

COMENTARIS SOBRE EL DESENVOLUPAMENT DE LA MICROSCÒPIA *

Comunicació presentada el dia 21 de gener pel doctor

LLUÍS VALLMITJANA

Professor d'Histologia a la Facultat de Ciències
de la Universitat de Barcelona

* Nota exposada com a introducció al segon curs de Microscòpia Electrònica, acompanyada d'un estudi del microscopi «Scanning» a càrrec de R. Bargalló.

Com a introducció al curset de Microscòpia, considerem necessari d'exposar primer unes idees sobre el microscopi òptic com a base o preludi del microscopi electrònic.

El nostre desig seria de fer una recopilació del fonament, de les varietats i de les aplicacions, dels principals tipus de microscopis, però naturalment això no és possible de resumir-ho en una breu sessió, i potser també ens manca la informació necessària.

Ens limitarem a exposar alguns punts fonamentals de la microscòpia, els progressos principals i les idees que han servit per a aquest salt que ha consistit a passar de la microscòpia fotònica a l'electrònica. Per tot això seguirem un criteri de tipus històric.

Naturalment, és quasi impossible d'iniciar una revisió històrica amb el temps de què disposem, àdhuc prescindint de l'origen dels materials principals (vidre, certs metalls, que en bona part poden ésser reemplaçats). També prescindirem de possibles intents o assaigs sense continuïtat ni aplicació reconeguda (vegeu la bibliografia).

Podem iniciar els punts o fets fonamentals amb el segle XVII; abans ja era coneguda la lupa i també els miralls, bé que en general amb molt poques aplicacions.

Afegirem que, en l'esmentada època, en els incipients estudis d'òptica hom barrejava assaigs per a corregir la visió i augmentar la imatge amb els instruments de visió a distància i d'altres.

Ens permetem de recordar algunes dades fonamentals: a la primera meitat del segle XVII, tenim la iniciació del microscopi compost; entre els primers constructors (1600 i 1650) recordem els assaigs de GALILEU, JANSSEN, LIPPERSHEY, més tard R. HOOKE, DIVINI i també el projecte mitjançant grans espills de DESCARTES, etc.,* encara que en aquella època el seu ús era compartit amb el del microscopi simple (LEEUVENHOEK, etc.). Després el microscopi experimentà una sèrie de perfeccionaments, sobretot les correccions dels defectes principals de les lents (correcció del cromatisme, 1800-1825, aproximadament, BEELDSNYDER, VAN DEYL, SELIGUE, CHEVALIER, AMICI, LISTER, etc.).

Finalment, entre 1870 i 1875, ABBE i d'altres estudiaren i perfecciona-

* Hom sol esmentar d'altres noms, però sembla que foren «usuaris», però no constructors (BOREEL, SCOTT, KIRCHER, STELLUTI, etc.).

ren encara més l'òptica. L'esmentat ABBE (1800-1883) construí els sistemes apocromàtics, però també precisà amb la seva famosa fórmula que hom ja havia aconseguit el màxim poder resolutiu, bo i limitant tot possible perfeccionament posterior; vegeu a les taules I, II i III el perfeccionament d'alguns tipus d'objectius per certs constructors.

Com a fruits del microscopi acromàtic tenim grans progressos de l'Anatomia Microscòpica i el desenvolupament de la Microbiologia, així com de la Histologia i de la Citologia (teoria cel·lular), etc.; amb les lents apocromàtiques hom perfecciona molts coneixements i són descoberts els orgànuls cel·lulars, però la manca de resolució, per les condicions de la llum, tallà el progrés i plantejà una munió de dubtes (vegeu un resum en ROOSEBOOM ³¹).

Sense oblidar alguns dispositius especials (ultramicroscopi, llum polaritzada, llum obliqua) i altres tipus de microscòpia (KÖHLER, òptica de quars i «llum» ultraviolada), hom aconsegueix de millorar un xic la resolució; altres mètodes (lents de Spirer, il·luminació segons Rheinberg, fluorescència, contrast fàsic i interferencial) tenen uns certs avantatges però no incrementen el límit de separació.

Aprofitant les ensenyances de la microscòpia òptica, però adaptant tot el conjunt per a utilitzar la suposada «ona associada a l'electró», hom inicià el 1932 la microscòpia electrònica, la qual, amb el seu colossal poder de resolució, aconsegueix de posar de manifest sensacionals detalls de la ultraestructura cel·lular. Les tècniques auxiliars són de gran complicació i delicadesa.

Per a la nova microscòpia cal emprar: producció (emissió) d'electrons; concentració i acceleració d'aquests, dispositius per a desviar el trajecte que recorre l'electró com una lent desvia un raig de llum, mecanisme per a captar la imatge final. A més, li calen diversos accessoris mecànics i elèctrics auxiliars: producció i manteniment del buit, etc.

Amb el nou aparell cal remarcar la troballa de la ultraestructura complexa i composta del condriosoma. Hom ha trobat també una ultraestructura complexa en els plasts, aparell de Golgi i centríol. La delimitació i les característiques d'aquestes estructures, encara que no són definitives, han progressat molt.

L'ergastoplasma, malgrat que ja fou sospitat, ha passat a constituir una realitat. També ha estat descobert el ribosoma (i en un altre terreny els virus), i també els microtúbuls, els lisosomes i els microsomes han constituït realitats ben visibles i característiques.

Finalment no oblidem l'estructura interna dels cilis i la realitat i les característiques de la membrana cel·lular.

No podem, però, ocultar dos grans defectes del microscopi electrònic: les cèl·lules no poden ésser-hi vistes senceres ni possiblement tampoc vives.

A part el microscopi electrònic bàsic (de transmissió), hom ha assajat altres tipus amb els quals són obtinguts efectes especials; un d'ells és el d'emissió o «scanning», molt interessant per a l'estudi de superfícies i relleus.

No obstant això, per a l'estudi de la cèl·lula «viva i sencera» (amb microscopi òptic), cal pensar que a més dels mitjans actuals, pugui ésser millorada la resolució i incrementat l'augment fins a obtenir unes tècniques de tipus intermedi entre la microscòpia fotònica i l'electrònica actual.

La utilització de la llum coherent, el registre de la imatge de difracció intermèdia i el seu «revelat» o interpretació pels procediments equivalents a l'holografia, etc., permeten d'aspirar a nous pròxims avanços en el camp de la microscòpia.

* * *

En les taules següents hom pot veure el perfeccionament gradual i la resolució de les lents durant el segle passat; a la taula IV, el ràpid perfeccionament del microscopi electrònic. I a l'última llista hi ha una ressenya cronològica dels avanços obtinguts. Les referències són preses de BRADBURY I FREEMAN.

TAULA I

Exemple de les característiques i evolució dels objectius fabricats per la casa Powell (posteriorment Powell i Lealand)

Data	Distància focal en polzades	Angle d'obertura	Obertura numèrica
1838	1"	29°	0,25
	1/2"	26°	0,22
	1/4"	40°	0,34
	1/8"	60°	0,50
1840	1/2"	40°	0,34
	1/16"	74°	0,60
1857	1/4"	89°	0,70
	1/12"	137°	0,93
	1/10"	175°	0,99
1860	1/25"	175° +	proper a 1,0
1864	1/50"	?	?
	1/80"	?	?

TAULA II

Objectius acromàtics d'immersió: exemple de llur desenvolupament

Any	Constructor	Sistema	Distància focal en polzades	Obertura numèrica
1867	Hartnack	Aigua	N.º 9, 1/12"	1,00 +
1867	Hartnack	Aigua	N.º 12, 1/21"	1,00 +
1873	Tolles	Bàlsam	1/5"	1,27
1873	Tolles	Bàlsam	1/10"	1,27
1874	Gundlach	Aigua	1/16"	1,00 +
1875	Tolles	Aigua	1/10"	1,20
1875	Powell & Lealand	Aigua	1/4"	1,18 +
1875	Powell & Lealand	Aigua	1/8"	1,15 +
1875	Zeiss	Aigua	1/8"	1,05 +
1875	Zeiss	Aigua	1/15"	1,05 +
1875	Zeiss	Aigua	1/25"	1,05 +
1877	Powell & Lealand	Aigua	1/8"	1,26
1877	Powell & Lealand	Aigua	1/12"	1,22
1878/9	Zeiss	Oli	1/8"	1,20
1878/9	Zeiss	Oli	1/18"	1,20
1878/9	Zeiss	Oli	1/12"	1,35
1879	Powell & Lealand	Oli	1/12"	1,20
1879	Tolles	Oli	1/8"	1,20
1879	Tolles	Oli	1/10"	1,30 +
1879	Tolles	Oli	1/12"	1,30 +
1879	Zeiss	Oli	1/8"	1,40
1880	Powell & Lealand	Oli	1/25"	1,38
1880	Powell & Lealand	Oli	1/50"	1,38
1880	Powell & Lealand	Oli	1/12" *	1,43
1885	Powell & Lealand	Oli	1/8" **	1,50
1885	Powell & Lealand	Oli	1/12" **	1,50
1885	Powell & Lealand	Oli	1/50" **	1,50

* Element frontal hiperhemisfèric.

** Element frontal de vidre «flint».

TAULA III

Desenvolupament dels objectius apocromàtics

Any	Fabricant	Sistema	Distància focal	Obertura numèrica	Comentaris
1883	Abbe	sec	1"	0,30	Objectius experimentals
1883/4	Abbe	sec	1/6"	0,86	» »
1886	Zeiss	sec	1"	0,30	
	(dissenyats	sec	2/3"	0,30	
	per Abbe)	sec	1/2"	0,60	Primera sèrie; vidre inestable en certs elements i les lents no eren de confiança després d'un temps en determinats climes.
	»	sec	1/3"	0,60	
	»	sec	1/4"	0,95	
	»	sec	1/6"	0,95	
	»	aigua	1/10"	1,25	
	»	oli	1/8"	1,30	
	»	oli	1/12"	1,30	
	»	oli	1/8"	1,40	
	»	oli	1/12"	1,40	
1888	»	sec	1/4"	0,95	Segona sèrie; recalculada i amb millors correccions.
	»	sec	1/6"	0,95	
1889	»	sec	1/8"	0,95	
	»	oli	1/16"	1,30	
1894	»	sec	1/8"	0,95	Tercera sèrie; construïda amb vidre nou.
	»	oli	1/12"	1,30	
1895	»	sec	1/6"	0,95	
1897	»	restes de sèrie			
1889	»	monobromur de naftalè	1/10"	1,63	Poques unitats; costaven unes 40 lliures el 1893.
1892	Powell & Lealand	oli	1/8"	1,40	
	»	oli	1/10"	1,40	
	»	oli	1/12"	1,40	
	»	oli	1/20"	1,40	
	»	oli	1/10"	1,50	Van Heurck opinava que eren molt bons; costaven 50 lliures el 1893.
	»	oli	1/12"	1,50	
	»	oli	1/20"	1,50	

TAULA IV

Alguns microscopis electrònics i llur poder resolutiu aproximat

Any	Constructor	Model	Poder resolutiu
1934	Ruska		500 Å
1934	Driest i Müller		400 Å
1936	Marton i cols.	E.M.1	Millor que 1
1939	Siemens (primer model comercial)		100 Å
1940	RCA	«B»	25 Å
1940	Siemens		25 Å
1944	RCA	EMU	20 Å o millor
1945	Metro-Vick	E.M.2	100 Å o millor
1950	Metro-Vick	E.M.3	Mitjana de 35 Å; el millor, 25 Å
1953	Siemens	ÜM100e	10 Å
1954	Siemens	Elmiskop I	9 Å
1956	A.E.I.	E.M.6	Prototipus 10 Å; més tard milloraren a 5 Å
1964	A.E.I.	E.M.6B	3 Å

TAULA V

Revisió històrica de la microscòpia electrònica

1650. O. VON GUERICKE construí el tub electrònic.
1873. ERNST ABBE demostrà que el poder resolutiu usual del microscopi fotònic estava limitat per la longitud d'ona de la llum emprada, aproximadament $1/2$ de la longitud d'ona de la llum.
1897. F. BRAUN inventà el tub de raigs catòdics.
1897. J. J. THOMSON demostrà relacions entre els electrons i el tub de raigs catòdics.
1907. C. STOEMER calculà acuradament la trajectòria dels electrons en els camps magnètics.
1924. L. V. DE BROGLIE demostrà que un feix d'electrons pot ésser considerat com una ona en moviment, d'una manera similar a la llum.
1926. H. BUSCH demostrà que un camp magnètic de forma convenient operaria com una lent i faria convergir un feix d'electrons.
1927. D. GABOR desenvolupà una lent magnètica envoltada de ferro.
1932. R. RÜDENBERG patentà el projecte d'un microscopi electrònic a Alemanya.
1932. E. BRÜCHE i H. JOHANNSON construïren el primer microscopi electrònic electrostàtic.
1932. M. KNOLL i E. RUSKA construïren el primer model de microscopi electrònic que utilitzava lents magnètiques.
1934. L. MARTON construí un microscopi electrònic magnètic simple amb el qual es feren les primeres observacions biològiques.
1935. E. DRIEST i H. O. MUELLER aconseguiren un augment d'aproximadament 5.000 diàmetres amb una resolució superior a la del microscopi fotònic, usant el microscopi electrònic magnètic de KNOLL i RUSKA.
1937. L. MARTON obtingué les primeres microelectrografies bacteriològiques.

1938. B. VON BORRIES i E. RUSKA projectaren i construïren un instrument capaç d'aconseguir 20.000 diàmetres d'augment i una resolució de 100 Å.
1938. A. PREBUST i J. HILLIER fabricaren el primer microscopi electrònic magnètic als Estats Units.
1939. La Companyia Siemens i Halske a Alemanya començà la producció comercial del microscopi de BORRIES i RUSKA.
1940. La R. C. A. llançà al mercat un microscopi electrònic comercial basat en el disseny de PREBUST i HILLIER.
1940. H. RUSKA obtingué les primeres imatges de virus.
1940. H. MAHL produí un microscopi electrònic electrostàtic a Alemanya.
1943. H. BOERSCH descobrí el fenomen de difracció de Fresnel en les imatges del microscopi electrònic.
1944. R. WILLIAMS i R. W. G. WYCKOFF desenvoluparen la tècnica d'ombrejat que permet de mostrar els perfils dels organismes.
1945. V. ZWORYKIN, G. MORTON, E. RAMBERG, J. HILLIER i A. VANCE publicaren llur text clàssic «Electron optics and the electron microscope».
1946. J. HILLIER i E. RAMBERG observaren el paper de l'astigmatisme de les lents en la limitació de l'alta resolució.
1949. S. NEWMAN, E. BORYSKO i M. SWERDLOW introduïren el metacrilat com a mitjà d'inclusió.
1950. H. LATTA i J. HARTMANN introduïren les ganivetes de vidre per al seccionament.
1952. G. PALADE utilitzà el tetraòxid d'osmi amortit com a fixador acceptable.
1953. K. PORTER i J. BLUM introduïren un micròtom apte per a tallar els espèimens per a microscòpia electrònica.
1955. C. HALL usà el tintatge negatiu en la demostració de l'estructura fina dels virus.
1956. J. LUFT desenvolupà la fixació amb el permanganat.
1956. O. MAALÉ i A. BIRCH-ANDERSEN reeixiren en la inclusió de resina epoxi Araldita.
1956. E. KELLENBERGER, W. SCHWAB i A. RYTER informaren que un poliester (Vestopal-W) era un medi d'inclusió apte.
1960. J. LUFT a Amèrica i H. KUSHIDA al Japó introduïren un altre mitjà d'inclusió epoxi, l'Epon 812.
1960. G. DUPOUY, F. PERRIER i L. DURRIEU a Toulouse (França) examinaren organismes vius a 650 kV. amb un nou instrument projectat per a treballar a 1,5 MV.
1962. J. FREEMAN i B. SPURLOCK aplicaren el Maraglas epoxi com a medi d'inclusió.
1963. D. SABATINI, K. BENSCH i R. BARNETT demostraren que l'estructura fina cel·lular i l'activitat enzimàtica es preservaven amb la fixació per mitjà d'aldehids.

BIBLIOGRAFIA

1. BARGALLÓ, R. — *Nociones de Microscopia Electrónica para Biólogos*. Librería Herder, Barcelona, 1970.
2. BARRON, A. L. E. — *Using the Microscope*. Chapman and Hall Ltd., 11 New Fetter Lane, Londres, 1965.
3. BLUMBERG, J. M. i altres. — *The Billings Microscope Collection*. The American Registry of Pathology, Washington, 1967.
4. BRADBURY, S. — *The Evolution of the Microscope*. Pergamon Press, 1967.
5. BROTHERTON, M. — *Fonctionnement et utilisations des Masers et Lasers*. Dunod, París, 1970.
6. CLARK, G. L. — *The Encyclopedia of Microscopy*. «Reinhold Publ. Co.», 1961 (Art. sobre hist., etc.).
7. CLAY, R. S., i COURT, T. H. — *The History of the Microscope*. Charles Griffin Co., Londres, 1932.
8. COSSLETT, V. E. — *Practical Electron Microscopy*. «London But. Sc. Publ.», 1951.

9. CULLELL, R. — *Aspectos de la evolución del microscopio*. «Revista de la Real Academia de Farmacia de Barcelona», 9, 1961.
10. FONVIELLE, W. DE. — *Les Merveilles du Monde Invisible*. Librairie de L. Hachette, París, 1867. (Altres monografies en el mateix volum.)
11. FRANÇON, M. — *Progress in Microscopy*. Pergamon Press, 1961.
12. FRANÇON, M. — *Holographie*. Masson & Cie., París, 1969.
13. FREEMAN, J. A. — *Cellular fine structure. An introductory Student Text & Atlas*. The Blafiston Division. McGraw-Hill Book Company, 1964.
14. FRISON, ED. — *L'évolution de la partie optique du microscope au cours du dix-neuvième siècle*. Les tests objects, les test-, Probe-et Typen-Plattens (Anvers). Leiden, 1954. Rijksmuseum voor de Geschiedenis der Natuurwetenschappen.
15. FRISON, ED. — *Henri Ferdinand van Heurck 1838-1909, sa vie, son oeuvre* (Anvers). Leiden, 1959. Rijksmuseum voor de Geschiedenis der Natuurwetenschappen.
16. FRISON, ED. — *Geïllustreerde Inventaris van de Historische Microscopen Onderdelen en Uitrusting* (Henri van Heurck Museum). Koninklijke Maatschappij voor Dierkunde van Antwerpen.
17. HAINE, M. E., i COSSLETT, V. E. — *The Electron Microscope. The present state of the art*. E. & F. N. Spon Limited, Londres, 1961.
18. HALE, A. J. — *The interference Microscope in Biological Research*, E. & S. Livingstone, Ltd. Edimburg i Londres, 1958.
19. HARTLEY, W. G. — *Microscopy*. English Universities Press, Ltd., 102. Newgate Street, Londres, 1962.
20. HOLZL, J., i BANCHER, E. — *Microscopios clásicos*. «Revista Zeiss», 48: 64 (19...).
21. HOOKE, R. — *Micrographia or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies made By Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. Original 1663, Royal Soc. etc. Dover Pub., Inc., Nova York, 1961, reimpressió.
22. KRUG, RIENITZ i SCHULZ. — *Contributions to interference microscopy*. Hilguier & Watts Ltd., 1964.
23. LEEUWENHOEK, A. — *Opera (Epistolae Phisiologiae super compluribus naturale Arcanis)*. Adrianum Beman, Delphis, 1719. (Exemplar existent a l'Institut Botànic.)
24. LEEUWENHOEK, A. — *The collected lettres of Antoni van Leeuwenhoek*, Committee of Dutch Scientists. Sweets & Zeitlinger, Ltd., 1939.
25. LOTTO, E. DE. — *Dallo smeraldo di Nerone agli ochiali del Cadore*. Topografia Benetta-Belluno, 1956.
26. MAGNAN, C. — *Traité de Microscopie Electronique*. Hermann, 1 i 2, 1961.
27. MARECHAL, A., i FRANÇON, M. — *Diffraction Structure des Images. Influence de la cohérence de la lumière*. Masson & Cie., París, 1970.
28. MEEK, G. A. — *Practical Electron Microscopy for Biologists*. Wiley-Interscience, a division John Wiley & Sons Ltd., Londres, Nova York, Sydney, Toronto, 1970.
29. MIELLI, A. — *Panorama general de Historia de la Ciencia*. Espasa-Calpe Argentina, S. A., Buenos Aires-Mèxic, 1952.
30. ORUETA Y DUARTE, D. DE. — *Microscopía (La teoría y manejo del microscopio)*. Madrid, 1923.
31. ROOSEBOOM, M. — *Microscopium*. Leiden, 1956. Rijksmuseum voor de Geschiedenis der Natuurwetenschappen.
32. TERRIEN, J. — *De la loupe au microscope électronique*. Presses Universitaires de France, París, 1959.
33. WISCHNITZER, S. — *Introduction to electron microscopy*. Pergamon Press, 1962.