

EL MICROSCOPI ELECTRÒNIC DE «SCANNING»

Comunicació presentada el dia 21 de gener de 1971 pel senyor

R. BARGALLÓ

Del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona

El microscopi electrònic de «scanning» (MES) és un aparell nou ja que la seva comercialització no té més de quatre o cinc anys d'existència. També és un instrument interessant ja que el seu desenvolupament representa un esforç realment intel·ligent per tal d'assolir el màxim aprofitament del xoc d'unes partícules elèctriques damunt l'objecte en estudi. D'altra banda les seves aplicacions no es limiten a l'obtenció de dades morfològiques de l'espècimen, sinó que en permeten realitzar una anàlisi química elemental qualitativa i quantitativa. I finalment, és espectacular perquè ho són les imatges que s'hi aconsegueixen; tot i haver-se difós ràpidament i ésser ja freqüents en els treballs moderns de biologia, ens permetem de presentar-ne unes que al nostre entendre són molt demostratives (figs. 1, 2, 3, 4 i 5).

El nom de MES introdueix un anglicisme que com tants d'altres entren contínuament a la nostra llengua a través de la ciència, la tecnologia, etc.; i és que el mot de «scanning» (=exploració) s'ha fet universal en tractar d'aquest aparell. Alguns microscopistes francesos en diuen microscopi electrònic d'«escombrat», però cal admetre que aquest terme, quan es refereix a aspectes de l'electrònica, en francès té un significat de què no disposa el català. Potser es més correcta l'expressió d'alguns alemanys que l'anomenen de «rastrejament», i tampoc serà desencertat de dir-ne d'«exploració», però nosaltres preferim de seguir el corrent general i parlar del microscopi electrònic de «scanning».

Per a introduir-nos en el tema podem donar una definició prèvia senzilla: el MES és un instrument compost per un sistema òptico-electrònic que explora la preparació per mitjà d'un raig d'electrons molt accelerats, que provoquen la formació de diversos tipus de radiacions. Aquestes són detectades per uns col·lectors que forneixen uns senyals elèctrics que són tramesos a un sistema de televisió (TV) per tal de recompondre'ls en imatges visibles. Aquest MES permet d'examinar únicament superfícies de l'espècimen en estudi, dóna unes imatges amb una resolució màxima de 150 Å i l'augment és variable des de, per exemple, 20 fins a 100.000 o 150.000 diàmetres.

La mida de l'aparell és comparable a la d'un microscopi electrònic clàssic (de transmissió) i la seva disposició sol ésser la que hom pot veure a la figura 6. A l'esquerra hom observa el sistema òptic o columna i a la dreta

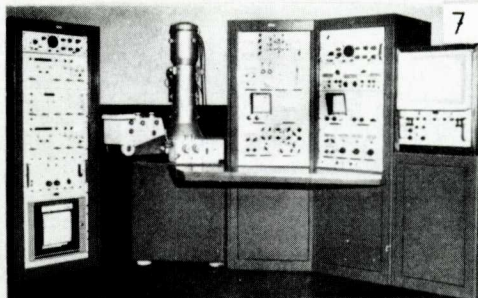
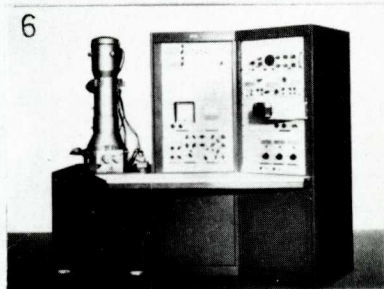
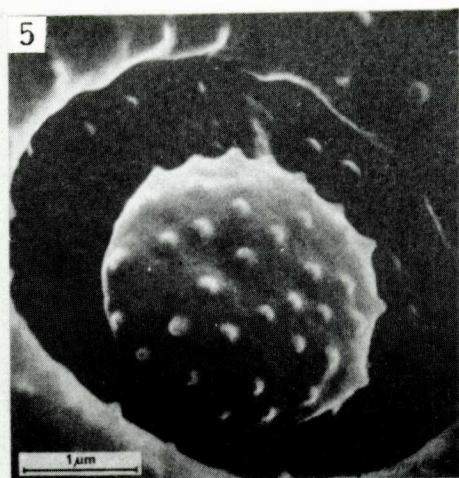
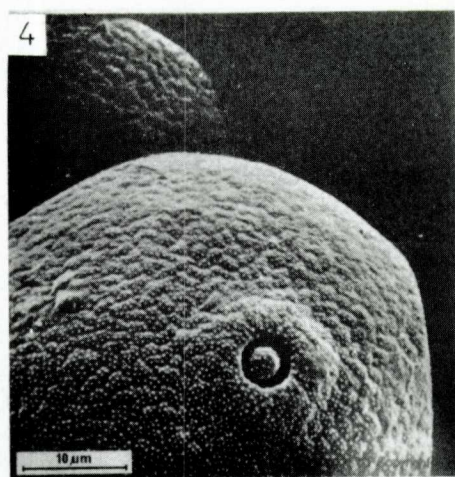
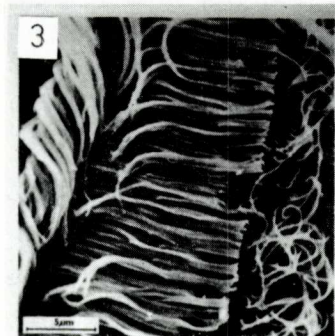
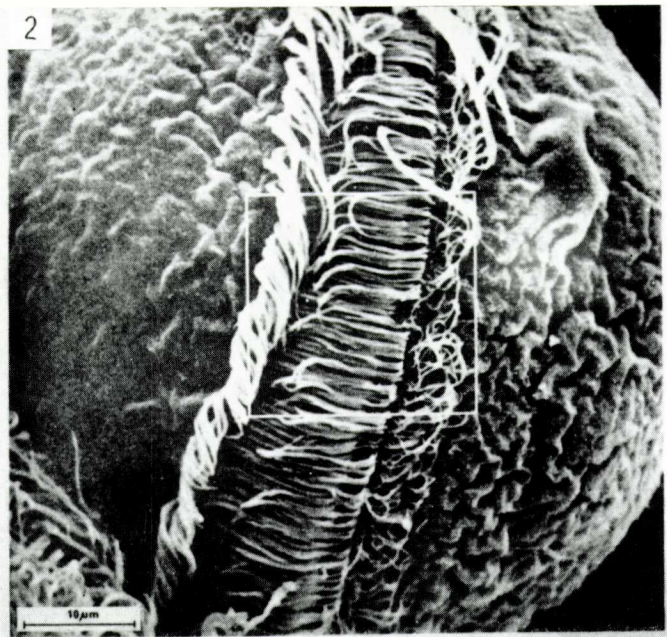
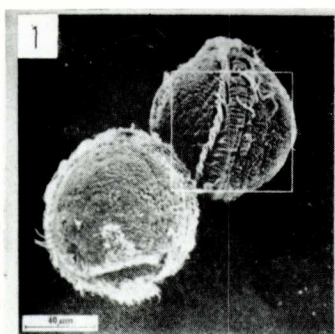
hi ha els circuits electrònics amb les pantalles de TV, una de les quals porta acoblada una cambra fotogràfica per a obtenir imatges permanents. Hom col·loca la preparació a la part inferior de la columna i sota hi tenim el sistema de buit que extreu els gasos per tal de facilitar la cursa del feix electrònic. Aquesta disposició correspon al microscopi *standard* que sols permet d'efectuar estudis topogràfics. La imatge de la figura 7 correspon, en canvi, a la del mateix aparell més els additaments de raigs Roentgen que el converteixen en un instrument per a microanàlisi. La columna porta adossats uns espectròmetres, i l'armari de l'esquerra inclou els circuits que permeten de transcriure els resultats analítics sobre paper pautat.

Passem ara a veure què s'esdevé en el si de la preparació:

Quan un feix d'electrons molt accelerats bombardeja un objecte molt prim (d'uns centenars d'Å de gruix) la majoria d'electrons el travessen sense sofrir cap modificació important de llur trajectòria ni de llur energia (fig. 8). Si l'objecte no és uniformement prim o presenta zones transparents als electrons i d'altres que no ho són (per exemple perquè inclouen elements de gran nombre atòmic), hi haurà partícules elèctriques que es dispersaran després de l'impacte amb l'objecte. Aquest és precisament el mecanisme de la formació de la imatge en el microscopi electrònic de transmissió, el qual obté la informació útil a partir dels electrons que *no han estat desviats* durant el pas per la preparació, descartant, en canvi, la informació de tots els altres.

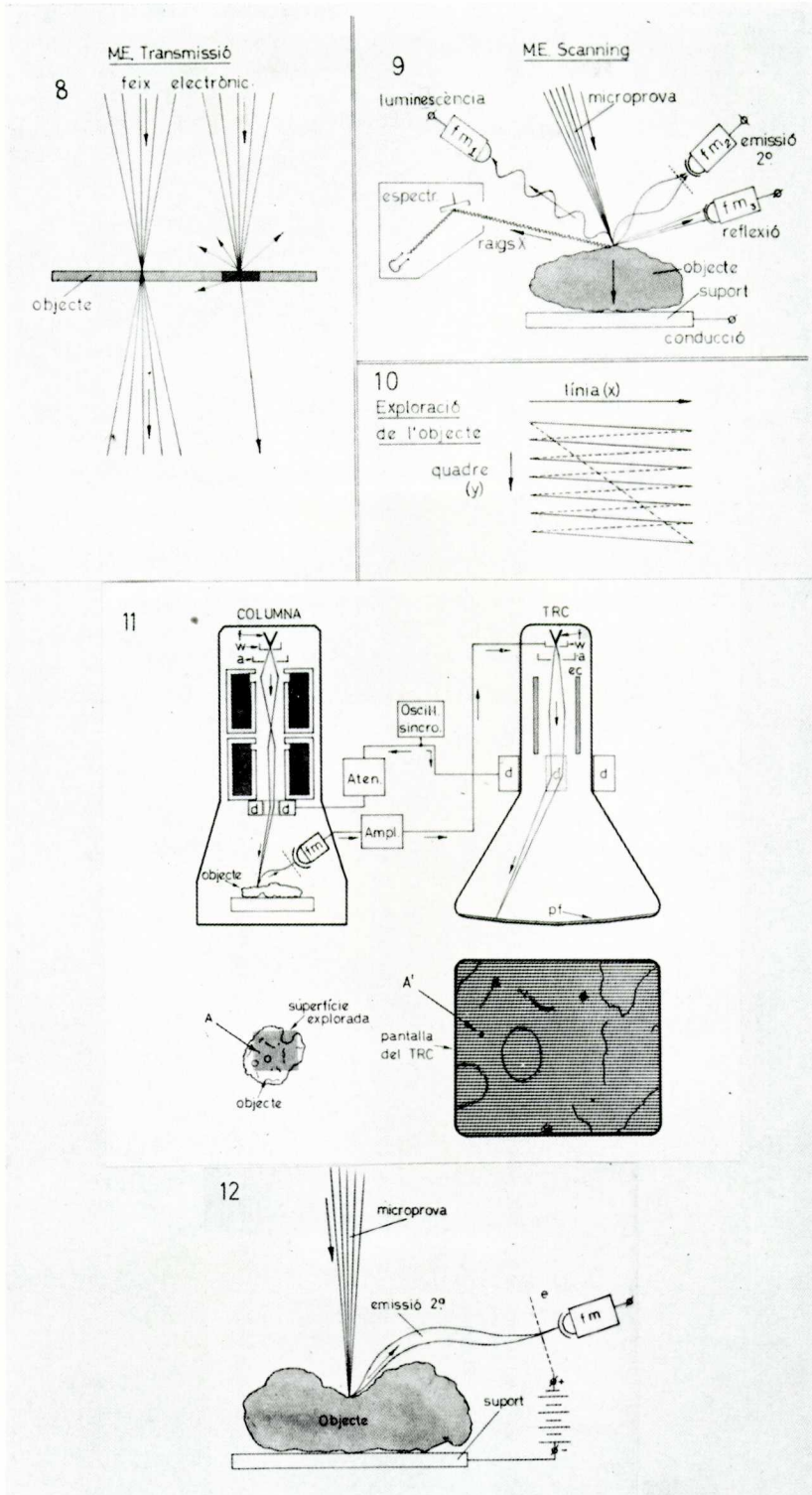
El MES ha estat concebut i desenvolupat amb l'intent de detectar i d'aprofitar l'energia de tots els electrons que descarta el microscopi electrònic clàssic. En la figura 9 veiem que els electrons d'un feix molt prim (que aquí és anomenat microprova) col·lisionen amb l'objecte, que ara pot tenir una forma qualsevol, i els que ho fan inelàsticament perden bona part de llur energia. Aquesta energia sofreix diferents transformacions i aquestes donen unes radiacions que cal que siguin detectades i convertides en senyals elèctrics:

- Una part es transforma en *energia calorífica*, que no és aprofitada en el nostre aparell.
- Una altra provoca una *conducció elèctrica* o pas de corrent per l'objecte, òbviament si aquest és conductor, que és detectada trametent a un amplificador la diferència de potencial detectable en el suport.
- Part de l'energia produeix *raigs X* que són collectables i mesurables per mitjà d'un o més espectròmetres que donen una diferència de potencial processable elèctricament.



Les 7 primeres figures han estat cedides amablement per la Cambridge Scientific Instruments Ltd. 1. Larva trocòfora d'*Harmotöe imbricata* en visió de conjunt. Augment aproximat: 250 X. (Dr. Barber, Univ. Bristol). 2. Detall de la fig. 1 que mostra la proto- i la metatroca. Augment: 1.500 X. 3. Detall de la fig. anterior. Augment: 2.000 X. 4. Gra de pol·len de *Sorghum*. Augment: 1.400 X. (Dr. P. Echlin, Depart. Botànica, Univ. Cambridge). 5. Detall de l'anterior a gran augment (uns 15.000 X.) Observen el gran poder resolvent del detall dels porus. 6. Vista general d'un microscopi electrònic de «scanning» (Stereoscan). 7. El mateix instrument proveït dels accessoris que permeten l'estudi analític per mitjà dels raigs X. (Vegeu text.)

8. Pas del feix d'electrons per un objecte molt prim i formació de la imatge en el microscopi electrònic de transmissió. A l'esquerra no es presenta dispersió, però a la dreta sí.
 9. La microprova, en incidir sobre la preparació, provoca diferents tipus de radiacions, detectables per distints collectors, que poden ésser font d'informació per al MES (vegeu text); fm: fotomultiplicador. 10. Trajecte (esquemàtic) de l'exploració del feix electrònic damunt l'objecte o la pantalla de TV. 11. Comparació dels dos elements fonamentals del MES: el microscopi pròpiament dit (columna) i la pantalla de TV (TRC). f: filament; w: cilindre de Wehnelt; a: ànode; C₁ i C₂: lents condensadores; ec: elèctrode de concentració; d: defectors; pf: pantalla fluorescent. A la part inferior de la figura hom veu la superfície explorada pel pinzell d'electrons en l'objecte (esquerra) i la imatge corresponent al TRC (dreta) que és formada per l'exploració del pinzell sobre la pantalla fluorescent (vegeu text). 12 El camp electrostàtic format entre l'elèctrode *e* i el suport, recull els electrons de poca energia (emissió secundària) i en aconduir-los al fm, permet de treure'n informació útil. Per mitjà d'aquest fenomen les imatges del MES aconsegueixen la característica sensació de relleu, en obtenir informació de zones situades fora de la «visió» del collector de radiacions.



- També es formen radiacions lluminoses per un fenomen de *catodo-luminescència* de les substàncies que la presenten i que es pot captar directament amb un fotomultiplicador (fm_1). Això és un dispositiu comparable a una cèl·lula fotoelèctrica molt sensible.
- L'energia de les col·lisions també provoca l'alliberament dels electrons de les òrbites perifèriques atòmiques de l'objecte estudiat, en un mot, l'*emissió secundària*. Però aquests electrons, que són els més emprats en el MES, tenen lògicament molt poca energia cinètica i es dispersen; per això convé de canalitzar-los per mitjà d'un fort camp electrostàtic cap a un transductor fluorescent dipositat damunt un fotomultiplicador (fm_2) que els converteix en senyals elèctrics.
- Finalment, per un altre fenomen que s'anomena de *reflexió electrònica*, uns electrons reboten més o menys elàsticament a la superfície de la preparació, canvien llur trajectòria i es dispersen. També aquestes partícules poden ésser aconduïdes a un dispositiu similar a l'anterior (fm_3).

Ja hem dit que el microscopi electrònic de transmissió forma la imatge amb els electrons no dispersats, per tant aquests estan ordenats en l'espai d'acord amb la disposició de les zones electropormeables de la preparació i per això ja poden ésser directament processats per les lents electròniques (objectiu i projectores) i donar una imatge amb tots alhora. En canvi, les radiacions obtingudes al MES no estan ordenades respecte a l'espai (no són coherents), ja que les que procedeixen d'un mateix punt es dispersen en direccions diferents i no poden donar cap imatge si no és la d'un sol punt.

Per a resoldre aquest inconvenient cal processar separatament les informacions de cada punt de la preparació i ordenar-les segons el temps. Això cal fer-ho de la manera següent: la microprova és mòbil i va resseguint una zona determinada de l'objecte tal com es fa en els equips de TV (fig. 10), és a dir, segons línies i quadres (usant el símil de llegir, podríem dir segons ratlles i pàgines). Va i torna en el sentit de l'eix X molt de pressa i també ho fa en el sentit de l'eix Y però molt més lentament (unes 800 vegades). La composició dels dos moviments dona una trajectòria resultant en forma de dents de serra i d'aquesta manera es pren lectura de molts punts de la preparació.

Una vegada collectada la radiació produïda per l'impacte, hom obté informació elèctrica de tots els punts i és processada seqüencialment en un sistema de TV en el qual aquella informació és reordenada en l'espai. Finalment, la integració de les imatges puntuals de l'espècimen és deguda a la

persistència: a) de la substància fluorescent, b) de la retina de l'observador, c) de l'emulsió fotogràfica.

Vegem ara a la figura 11 una ràpida descripció del MES. Essencialment és un conjunt format per dos tubs de raigs catòdics (TRC) semblants i interconnectats. El de l'esquerra és el microscopi pròpiament dit, allotja la preparació i és metàl·lic. El de la dreta és una pantalla de TV i òbviament és de vidre. Els dos tenen:

- Un filament que genera electrons (f).
- Un elèctrode que permet de controlar la intensitat electrònica del feix i que és anomenat cilindre de Wehnelt (w).
- Un ànode que accelera els electrons (a).
- Un sistema òptic per a controlar el feix, que a la pantalla de TV és electrostàtic i és anomenat elèctrode concentrador (ec), i en la columna sol constar de dues o tres lents condensadores electromagnètiques de gran qualitat òptica (C_1 i C_2), que fan que la imatge del filament sigui 5.000 vegades més petita que aquest, per la qual cosa mesura uns 100 Å, i també fan que l'angle d'obertura de la microprova sigui petitíssim per tal de proporcionar l'extraordinària profunditat focal característica del MES.
- Els dos TRC també disposen d'un doble joc de bobines deflectores, (d), que per mitjà d'impulsos elèctrics permeten de desviar els feixos d'electrons segons els eixos X i Y tal com hem explicat abans.

Aquesta exploració dels feixos dels dos tubs (columna i pantalla) és duta a terme sincrònicament per tal com els impulsos provenen d'un sol oscil·lador (Oscil·l. sincro.). Hi ha doncs una correspondència punt per punt entre la zona explorada de l'espècimen i la de la pantalla (fig. 11). Per tant a qualsevol punt (A) de la preparació li correspon un punt imatge (A') a la pantalla de TV que té una posició idèntica respecte al temps (són sincrònics), per això ambdós presenten una posició anàloga respecte a l'espai.

Els senyals elèctrics dels col·lectors són portats a la unitat de circuits on encara són augmentats per mitjà d'un o més amplificadors (Ampl.) i després injectats al cilindre de Wehnelt del TRC de la dreta, al qual modulen el feix i donen la imatge final.

Si un punt (A) de la preparació, pel que sigui, proporciona més electrons secundaris que els dels voltants, el senyal elèctric collectat pel fotomultiplicador (fm) serà més gran i després d'amplificat i portat al cilindre de Wehnelt de la pantalla de TV provocarà, per exemple, un augment de la intensitat del seu feix i per tant un punt imatge (A') més lluminós a la pantalla. Aquest és el procés de formació de la imatge visible en el MES.

Tal com ja hem dit, el sincronisme de les dues unitats és aconseguit fent que hi hagi un sol oscil·lador d'impulsos de deflexió, però en la pantalla de TV l'amplada de la zona explorada pel seu propi feix és constant, de manera que el rastrejament ocupa tota la superfície fluorescent (fig. 11, a baix, dreta). En canvi, l'amplada de la zona explorada de l'espècimen (a baix, esquerra) és variable i controlada per mitjà d'un atenuador (Aten.) que actua de reductor del potencial dels impulsos respectius. Vist això i a l'albir de la correspondència punt per punt a què abans hem alludit, com més petita sigui la superfície explorada de l'espècimen més gran serà l'augment. Per això el control de magnificació del MES és precisament l'esmentat dispositiu atenuador.

Una de les característiques més interessants de les imatges obtingudes pel MES és la de l'extraordinària sensació de relleu (figs. 1 a 5). Vegem a què és degut aquest efecte. La majoria de les radiacions produïdes per l'impacte de la microprova sobre l'objecte són disperses, amb la qual cosa permeten d'obtenir informació dels indrets més amagats. En efecte, la petita energia cinètica dels electrons d'emissió secundària per exemple, no dificulta que molts dels procedents de regions no «observables» pel fotomultiplicador (fm, fig. 12) puguin arribar a aquest gràcies al camp electrostàtic provocat per l'elèctrode carregat electropositivament, ja que els corregeix llur trajectòria canalitzant-los cap a la substància fluorescent collectora.

Alguns models de MES tenen un dispositiu que, col·locat sota la preparació, capta els electrons no dispersats per un objecte prou prim; d'aquesta manera l'instrument actua d'una forma anàloga a com ho fa un microscopi electrònic de transmissió, encara que naturalment sense la necessitat d'objectiu ni de lents projectores. Com és lògic, el poder resolutiu també és llavors inferior al de transmissió: hom aconsegueix per aquest procediment que valgui uns 70 Å.

La platina portaobjectes permet de suportar espècimens d'una mida considerable (fins a 100 mm. en determinats casos) i disposa de possibilitats de desplaçar-los segons els eixos X, Y i Z i també de fer-los girar al voltant d'un o dos d'aquests eixos.

Un dels avantatges del MES sobre el microscopi de transmissió és el fet que la tècnica de preparació té uns processos més senzills i curts i també menys crítics. L'única exigència realment limitant és que l'objecte en estudi pugui conservar la seva estructura dins el buit de la columna. D'altra banda, els espècimens conductors no necessiten cap altra condició; els aïllants —els biològics solen ésser-ho— convé recobrir-los d'una capa molt fina de metall conductor (per exemple d'un aliatge Au-Pd) amb l'ajut d'un evaporador similar al que és utilitzat en la preparació d'ombres i rèpliques per a microscòpia electrònica de transmissió. Hom sap

que els metalls són bons donadors d'electrons a causa de les condicions de llurs òrbites electròniques externes, i sobretot els metalls pesants.

Per tant no cal ni incloure ni tallar amb l'ultramicrotòmic; hom fixa l'espècimen biològic per a considerar-ne l'estructura, aquest és deshidratat per a poder-lo introduir al buit, i si cal és recobert amb Au-Pd. Després d'això ja pot ésser col·locat en el portaobjectes de la columna i estudiat seguidament.

Cal recordar el que hem dit al començament respecte a les possibilitats del nostre MES: no és un simple instrument d'estudi morfològic, ja que quan va equipat dels espectròmetres de raigs Roentgen es converteix en un petit però prodigiós laboratori de microanàlisi per raigs X, que permet d'estudiar la composició elemental de l'objecte a partir, normalment, del bor cap endavant.

Els raigs X poden ésser aprofitats de diferents formes; vegem-ne tres exemples:

- Fixar la microprova en un sol punt de la preparació i realitzar una microanàlisi elemental qualitativa i quantitativa, transcrita sobre paper pautat, dels elements constituents de l'espècimen.
- Analitzar quantitativament o qualitativa una línia i reproduir-ne l'anàlisi gràficament.
- Sintonitzar l'espectròmetre per a un determinat element i passar la informació obtinguda sobre la pantalla de TV, on obtindrem la presència o l'absència d'aquest element sobre la imatge de l'objecte. En altres mots, aconseguir un mapa de la localització de l'element sobre la superfície de l'espècimen.

Els elements pesants com el Ca, el S o el Fe, per exemple, poden ésser localitzats per aquest mètode en quantitats de fins 10^{-15} grams, amb una resolució de l'ordre dels 1.000 Å.

No cal dir l'interès que poden tenir totes aquestes possibilitats aplicades sobretot al camp de la histoquímica, per exemple en la localització del lloc d'acció d'un enzim, etc.

Comparant el MES amb el microscopi fotònic observem que aquell té 12 vegades més de resolució i per tant l'augment útil també és 12 vegades superior, i la profunditat de focus és 500 vegades més gran. No obstant això, els desavantatges respecte a l'òptic són: la impossibilitat d'examinar organismes vius i la conveniència de fer conductor elèctric l'espècimen.

Els avantatges del MES respecte al microscopi de transmissió són: no ésser necessari tallar l'objecte en estudi ni per tant incloure'l, fins a poder en molts cassos examinar-lo sencer i produir una contaminació molt re-

duïda sobre la preparació. Els inconvenients són: no poder examinar res més que estructures superficials i tenir menor poder resolvent.

Com tota eina, té unes funcions concretes i uns límits en la seva utilització i aplicació; això ho diem per defugir la possible eufòria que poden provocar les imatges que proporciona el MES i per valorar justament la seva importància i utilitat. Cal insistir que el factor limitant principal és que amb el nostre instrument només podem estudiar la topografia superficial dels objectes.

Finalment volem concloure que, per les seves característiques, el MES representa una eina complementària i no intermèdia del microscopi fotònic i de l'electrònic convencional, que ofereix una perspectiva morfològica diferent de les que fins ara teníem i això potser ens permetrà de resoldre incògnites actuals i de donar nous enfocaments en el camp de la investigació microscòpica.