء، والفرق بينهما أن مصدر الضوء فى المجهر الإلكترونى هو مدفع إلكترونات Electron gun مزود به العمود، وحيث إن الإلكترونات تكون غير مرئية يتم اعتراضها بشاشة فلورسنتية Fluorescent screen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

وثمة فرق جوهرى آخر أن العدسات الكهرومغناطيسية تختلف، عكس الحال بالنسبة للعدسات الزجاجية، بتغيير التيار خلال ملف العدسات وكذلك الطول البؤرى (الذى يحدد التكبير) بينما فى حالة المجهر الضوئى يلزم تغيير العدسات المستخدمة للحصول على قوة تكبير مختلفة .

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



شكل (١١-١٦) : مسار أشعة الضوء فى المجهر الضوئى LM مقارنة بالإلكترونات فى المجهر الإلكترونى المتخلل TEM (شوتانس Schotanus- فيليبس).



شكل (١١-١٧) : مقارنة بين المجهر الإلكترونى المتخلل TEMوعارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شوتانس Schotanus- فيليبس).

يتركب مدفع الإلكترونات (شكل ١١-١٨) من قطب سالب Cathode وفتيل Filament وما يعرف بالقطب الكهربائى ڤينلت Wehnelt electrode وتعرف هذه الأجزاء فى مجموعها بأسطوانة ڤينلت، إلى جانب قطب موجب Anode يكون الفتيل تنجستين على هيئة دبوس شعر يجرى تسخينه إلى نحو ٢٧٠٠° م وكلما ارتفعت درجة حرارة الفتيل، زاد الناتج من الإلكترونات بواسطة مدفع الإلكترونات، ولهذا الفتيل عمر تحده فترة زمنية معينة، وفى بعض المجاهر يستبدل الفتيل المعتاد (تنجستين على شكل دبوس الشعر) بنوع خاص من البلورات يتم تسخينها، وبصفة عامة كلما زادت كمية الإلكترونات المنبعثة من المصدر المستخدم ، كان قطر الحزمة الإلكترونية صغيرًا وهذا يعطى تميزًا أفضل للعينة. عند توصيل قوة محركة كهربائية موجبة عالية جدًا (من ٢٠,٠٠٠ إلى عدة مئات الألوف فولت) إلى القطب الموجب يمكن الحصول على الإلكترونات من السحابة الإلكترونية حول الفتيل وبعد تجمعها على شكل حزمى بالقطب الكهربائى ، تنشط إلى سرعات تصل إلى عدة مئات الألوف من الكيلو مترات فى الثانية، وتمر خلال ثقب بمنتصف القطب الموجب عن طريق عدسات المكثف لتتخلل العينة (الرقيقة جدًا) والعدسات المكبرة لتصطدم فى النهاية بالشاشة الفلورسنتية ، التى تحول الصورة الإلكترونية إلى صورة مرئية .

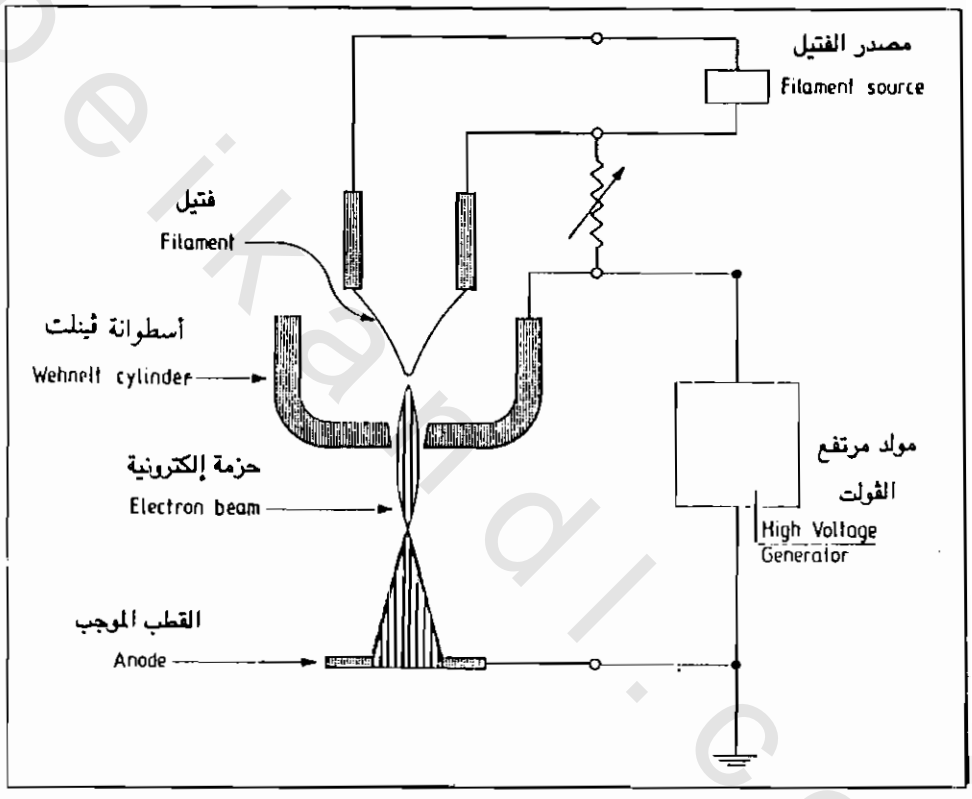
إذا لم تكن العينة رقيقة جدًا فإن الإلكترونات تقف ولا تتكون الصورة، وعادة لا يزيد سمك العينات المختبرة بالمجهر الإلكترونى المتخلل عن نصف ميكرون، كما لا يزيد قطرها عادة عن ٣ مم، لذلك كلما زادت سرعة الإلكترونات ، أو بمعنى آخر كلما زادت سرعة القوة المحركة الكهربائية ، أمكن دراسة عينات أكثر سمكًا .

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 المظهرى Phase contrast بالصورة .



شكل (١١-١٨) : رسم تخطيطي لقطاع مستعرض لمدفع الإلكترونات
(شوتانس Schotanus- فيليبس).

(٣) تنحرف الإلكترونات فى حالة العينات البللورية فى اتجاهات محددة نتيجة للتركيب الشبكى للعينة وهذا يعطى أنماط إنحراف متميزة للعينة .

(٤) تنعكس بعض الإلكترونات المرتطمة بالعينة (إلكترونات مبعثرة للخلف) .

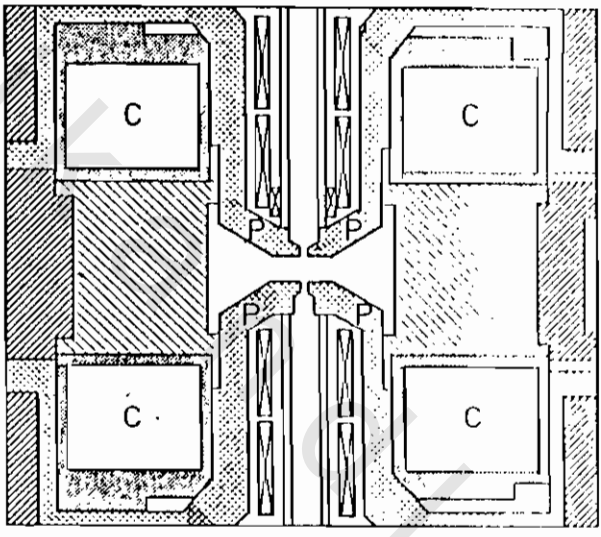
(٥) تقذف العينة ذاتها إلكترونات ثانوية .

(٦) تقذف العينة أشعة سينية ذات طاقة، وطول موجة، ترتبط بتركيب العناصر بالعينة .

(٧) تقذف العينة فوتونات (= ضوء) Cathodo luminescence .

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

يوضح شكل (١١-١٩) قطاعًا مستعرضًا للتركيب الميكانيكى لعدسة كهرومغناطيسية . عند مرور تيار كهربائى خلال الملفات الكهربائية (C) ينتج مجال كهرومغناطيسى بين مايعرف بالقطع القطبية (أ) ، ويمكن تغيير قوة تكبير العدسة بتغيير التيار الكهربائى 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 الكروى عن اختلاف التكبير فى المركز عن الحواف. والزيغ اللونى اختلاف تكبير العدسة باختلاف طول موجة الإلكترونات فى شعاع الإضاءة واللابؤرية Astigmatism حيث تكون صورة الدائرة بيضاوية الشكل .



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

C : ملف كهربائى .

P : قطعة قطب

(شوتانس Schotanus - فيليبس).

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

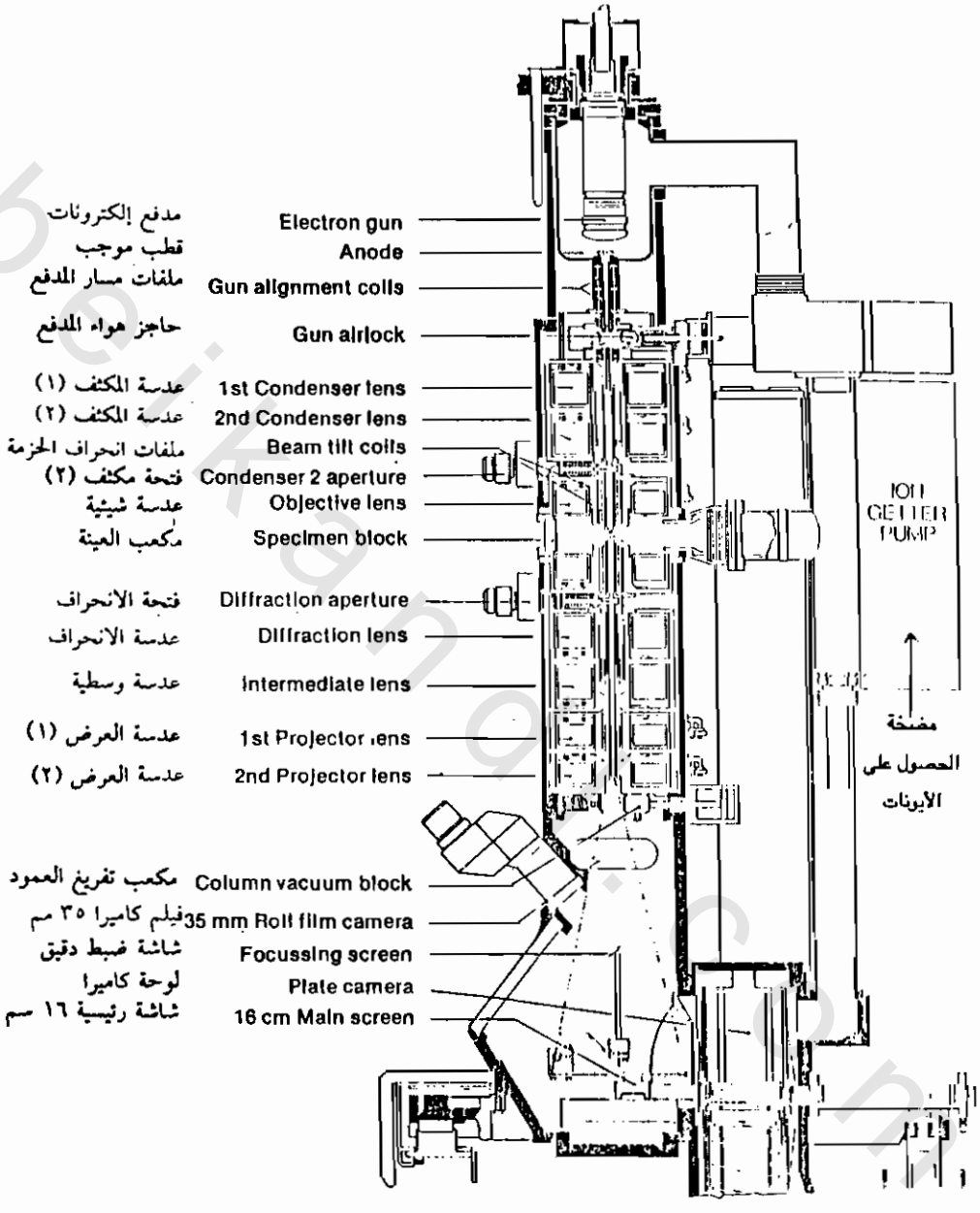
وعادة ما يعقب العدسة الشيئية أربع عدسات، وعدسة انحرافات، وعدسة وسطية، وعدستان للعرض ، وقد تزود العدسات بنظام للتبريد المائى لضمان درجة مرتفعة من الثبات والحصول على أعلى تكبير ممكن .

تمر الحزمة الإلكترونية من الفتيل إلى الشاشة الفلورسنتية خلال سلسلة من الفتحات مختلفة الأقطار، ويجب أن تمنع مرور الإلكترونات التى لا تفيد فى عملية تكوين الصورة. ويمكن من خلال ماسك خاص يحمل أربع فتحات مختلفة التحكم من خارج العمود وتبعًا 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 الفلورسنتية من خلال نوافذ كبيرة فى غرفة العرض. وعند مشاهدة التفاصيل الدقيقة جدًا للعينة، أو عندما تتطلب الصورة ضبطًا دقيقًا يمكن إعتراض الحزمة بشاشة ضبط خاصة ذات حبيبات دقيقة جدًا، وفى هذه الحالة تشاهد الشاشة بواسطة مجهر بسيط Binocular قوة (12 X) عالى 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 وبالتالى للحصول على ما يعرف بالصورة الإلكترونية الدقيقة لا يتطلب الأمر سوى إعداد موضع أسفل عدسة العرض النهائية يوضع به حاملة Cassette بها عدد من اللوحات أو الأفلام الفوتوغرافية، وتقع هذه الحاملة أسفل الشاشة الفلورسنتية. يمكن تسجيل الصورة بإمالة الشاشة بعيدًا، وفى بعض أنواع المجهر المتخلل يمكن وضع فيلم ٣٥ مم بالحاملة. يوضح الشكل (١١-٢٠) قطاعًا عرضيًا بالعمود لمجهر إلكترونى متخلل حديث .



شكل (١١-٢٠) : قطاع عرضى لعمود مجهر إلكترونى متخلل حديث.
(شوتانس Schotanus - فيليبس).

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

يمكن أيضًا مشاهدة الصورة باستعمال شاشة فلورسنتية شفافة (من خارج العمود المفرغ) بواسطة كاميرا تلفزيونية تنقل الصورة إلى عارض تلفزيونى T.V. monitor - ومما لا شك فيه أن هذه الطريقة تكون أفضل إذا أمكن مشاهدة الشاشة الفلورسنتية 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 دائمًا 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 الخامات الفوتوغرافية، أو الفتيل.

يكون نظام التفريغ فى المجاهر الإلكترونية المتحللة الحديثة محكمًا ذاتيًا ، 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 الإلكترونى المتخلل الحالى يتطلب ثبات الفولت والتيار الكهربى المار خلال العدسات، لذلك تشتمل غرفة القوة الكهربية للمجهر الإلكترونى المتخلل الحديث على عدد ملموس من المصادر، وتيار لا ينحرف بأكثر من جزء من المليون من القيمة المطلوبة للدراسة، من أجل ذلك لابد 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 Microprocessorتلعب دورًا حيويًا فى هذا الصدد، ولقد ساعد ذلك على تقليل مفاتيح التحكم ، كما أتاح 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 الإلكترونى 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 الإلكترونى 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 ضغوط ممكنًا بواسطة مقياس زاوية Goniometer يوجد حول العدسة الشيئية، ويوفر مقياس الزاوية الحركة فى الاتجاه الأفقى أساسًا (من خلال قضيبين على جانبى العمود يتحكمان فى حركة العينة) كما توجد مجموعة أخرى من القضبان حول العينة مصممة بطريقة تتيح الحركة فى بقية الاتجاهات .

استخدام المجهر الإلكترونى المتخلل وإعداد العينة

Application and specimen preparation

يمكن استخدام المجهر الإلكترونى 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 ٣ مم) تسمح بوضعها فى عمود المجهر المفرغ، ورقيقة بدرجة كافية (أقل من ٠,٥ ميكرومتر) تسمح بمرور الإلكترونات ولها القدرة على مقاومة كل من التفريغ وتأثير الشعاع الإلكترونى، وتشير الأعداد الكبيرة من الأبحاث المنشورة التى استعانت بالمجهر الإلكترونى إلى مدى أهميته للدارسين فى المجالات البيولوجية والتكنولوجية المختلفة .

كل فرع من الدراسة له طرق متخصصة لتجهيز العينة بالصورة الملائمة للفحص بالمجهر الإلكترونى، 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 .

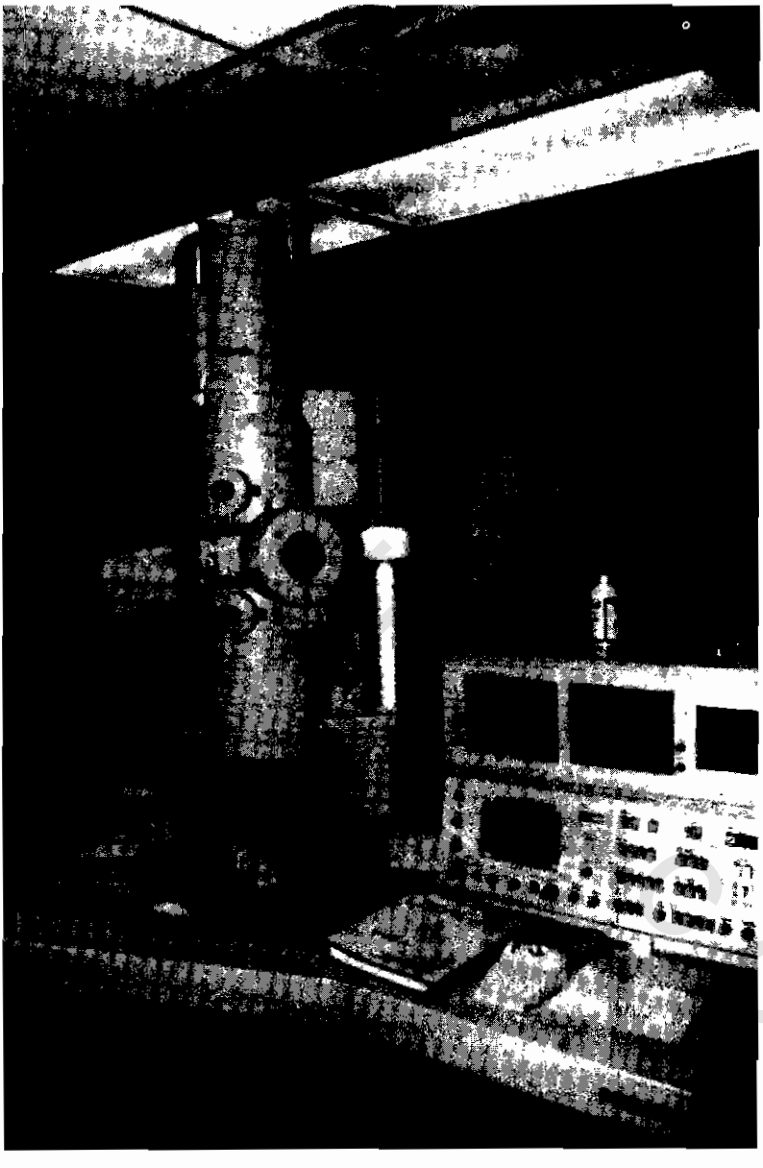
توضع القطاعات الصغيرة التى يتم الحصول عليها على حامل عينة - عادة شبكة نحاسية خاصة قطرها ٣ مم ، سبق طلائها بكربون عديم التركيب بسمك ٠,١ ميكرومتر .

ويوضح الشكل (١١-٢١) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكترونى المتخلل .

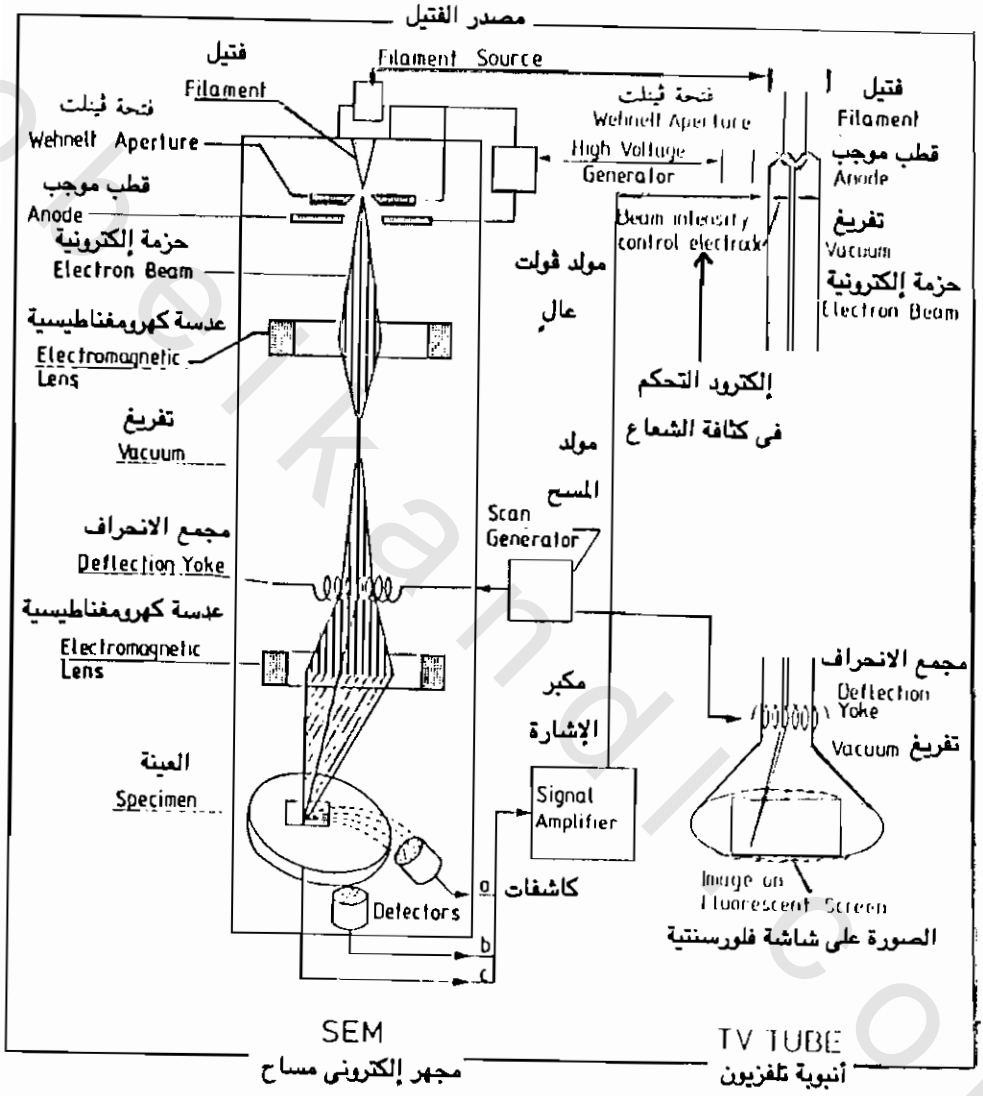
المجهر الإلكترونى المساح Scanning electron microscope (SEM)

تجتمع كافة مكونات المجهر الإلكترونى المساح عادة فى ذات الوحدة، ويوجد العمود البصرى الإلكترونى 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 الإلكترونى المساح مع بعض التحفظات المجهر ذو الضوء المنعكس، ويوضح شكل (١١-٢٢) مقارنة أخرى، حيث يتضح أن تشغيل المجهر الإلكترونى المساح يماثل إلى حد كبير أنبوبة التشغيل المزود بها التليفزيون، حيث يوجد فى كلا النظامين مدفع إلكترونات يماثل ذلك المزود به المجهر الإلكترونى المتخلل ، الذى يعطى شعاعًا إلكترونيًا، وفى حالة المجهر الإلكترونى 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). يمسح الشعاع الإلكترونى مساحة صغيرة من سطح العينة خطا بعد خط، متزامنًا مع الشعاع الإلكترونى 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، وبالتالى تكون كمية الضوء التى تقذفها كل نقطة من شاشة التلفزيون متناسبة مع عدد الإلكترونات من النقطة المقابلة على سطح العينة، وبالتالى تظهر الصورة الممثلة لسطح العينة على شاشة التلفزيون خطًا بعد خط .



شكل (١١-٢١) : المجهر الإلكترونى المتخلل.



شكل (١١ - ٢٢) : مقارنة بين نظام التشغيل فى المجهر الإلكترونى المساح وأنبوبة التليفزيون (شوتانس Schotanus - فيليبس)

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

وفيما يلى وصف لمختلف أجزاء المجهر الإلكترونى المساح ، وبعض أوجه التقنية الخاصة به .

مدفع الإلكترونات Electron gun

يتركب مدفع الإلكترونات من فتيل، وأسطوانة ڤنلت تماثلان نظيريهما فى المجهر الإلكترونى 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 الإلكترونى 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) ڤولت التنشيط أكثر انخفاضًا فى المجهر الإلكترونى المساح عنه فى المجهر الإلكترونى المتخلل ؛ حيث يتراوح فى الأول ما بين ٢٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ ڤولت .

والسؤال الآن، ماذا يحدث بالعينة عند انطلاق الإلكترونات ؟

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

(١) ينبعث عن العينة ذاتها ما يعرف بالإلكترونات الثانوية .

(٢) تنعكس بعض الإلكترونات (الإلكترونات التى تتشتت إلى الخلف) .

(٣) تمتص العينة إلكترونات .

(٤) ينبعث عن العينة أشعة سينية .

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

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

تتداخل كل هذه الظواهر معًا ويعتمد كل منها إلى حد ما على التضاريس، والعدد الذرى، والحالة الكيميائية للعينة، ويعتمد عدد الإلكترونات التى تتشتت 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 تتشتت إلى الخلف والإلكترونات الثانوية التى تنبعث 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 الإلكترونى المساح بواسطة الدائرة الإلكترونية التى تمسح الحزمة فوق العينة (وفى ذات الوقت فوق الشاشة الفلورسنتية لأنبوبة التلفزيون حيث تظهر الصورة) وفوق مقطع أنبوبة التلفزيون .

$$\text{تكبير المجهر الإلكترونى المساح} = \frac{\text{طول أحد الخطوط (التى تكتبها) الحزمة الإلكترونية على شاشة التلفزيون (عرض صورة التلفزيون)}}{\text{طول أحد (مسارات) الحزمة الإلكترونية على العينة}}$$

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

obeikandl.com

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 الإلكترونى المساح عادة بعارضين للصورة Image monitor يشاهد الباحث الصورة من خلال أحدهما، أما الآخر ويعرف عادة بالعارض عالى 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 فى المجهر الإلكترونى المساح يتم بالكامل إلكترونيًا فإن من الممكن معاملتها بمختلف الأساليب الإلكترونية الحديثة، والتى تشتمل على تعظيم الاختلافات، والتعاكس (الأسود يصير أبيض) ومزج الصور من كاشفات مختلفة، وتحليل الصورة، واستخراج صورة أحد الكاشفات، وبالتالى يمكن الاستفادة من مختلف هذه التقنيات التى تناسب الحصول على أفضل البيانات الممكنة من العينة .

التفريغ Vacuum

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

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

الإلكترونيات Electronics

من البديهى أن المجهر الإلكترونى المساح مثل المجهر الإلكترونى المتخلل من حيث حاجته إلى ثبات الفولت والتيار اللازمين لمدفع الإلكترونات وعدسات المكثف للحصول على أفضل تمييز، وبالمثل يلزم إحكام ثبات الدائرة الإلكترونية المصاحبة للكاشفات بدقة بالغة، فالحال هنا يماثل المجهر الإلكترونى المتخلل حيث لا يسمح بالتجاوز بجزء فى المليون .

توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

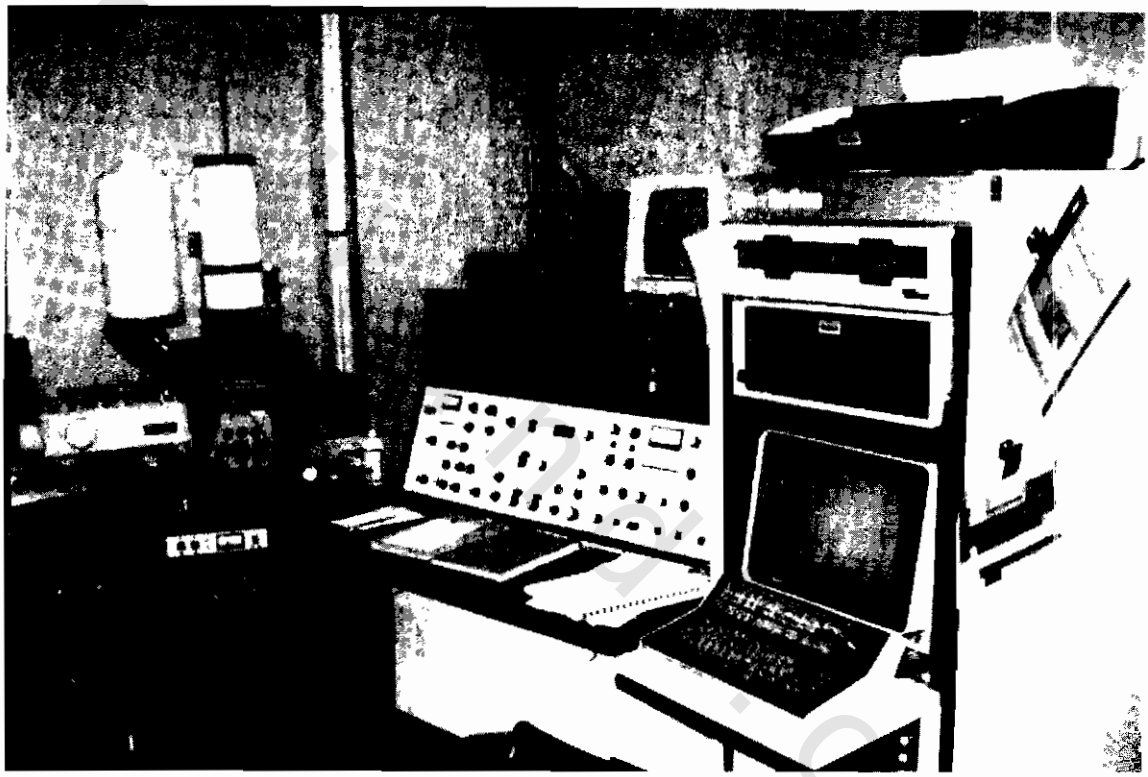
تعتمد نوعية الصورة بالمجهر الإلكترونى المساح على توجيه وبعد العينة بالنسبة للكاشفات الإلكترونية، لذلك يراعى فى المجهر الإلكترونى المساح حاليًا حرية حركة العينة فى الاتجاهين الأفقى والرأسى كذلك إمكانية دورانها وإمالتها تبعًا للحاجة، وعادة ما يكون حجم العينة فى المجهر الإلكترونى المساح أكبر من تلك بالمجهر الإلكترونى المتخلل، حيث يمكن استخدام عينات يصل حجمها إلى ٦٥ × ٦٥ × ٥٠ مم، وقد تضيف بعض المصانع إمكانية فحص العينة تحت تبريد أو تسخين أو تعريضها للشد .

استخدام المجهر الإلكترونى المساح وإعداد العينة
Application and specimen preparation

يستخدم المجهر الإلكترونى المساح فى عديد من فروع العلم والتكنولوجيا عندما تكون هناك حاجة إلى دراسة سطح العينة، وتحد القيمة الشرائية للجهاز من انتشار استخدامه .

يمكن فحص أى عينة كما هى بالمجهر الإلكترونى 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 (١ نم) وعادة ما يزود المجهر برشاش طلاء Sputter coater لهذا الغرض .

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



Hitachi Scanning Electron Microscope (SEM)

شكل (١١-٢٣) : المجهر الإلكترونى المساح.

الفحص المجهرى الإلكترونى المساح المتخلل
Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)

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

يمكن الحصول على نتائج مماثلة عندما يسمح للحزمة الإلكترونية فى المجهر الإلكترونى المتخلل أن تمسح العينة ويتزامن مع ذلك حزمة إلكترونية فى أنبوبة تلفزيون كما هو الحال فى المجهر الإلكترونى المساح، ويحمل أسفل عدسة العارض النهائية كاشفًا إلكترونيًا متخللاً، ويمكن حاليًا تزويد معظم المجاهر الإلكترونية المتخللة بهذه الإمكانية سواء كجزء إضافى أو جزء أساسى داخل المجهر، ويمكن لهذه التقنية التكبير حتى مليون ضعف وبقوة تمييز ١ نم .

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

تجهيز العينات Tissue preparation

يقتضى تجهيز النسيج للفحص بالمجهر الإلكترونى 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 للفحص المجهرى، ويتطلب ذلك اختيار المصدر المناسب للدراسة المطلوبة والقائم على طبيعة المادة والخطوات المزمع إجراؤها، ومن النقاط الواجب 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 جهدًا فائقًا 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 Osmium tetroxide (OsO_4) مع المحلول المنظم Acetate - veronal buffer بكثرة مع المجهر الإلكترونى أكثر من أى مثبت آخر، وإن تعددت المحاليل المستخدمة حديثًا وينصح عادة بمراعاة درجة الحموضة عند ٧,٣ إلى ٧,٥ حيث تؤدى 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 قريبًا 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 .

تحدَّد الفترة اللازمة لإجراء التثبيت بالمواءمة بين إتمام التثبيت من جهة وتسرب المكونات الخلوية من جهة أخرى، لذلك يفضل أن تكون الفترة قصيرة ما أمكن، وعمومًا تتراوح الفترة المتبعة ما بين ٣٠ دقيقة إلى ساعتين تبعًا 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 OsO4	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 البللورات وتسرع من تكوين المحلول، كما يساعد الرج بشدة أيضًا، 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 الإجمالى ٢ ١/٢ ضعف حجم المحلول المنظم الأساسى، يخلط المحلول المنظم المتعادل مباشرة (حتى لا يتبلور) مع حجم مماثل من محلول ٢ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم ليعطى المحلول المثبت النهائى (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	5 vol.
Final mixture	10 vol.

(٢) رابع أكسيد الأوزميوم - كلوريد صوديوم OsO_4 - Na Cl

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

(٣) رابع أكسيد الأوزميوم - سكروز OsO_4 - sucrose

ينصح البعض إضافة ٤,٥ جم سكروز لكل ١٠٠ مل من المثبت، ويعمل السكروز على رفع الضغط الأوزموزى 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	2 vol
Final mixture	4 vol.

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

وينصح باستخدامه فى 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 OsO_4 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 ثباتًا 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 ٧,٤ ، 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 فى حالة العينات النسيجية الكبيرة نسبيًا، فهو سريع التخلل جدًا، 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 ٧,٣ إلى ٧,٥ 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 OsO_4

يجهز محلول منظم أساسى فوسفاتى كالتالى :

Phosphate buffer stock solution (0.15 M)

$Na\ H_2\ PO_4\ .\ H_2O$	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) جلوتار ألدهيد Glutaraldehyde

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

Glutaraldhyde, 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 جلوتارالدهيد، ثم استخدام أحد أنواع المثبت رابع أكسيد الأوزميوم، أحيانًا تكتسب العينة صلابة وتكون القطاعات ممزقة - فى هذه الحالة يخفض تركيز الجلوتارالدهيد 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 ٧,٥ × 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 بملعقة 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 والطمر Dehydration and Embedding

يلزم بعد تمام عملية التثبيت لأنسجة العينة إجراء عمليتى التجفيف والطمر (الصب فى القوالب). ويقصد بالتجفيف تمرير الأنسجة خلال سلسلة من الكحولات يتزايد تركيزها حتى الوصول إلى الكحول المطلق، ويتم الطمر بعد ذلك خلال مواد خاصة مثل ميثاكريليت Methacrylate ، وراتنج إبُكسى Epoxy resin والجيلاتين Gelatin - يؤخذ على الميثاكريليت الانكماش عندما يتبلمر كما يحدث أضرارًا بالتراكيب الدقيقة، لكنه يتميز بقدرته على تخلل أنواع عديدة من الأنسجة كما يسهل القطع خلاله. ينكمش راتنج إبُكسى بدرجة أقل ويحافظ على التراكيب الدقيقة، لكنه يتخلل بعض الأنسجة بصعوبة، وغالبًا مايكون 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 يماثل المثبت ، لكنه خالٍ من الجوهر المثبت أو محلول كلوريد صوديوم له ذات التركيز .

سلسلة الكحولات

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

يراعى خلو الكحـول المطلق من الماء تمامًا Anhydrous ويحفظ فى زجاجـات محكمة الغلق .

ميثاكريليت Methacrylates

يمكن خلط كل من Acrylic resins n-butyl مع Methyl - methacrylate بنسب مختلفة لإنتاج قوالـب مختلفة الصلابة، وخصائص التقطيـع؛ ومن المفضل أن تكون صلابة بيئة التشرب متناسـبة مع صلابة العينة المطمورة، حيث يصاحب عدم تـناسبهما معًا صعوبة فى الحصول على قطاعات متماثلة - ويتوفر عديد مـن المواد التجارية بأسماء مختلفة تستعمل كبيئة للطمر أو كمواد مساعدة لهذه العملية .

إيبون Epon

تتوفر راتنجات الأبكسى Epoxy resins تجاريًا بالاسم إيبون Epon وهى ذات كفاءة مرتفعة، توضع العينة المطلوب إجراء عملية الـطمر لها على سطح مخلوط إيبون حديث معداً داخل كبسولة چيلاتين، تستقر معظم العينـات بقاع الكبسولة قبل أن يتصلب الإيبون، ويتم نقل العينة بواسطة عصا خشبية دقيقة، أو ملعقة صغيرة .

ينصح باستخدام أنابيب زجاجية رخيصة عند غمر العينات فى مخلوط الإيبون للتخلص منها بعد إتمام هذه العمـلية، فذلك أفضل من تنظيفها، وإن لزم التنظـيف تغمر الزجاجيات عقب استعمالها مباشرة فى الأسيتون وقبل أن يـتصلب الإيبون، ثم تغسل بالوسائل المعتادة بعد ذلك .

عقب تصلب الكبسـولة يرفع عنها الـغطاء (إن وجد) وتوضع فى ماء دافئ لبضعة دقائق حتى يصير الچيلاتين رخواً ويسهل التخلص منه، وتكون القوالب معدة للاستعمال، وينصح دائمًا بإزالـة الچيلاتين قبـل حفظ القوالـب مهما طالت الـفترة منعًا لـنمو الفطريـات على الچيلاتين إذا ما توفرت رطوبة .

صبغ قوالب العينات والقطاعات الثلجية

Staining tissue blocks and frozen sections

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

يعطى Phosphotungstic acid (PTA) نتائج طيبة فى صباغة 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 الإلكترونى Ultrastructure of the cell

يهدف الميكروتكنيك إلى إعداد نسيج ما متضمنًا ما تحتويه خلاياه بصورة تناسب الفحص المجهرى بعد ذلك، لكن عادة ما يتطلب الأمر المزيد من المعرفة عن التركيب الدقيق لهذه الخلايا كما تشاهد بالمجهر الإلكترونى، 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 فقد 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 :

الغشاء الخلوى The cell membrane (CM)

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 الإلكترونى على هيئة خطين كثيفين متوازيين يغلفان فراغًا إلكترونيًا شفافًا .

النواة The nucleus (N)

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 المحببة الخلايا التى تمثل الجليكوجين (فى الكبد) بينما تصاحب الشبكة الإندوبلازمية المحببة تمثيل البروتين .

اجسام جولجى Golgi apparatus (GA)

تشاهد بالخلايا التى تقوم بالإفراز .

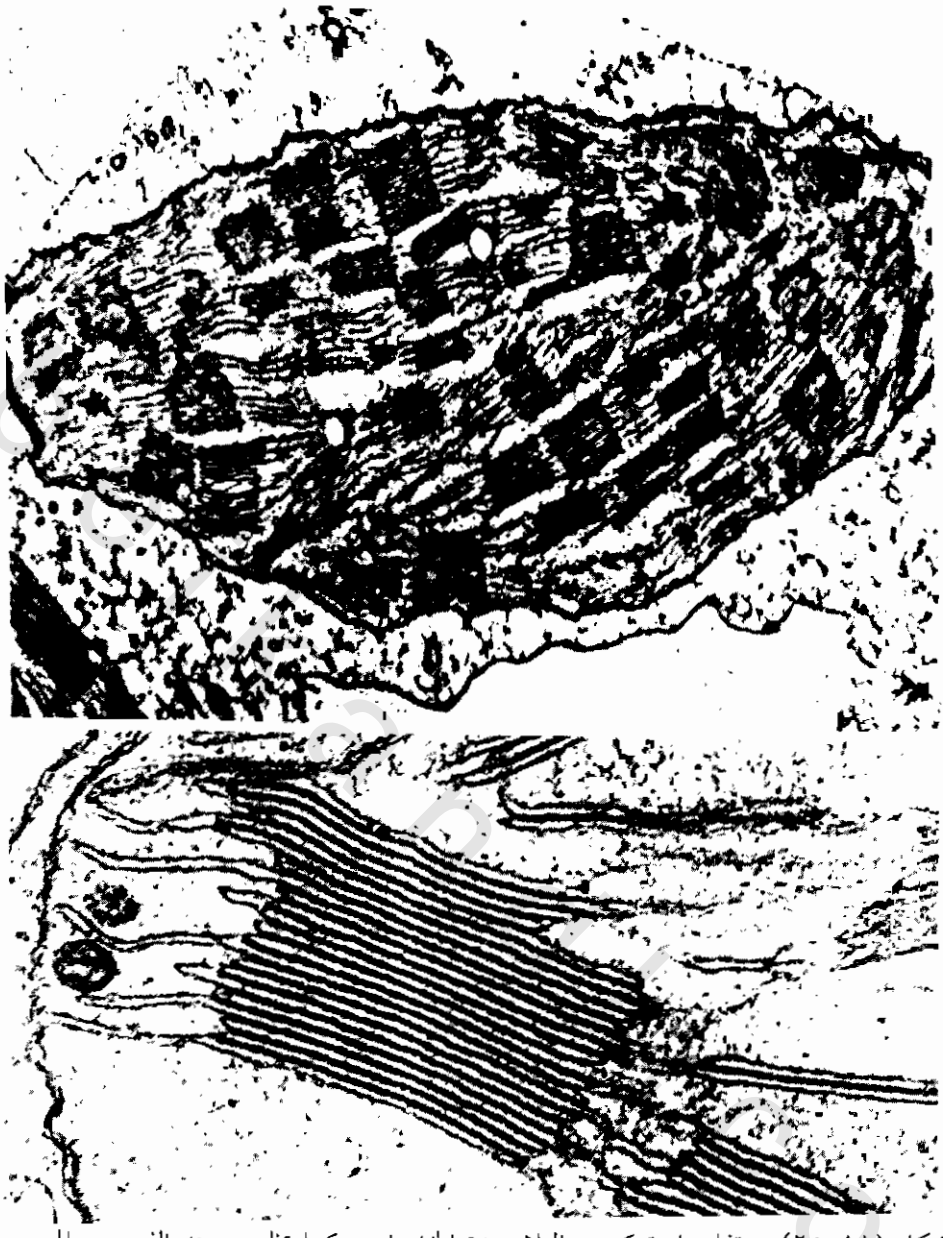
الميتوكوندريا The mitochondria (M)

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 الإلكترونى .

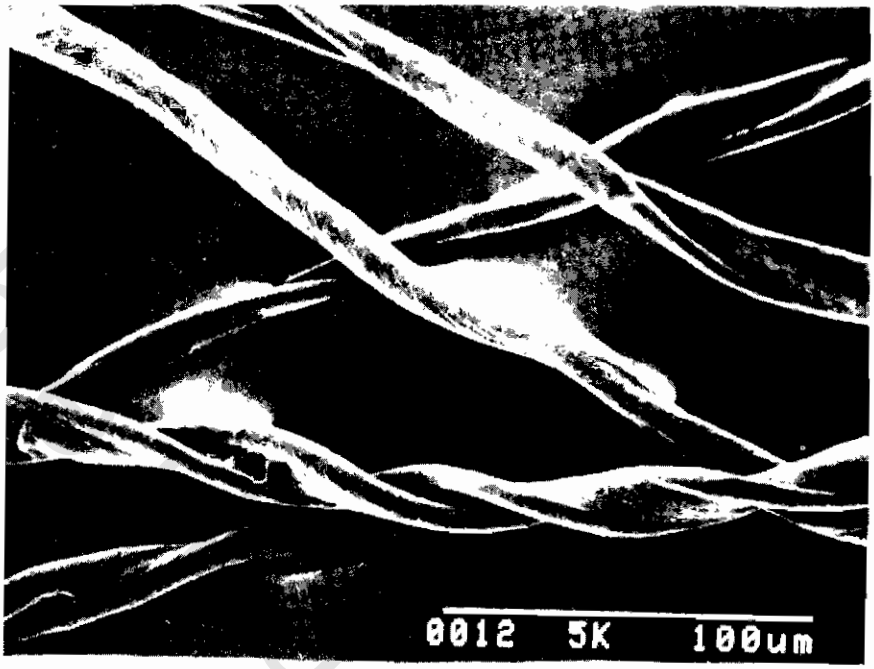
تمثل الأشكال (١١-٢٤) و (١١-٢٥) و (١١-٢٦) و (١١-٢٧) أجزاء نباتية مختلفة ، كما تظهر عند فحصها بالمجهر الإلكترونى .

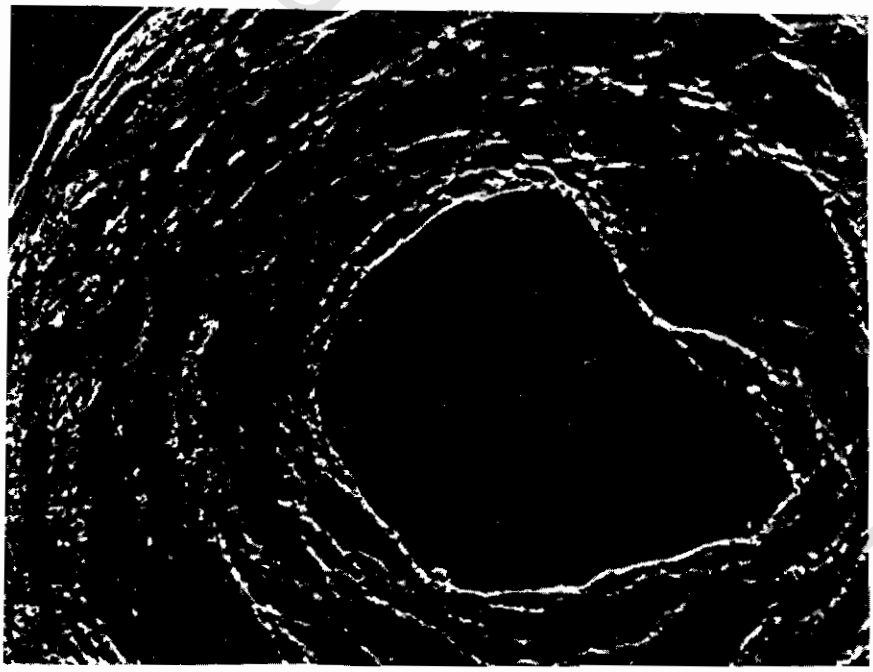
شكل (١١-٢٤) : تفاصيل تركيب خلية من قطاع عرضى فى قمة الجذر كما تبدو بالمجهر الإلكترونى المتخلل حيث: (n) النواة - (er) الشبكة الاندوبلازمية - (m) الميتوكوندريا - (ga) جسم جولجى - (a) بلاستيدة - (nd) ثقب فى غشاء النواة (X 6000) .



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

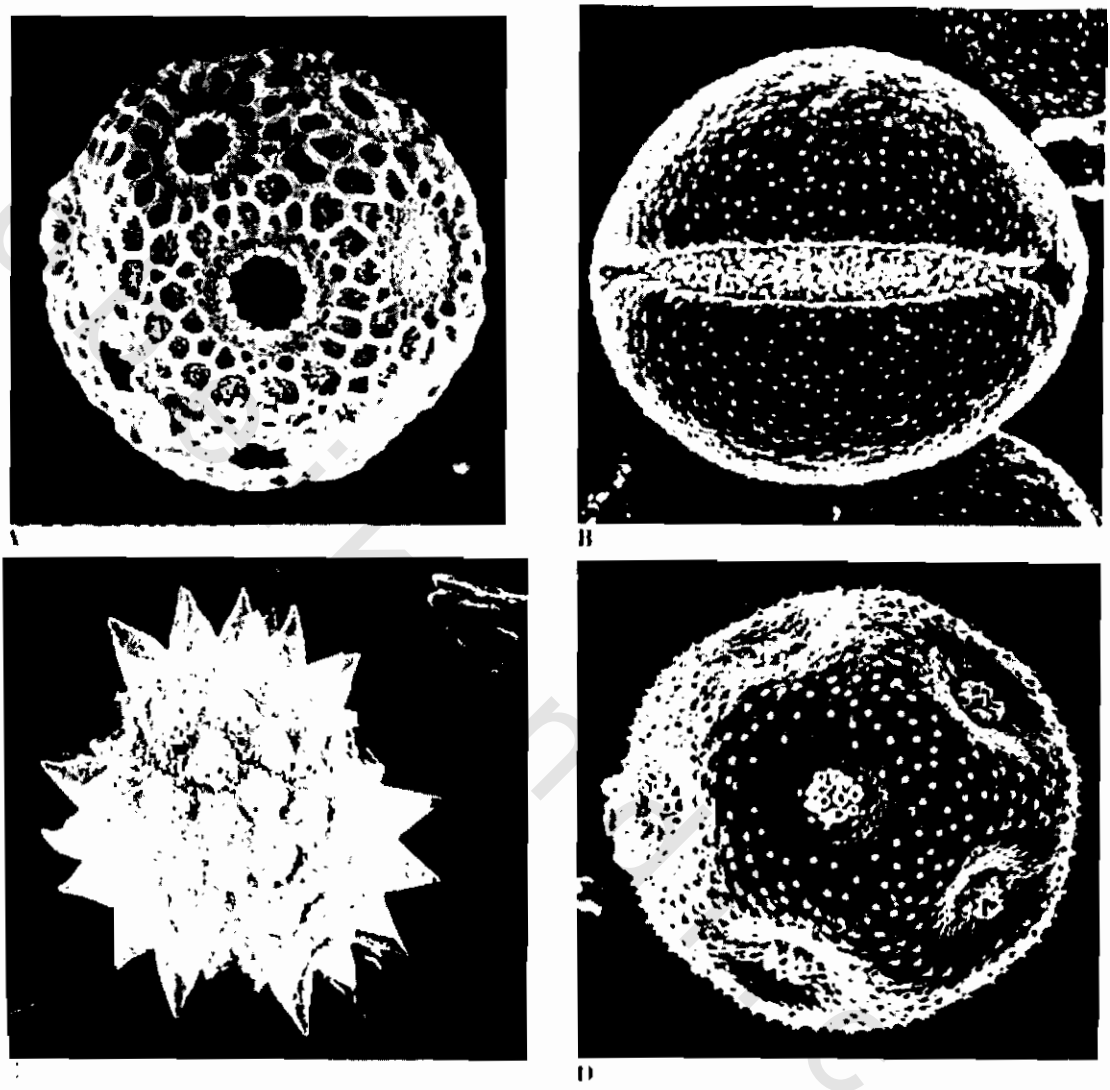
- إلى أعلى بلاستيدة كاملة تحاط بغشاء مزدوج يغلف Stroma تحتوى على Grana تتصل ببعضها بواسطة أغشية رقيقة (X 30.000) .
- إلى أسفل جزء مكبر من البلاستيدة يوضح أغشية Thylakoids مرتبة على هيئة أسطوانة قصيرة Granum وهذه تتصل بغيرها بالأغشية الرقيقة - لاحظ القطرات الزيتية كأجسام مستديرة كثيفة (X 88000) .





شكل (١١-٢٦) : تفاصيل تركيب شعرة القطن ، كما تظهر عند الفحص بالمجهر الإلكترونى .

- إلى أعلى : منظر عام بالمجهر الإلكترونى المساح (X 500).
- إلى أسفل : قطاع عرضى بالمجهر الإلكترونى المتخلل (X 3740).



شكل (١١-٢٧) : تفاصيل تركيب جدار حبوب اللقاح لإظهار بعض أشكال زركشة الجدار، كما تبدو عند الفحص بالمجهر الإلكترونى 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 عـديدة من المجاهر دون عدسات زجاجية ، خلاف المجهر الإلكترونـى المتخلل والمجهر الإلكـترونى المساح واتحادهمـا، وهى تستخدم لتحـقيق أغراض محددة ، تضم هذه الأنواع ما يلى :

Thermal emission microscope

Field ion microscope

Mirror electron microscope

Scanning acoustic microscope

Scanning laser acoustic microscope

X - ray microscope

Scanning tunnelling microscope

obeikandl.com

obeikandl.com

المراجـــع

obeikandl.com

obeikandl.com

المراجـــع

اولا: المراجع العربية

محاضرات مقرر ميكروتكنيك نباتى (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 .

ثانيا: 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.

obeikandl.com

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.

ثالثاً: كتالوجات

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 Markering 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 ?

oberkandl.com