

ELECTRON MICROSCOPY

Proceedings
of the Stockholm Conference

SEPTEMBER 1956

MBL/WHOI



0 0301 0010390 9

ELECTRON MICROSCOPY

ELECTRON MICROSCOPY

Proceedings of the Stockholm Conference

September 1956

EDITORS

F. S. SJÖSTRAND and J. RHODIN



ACADEMIC PRESS INC., PUBLISHERS, NEW YORK, N. Y.

PRINTED IN SWEDEN

Almqvist & Wiksells

BOKTRYCKERI AKTIEBOLAG

UPPSALA 1957



To the Memory of

BODO VON BORRIES

CONTENTS

Preface F. S. SJÖSTRAND	1	II. ELECTRON OPTICS	
Zum Gedenken an Bodo v. Borries E. RUSKA	3	Über asymptotische Bildfehler. F. LENZ	48
Commemorative address in honour of Bodo v. Borries V. E. COSSLETT	5	Zur Errechnung elektronenoptischer Feldverteilungen mit geforderten Abbildungseigenschaften. K. W. J. PICH	52
I. INSTRUMENTATION		Lentilles électroniques magnétiques. Règles de leur construction et expressions universelles de leurs caractéristiques électro-optiques. P. DURANDIAU	55
Observation directe des surfaces métalliques par réflexion (<i>Invited paper</i>). CH. FERT	8	III. ELECTRON SPECIMEN INTERACTION	
A Scanning Microscope with either Electron or X-Ray Recording. V. E. COSSLETT AND P. DUNCUMB	12	Über die Entstehung des Kontrastes im elektronenmikroskopischen Bild (<i>Invited paper</i>). B. v. BORRIES UND F. LENZ	60
Imaging Elements Operating with Permanent Magnets. B. v. BORRIES, G. LANGNER AND W. SCHEFFELS	14	The Differential Scattering Cross Section of Atoms at Small Angles. M. E. HAINE AND A. W. AGAR	64
Über magnetostatische Linsenarrangements mit mechanischen Regelgliedern. K. MÜLLER.	17	Experimentelle Untersuchung der Streuung von 70-kV-Elektronen an Kohlenstoff in kleinste Winkel. G. KEMPE UND F. LENZ	67
Der Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die Objektverschmutzung. S. LEISEGANG UND O. SCHOTT	20	Experimentelle Untersuchungen zum Kontrast dünner Schichten im Elektronenmikroskop. W. LIPPERT	73
Objektkühlung im Elektronenmikroskop. O. SCHOTT UND S. LEISEGANG	27	Zur Veränderung des Streuvermögens eines Festkörpers gegenüber mittelschnellen Elektronen infolge Ionisation und Anregung. W. SCHEFFELS	76
Über ein Elektronenmikroskop mit universeller Anwendbarkeit für Elektronenbeugung. H. BETHGE	30	Contraste de phase et contraste interchromatique. Etude comparée des méthodes. M. LOCQUIN	78
A New Universal Electron Microscope of High Resolving Power: Metro-Vick Type EM6. M. E. HAINE AND R. S. PAGE	32	Der Einfluß von Temperatur, Unterlage und Bedeckung auf die Veränderung elektronenmikroskopischer Präparate. K. J. HANSZEN	79
Über ein neues elektrostatisches Gebrauchs-Elektronenmikroskop. H. MAHL, H. VOLKMANN UND W. WEITSCH	34	IV. HIGH RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPY AND ELECTRON DIFFRACTION	
Bolzenkathode als Objekt im Elektronenemissionsmikroskop. E. B. BAS	37	Der Durchgang von Elektronenstrahlen durch das Kristallgitter und seine Folgen für das elektronenmikroskopische Bild. H. NIEHRS	86
Richtstrahlwerte der kalten Kathode. L. WEGMANN UND M. GRIBI	41	The Resolution of Crystal Lattices (<i>Invited paper</i>). J. W. MENTER	88
Summary of the Proceedings of a Symposium on X-Ray Microscopy and Microradiography, Cambridge University, England, August 16-21, 1956. W. C. NIXON	42	Elektronenmikroskopische Abbildung von Kristallgitterstrukturen. R. NEIDER	93

Investigation of High Resolution Electron Diffraction Patterns from Individual Micro-Crystals by Using a Three-Stage Electron Microscope.	98	The Effect of Acridine Type Dyes on the Submicroscopical Structure of Large Molecules.	131
W. D. RIECKE		F. GUBA, G. HAJÓSSI-KEREK AND G. ROMHÁNYI	
An Electron Microscope Examination of Freshly Prepared Silver Iodide Sols.	102	VI. CELL ULTRASTRUCTURE, GENERAL	
R. OTTEWILL AND R. W. HORNE		<i>Mitochondria</i>	
V. SPECIMEN PREPARATION TECHNIQUES IN BIOLOGY AND MEDICINE		Elektronenmikroskopische Studien an Leberschnitten von Thyroxin-behandelten Ratten.	
Problems of Osmium Fixation.	106	H. SCHULZ, H. LÖW, L. ERNSTER UND F. S. SJÖSTRAND	134
G. F. BAHR, G. BLOOM AND U. FRIBERG		Die Entstehung, die Vermehrung und die Abscheidung geformter Sekrete der Mitochondrien von Paramecium.	
The Quantitative Assay of Lipids Extracted from Untreated and OsO ₄ -fixed Beef Brain.	107	K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN	137
G. F. BAHR		<i>Golgi Apparatus</i>	
The Fixation of Nuclei in Locust Testis.	108	Changes in the Ultrastructure of the Ciliary Epithelium during Inhibition of the Secretion of Aqueous Humour.	
I. R. GIBBONS AND J. R. G. BRADFIELD		Å. HOLMBERG	139
Ultra-thin Sections of Avian Tubercle Bacilli in a New Embedding Medium.	111	L'appareil de Golgi des protozoaires et son ultrastructure comparée à celle des métazoaires.	
A. M. GLAUERT AND E. M. BRIEGER		P.-P. GRASSÉ	143
The Use of Gelatin for Embedding Biological Objects in Preparation of Ultrathin Sections for Electron Microscopy.	113	The Morphology of the Golgi Apparatus in Neurons and Epithelial Cells of the Common Limpet <i>Patella vulgata</i> .	
V. P. GILĚV		D. LACY	145
On the Preparation of Ultrathin Serial Sections by Means of a Watchmaker's Lathe.	115	<i>Cytoplasmic Basophilia</i>	
W. NIKLOWITZ		Basophilic Structures in the Cytoplasm of the Sea Urchin Egg.	
How to Prepare Ultrathin Sections of Tissue Cultures.	117	B. A. AFZELIUS	147
V. DOSTAL		<i>Plasma Membrane</i>	
Eine einfache Vorrichtung zum Anspitzen von plexiglaseingebetteten Objekten.	118	Functional Changes of the Free Cell Surface Membrane of the Intestinal Absorbing Cell.	
A. MAAS		F. S. SJÖSTRAND AND H. ZETTERQVIST	150
An Improved Method to Prepare Formvar Nets for Mounting Thin Sections for Electron Microscopy.	120	The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell and Its Histological Relationships.	
F. S. SJÖSTRAND		H. F. PARKS	151
Experiments on Staining Thin-Sections for Electron Microscopy.	121	Observations on Early Stages of Phagocytosis of Colloidal Particles by Hepatic Phagocytes of the Mouse.	
I. R. GIBBONS AND J. R. G. BRADFIELD		H. F. PARKS AND A. D. CHIQUOINE	154
Die Eignung und Anwendung von Phosphorwolframsäure und Thalliumnitrat als Kontrastmittel zur Darstellung cytoplasmatischer Strukturen.	124	The Role of Cell Membranes in Morphogenesis.	
K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN		M. S. C. BIRBECK AND E. H. MERCER	156
The Use of the Electron Microscope to Control Preparation of Cellular Constituents.	125	Electron Microscopic, X-Ray, and Birefringence Studies on the Proteins of the Hair Follicle.	
M. S. C. BIRBECK AND E. H. MERCER		M. S. C. BIRBECK AND E. H. MERCER	158
A Micro-manipulation Method for the Preparation of Calibrated Microdroplets over the Range 10 ⁻⁶ -10 ⁻¹⁰ ml in Electron Microscopy.	127	The Mechanism of Hemolysis Caused by Ultrasonic Irradiation I.	
IRENE SUGÁR		W. ROMANOWSKI, A. FELTYNOWSKI AND J. LITWIN	161
Über die quantitative Spreitung von Zellen. Eine Untersuchung dünnster Filme mit dem Elektronenmikroskop.	128	The Mechanism of Hemolysis Caused by Ultrasonic Irradiation II.	
A. KLEINSCHMIDT		W. ROMANOWSKI AND A. FELTYNOWSKI	161

<i>Cell Nucleus</i>		Preliminary Observations on the Ultrastructure of a Frog Muscle Spindle.	197
L'ultrastructure de la membrane nucléaire des ovocytes de l'Araignée (<i>Tegenaria domestica</i> Clerk).	162	J. D. ROBERTSON	
J. ANDRÉ ET CH. ROULLIER			
Electron Microscopy on Grasshopper Spermatids.	164	VIII. MUSCLE AND OTHER CONTRACTILE ELEMENTS	
F. S. SJÖSTRAND AND B. A. AFZELIUS			
The Acrosomal Reaction of the Sea Urchin Spermatozoon.	167	Preliminary Observations on the Structure of Insect Flight Muscle.	202
B. A. AFZELIUS		H. L. HUNFELY AND JEAN HANSSON	
The Structure of Galea Capitis in Human Sperm.	169	The Ultrastructure of Skeletal Muscle Myofilaments.	204
J. SCHULTZ-LARSEN AND R. HAMMEN		F. S. SJÖSTRAND AND EBBA ANDERSSON	
<i>Thyroid Gland</i>		The Tubular System in the Striated Muscle Cell.	208
The Ultrastructure of the Thyroid Gland of the Mouse.	171	EBBA ANDERSSON	
R. EKHOLM AND F. S. SJÖSTRAND		Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte.	210
Electron Microscopy of Chick Embryo Thyroid.	173	HEDI GANSLER	
R. STOLL, P. BLANQUET, A. P. LACHAPELLE, R. MARAUD AND A. MAGIMEL		Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Gewebe des glatten Muskels.	212
<i>Kidney</i>		F. GUBA UND G. HAJÓSSI-KEREK	
Preliminary Studies on the Development and Differentiation of Cells and Structures of the Renal Corpuscle.	176	Mechanism of Pigment Migration within Teleost Melanophores.	213
B. V. HALL AND L. E. ROTH		S. FALK AND J. RHODIN	
Further Studies on the Nephron Ultrastructure in Mouse: Terminal Part of Proximal Convolution.	180	The Pharyngeal Protein Fibres of the Ciliates.	216
J. RHODIN		CH. ROULLIER, E. FAURÉ-FREMIET AND M. GAUCHIERY	
<i>Adipose Tissue</i>		IX. COLLAGEN, CARTILAGE, BONE	
The Fine Structure of Brown Adipose Tissue in the Rat: with Observations on the Cytological Changes Following Starvation and Adrenalectomy.	182	Kollagen (<i>Invited paper</i>).	220
J. D. LEVER		U. HOEMANN UND K. KÜHN	
VII. NERVE CELLS AND RECEPTORS		Neue Befunde zur Struktur der Sehnenfibrille an Hand von Dünnschnitten.	223
Neurofilaments et neurofibrilles dans les fibres nerveuses de la Sangsue.	188	E. KUHNKE UND K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN	
R. COUTEAUX		The Proteolytic Action of Papain Studied by Means of the Electron Microscope.	225
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Grenzstrangganglien von menschlichem Operationsmaterial.	190	G. LELLI AND G. ARANGIO-RUIZ	
HEDI GANSLER		Electron Microscopic Observations on Frozen Collagen.	227
Ultra-structure des cellules visuelles du Gecko. Mise en évidence de prolongements cytoplasmiques infra-microscopiques au niveau du segment interne.	192	G. LELLI AND G. ARANGIO-RUIZ	
NINA CARASSO		Electron Microscopic Observations on Collagen Exposed to X-Rays.	228
Some Observations on the Structure of the Retinal Receptors of the Toad Eye as Revealed by the Electron Microscope.	194	G. LELLI, U. MAROTTA AND A. D'AMORI	
F. S. SJÖSTRAND AND L. G. ELFVIN		Studies on the Fibrogenesis of Collagen.	229
Submicroscopic Morphology of the Retinal Pigment Epithelium.	196	SYLVIA FITTON JACKSON	
G. LION, C. MAERTENS AND G. VANDERMEERSCH		Further Observations on the Transformation of Collagen Fibrils into "Elastin".	230
		M. K. KLECH AND R. REED	
		Osteoarthritis of the Hip Joint.	233
		K. LITTLE AND L. H. PIMM	
		Correlation of Electron Microscopy with X-Ray Diffraction and Optical Birefringence in the Study of the Bone.	234
		V. CAGLIOPI, A. ASCINZI AND A. SANTORO	

X. PATHOLOGY

- Elektronenmikroskopische Untersuchungen des experimentellen Lungenödems. 240
H. SCHULZ
- Electron Microscope Studies on Alveolar Cells from Mammals. 244
A. POLICARD, A. COLLET AND S. PREGERMAIN
- Vergleichende Untersuchungen der Mitochondrien in Rattenlungen nach intratrachealer Injektion von Kiesel säure. 246
W. KIKUTH, H. W. SCHLIPKÖTER UND P. SCHROETELER
- The Lung Tissue in Mice Infected by Tubercle Bacilli. 248
B. CEDERGREN
- The Importance of an Accurate Size Determination of Fine Particles when Investigating Their Biological Effects. 250
G. BLOOM, J. GLÖMME AND Å. SWENSSON
- Elektronenoptische Untersuchungen von Staubkorngößen in Staublungen. 251
H. W. SCHLIPKÖTER UND A. COLLI
- Electron Microscopy of the Glomerular Basement Membrane in Experimental Amyloidosis of the Mouse. 254
F. MILLER AND A. BOHLE
- Electron Microscope Investigation on Biopsy Material from Patients with Renal Diseases: A Case of Subacute Glomerulonephritis. 256
A. BERGSTRAND AND H. BUCHT

XI. MICROBIOLOGY

- Some Observations on the Structure of Tobacco Mosaic Virus. 260
H. E. HUXLEY
- Electron Microscope Studies on the Periodicity in Tobacco Mosaic Virus. 261
R. E. F. MATTHEWS, R. W. HORNE AND E. M. GREEN
- Filamentous Forms of Influenza Viruses. 262
A. FELTYNOWSKI
- Fastening of Phage Particles to Bacterial Cell. 264
A. S. TIKHONENKO AND A. E. KRISS
- Filamentous Form of Bacteriophage at the Earliest Stages of Their Formation in a Bacterial Cell. 265
A. S. TIKHONENKO AND A. E. KRISS
- Comparative Studies on Sections of Intact Cells, Protoplasts, and "Ghosts" of a *Bacillus* Species. 266
C. WEIBULL AND K. G. THORSSON
- A Study of the Division of *Saccharomyces cerevisiae* Using Carbon Replicas. 268
D. E. BRADLEY

XII. BOTANY

- Die Ontogenese der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. 272
E. S. PERNER
- Some Botanical Applications of the Carbon Replica Technique. 274
D. E. BRADLEY
- On the Ultrastructure of a Fungus: The Gametes of *Allomyces*. 276
G. TURIAN AND E. KELLENBERGER
- Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Warzenstruktur bei den Koniferen. 276
W. LIESE

XIII. PAPER AND TEXTILE RESEARCH

- X-Ray Microscopy of Paper. 282
J. ISINGS, ONG SIN POEN, J. B. LE POOLE AND G. VAN NEDERVEEN
- Partial Embedding Technique for Replication of Fibres. 283
J. DLUGOSZ
- A Method for the Carbon Replication of Extensive Areas of Very Irregular Surfaces, with Particular Application to the Study of Pulp Fibres, Wood and Paper. 285
D. H. PAGE
- Further Reflection Electron Microscopy of Pulp Fibres and Paper. 287
H. W. EMERTON, D. H. PAGE AND J. WATTS
- Application of Ultra-Microtomy to the Fine Structure Study of Rayon Viscose Fibre. 290
P. KASSENBECK
- Structural Details of Natural Fibers as Observed with the Electron Microscope. 292
C. MAERTENS, G. RAES AND G. VANDERMEERSCHÉ
- Contact Region between Two Fibres. 293
SAARA ASUNMAA
- Die elektronenmikroskopische Darstellung großer Perioden in Cellulosefasern durch Einlagerung schwerer Atome. 295
K. HESS
- On the Submicroscopic Structure of Mannans. 298
H. MEIER
- A Contribution to the Structure of Keratin. 300
M. W. ANDREWS AND J. SIKORSKI
- The Electron Microscopy of Pigmented Keratinous Materials. 303
J. HOPE, J. SIKORSKI AND C. S. WHEWELL
- Über den Feinbau der Spinnenfäden. 307
R. LEHMENSICK UND E. KULLMANN

XIV. METALLOGRAPHY AND OTHER INDUSTRIAL APPLICATIONS

Direct Observation of Dislocations and Their Movement in Metal Foils.	312	Zur Kenntnis der Glasoberfläche.	336
P. B. HIRSCH, R. W. HORNE AND M. J. WILLIAMS		E. BRÜCHER UND H. POPPA	
Dislocations in Stainless Steel.	316	Elektronenoptische Untersuchung natürlicher Opale in Verbindung mit differentialthermischen und röntgenographischen Studien über die Polytypie des SiO_2 .	339
W. BOLLMANN		A. MAAS	
Migrations of Grain Boundaries Studied with the Electronic Emission Microscope.	318	A Reflection Electron Microscope Study of Diamond Cleavage Surfaces.	341
R. ARNAL AND M. SORFEL		M. SIAI	
Perlit- und Bainitgefüge in drei Kohlenstoffstählen mit 0,18%, 0,50% und 0,86% C.	319	The Direct Observation in the Scanning Microscope of Chemical Reactions.	343
S. MODIN		J. H. L. MCAUSLAN AND K. C. A. SMITH	
Selective Oxidation due to the Heating of the Evaporated Film of α -Brass.	322	Über das Teilchenwachstum sublimierbarer Stoffe, dargestellt am Beispiel des Zinksulfids.	346
N. TAKAHASHI AND K. MIHAMA		W. MÜLLER UND W. JAENICKE	
The Electropolishing of Aluminium.	324	Electron-microscopical Investigations of Calcium Hydroxide and Calcium Carbonate.	347
A. W. AGAR AND R. S. M. REVELL		G. SCHIMMEL	
Zur Anwendung eines neuartigen elektrolytischen Poliergerätes.	326	Further Investigations of Photographic Development by Means of the Electron Microscope.	349
R. ZETZSCHE, E. GUYENOT UND H. J. PRÖGLER		E. KLIN	
Elektronenoptische Untersuchungen an metallurgischen Stäuben, insbesondere deren Präparation und physikalische Differenzierung.	328	Gelatin in the Photographic Process.	351
A. M. D'ANS UND L. VON BOGDANDY		G. VANDERMEERSCHIE, C. MAERTENS AND G. LION	
The Electron Microscope in the Study of Wear.	331	The Microstructure of Photoconductive PbTe Layers.	352
D. SCOTT AND H. M. SCOTT		A. FELTYNOWSKI, J. GLASS AND L. GRELEWICZ	
Anwendungen der Mikrotomschnitt-Technik auf elektronenmikroskopische Mineraluntersuchungen.	333	Identification of Minerals Present in Mine Dusts by Electron Diffraction and Electron Microscopy.	353
G. PREFFERKORN, H. THEMANN UND H. URBAN		J. H. TALBOT	
The Use of a Freeze-drying Technique in the Investigation of Sodium-Montmorillonite by Electron Microscopy.	334		
H. C. CORBET AND J. WOLFFES			



DURING four busy days, from the 17th to the 20th of September 1956, a conference on electron microscopy was held at the Karolinska Institute in Stockholm. The conference was organized in about seven months by the Scandinavian Electron Microscope Society at the request of the International Federation of Electron Microscope Societies. It represented the first European regional conference arranged under the auspices of this federation.

The organizing committee consisted of the Committee of the Scandinavian Electron Microscope Society with the addition of a few other members of that society. Financial support for the conference has been granted by the Swedish Government through the Minister of Education, Mr. I. Persson, and through the State Research Councils on Agriculture, Natural Sciences, and Technology. The members of the organizing committee express their appreciation for this important support.

When the conference was opened by the Rector of the Karolinska Institute, Professor S. Friberg, it proved to have attracted 370 participants from 27 countries (see the list overleaf).

The number of participants and of papers by far exceeded what had seemed reasonable to expect for a regional conference. In fact, with 176 papers read, this conference represented the largest meeting of electron microscopists ever held. It proved to be a difficult problem to squeeze this program into the time limits. An unavoidable consequence was to run mostly two and, temporarily, three parallel sessions.

An extensive and representative exhibition of

electron micrographs and of electron microscopes and accessories had been arranged. The participants had the opportunity of seeing the following types of electron microscopes in performance: Akashi Troncoscope, Philips EM 100 B and EM 75 B, RCA EMU 2 and EMU 3c, Siemens Elmiskop I, and the prototype of the new Zeiss electrostatic microscope.

The tragic death of Professor Bodo von Borries on July 17, 1956, overshadowed the conference. In commemorative addresses, Dr. V. E. Cosslett, Secretary of the International Federation of Electron Microscope Societies, and Professor E. Ruska, honoured his pioneer work in electron microscopy. On a proposal of Dr. J. Hillier, this conference will be referred to as the "Bodo von Borries Memorial Conference".

The Proceedings of the Stockholm conference have been edited with two major aims: to have the proceedings in print in the shortest possible time, and to keep their size within reasonable limits. We have therefore had to cut down the editorial work, to exclude summaries, to restrict the space available for pictures, and to shorten the texts of several papers. We feel that a great deal more could have been done from an editorial point of view.

These Proceedings are dedicated to the Memory of Bodo von Borries, in accordance with a proposal made by Dr. J. Hillier and by the decision of the Committee of the Scandinavian Electron Microscope Society.

Stockholm, February 1957

FRITIOF S. SJÖSTRAND

ORGANIZING COMMITTEE

of the Stockholm Conference on Electron Microscopy

President	Dr. F. S. SJÖSTRAND
Secretary	Dr. J. RHODIN
Assistant Secretary	Mrs. ELISABETH JOHANNESON
Treasurer	Mr. OVE NILSSON
Members	Mr. A. BIRCH-ANDERSEN
	Prof. A. ENGSTRÖM
	Dr. H. ENGSTRÖM
	Prof. G. GLIMSTEDT

COUNTRIES REPRESENTED

at the Stockholm Conference on Electron Microscopy

Number of participants in parentheses

Argentina (1)	Germany [Western] (99)	Portugal (1)
Australia (1)	Great Britain (40)	Soviet Union (8)
Austria (4)	Holland (20)	South Africa (1)
Belgium (5)	Hungary (2)	Spain (6)
Czechoslovakia (3)	Ireland (1)	Sweden (72)
Denmark (9)	Italy (11)	Switzerland (12)
Finland (4)	Japan (2)	Turkey (1)
France (31)	Norway (3)	United States (17)
Germany [Eastern] (13)	Poland (1)	Yugoslavia (2)



BODO VON BORRIES

1905–1956

Am 17. Juli 1956 verschied unerwartet in seinem 52. Lebensjahr nach kurzer schwerer Krankheit der Pionier der Elektronenmikroskopie Prof. Dr.-Ing. habil. BODO V. BORRIES.

Der Verstorbene wurde am 22. Mai 1905 in Herford als Sohn des dortigen Landrats geboren und wandte sich — wohl durch sein mütterliches Erbe bestimmt — der technischen Wissenschaft zu. Er studierte in Karlsruhe, Danzig und München Elektrotechnik und wurde 1930 wissenschaftlicher Assistent von Prof. A. MATTHIAS am Hochspannungsinstitut der Technischen Hochschule Berlin, an dem eine von M. KNOLL geleitete Arbeitsgruppe sich mit der Physik und Technik des Elektronenstrahloszillographen beschäftigte. 1932 promovierte er dort mit einer Arbeit über die „Außenaufnahme am Kathodenstrahloszillographen“.

Während seiner Doktorandenzeit begannen ihn die Aussichten zu fesseln, die sich damals der Forschung durch die Möglichkeit eröffneten, Elektronenstrahlen zur Mikroskopie zu verwenden. Er wandte sich daher bald elektronenoptischen Untersuchungen zu und betrat so in jungen Jahren den

Weg, auf dem er bis zuletzt in unermüdlicher wissenschaftlicher, technischer und organisatorischer Tätigkeit so fruchtbare Arbeit leisten sollte.

Die zu jener Zeit von verschiedener Seite auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie erzielten — zumindest ermutigenden — theoretischen und experimentellen Ergebnisse hatten noch keineswegs vermocht, die Bedenken und psychologischen Hemmungen zu überwinden, die sowohl bei Physikern als auch bei anderen das Lichtmikroskop benutzenden Forschern gegenüber der neuen Methode bestanden. Dadurch war es zunächst nicht möglich, die erforderlichen erheblichen Mittel für eine intensive Entwicklung dieses Gebietes von wissenschaftlicher oder industrieller Seite zu erhalten. B. v. BORRIES hat schon früh die große Bedeutung der Elektronenmikroskopie mit klarem Blick erkannt und sich in Wort und Schrift mit seiner ganzen überzeugenden Persönlichkeit für ihre Förderung eingesetzt.

Ein erster entscheidender Erfolg war diesen Bemühungen beschieden, als das Haus Siemens ihm und dem Referenten Ende 1936 die Möglichkeit

bot, Elektronenmikroskope für die Praxis zu entwickeln. Unsere 1937 bei Siemens beginnende gemeinsame Arbeit wurde bald darauf noch durch H. RUSKA unterstützt, der als Mediziner die sich abzeichnende Erweiterung der mikroskopischen Möglichkeiten schon seit Jahren verfolgt hatte. Als Frucht dieser Zusammenarbeit konnte das Frühstadium der Experimente und Versuchsanordnungen überwunden und Ende 1939 das erste serienmäßige Elektronenmikroskop in einem Forschungslaboratorium der IG-Farben in Höchst in Betrieb genommen werden.

Neben der Vervollkommnung des Durchstrahlungsmikroskops widmete sich v. BORRIES besonders auch der Verbesserung des Rückstrahlungsprinzips. Es gelang ihm dabei erstmals, Oberflächen von Metallproben mit besserer als lichtmikroskopischer Auflösung elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, wodurch er die bisher auf durchstrahlbare, d. h. sehr dünne Objekte beschränkte Elektronenmikroskopie aufs glücklichste ergänzte. In den letzten Kriegsjahren begann er dann — anknüpfend an seine frühen Arbeiten über die Elektronenempfindlichkeit photographischer Platten — mit systematischen Untersuchungen der energetischen Wechselwirkungen im Elektronenmikroskop, mit denen er sich im Frühjahr 1945 an der Technischen Hochschule Berlin habilitierte. Für seine Verdienste erhielt v. BORRIES 1941 die Silberne Leibnizmedaille der Preußischen Akademie der Wissenschaften.

Als während der Kriegsjahre die Fortführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten wegen der für dringlicher gehaltenen Entwicklungen und Fabrikationen immer aufs neue in Frage gestellt wurde, kämpfte er mit erfolgreicher Hartnäckigkeit für das Bestehenbleiben dieser Arbeitsstätte, so daß bis Februar 1945 etwa 35 Elektronenmikroskope in wissenschaftlichen und industriellen Forschungsinstituten aufgestellt werden konnten.

Das Kriegsende verschlug ihn mit seiner Familie und einigen Berliner Mitarbeitern in seine westfälische Heimat. Dort legte er die bisher erarbeiteten Kenntnisse und Erfahrungen in dem 1949 im Verlag W. Saenger erschienenen Buch „Die Übermikroskopie“ nieder. In diesem Werk untersucht er insbesondere die Leistungsgrenzen der Elektronenmikroskopie, welche durch die energetischen Verhältnisse in der Elektronenstrahlquelle, am Objekt und auf dem Leuchtschirm sowie auf der photographischen Platte gegeben sind. Eine Klärung dieser Fragen ist für die Elektronenmikroskopie von großer Bedeutung, weil sie nicht nur die Entstehung elektronenoptischer Bilder verständlich macht und ihre Deutung und Auswertung ermöglicht, sondern weil sie auch erkennen läßt, auf welchen Wegen man die Mikroskopie mittels Elektronenstrahlen bis zur Sichtbarmachung einzelner Moleküle bzw. Atome vervollkommen kann.

Mit Tatkraft und Umsicht setzte er sich in den schwierigen Nachkriegsjahren für die Weiterführung

der elektronenmikroskopischen Forschung ein. Auf seine Initiative wurde 1948 die „Gesellschaft für Übermikroskopie e. V. zu Düsseldorf“ ins Leben gerufen, der die Ministerien für Kultus und Wirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen und verschiedene industrielle Unternehmungen angehörten. Diese gründete und betrieb dann das „Rheinisch-Westfälische Institut für Übermikroskopie“, das er als Direktor leitete. Aus diesem Institut, das sowohl der Weiterentwicklung des Elektronenmikroskops selbst als auch seiner Anwendung auf mannigfachen Gebieten dienen sollte, sind von ihm, seinen Mitarbeitern und den wissenschaftlichen Gästen viele wertvolle Arbeiten veröffentlicht worden. Sein persönliches Interesse wandte sich insbesondere der Berechnung und Konstruktion von permanentmagnetischen Elektronenlinsen zu, bei deren Verwendung die bisher erforderlichen Stromquellen hoher Konstanz fortfallen. Er entwickelte in seinem Institut mit neuen Konstruktionsideen ein leistungsfähiges magnetostatisches Elektronenmikroskop. Später wurde von ihm und seinen Mitarbeitern ein Ultramikrotom neuer Bauart veröffentlicht, das sich inzwischen ebenfalls gut bewährt hat.

Schon früh hat sich B. v. BORRIES mit der Frage auseinandergesetzt, auf welchen Wegen eine intensive und universelle Auswirkung der Elektronenmikroskopie in der naturwissenschaftlichen Grundlagenforschung und in ihren speziellen Anwendungen zu erreichen wäre. Hierbei war offensichtlich der zu große Aufwand für die Beschaffung und den Betrieb eines Elektronenmikroskops hinderlich. Er hat daher versucht, rationellere konstruktive Lösungen für die Geräte zu finden und so zu einer Senkung der Kosten beizutragen. Notwendig war es auch, an mikroskopischen Forschungen interessierte Wissenschaftler verschiedener Fachgebiete zusammenzubringen, um die Probleme der bis in die Größenordnung der Moleküle und Atome vordringenden neuen Mikroskopie zu erörtern und ihre Einführung und breite Anwendung durch ständigen Erfahrungsaustausch zu fördern. Ihm ist es an erster Stelle zu danken, daß nach dem Krieg die Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie gegründet wurde, die er — zuerst als verantwortlicher Schriftführer und dann als Geschäftsführender Vorsitzender — umsichtig und verantwortungsbewußt bis zu seinem Tod geleitet hat. Mit dem Ziel, die Veröffentlichung elektronenmikroskopischer Ergebnisse stärker als bisher in einem hierfür besonders geeigneten Organ zu konzentrieren, hat er sich erfolgreich mit dafür eingesetzt, daß die Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik, die nach dem Krieg — wie viele andere — aus wirtschaftlichen Gründen ihr Erscheinen einstellen mußte, wieder fortgeführt und durch einen elektronenmikroskopischen Teil erweitert wurde. Auf vielen in- und ausländischen Kongressen hat er die Interessen unseres Faches vertreten und die internationale Zusammenarbeit gefördert. Bei der Gründung der

International Federation of Electron Microscope Societies 1954 in London wählten ihn die Delegierten der ausländischen Gesellschaften in Anerkennung seiner wissenschaftlichen und organisatorischen Leistungen und Fähigkeiten zum Präsidenten. B. v. BORRIES fühlte sich in erster Linie als Ingenieur, und in der Tat entsprangen seine Leistungen der Synthese von wissenschaftlichem, technischem und wirtschaftlichem Denken und Schaffen. Seine Liebe galt ganz besonders dem Konstruieren. Er wurde 1949 als Honorarprofessor an die Medizinische Akademie zu Düsseldorf und 1953 als ordentlicher Professor auf den neugeschaffenen Lehrstuhl für Elektronenoptik und Feinmechanik der Technischen Hochschule Aachen berufen und konnte so — wenn auch nur noch wenige Jahre — seine reichen Erfahrungen als ein selbst begeisterter und daher mitreißender Lehrer an die jüngere Generation weitergeben. Seinen Studenten und Mitarbeitern gab er nicht nur vielfältige Anregungen, sondern brachte ihnen auch ein warmes menschliches Interesse entgegen und half ihnen in persönlichen Schwierigkeiten mit Rat und Tat.

B. v. BORRIES hat die Elektronenmikroskopie seit ihrem Entstehen über 25 Jahre lang leidenschaftlich und unermüdet gefördert. Seelischen Ausgleich für seine dauernde geistige Anspannung suchte und fand er in einem harmonischen Familienleben. Mit großer Liebe hing er an seiner Lebensgefährtin und an seinen fünf Kindern, denen er ein verständnisvoller Vater und Freund war. Er schätzte und pflegte die häusliche Geselligkeit und verbrachte auch auf den elektronenmikroskopischen Tagungen im In- und Ausland mit den Fachgenossen manche frohe und beschwingte Stunden. Es erfüllte ihn dabei mit großer Genugtuung, daß sich in so vielen Ländern der Kreis elektronenmikroskopisch arbeitender Kollegen von Jahr zu Jahr sichtlich vergrößerte. Wir Freunde und Kollegen bedauern zutiefst den so unerwartet frühen Tod des aktivsten Vorkämpfers der Elektronenmikroskopie, dessen Persönlichkeit und Lebensleistung uns unvergänglich bleiben werden. Auch seine Schüler und engeren Mitarbeiter werden ihren Lehrer und Förderer in dankbarer Erinnerung behalten.

Ernst Ruska.

It is my sorrowful duty and privilege to recall to you the untimely passing, after a short illness and serious operation, of the President of our International Federation of Electron Microscope Societies. It is sad, sad almost beyond words, that we must commence this meeting under the shadow of the death of the man who would have been presiding here, had he but lived. Professor von Borries had worked hard to prepare the way for this Congress—I believe it is correct to say that the idea of holding Regional Meetings, between the larger World Conferences, was his in the first place, and he was very much concerned to make a success of the first gathering of this kind. Could he have been with us this morning, I am sure he would have agreed that in attendance and volume of contributions it has exceeded his highest expectations.

Bodo von Borries has been one of the chief founders of electron microscopy in the strictly scientific as well as in the organisational sphere. It should be known to even the youngest of our members how he was successful, with Dr. Ernst Ruska, in obtaining in 1932 the first transmission pictures with an electron microscope. From that time on, the collaboration of von Borries and Ruska continued the development first of the electron microscope in the research laboratories of the Technical University of Charlottenburg and then of the original model for the firm of Siemens and Halske. He occupied

himself with the applications as well as the design and operation of the instrument, and was especially interested in explaining its principles and potentialities to wider scientific and semi-scientific audiences. After 1945 he had a long and hard struggle to get a laboratory established again for independent research in the subject. It is a remarkable tribute to his vision and ability that he finally successfully formed and financed, almost entirely by his own efforts, the Rheinisch-Westfälische Institut für Übermikroskopie in Düsseldorf. This must be almost unique of its kind in the world, being, so far as I know, the only independent research centre for electron microscopy, financed on a very wide basis from state, industrial and philanthropic sources, and established and directed by one man. And at the same time he was actively promoting the organisation of electron microscopy in Germany and on the international level. Others can speak with better knowledge than myself of the part he played in setting up and carrying on the Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, but it is evident that that Society has largely been inspired by him and without his constant activity on its behalf would not now be the large and influential body that it is. He was its main founder, and at his death was its executive President. I mention almost as an aside that he was Professor of electron microscopy at the Technische Hochschule at Aachen, at the same time

as he was directing the Institute in Düsseldorf and fulfilling a number of other functions in educational and scientific bodies.

In the international sphere von Borries was also most active, and deeply concerned to establish good scientific relations with electron microscopists in other countries, despite the deep wounds caused by the War. He visited us in Britain in 1948 and ever since that time has worked hard to set up an effective international organisation for electron microscopy, and to ensure that his own country played a full part in it. I need not remind you that he was elected first President of the Joint Commission for Electron Microscopy that was set up at the London Conference in 1954. When that body was in effect vetoed by the International Council of Scientific Unions he was most concerned that all the ground work put into it should not go wasted and that some viable organisation should be established as quickly as possible. He played a major part in the transformation of the Joint Commission into the International Federation of Electron Microscope Societies, and was its first President. In this capacity he worked unceasingly for the extension of the Federation's activities, for the success of the Regional

Conferences being held for the first time this year, and in preparing for the next World Congress in 1958, which was to be held in his country. At the time of his death he was planning to visit Japan during October, to attend the Regional Congress for Asia and Oceania, at which he was to have given the opening address.

By his untimely end, in the midst of full creative activity, the young science of electron microscopy has lost one of its greatest exponents and indeed one of its two original pioneers. Germany has lost the founder and mainspring of its electron microscope society and the International Federation its first president and chief advocate. I commend his career to you as an outstanding example of service to science in its fundamental, applied, educational and organisational aspects equally. Let us honour his memory by continuing to advance the aims and ideals he followed, particularly in developing the potentialities of electron microscopy in Science and technology, nationally and internationally. We mourn the death, but we salute the memory of Bodo von Borries, pioneer of electron microscopy and first President of our International Federation.



I

INSTRUMENTATION

Observation directe des surfaces métalliques par réflexion

C. FERT

Laboratoire d'Optique Electronique, Toulouse

AU cours des dernières années, l'observation directe des surfaces par réflexion d'électrons a donné lieu à diverses recherches, et plusieurs communications de ce congrès sont consacrées aux applications de cette méthode.

Je désire présenter ce problème du point de vue du physicien, en insistant sur les faits nouveaux depuis le Congrès de Londres (1954).

Généralités.— Dans un microscope électronique par « réflexion », l'objet est « éclairé » par un faisceau d'électrons monocinétiques. Les électrons diffusés dans la direction de l'objectif servent à la formation de l'image¹.

L'axe du faisceau qui éclaire l'objet est incliné par rapport à l'axe de l'objectif d'un angle $\theta_1 + \theta_2$ (fig. 1). L'objet est éclairé sous un angle θ_1 (angle d'éclairage). La surface de l'objet fait avec l'axe de l'objectif un angle θ_2 (angle d'observation).

Angle θ_2 et distorsion de l'image : L'image qui se forme sur l'écran est celle de la projection de la surface de l'objet sur le plan de front conjugué de l'écran. Soit M_1 le grandissement. Si un quadrillage carré de côté a est tracé sur l'objet², l'image de chaque carré est un rectangle de côté $M_1 a$ et $M_1 \sin \theta_2 a$. On parle de deux grandissements caractéristiques M_1 et $M_2 = M_1 / \sin \theta_2$. On peut dire que le rapport $M_2 / M_1 = \sin \theta_2$ caractérise une « distorsion » de l'image.

Angle θ_1 et sensibilité au relief : Nous verrons que θ_1 est toujours petit devant θ_2 : l'éclairage est très rasant. Les aspérités de l'objet portent ombre sur sa surface³. Si θ_1 est très petit, les ombres sont très

$$l = h \frac{\sin(\theta_1 + \theta_2)}{\sin \theta_1}$$

allongées, la sensibilité au relief très bonne : une aspérité de quelques millimicrons est mise en évidence. Cette cause de contraste est prépondérante devant toutes les autres, ce qui distingue nettement la microscopie électronique par réflexion d'autres méthodes d'observation directe des surfaces (microscopie électronique à émission par exemple).

Influence de θ_1 et θ_2 sur la résolution : Microscopie électronique par réflexion sous grand angle.— Jusqu'en 1954, la seule technique utilisée était celle de l'observation rasante¹ : θ_2 petit, de l'ordre de 4 à 6°, M_1 / M_2 de l'ordre de 10 à 15; dans ces conditions, la distorsion des images est très gênante, mais il était admis que si θ_2 était plus grand la dispersion des vitesses des électrons diffusés devenait importante et la résolution mauvaise⁵.

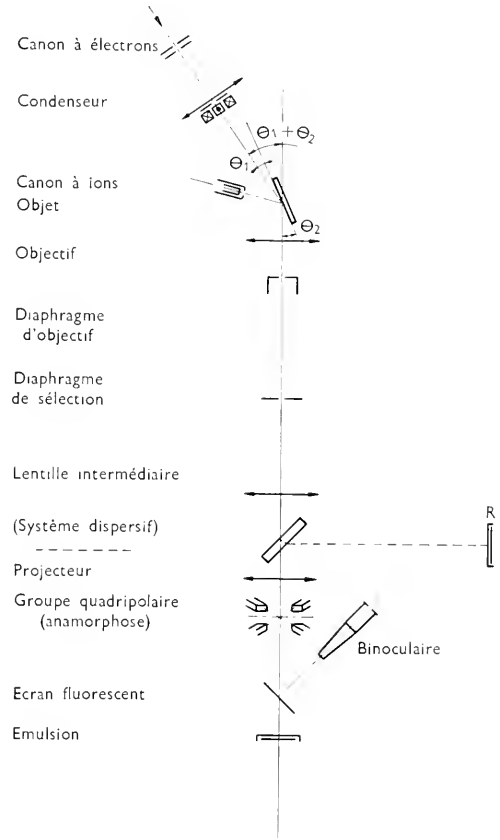


Fig. 1. Direct observation of solid surfaces by reflection. Apparatus.

Nous avons cherché à déterminer expérimentalement l'influence réelle de θ_2 .

A notre surprise, l'expérience a montré que, si l'objet est très propre, très peu corrodé et le faisceau incident rasant (θ_1 petit, 1 à 3° par exemple), la résolution ne varie pas, pour une ouverture donnée, si θ_2 augmente. Elle est, par exemple, voisine de 300 Å pour une ouverture $2\alpha = 5 \cdot 10^{-3}$ radians, pour la plupart des échantillons examinés.

¹ Le premier essai de microscopie électronique par réflexion est dû à Ruska (5).

² On suppose que un côté est orienté perpendiculairement au plan d'incidence.

³ La longueur *apparente*, en projection sur le plan de front conjugué de l'écran, de l'ombre d'une aspérité de hauteur h est

⁴ Voir par exemple : Dupouy et Fert, Congrès de Londres (1954). La première publication sur cette technique est celle de von Borries (1).

⁵ Dans le microscope électronique par réflexion, c'est l'aberration chromatique de l'objectif qui limite la résolution.

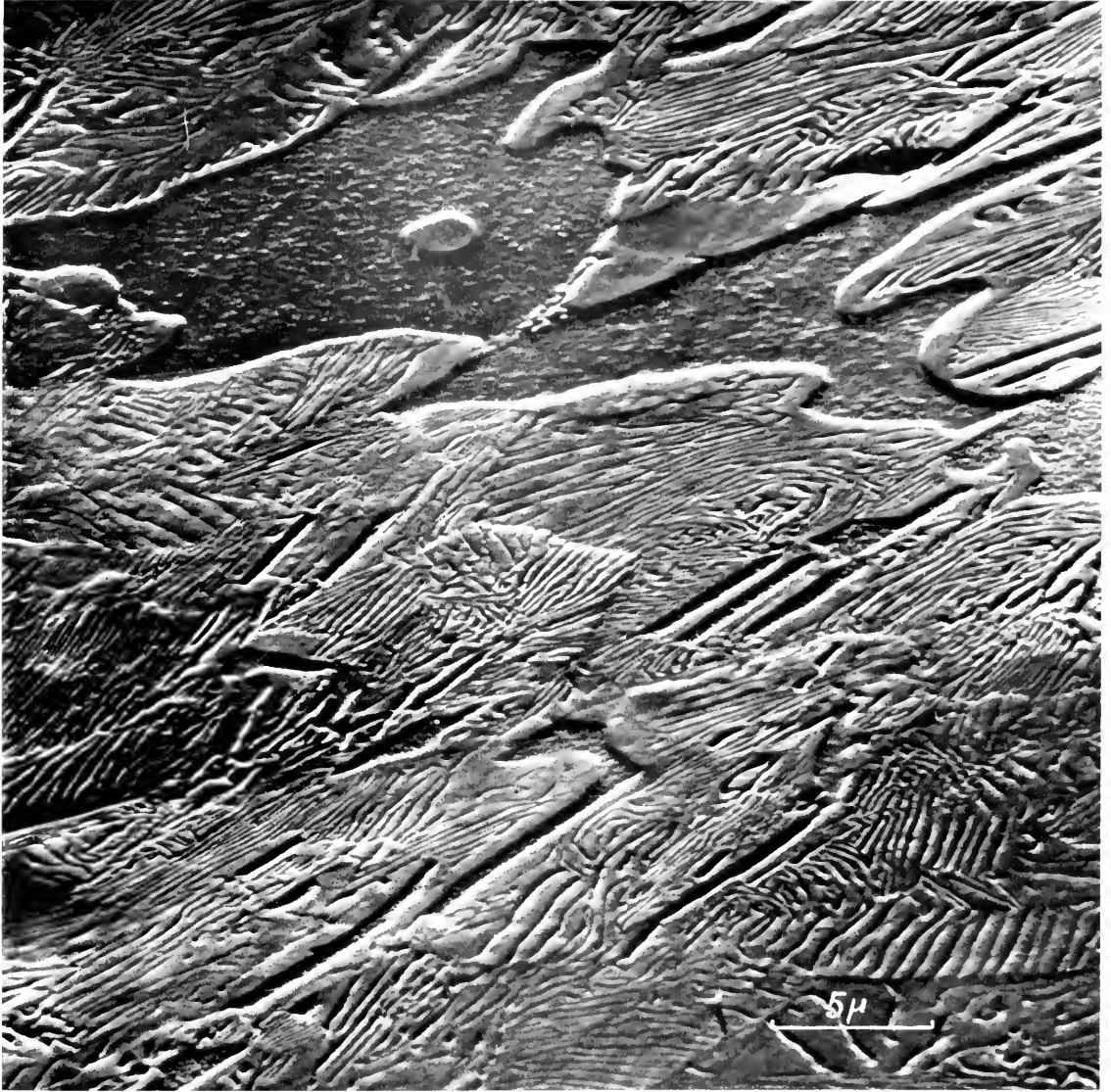


Fig. 2. White pearlitic cast-iron etched by cathode sputtering. Experimental conditions: $\theta_1 = 2^\circ$, $\theta_2 = 23^\circ$; ratio of the characteristic magnifications: 2.5. Objective focal length $f = 3.5$ mm. Objective diaphragm: $2r = 30$ microns. Direct magnification, 1800. Exposure time: 15 seconds.

This photograph has been obtained by joining together three photographs which were taken with slightly different focusing, corresponding to a known variation of the resistance which is placed in series with the objective.

Autrement dit : si θ_1 reste petit, la dispersion des vitesses des électrons diffusés n'augmente pas sensiblement avec θ_2 .¹

L'emploi de grands angles d'observation ($\theta_2 = 15^\circ$)

¹ Pour préciser ce résultat, nous faisons actuellement une étude expérimentale directe de cette dispersion en fonction de θ_1 et θ_2 par spectrographie des vitesses électroniques. L'élément dispersif (en pointillé sur la fig. 1) est monté sur le microscope électronique par réflexion, et permet d'obtenir le spectre des vitesses des électrons diffusés par une région choisie de l'objet.

² Diverses conséquences résultent de l'emploi de grandes valeurs de θ_2 : bande de netteté plus large, sensibilité au relief plus grande etc... Nous n'insistons pas ici sur ces résultats, qu'il est facile de prévoir (4).

change complètement l'aspect des images. Nous avons principalement utilisé des valeurs de $\theta_1 = \theta_2 = 25^\circ$, soit $\theta_2 = 23^\circ$.

La figure 2 montre une image obtenue dans ces conditions. Le rapport M_1/M_2 , caractéristique de la distorsion des images, est $M_1/M_2 = 2.5$ au lieu de 15 pour $\theta_2 = 4^\circ$.

Reduction de la distorsion des images par une lentille correctrice. Pour réduire encore davantage cette distorsion (quel que soit θ_2), nous avons en outre utilisé l'artifice suivant.

Un système à symétrie non axiale est disposé après le projecteur. Son rôle est d'augmenter le grandissement dans le plan d'incidence, et de le réduire dans le plan perpendiculaire (3).

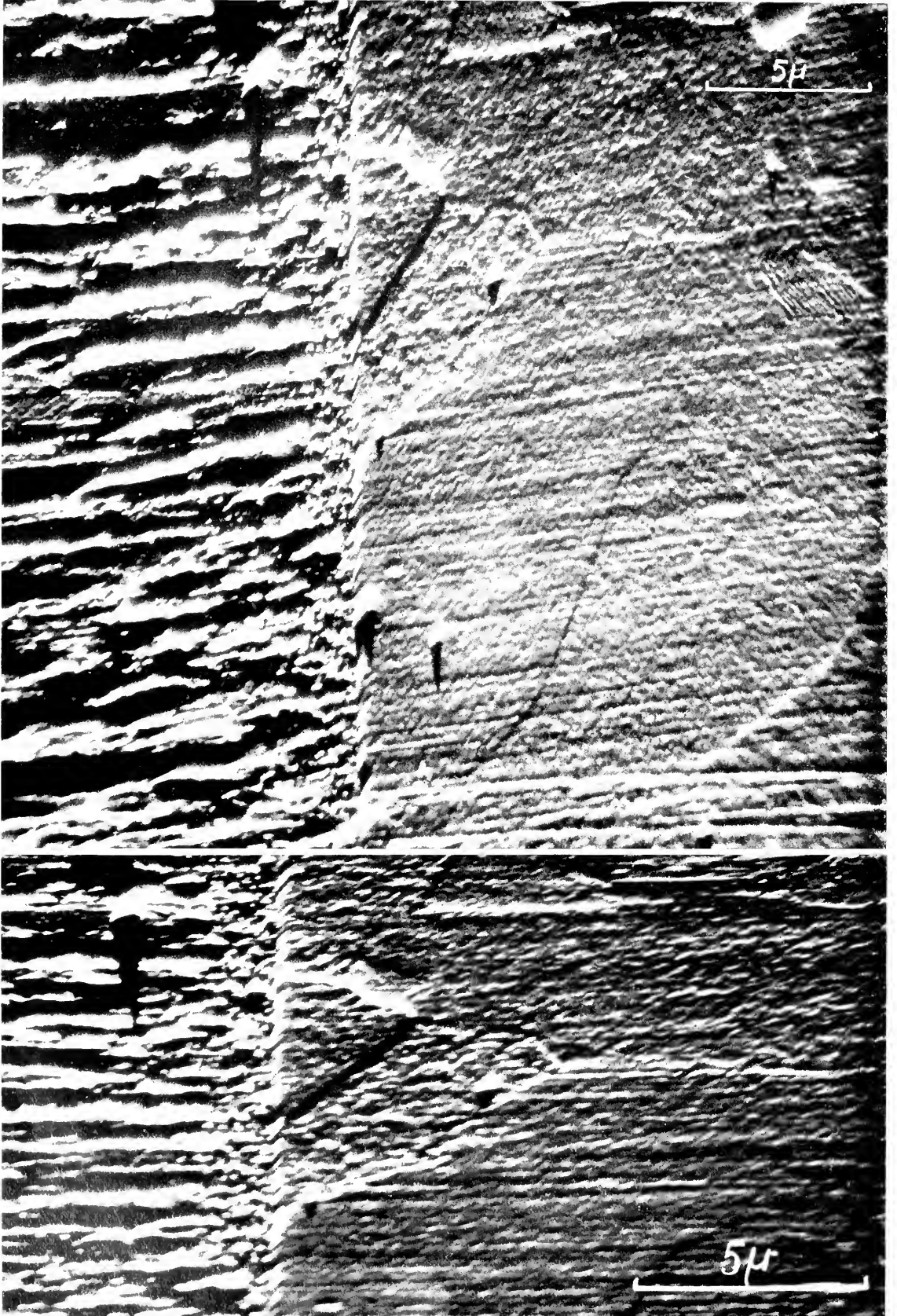


Fig. 3 Correcting lens operating. The specimen is an electrolytic deposit of Nickel on cast-iron. The two parts of this figure represent the same region of the specimen with and without correcting lens.

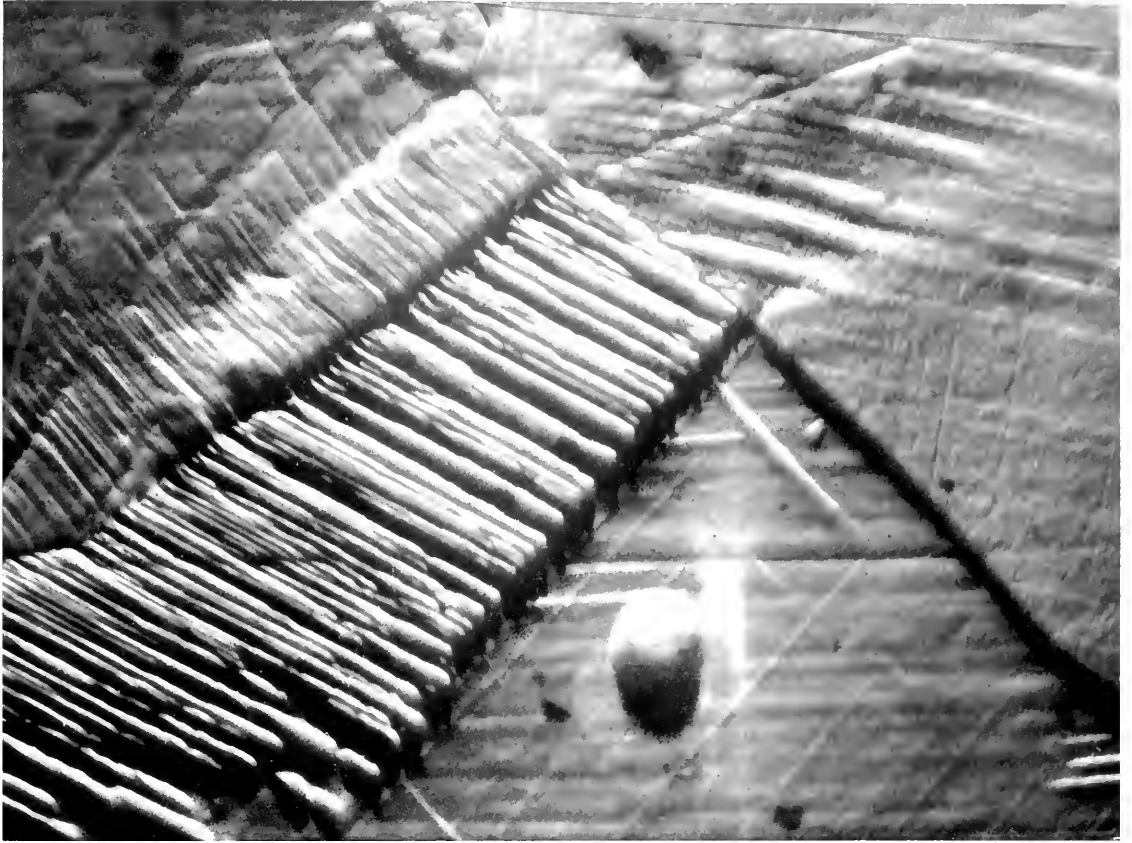


Fig. 4. Austenitic steel. $\theta_1 + \theta_2 = 25^\circ$; with correcting lens, $M_1/M_2 = 1.3$.

Nous avons obtenu d'abord ce résultat avec une lentille électronique sphéro-cylindrique. Nous utilisons maintenant un groupe quadrupolaire magnétique (fig. 1) convenablement orienté. Si i est le courant d'excitation des bobines de ce système, le rapport M_1/M_2 devient¹ :

$$\frac{M_1}{M_2} = \frac{1}{\sin \theta_2} \cdot \frac{1 - \omega i}{1 + \omega i}$$

(ω , coefficient caractéristique du groupe quadrupolaire).

Les figures 3 à 5 ont été obtenue dans ces conditions, pour $\theta_2 = 23^\circ$ (Fig. 3), $\theta = \theta_2 = 25^\circ$ (Fig. 4), $\theta = 12^\circ$ (Fig. 5).

Cet artifice reste évidemment valable pour des valeurs plus petites de θ_2 , qui présentent l'avantage de donner des images mieux éclairées, ou de permettre la micro diffraction. Il facilite toujours beau-

coup l'observation des images ou l'interprétation des photographies.

Description de l'appareil.— La figure 1 précise le montage. On notera :

Le canon à ions; le bombardement ionique de l'échantillon évite sa contamination (2).

Le diaphragme de sélection qui limite la région de l'objet si on veut obtenir soit le diaphragme de diffraction de cette région (θ_2 petit), soit le spectre des vitesses des électrons diffusés par cette région.

Le groupe quadrupolaire correcteur.

L'écran fluorescent *incliné* qui assure une correction complémentaire de la distorsion de l'image, dans l'observation visuelle. Cet écran est *relativement éloigné de l'émulsion* afin d'observer une image à grandissement réduit, donc plus éclairée.

Nos efforts se poursuivent actuellement afin d'améliorer la résolution et l'éclaircissement des images par :

(a) l'emploi d'une différence de potentiel accélératrice plus élevée, afin d'augmenter la brillance de la source, et, peut-être, de réduire $\Delta V/V$.

(b) l'emploi de systèmes correcteurs de l'aberration chromatique, à symétrie non axiale.

Conclusion.— La microscopie électronique par réflexion est possible pour une très large gamme des valeurs de l'angle d'observation, à résolution sensi-

¹ L'expression de la longueur apparente d'une ombre portée prend la forme :

$$l = h \frac{\sin(\theta_1 - \theta_2)}{\sin \theta_1} \cdot \frac{1 - \omega i}{1 + \omega i}$$

L'impression de relief est augmentée.

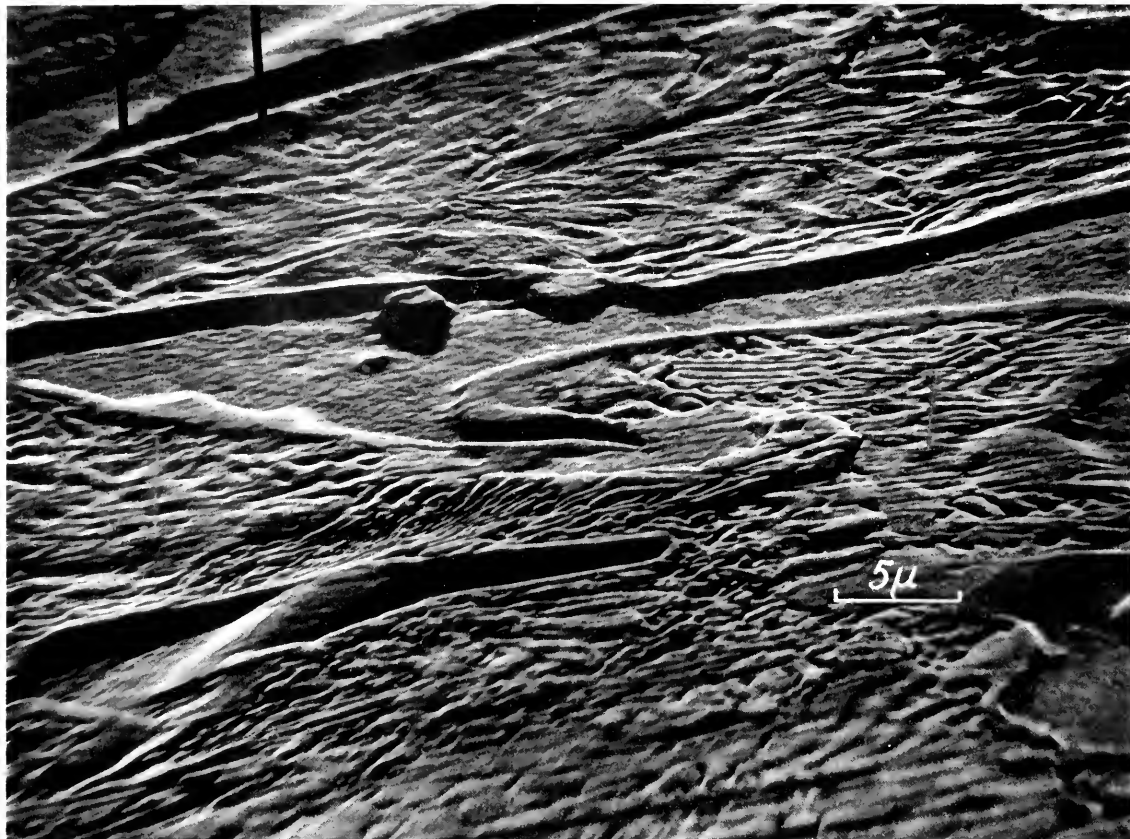


Fig. 5. White pearlitic cast-iron. $\theta_1 + \theta_2 = 14^\circ$, $\theta_2 = 12^\circ$, with correcting lens, $M_1/M_2 = 3$. Exposure time: 3 seconds. Direct magnification: 1000.

blement constante. Elle présente une sensibilité au relief comparable à celle des méthodes optiques interférentielles ou par contraste de phase, tout en ayant une limite de résolution dix fois meilleure environ, dans les conditions actuelles. Ces caractéristiques essentielles, fixeront, sans aucun doute, le domaine propre d'utilisation de la microscopie électronique par réflexion dans l'observation directe des surfaces.

BIBLIOGRAPHIE

1. VON BORRIES, B., *Z. Physik* **116**, 370 (1940).
2. FERT, CH., *Compt. rend. acad. sci.* **248**, 333 (1954).
3. FERT, CH. et MARTY, B., *Compt. rend. acad. sci.* **241**, 1454 (1955).
4. FERT, CH., MARTY, B. et LAPORTE, R., Comptes rendus du colloque CNRS à Toulouse, Avril 1955.
5. RUSKA, E., *Z. Physik* **83**, 492 (1933).

A Scanning Microscope with either Electron or X-Ray Recording

V. E. COSSLETT and P. DUNCUMB

Cavendish Laboratory, Cambridge

THE purpose of the scanning microscope is to form an image of a surface either by electron scattering or by x-ray emission, and to analyse the elements in a selected volume of about one cubic micron in the surface by the characteristic x-ray lines emitted.

A block diagram of the apparatus is shown in fig. 1. The electron beam is focussed by two magnetic

lenses into a small spot on the specimen, using a similar technique to the x-ray projection microscope (4, 6), and is scanned over the specimen by the deflection coils. These coils are similar to those used by McMullan and Smith in their scanning electron microscope (5, 7), and give the beam a double deflection balanced so that the beam always goes through

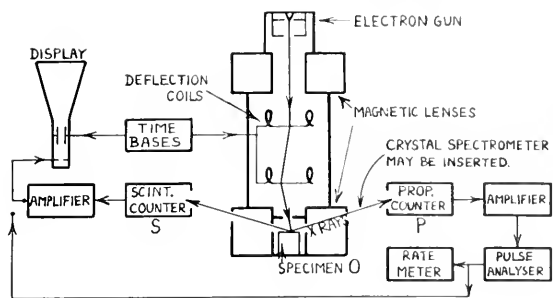


Fig. 1. Block diagram of the scanning microscope.

the lens aperture. The spot size is 0.1μ to 1μ and the area of scan about $\frac{1}{2}$ mm square at largest. Part of the emitted x-rays are collected through a window in the polepiece gap by a scintillation counter, or alternatively the phosphor of the counter may be pushed into the vacuum to record high energy scattered electrons. The amplified signal from the counter modulates the brightness of a cathode ray tube scanned in synchronism with the microscope beam, so that an image is obtained of the variation of scattered electron intensity or of x-ray emission over the surface.

The scan may then be stopped and the microscope beam accurately positioned on any feature in the specimen by observing the spot on the afterglow of the picture on the display tube. Through another window part of the emitted x-rays pass into a crystal spectrometer for analysis of the emission spectrum from that point, as in the method of microanalysis developed by Castaing (1, 2).

Alternatively, the crystal can be removed from the spectrometer so that the x-rays pass straight into a proportional counter, which gives for each quantum a pulse of height approximately proportional to its energy. A single channel pulse analyser can be used to pass only pulses corresponding to a given characteristic line and, with the beam scanning, these can modulate the display tube so that the distribution of the element emitting that line is shown up.

The second lens is shown in fig. 2. The electrons are focussed on to the specimen which is level with the lower pole face, and x-rays pass through a beryllium window into the phosphor of the scintillation counter just outside the gap. The light generated is transmitted by a perspex rod to the photocathode of the multiplier outside the lens. The electrons scattered from the specimen are deflected by the lens field, but may be collected by removing the window and pushing the phosphor into the polepiece gap. The signal from the photomultiplier with electron recording is several hundred times that with x-ray recording with other conditions unaltered.

Through another window in the polepiece gap x-rays pass into a hydrogen filled tube and into the crystal spectrometer or proportional counter. The

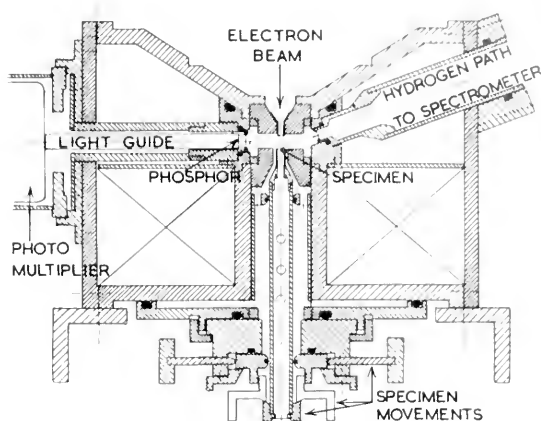


Fig. 2. Final lens.

specimen can be moved laterally and vertically or rotated and is insulated from earth in order to measure the incident electron current. The focal length of the lens is about 4 mm; this is slightly shortened by a thick ferromagnetic specimen but the spot is not distorted.

Fig. 3 shows an area of 1500 mesh/inch silver grid as photographed from the display tube with electron collection in *A* and x-ray in *B*. The accelerating voltage was 25 kV giving an electron penetration in the specimen of about 1μ . The topography of the bars is shown up with electron collection (*A*) but not with x-ray collection (*B*) unless the irregularities are more than a few microns in size. With x-ray collection the resolution can be no better than the electron penetration since x-rays are emitted throughout the volume of electron diffusion, but with electron collection the resolution is well below this. Smith reports a resolution of about 200 \AA with his scanning microscope (7).

The particular advantage in using x-rays to form the picture lies in being able to show up the distribution of one element by using a proportional counter and pulse analyser. For example, with a specimen of silver and copper grids it is possible to make either one appear the brighter by selecting the CuK

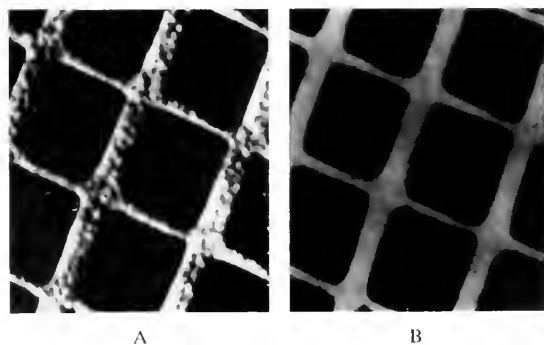


Fig. 3. 1500 mesh inch silver grid, bars 3μ and $1\frac{1}{2} \mu$ wide. *A*, electron collection; *B*, x-ray collection.

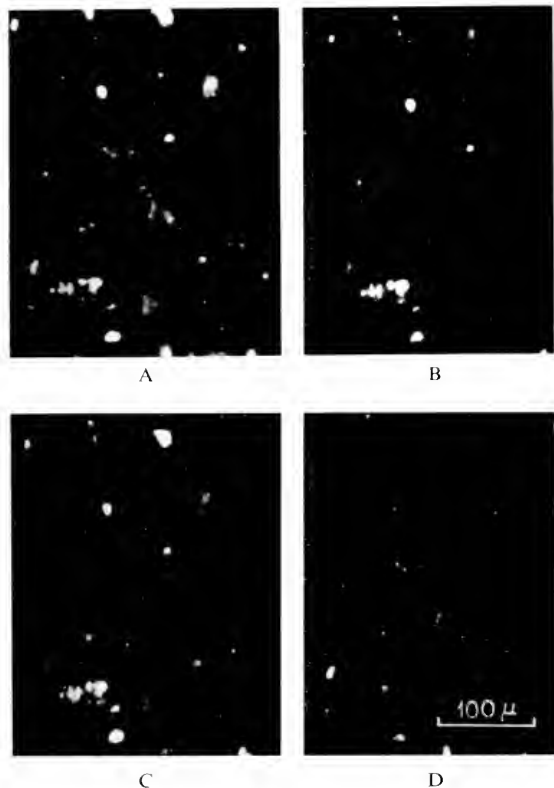


Fig. 4. Impurities in beryllium foil, x-ray collection. *A*, all radiation recorded; *B*, *C*, *D*, characteristic emission from different impurities separately selected—manganese, nickel and calcium respectively.

or AgL characteristic radiation to form the picture. The distribution of the copper can thus be shown in one picture and the distribution of the silver in the other. Another way of displaying this same result is to regard the two pictures as components of a colour picture and photograph them through different filters in register on the same piece of colour film. In this way the copper was made to appear red and the silver green. In principle one can attach a

given colour to a given x-ray wavelength, which may be a useful technique for presenting in one picture the relative positions of several elements.

As an example of the identification of inclusions in a surface, fig. 4 shows some impurities in a piece of beryllium foil (3). In *A* all the emitted x-rays were used to form the picture and the impurities show up as emitting more strongly than the beryllium. In *B*, *C*, and *D* the pulse analyser was set to pass the characteristic radiation from three different types of impurity in turn, which were identified as manganese, nickel and calcium respectively. The information may again be presented on one picture in colour.

The energy resolution of the proportional counter is not good enough for the separation of characteristic radiation from elements which differ by less than about four in atomic number. However, it seems that there would be sufficient intensity reflected from a curved crystal in the spectrometer to form the picture, in which case adjacent elements would easily be separable.

The instrument, therefore, can show up either the topography of a surface by electron scattering with a resolution of well below 1μ , or the distribution of an element over a surface by x-ray emission with a resolution of about 1μ . A selected point in the surface can then be analysed quantitatively by plotting the characteristic x-ray emission spectrum by means of a crystal spectrometer.

REFERENCES

1. CASTAING, R., Thesis. Paris, 1951.
2. CASTAING, R. and DESCAMPS, J., *J. phys.* **16**, 304 (1955).
3. COSSLETT, V. E. and DUNCUMB, P., *Nature* **177**, 1172 (1956).
4. COSSLETT, V. E. and NIXON, W. C., *J. Appl. Phys.* **24**, 616 (1953).
5. McMULLAN, D., *Proc. Inst. Elec. Engrs.*, Pt. 1, **100**, 245 (1953).
6. NIXON, W. C., *Proc. Roy. Soc. A* **232**, 475 (1955).
7. SMITH, K. C. A. and OATLEY, C. W., *Brit. J. Appl. Phys.* **6**, 391 (1955).

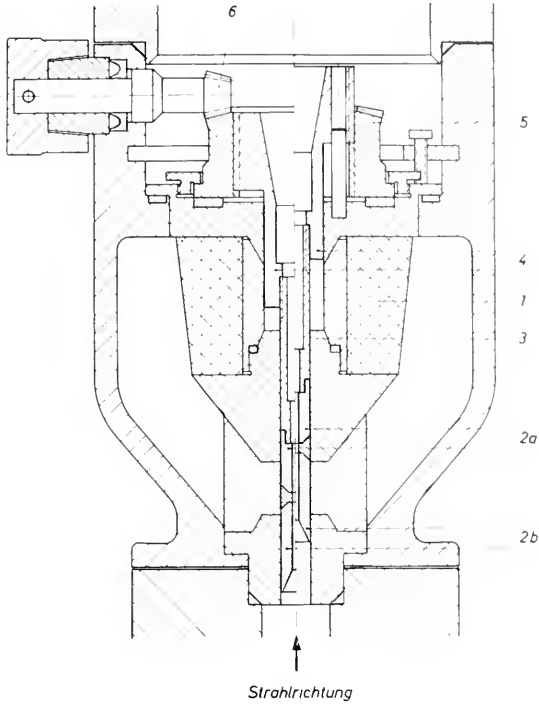
Imaging Elements Operating with Permanent Magnets

B. V. BORRIES †, G. LANGNER and W. SCHEFFELS

Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf

ELECTRON lenses operating with permanent magnets can be employed in electron microscopes, as several authors (1, 8) have shown. The advantage of such lenses is that no source for a highly stabilized lens current is needed. As the main disadvantage during operation must be named the impossibility to switch off the magnetic field. Moreover there must be at least two gaps in a system excited by permanent

magnets to avoid stray field. This does not necessarily mean, however, that these gaps must act as separate lenses. Permanent magnetic einzel-lenses with variable focal length have been used as condenser lenses by v. Borries (1954), the magnetic circuit of which has been calculated by v. Borries and Lenz (4) and the properties of which have been investigated experimentally by Langner (6). Also as



1, Permanent magnet. 2 a, 2 b, Displaceable polepieces of the intermediate lens. 3, Insert, at the same time fixed pole-piece at the final projector lens. 4, Displaceable polepiece of the final projector lens. 5, Control nut. 6, Bevel gear.

Fig. 1. Cross section through a two-stage projective system operating with permanent magnets.

an electron microscope objective lens a permanent magnetic einzel-lens may be used. On its electron optical properties Lenz (9) has published a paper. Such einzel-lenses and any lens system of two or more gaps operated by a single permanent magnet as described e.g. in a paper by v. Borries and Langner (4) show no image rotation, or, if the specimen immerses in the field as is the case in strong lenses, the image rotation is at least small and does not vary noticeably when the magnification is changed.

The size of such a system depends on the magnetomotive force of the permanent magnet. The optimum shape of a permanent magnetic lens system has been calculated by v. Borries and Lenz (4), and it can roughly be said that for the diameter D of such a system, provided the best obtainable Alnico magnets with at least $4.5 \cdot 10^6$ Gauss-Oersted are used, the following simple rule holds:

$$D \approx 7 \cdot 10^{-2} \text{ mm Amp}^{-1} I,$$

where I is the number of ampere-turns the magnet supplies when in the system. Based on the design of what we think an optimum system for an electron lens system with rotational symmetry three permanent magnetic electron microscopes have been completed with $I \approx 2500$ Amp on which papers have been published by v. Borries (1, 2). Recently we have built a two-stage projector system of $I =$

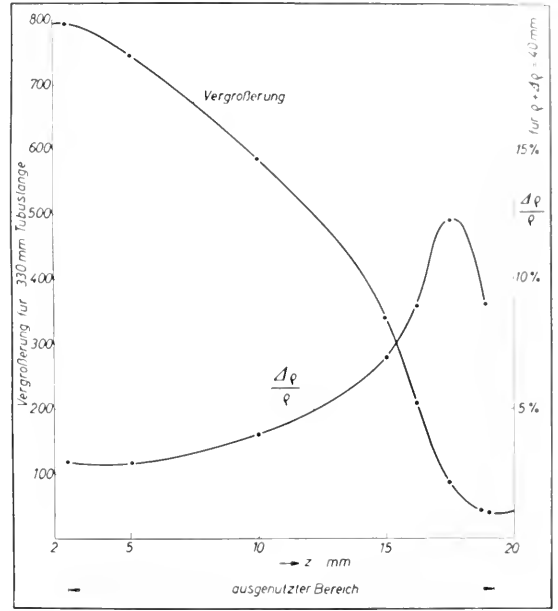
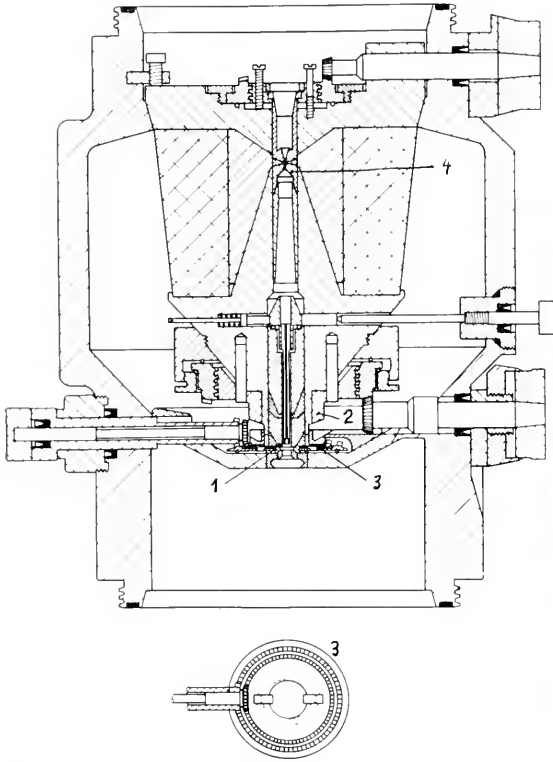


Fig. 2. Magnification and distortion of a two-stage permanent magnetic projector system.

1720 Amp, $I^2 U = 60 \text{ Amp}^2 \text{ Volt}$ for 50 kV, for the use with an immersion objective. The cross section is shown in fig. 1. The magnet is outside the vacuum. The intermediate lens is formed by the polepieces 2a and 2b, the axial displacement of which permits the magnification of this stage to be varied. The properties of such lenses have been described earlier (6, 7). A rather large range of magnification is achieved at the cost of considerable radial distortion. The final projector has therefore been designed as a lens with a variable gap-width which yields less distortion but also less variation of magnification. Fig. 2 illustrates magnification and radial distortion versus the displacement of the polepieces. The magnification can be continuously varied in the ratio 1:20 while the specimen is under observation.

Furthermore we have enlarged the above-mentioned system and used a magnet with 3250 Amp. With this two-stage microscope a magnification of 28,000 has been obtained. Fig. 3 shows the cross section of this system. The objective lens 1 is normally operated with one gap, but by axial displacement of an iron piece 2 the second gap opens. So the back focal plane of the first gap can be imaged to obtain three-stage diffraction diagrams. In the first gap we use a magnetic stigmator 3 which is schematically shown below. Two pieces of iron slide within slotted pieces, so the azimuth and the strength of the stigmator can be controlled separately.

The projector consists of a polepiece unit 4 which is also axially displaceable and permits a variation of the magnification of 1:11. New in respect to former instruments of that kind is the separate control of the magnification in the projector and in the objective. Owing to this it is e.g. possible to image



$I = 3250$ Amp., $U = 60$ kV. Continuous variation of magnification between the three stage diffraction patterns and $A_{\max} = 28\ 000$.

Fig. 3. Cross section of a permanent magnetic microscope system.

three-stage diffraction patterns with different magnifications.

It is also possible to use the whole system as a diffraction condenser, and also to use it as an electron shadow microscope. If crystalline matter is put into the caustic, dynamic diffraction patterns can be obtained which resemble Kikuchi lines. Such patterns from MgO crystals are shown in fig. 4.

Another problem in the field of permanent magnetic lenses which we have investigated is the so-called "reflexion microscopy" which is really a dark field microscopy of surfaces hit by the electron beam in grazing incidence. In order to avoid immersion the focal length must be considerably greater than half the gap width in order to give space for the axial movement of the specimen. On the other hand the chromatic aberration constant C_c should be as small as possible because the mostly inelastically scattered electrons which are used to image have suffered considerable energy losses ΔE . If we put for a moment $C_c \approx f$ (f focal length), and d be the diameter of the aperture stop, we obtain for the resolving power

$$\delta = \frac{d}{f} \cdot C_c \cdot \frac{\Delta E}{eU^*} \approx d \frac{\Delta E}{eU^*}$$



Fig. 4. Kikuchi lines of MgO crystals obtained in the caustic of a strong permanent magnetic lens.

when using permanent magnetic lenses with the relativistic accelerating voltage U^* . The image brightness goes with the 2nd power of α , so using half the focal length one should get four times the brightness in the image at the same resolution and magnification.

The requirement of non-immersion objective lenses sets a limit to the lens excitation. We have tried an objective lens with $b = 1$ mm bore, $s = 0.8$ mm gap-width, $f = 1.45$ mm, $C_c = 1.35$ mm which needs $I = 1450$ Amp at 60 kV. In a two-stage permanent magnetic system this demands the same low excitation also for the projector which then is likely to cause distortion. This is a difficulty which arises when using permanent magnetic microscopes for "reflexion microscopy". This difficulty can be overcome by using two-gap objective lenses, over which the effective ampere turns of the magnet are distributed so that the objective lens gets a suitable low excitation and the series gap takes the rest and is used as an intermediate lens. The latter, however, may also cause some distortion.

We leave now the permanent magnetic lens systems with rotational symmetric lenses, and turn to elements with less symmetry. For "reflexion microscopy" normally the condenser is tilted. It is also possible to deflect the beam so that its angle of incidence is suitable for "reflexion microscopy". K. Ito and T. Ito (5) have used deflection coils. We have tried to use small permanent magnets. For small deflection angles β the following relation holds



Fig. 5. Reflection units using small permanent magnets.

$$\beta = \sqrt{\frac{e}{2m_0 U^*}} \int_{z_0}^{z_1} B_x(z) dz.$$

Here e is the charge of an electron, m_0 its mass, B_x the component of the induction normal to the plane

of motion. z measures in the initial direction, the field extends between, z_0 and z_1 . Fig. 5d illustrates the principle of a deflection unit working with small flat Alnico magnets. Fig. 5a shows the unit assembled and Fig. 5b the magnets, the magnetic link and the mount. With these magnets an angle of deflection of 11° can be obtained.

It may only be mentioned here that two permanent magnets of this type can be arranged in a way that they form a magnetic quadrupole and so have focussing properties. Lenses of both positive and negative focal length in the order of 5–6 mm could be realized with the small magnets described above. The very preliminary experiments were carried out with the help of a device shown in fig. 5c, which has two or four degrees of freedom.

For many fruitful discussions the authors wish to thank Dr. Lenz. The technical designs of the lens systems lay in the hands of Ing. J. Huppertz.

REFERENCES

1. VON BORRIES, B., *Kolloid-Z.* **114**, 164–167 (1949).
2. — *Z. wiss. Mikroskop.* **60**, 317–358 (1952).
3. VON BORRIES, B. and LANGNER, G., *Comptes rendus du colloque CNRS à Toulouse*, 4.–8. April 1955, pp. 285–295 (1956).
4. VON BORRIES, B. and LENZ, F., *Optik* **13**, 264–276 (1956).
5. ITO, K., ITO, T. and WATANABE, M., *J. Electron-microscopy (Japan)* **2**, 10–14 (1954).
6. LANGNER, G., *Optik* **12**, 554–562 (1955).
7. LANGNER, G. and LENZ, F., *Optik* **11**, 171–180 (1954).
8. REISNER, I. H. and DORNFELD, E. G., *J. Appl. Phys.* **21**, 1131–1139 (1950).
9. LENZ, F., *Z. ang. Phys.* **8**, 492–496 (1956).

Über magnetostatische Linsenarrangements mit mechanischen Regelgliedern¹

K. MÜLLER

Siemens & Halske AG, Wernerwerk für Meßtechnik, Berlin-Siemensstadt

IM Rahmen einer Entwicklung magnetostatischer Elektronenlinsen haben wir vor allem die Möglichkeiten studiert, die Brennweite solcher Linsen zu regeln, wie es zur Scharfstellung des Bildes oder zum Wechsel des Abbildungsmaßstabes notwendig ist.

Die Brennweite einer magnetischen Elektronenlinse hängt von drei Größen ab: von der Strahlspannung, der Maximalfeldstärke im Linsenspalt und von der Halbwertsbreite des Linsenfeldes. Die Änderung einer dieser drei Größen bewirkt eine Regelung der Brennweite, doch sind nicht alle Größen in gleicher Weise geeignet: Strahlspannungsänderungen beeinflussen in meist unerwünschter Weise das Durch-

dringungsvermögen der Elektronen. Man wird diese Möglichkeit der Brennweitenregelung deshalb höchstens in einem schmalen Bereich anwenden, der zur Feinfokussierung des Bildes genügt, dagegen für Grobscharfstellung und Vergrößerungswechsel die Änderung von Maximalfeldstärke und Halbwertsbreite vorziehen. Die Halbwertsbreite des Feldes ist — wenn man von Sättigungserscheinungen absieht — allein eine Funktion der Linsengeometrie, also des Polschuhabstandes und des Bohrungsdurchmessers. Sie kann daher durch das Auswechseln von Polschuhen oder durch Verschieben der beiden Polschuhe einer Linse gegeneinander verändert werden. Das Auswechseln schien uns technisch unbequem; die Möglichkeit einer Polschuhverschiebung gefährdet eine exakte Zentrierung der Linsen. Wir wählten deshalb den dritten Weg: die Regelung der Feld-

¹ Eine ausführlichere Veröffentlichung erscheint demnächst in *Z. wiss. Mikroskopie*.

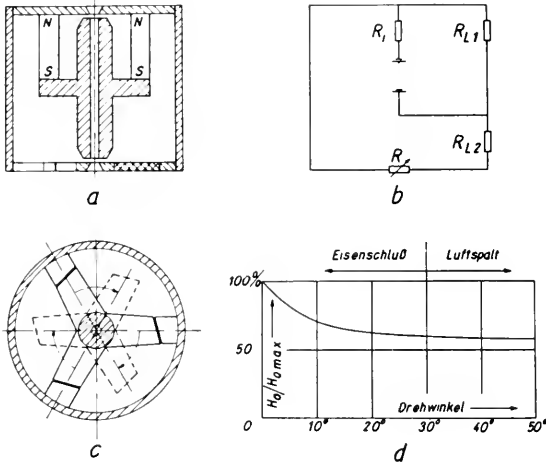


Abb. 1. Magnetostatische Linsenordnung mit Zackenregler. a) Magnetische Anordnung; b) elektrisches Ersatzbild; c) Zackenregler; d) Feldstärke-Regelkurve.

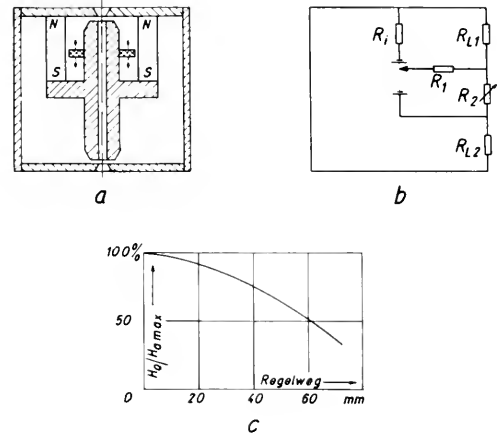


Abb. 2. Magnetostatische Linsenordnung mit Innenscheibe. a) Magnetische Anordnung; b) elektrisches Ersatzbild; c) Feldstärke-Regelkurve.

stärke durch Änderung der magnetischen Spannung am Linsenspalt. B. v. Borries und Mitarbeiter erreichen eine solche Änderung z. B. durch wechselnde Aufteilung einer konstanten Spannung auf zwei Linsenspalte (z. B. G. Langner 1955). Es gibt aber noch andere Möglichkeiten, das Linsenfeld bei starrer Polschuhanordnung durch die Bewegung von Eisenteilen zu beeinflussen:

Abb. 1 zeigt eine magnetische Linsenordnung, daneben das elektrische Ersatzschaltbild: Ein Permanentmagnet möge zwei Linsenspalte (L_1 und L_2) gegenpolig erregen. Dem Magneten entspricht eine Stromquelle mit dem inneren Widerstand R_i . R_{L1} und R_{L2} entsprechen den magnetischen Widerständen der Linsenspalte. Man kann die Spannung an R_{L2} nun z. B. durch Einfügen eines Widerstandes R vermindern. Im magnetischen Kreis geschieht das am einfachsten durch einen Zackenregler (Abb. 1c): Man verwendet zur Flußführung zwischen Magnet und Linse ein Rad mit einer beliebigen Anzahl von Speichen, die so geteilt sind, daß das Rad in einen ruhenden Teil, den „Stator“, und einen beweglichen Teil, den „Rotor“, zerfällt. Bei Drehung des Rotors ändert sich die Größe der Berührungsfläche zwischen Stator und Rotor und damit der magnetische Widerstand zwischen Magnet und Linse. Infolgedessen ändert sich die Feldkurve im Spalt der unteren Linse (L_2) gemäß der in Abb. 1d dargestellten Kurve. Die etwas wechselnde Belastung des Magneten verursacht eine wechselnde Durchströmung des inneren Widerstandes R_i . Daher läßt sich eine geringe Rückwirkung des Regelvorganges auf die zweite Linse des Systems nicht vermeiden. Sie ist gegensinnig, d. h. bei Schwächung der Linse 2 wird Linse 1 etwas stärker.

Abb. 2 zeigt einen anderen permanentmagnetischen Kreis und sein elektrisches Ersatzschaltbild. Es sei diesmal eine Beeinflussung der oberen Linse (L_1) erwünscht. Dazu dient eine ringförmige Regel-

scheibe, die zwischen Magnet und Polschuhhalter axial beweglich ist und einen variablen Teil des Magneten zusätzlich belastet (Innenscheibe). Durch geeignete Dimensionierung kann man erreichen, daß beim Aufwärtsbewegen der Scheibe der Weicheisenkreis zwischen Magnet und Linsenspalt infolge der Flußerhöhung in wachsendem Maße gesättigt wird. Das entspricht einer Veränderung des Widerstandes R_2 und bewirkt demzufolge eine Änderung der Feldstärke in der oberen Linse. Auch diese Regelung erfolgt wegen der wechselnden Durchströmung des Widerstandes R_i mit geringer, diesmal gleichsinniger Rückwirkung auf die zweite Linse des Systems.

Gelegentlich legt man Wert darauf, daß beide Linsen in gleichem Maße geregelt werden. Dazu eignet sich eine Ringscheibe zwischen dem Magneten und dem Außenmantel des Systems (Außenscheibe, Abb. 3). Bei dieser Anordnung ist die Änderung der Durchströmung von R_i , die bei einer Axialbewegung dieser Scheibe auftritt, keine Nebenerscheinung, sondern der bestimmende Regelvorgang.

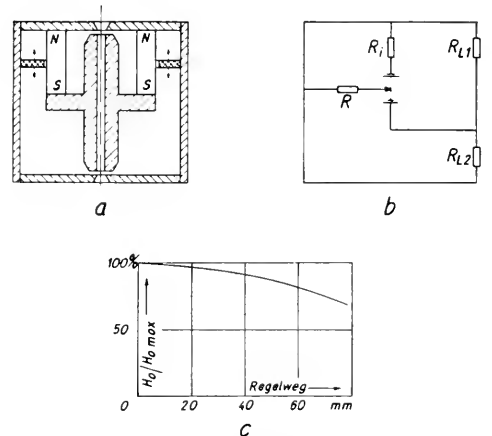


Abb. 3. Magnetostatische Linsenordnung mit Außenscheibe. a) Magnetische Anordnung; b) elektrisches Ersatzbild; c) Feldstärke-Regelkurve.

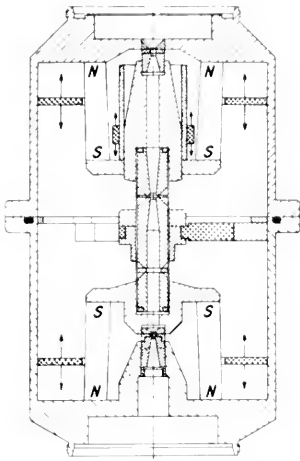


Abb. 4. Magnetostatische Vierlinsenoptik (vereinfachte Darstellung).

Wir haben nun eine Vierlinsenoptik zur elektronenoptischen Erprobung der verschiedenen Regelverfahren gebaut. Abb. 4 zeigt eine — der Übersichtlichkeit halber stark vereinfachte — Schnittzeichnung dieser Optik: Die beiden äußeren Linsen, Objektiv und Projektiv, wurden mit je einem axial angeordneten Rohrmagneten aus Alnico 400 ausgestattet. Die Systeme wurden so magnetisiert, daß gleichnamige Magnetpole einander gegenüberstanden. Die Mittellinsen wurden über den Außenmantel

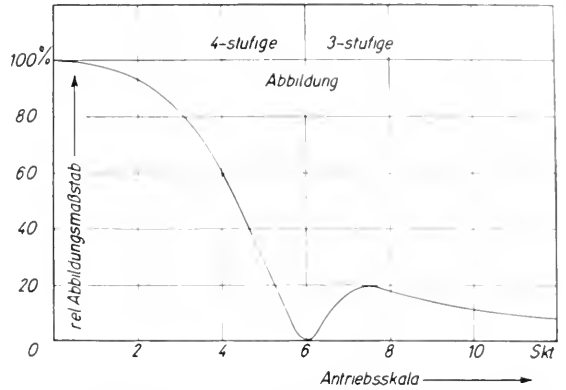


Abb. 5. Vergrößerungseichkurve für magnetostatische Vierlinsenoptik mit Zackenregler.

und einen Zackenregler gespeist. Bei geschlossenem Regler erhielten die Mittellinsen die volle Magnetspannung von etwa 2000 AW und waren so kurz-brennweitig, daß zwischen ihnen ein reelles Bild entstand. Durch Öffnen des Reglers konnte die magnetische Spannung an den Mittellinsen stetig auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes vermindert werden. Die Brennweiten der Linsen wurden dadurch so vergrößert, daß aus den zwei Einzellinsen ein Dublett entstand. Der Zackenregler ermöglichte auf diese Weise eine wirksame Änderung des Abbildungsmaßstabes. Eine Eichung des Zackenreglerantriebes gab eine schnelle und für die meisten Zwecke

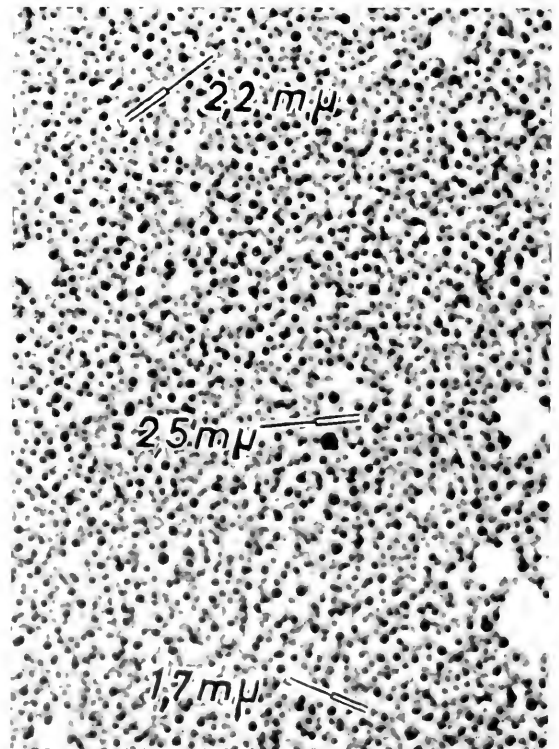
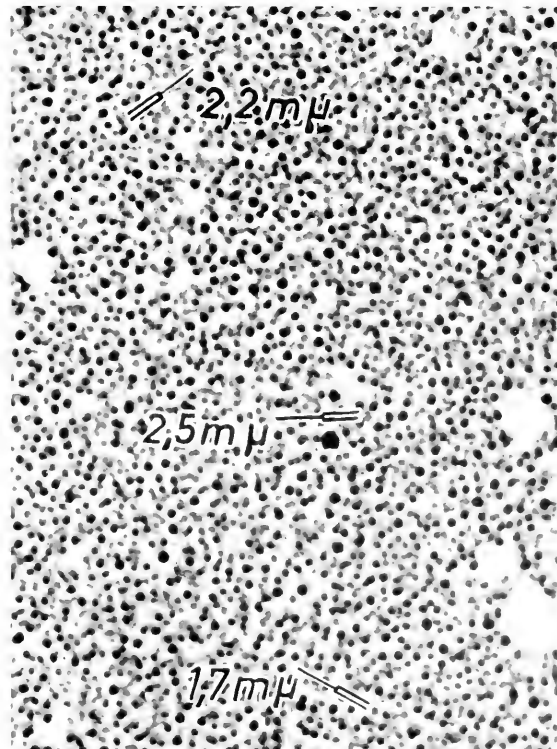


Abb. 6. Doppelaufnahme desselben Objektfeldes einer Platin-Aufdampfschicht mit der magnetostatischen Vierlinsenoptik. Elektronischer Maßstab 28000:1. Wiedergabe 240000:1. Strahlspannung 60 kV. Aufnahmematerial: Perutz-Kontrastplatte. Belichtungszeit 4 sec.

ausreichend genaue Angabe des jeweiligen Abbildungsmaßstabes. Abb. 5 zeigt eine derartige Eichkurve, links das Gebiet vierstufiger Abbildung, rechts das Gebiet dreistufiger Abbildung mit Dublettwirkung der Mittellinsen.

Wir dimensionierten die Linsen so, daß sich ein maximaler Abbildungsmaßstab von 60000:1 ergab. Im Gebiet vierstufiger Abbildung liess sich die Vergrößerung auf weniger als $\frac{1}{10}$ herabregeln, ohne daß die Verzeichnung des Endbildes in radialer oder tangentialer Richtung größer als 6 % wurde. Durch den Übergang zu dreistufiger Abbildung ließ sich der ausnutzbare Regelbereich noch erweitern. Es stellte sich nämlich heraus, daß dreistufig erzeugte Übersichtsbilder wesentlich weniger verzeichnet waren als ebenso schwach vergrößerte vierstufige Abbildungen. Bei diesem großen Regelumfang war es besonders angenehm, daß diese Regelart keine Bildrotation verursachte und es durch gute Zentrierung von Linsen, Zackenregler und Elektronenstrahl gelang, die Lage des Bildmittelpunktes während des Regelvorganges praktisch unbeweglich in der Endbildschirmmitte zu halten.

Die mit der Änderung der Mittellinsenerregung verbundene Defokussierung des Bildes mußte durch andere Regelorgane kompensiert werden. Wir hatten dafür ursprünglich eine Innenscheibe im Objektivkreis vorgesehen. Es stellte sich aber heraus, daß der Regelbereich der Scheibe dieser Aufgabe nicht annähernd entsprach. Außerdem war ihre Axialbewegung infolge des unvermeidbaren mechanischen Spiels mit geringen Querbewegungen verbunden. Die dadurch verursachten Verschiebungen des Bildes störten die Beobachtung gerade bei der Scharfstellung. Ein derartiger Einfluß der Scheibenbewegung auf den Elektronenstrahl nimmt ab, wenn die Entfernung zwischen Regelkörper und Strahl wächst.

Nun enthielt die Anordnung außer dieser Innenscheibe noch zwei weitere Regelscheiben, die sich zwischen den beiden Magneten und dem Mantel des Systems befanden. Diese Außenscheiben waren vorzüglich geeignet, eine Grobscharfstellung des Bildes vorzunehmen. Die Feinfokussierung mit mechanischen Regelgliedern erwies sich als un bequem, weil bei der Hin- und Rückbewegung infolge der Hysterese des magnetischen Materials etwas verschiedene Regelkurven durchlaufen werden. Sehr viel angenehmer ist statt dessen eine Feinregelung der Strahlspannung. Der notwendige Regelumfang von ± 500 V hat nicht den oben erwähnten Nachteil, daß die Durchdringungsfähigkeit der Elektronen merklich geändert wird.

Es ist noch zu erwähnen, daß es durch gleichzeitige Betätigung von Zackenregler und Außenscheiben gelang, Beugungsdiagramme durch die nicht abschaltbaren Linsen zu fädeln. Allerdings mußte der Objektbereich dabei auf weniger als $30 \mu \varnothing$ begrenzt werden.

Wir wollten die besprochene Anordnung gleichzeitig benutzen, um zu demonstrieren, daß sich auch mit derartig geregelten magnetostatischen Linsen ein recht gutes Auflösungsvermögen erreichen läßt. Wir legten deshalb großen Wert auf gute Zentrierung von Linsen und Elektronenstrahl. Bei der schrittweisen Entwicklung der optischen Eigenschaften war außerdem der Einbau eines Stigmatators besonders wirkungsvoll. Wir erreichten bisher ein Auflösungsvermögen von $2 \mu \mu$ (Abb. 6). Diese Grenze wird durch den Farbfehler bestimmt und ist wahrscheinlich auf die objektbedingte Streuung der Elektronenenergien zurückzuführen.

LITERATUR

LANGNER, G., *Optik* 12, 554–562 (1955).

Der Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die Objektverschmutzung

S. LEISEGANG und O. SCHOTT

Siemens und Halske AG, Wernerwerk für Meßtechnik, Berlin-Siemensstadt

Die Objektverschmutzung ist bei der Mikroskopie höchster Auflösung eine sehr störende Erscheinung. Nach den Messungen von Ennos ist die Verschmutzung stark abhängig von der Temperatur des Objektes. Durch verschiedene Bestrahlungsbedingungen kann die Temperatur des Objektes bei gleicher Stromdichte in weiten Grenzen verändert werden. Das hat zur Folge, daß auch die Objektverschmutzung stark von den Bestrahlungsbedingungen abhängt. Diese Abhängigkeit wird theoretisch und experimentell untersucht. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Tatsache, daß bei Bestrahlung der Objektblende selbst eine ganz wesentliche Erhöhung der Temperatur des Objektes eintritt.

Die Objektverschmutzung wurde in einem Elmiskop I als Funktion der Stromdichte bei Zimmertemperatur (etwa 25 C) auf folgende Weise gemessen:

Mit Hilfe des Feinstrahlkondensors wird ein kleiner Bereich des Testobjektes von $2 \mu \varnothing$ bestrahlt. Durch Bestrahlung eines so kleinen Bereiches wird die Temperatur des Testobjektes auch bei hoher Stromdichte nicht merklich erhöht [4]. Die Bestrahlungsstromdichte wird bei bekannter Vergrößerung im Endbild mit Faradaykäfig und Elektrometer gemessen. Die Objektdicke d und die Dicke der aufgewachsenen Verschmutzungsschicht d_v wird durch Messung der Streuabsorption (Objektivaper-

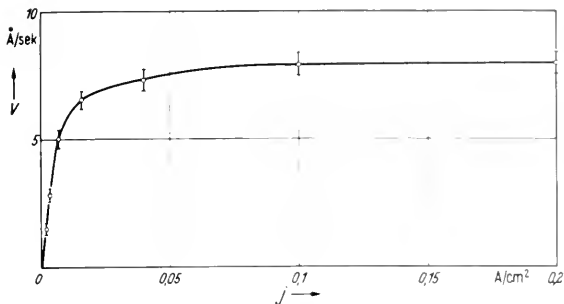


Bild 1. Objektverschmutzung V als Funktion der Stromdichte j bei Zimmertemperatur.

turbulente $50 \mu \varnothing$, Objektivapertur $z_0 = 9 \cdot 10^{-3}$) nach den in [5] angegebenen Formeln bestimmt. Die Messung erfolgt auch hier mit Faradaykäfig und Elektrometer im Endbild. Meßgrößen sind die im Faradaykäfig durch die unverschmutzte Folie gemessene Stromdichte j und die durch die verschmutzte Zone ins Endbild gelangende Stromdichte j_v . Die Dicke der aufgewachsenen Verschmutzungsschicht d_v ergibt sich dann aus:

$$\frac{j_v}{j} = \exp(-d_v \lambda_e). \quad (1)$$

Für λ_e , die mittlere freie Weglänge für elastischen Stoß, wurde bei 80 kV Strahlspannung der Wert $\lambda_e = 2000 \text{ \AA}$ eingesetzt. Als Testobjekte wurden etwa 300 \AA dicke Kohlefolien verwendet. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Bild 1 dargestellt.

Der in Bild 1 wiedergegebene Verlauf der Objektverschmutzung als Funktion der Stromdichte legt eine statistische Deutung der Erscheinung nahe.

Die die Verschmutzung erzeugenden Moleküle mögen einen Radius R , ein Molekulargewicht M , einen Partialdruck p und eine durch Adhäsion bedingte Verweilzeit auf der Folie τ haben. Die Wahrscheinlichkeit W , daß eines der die Verschmutzung erzeugenden Moleküle bei gegebener Elektronenzahl $n \text{ cm}^2 \text{ sec}$ getroffen wird, ist gegeben durch

$$W = \tau R^2 \cdot \tau n = R^2 \cdot \tau \tau \cdot \frac{j}{e} \quad (2)$$

j = Stromdichte (A cm^2), e = Elektronenladung (Coul).

Die Wahrscheinlichkeit W wird gleich 1 für die Stromdichte j_0 , die gegeben ist durch

$$j_0 = \frac{e}{\tau R^2 \tau}. \quad (3)$$

Für die Objektverschmutzung $V(j)$ ergibt sich daraus die — die Meßergebnisse gut wiedergebende — Beziehung

$$V(j) = V(\infty) [1 - \exp(-j/j_0)].$$

Eine weitere Betrachtung erlaubt, aus Annahmen über den Molekülradius die Verweilzeit τ und den

Partialdruck p der die Verschmutzung erzeugenden Dämpfe abzuschätzen.

Aus der kinetischen Gastheorie [2] folgt zunächst bei gegebenem Partialdruck p die Zahl der Stöße gegen die Folie (Wand) pro Sekunde und Quadratcentimeter A :

$$A = 3,5 \cdot 10^{22} \cdot K^{1/2} \text{ mm Hg}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ sec}^{-1} \frac{p}{M T} \quad (4)$$

Die Verweilzeit der Moleküle auf der Folie bei rein elastischem Stoß τ_0 sei dadurch definiert, daß angenommen wird: Verschmutzung erzeugende Moleküle sollen dann noch von den Elektronen auf der Folie „festgenagelt“ werden, wenn sie beim Zusammenstoß nicht weiter als eine Strecke Δx von der Folie entfernt sind.

Aus der mittleren Geschwindigkeit $\bar{v} = 14,5 \cdot 10^3 \text{ cm sec}^{-1} K^{-1/2} | T M$ der Moleküle folgt damit für cm

$$\tau_0 = \Delta x / \bar{v}. \quad (5)$$

Die Zahl der Moleküle n , die sich pro Sekunde und Quadratcentimeter bei einer Verweilzeit $\tau > \tau_0$ auf der Folie befinden, ist dann gegeben durch

$$n = A \frac{\tau}{\tau_0}. \quad (6)$$

Die Objektverschmutzung $V(\infty)$, bei der die Stromdichte der Elektronen so groß ist, daß alle Moleküle festgenagelt werden, ergibt sich aus der einfachen Annahme, daß die Zahl der Moleküle für eine einmolekulare Schicht der Flächeneinheit n_1 gegeben sei durch

$$n_1 = \frac{1}{R^2 \tau} \quad (7)$$

zu

$$V(\infty) = \frac{n}{n_1} \cdot 2 R = \tau \cdot 10^{27} \cdot \text{mm Hg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ sec}^{-2} \frac{\tau p R^3}{\Delta x M}. \quad (8)$$

Zwischen M , R und Dichte ρ gelte die oft gebrauchte Beziehung [2]

$$R = 0,66 \cdot 10^{-8} \left(\frac{M}{\rho} \right)^{1/3} g^{1/3}. \quad (9)$$

Damit fällt aus (8) R und M heraus und mit $\rho \approx 1 \text{ g cm}^3$ (schweres Öl) gilt

$$V(\infty) = 10^9 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-2} \text{ mm Hg}^{-1} \frac{\tau p}{\Delta x}. \quad (10)$$

Für j_0 und $V(\infty)$ ergeben sich aus Bild 1 die Werte $j_0 = 0,014 \text{ A cm}^2$ und $V(\infty) = 8 \text{ \AA sec}$. Als Verschmutzung erzeugende Moleküle seien hochmolekulare Kohlenwasserstoffe mit $M \approx 300$ und damit nach Gl. (9) $R \approx 4,5 \text{ \AA}$ angenommen.

Dann folgt aus Gl. (3) für die Verweilzeit $\tau \approx 2 \cdot 10^{-3}$ sec und mit der größenordnungsmäßig sicher richtigen Annahme $\Delta x \approx 1 \text{ \AA}$ für den Partialdruck $p \approx 5 \cdot 10^{-16}$ mm Hg. Die Verweilzeit ist also relativ sehr groß, der Partialdruck der die Verschmutzung erzeugenden Dämpfe außerordentlich klein.

Als unsichere Faktoren enthält Gl. (3) den Wert von R , ein um den Faktor 4 kleineren Radius, der als minimaler Wert gelten kann, führt zu einem um den Faktor 16 größeren Wert für τ und damit nach Gl. (10) zu einem um den Faktor 16 kleineren Wert von p . Außerdem ist p noch proportional zum nur größenordnungsmäßig bekannten Abstand Δx .

Die Objektverschmutzung als Funktion der Temperatur wurde von Ennos [3] bei einer Stromdichte von $0,01 \text{ A cm}^{-2}$ im Bereich von 50 bis 200°C gemessen.

In diesem Bereich lassen sich die Messungen wiedergeben durch die Beziehung:

$$V(T) = V_0 \exp(-T/T_0), \quad (11)$$

T = Temperatur ($^\circ\text{K}$), $T_0 = \text{const} = 84 \text{ K}$.

Es sei angenommen, daß diese Beziehung im ganzen interessierenden Bereich $300 \text{ K} = T < 1000 \text{ K}$ gelten.

Die wesentlich temperaturabhängige Größe in Gl. (3) und (10) ist die Verweilzeit τ . Die Objektverschmutzung als Funktion von Stromdichte und Temperatur $V(j, T)$ sollte sich dann darstellen lassen als:

$$V(j, T) = V(\infty, T_z) \cdot \frac{\tau(T)}{\tau_z} \left[1 - \exp\left(-\frac{j}{j_0} \frac{\tau(T)}{\tau_z}\right) \right], \quad (12)$$

T_z, τ_z = Werte von T und τ bei Zimmertemperatur.

Für $j = 0,01 \text{ A cm}^{-2}$ soll die von Ennos gemessene Beziehung (11) gelten.

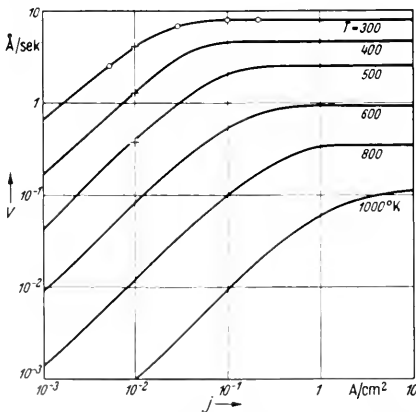


Bild 2. Objektverschmutzung V als Funktion von Stromdichte j und Temperatur T (nach Formel (12)).

- × × = Temperaturabhängigkeit bei $j = 0,01 \text{ A cm}^{-2}$ nach Ennos.
- ○ = Stromdichteabhängigkeit bei $T = 300 \text{ K}$ nach Bild 1.

Mit diesen Annahmen kann die Funktion $\tau(T)$ und damit aus Gleichung (12) die Verschmutzung als Funktion von Stromdichte j und Temperatur T , $V(j, T)$ berechnet werden.

Die Ableitung der Formeln ist in Anhang I gegeben, das Ergebnis der Rechnung zeigt Bild 2.

Die Temperaturverteilung auf einer Folie gleicher Dicke wurde in einer früheren Arbeit als Funktion der Stromdichte und des bestrahlten Bereiches berechnet [4]. Bei dieser Rechnung wurde vorausgesetzt, daß sich die Objektblende oder das Kupfernetz, von dem die Objektfolie getragen wird, auf Zimmertemperatur befindet. Diese Bedingung ist nicht immer erfüllt. Wird außer der Objektfolie auch ein großer Teil des Objektträgers bestrahlt, so kann die Temperatur des Objektträgers wesentlich höher sein als die Temperatur, die sich bei gleicher Stromdichte bei Bestrahlung der Objektfolie allein ergibt.

Auch die Erwärmung der Objektträger läßt sich aus den in [4] angegebenen Formeln in einfacher Weise berechnen. Da die Wärmeabstrahlung bei den relativ dicken Objektträgern (Dicke etwa 50μ) praktisch keine Rolle spielt, wird die Temperatur proportional zur Stromdichte j . Außerdem geht die geometrische Gestalt der Objektblende ein: Die Dicke d und der Radius R des inneren Bereichs der Blende mit der Dicke d spielen dabei — neben den Materialkonstanten — die wesentliche Rolle. Die Reichweite der Elektronen ist kleiner als die Dicke der Objektträger; praktisch die gesamte kinetische Energie der Elektronen wird in Wärme umgesetzt.

Der Blendenrand, dessen Dicke (etwa 1 mm) sehr groß gegenüber der Dicke d des inneren Bereiches ist, sei als so gut wärmeleitend angenommen, daß dort Zimmertemperatur erzwungen wird. Auf die Einzelheiten der Rechnung sei hier nicht näher eingegangen, die Formeln sind in Anhang II zusammengestellt.

Die Temperatur einer Objektblende bei einer

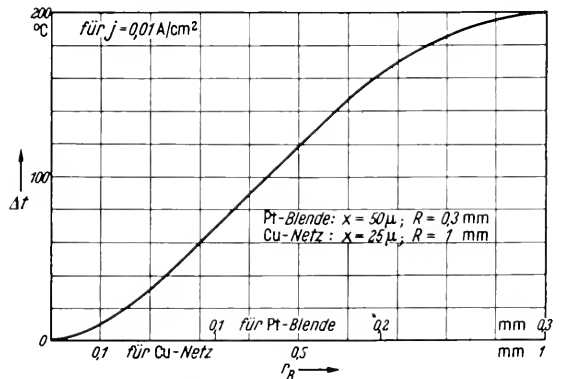


Bild 3. Erwärmung Δt einer Objektblende aus Platin der in Bild 5 dargestellten Form oder eines Kupfernetzes von 25μ Dicke, das mit einem Kupferring vom Durchmesser $2 R = 2 \text{ mm}$ gehalten ist, als Funktion des Radius des bestrahlten Bereiches r_B bei einer Stromdichte $j = 0,01 \text{ A cm}^{-2}$. Die Erwärmung ist proportional zur Stromdichte j (siehe Gleichung II,4).

Stromdichte von $j = 0,01 \text{ A cm}^{-2}$ ist in Bild 3 dargestellt. Als geometrische Daten sind die Werte einer oft verwendeten Objektblende ($d = 50 \mu$, $R = 300 \mu$, Material Platin, siehe Bild 5) in die Rechnung eingesetzt. Die Temperatur wird Funktion vom Radius des bestrahlten Bereiches r_B . Zwischen Stromdichte j , Radius des bestrahlten Bereiches r_B und Strahlstromstärke I besteht die Beziehung:

$$r_B^2 \pi \cdot j = I. \quad (13)$$

Danach erreicht die Temperatur der Objektblende — die Temperatur ist in erster Näherung proportional zur Stromdichte — bei Bestrahlung eines Bereiches von 600μ bei einer Strahlstromstärke von $28 \mu\text{A}$ 200°C und bei $140 \mu\text{A}$ 1000°C .

Das Ergebnis dieser Rechnung zwingt dazu, anzunehmen, daß die Temperatur der Objektfolie nicht allein durch die Stromdichte im Objekt, sondern auch durch die auf die Objektblende auftreffenden Elektronen bestimmt wird. Bei der Berechnung der Temperatur der Objektfolie ist zu berücksichtigen, daß bei höheren Temperaturen und dünnen Folien die Temperatur auf der Folie stark durch Wärmeabstrahlung beeinflusst wird. Es ist deshalb nicht zulässig, die Temperatur der Folie als Summe der Temperaturen von Objektblende und Folie zu berechnen. Eine einfache Lösung des Problems ergibt sich, wenn angenommen wird, daß die ganze Folie mit der Stromdichte j bestrahlt wird und am Rand der Folie die Blendentemperatur t_B herrscht. Die Durchführung dieser Rechnung ist in Anhang III gegeben. Den Einfluß der Abstrahlung auf die Blendentemperatur bei vorgegebener Temperatur des Blendenrandes t_B zeigt Bild 4.

Es ist auf diese Weise möglich, die Temperatur in der Mitte einer Folie bei verschiedenem Radius des bestrahlten Bereiches und bei vorgegebener Blendenform zu berechnen. Das wurde für eine 200 \AA dicke Al_2O_3 -Folie auf einer Platinblende der in Bild 5 wiedergegebenen Form getan.

Bei der Berechnung wurden folgende Daten verwendet:

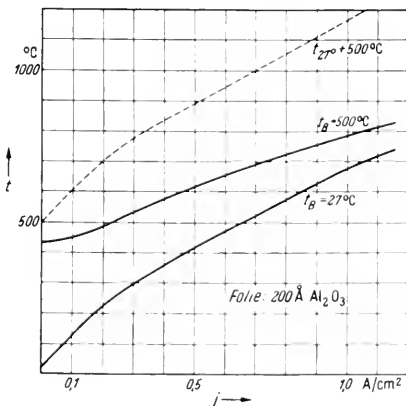


Bild 4. Temperatur einer Al_2O_3 -Folie als Funktion der Stromdichte bei verschiedener Temperatur t_B der Objektblende.

TABELLE 1.

	λ	C	x
	cal	cal	
	cm sec grad	cm ² sec grad ¹	(cm)
Al_2O_3	0,003	$3 \cdot 10^{-13}$	$2 \cdot 10^{-6}$
Pt	0,17	$8,5 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-3}$

	R	T_0	Q_T	γ
	(cm)	(K)	(V)	
Al_2O_3	$3,5 \cdot 10^{-3}$	300	4,6	$3,7 \cdot 10^{-1}$
Pt	$3 \cdot 10^{-2}$	300	$8 \cdot 10^1$	$4,5 \cdot 10^{-3}$

In Bild 5 ist das Ergebnis dieser Rechnung dargestellt. Die Rechnung für Al_2O_3 wurde deshalb durchgeführt, weil hier eine besonders einfache experimentelle Nachprüfung der Ergebnisse möglich ist. Al_2O_3 hat bei 600°C einen Umwandlungspunkt, der im elektronenoptischen Bild gut sichtbar ist.

Bei vorgegebenem Radius r_B des bestrahlten Bereiches wird die Stromdichte langsam gesteigert bis zu dem Wert, bei dem die Umwandlung einsetzt und damit eine Temperatur von 600°C erreicht ist. Die so erhaltenen Meßpunkte sind in Bild 5 eingezeichnet, die Übereinstimmung mit den Rechnungen ist hinreichend gut. Die große Bedeutung der Erwärmung der Objektblende selbst ist klar gezeigt: Bei Bestrahlung eines Bereiches von 350μ wird die Temperatur von 600°C schon bei einer Stromdichte erreicht, die mehr als eine Größenordnung kleiner ist als die Stromdichte bei Bestrahlung der Folie allein.

Bei der Berechnung der Temperatur, die ein Kupfernetz annimmt, sei darauf verzichtet, die aus der Gitterstruktur sich ergebende periodische Abhängigkeit der Temperatur vom Radius des bestrahlten Bereiches wiederzugeben; es sei nach einer mittleren Temperatur gefragt. Dann kann folgendes angenommen werden: Das Netz habe eine relative undurchsichtige Fläche p . Für die Wärmeableitung

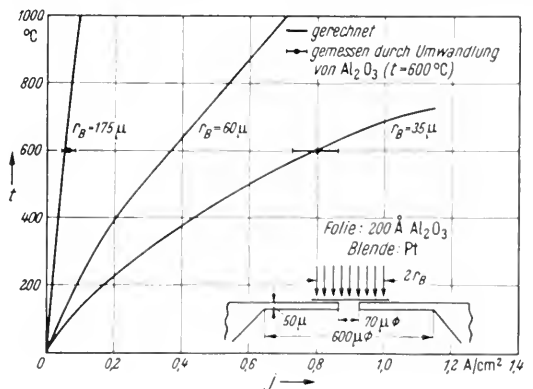


Bild 5. Temperatur t einer Al_2O_3 -Folie als Funktion der Stromdichte j bei verschiedenem Durchmesser $2r_B$ des bestrahlten Bereiches.

ist bei gegebener Dicke x des Netzes die Dicke $x = xp$, für die in Wärme umgesetzte Elektronenenergie Q_T der Wert $Q_T = Q_T \cdot p$ maßgebend. Aus Formel (II,3) folgt, daß deshalb die Temperatur des Netzes in erster Näherung richtig berechnet werden kann, ohne die Netzstruktur zu berücksichtigen. Wird für die Dicke des Netzes x der bei vielen Elektro-Mesh-Netzen übliche Wert von 25μ , für den Radius R der Netzhalterung der Wert von 1 mm eingesetzt, so ergibt sich für die Konstanten der Gl. (II,3) zusammen mit der Wärmeleitzahl von Kupfer praktisch der gleiche Wert wie für die Platinblende, so daß auch für die üblichen Netze Bild 3 quantitativ gültig ist. Auch hier ist bei Bestrahlung großer Bereiche die Temperatur des Netzes wesentlich höher als die Temperatur der Folie allein. Als Beispiel sei eine Kohlefolie von 200 \AA Dicke angenommen. Die Temperatur t_F der Folie ist bei kleinen Stromdichten ($j < 0,1 \text{ A cm}^{-2}$) und Bestrahlung eines Bereichs von $70 \mu \varnothing$ (= Maschenweite) etwa proportional j und gegeben durch

$$t_F = 750 \cdot j \quad \text{für } j < 0,1 \text{ A cm}^{-2}, \quad (14)$$

während sich für die Temperatur des Kupfernetzes t_N bei Bestrahlung eines Bereichs von $500 \mu \varnothing$ ($r_B = 0,25$) aus Bild 3 ergibt

$$t_N = 4600 \cdot j \quad \text{für } r_B = 250 \mu. \quad (15)$$

Die Temperatur des Netzes ist unter diesen Bedingungen um etwa einen Faktor 6 höher als bei Bestrahlung der Folie allein ($r_B = 35 \mu$). Auch hier wurde der prinzipielle Einfluß der Erwärmung des Netzes experimentell geprüft mit demselben Verfahren wie in c). Die Temperatur von 600 C wurde bei Bestrahlung eines Bereichs von $70 \mu \varnothing$ mit einer Stromdichte von $0,6 \text{ A/cm}^2$, bei Bestrahlung eines Bereichs von $350 \mu \varnothing$ schon bei einer Stromdichte von $0,08 \text{ A/cm}^2$ erreicht. Es ist damit gezeigt, daß auch bei einem Kupfernetz der Temperaturanstieg, der bei Bestrahlung großer Bereiche durch Erwärmung des Netzes selbst hervorgerufen wird, berücksichtigt werden muß.

Die Abhängigkeit der Objektverschmutzung von Stromdichte und Temperatur (siehe Bild 2) und die Abhängigkeit der Objekttemperatur bei gleicher Stromdichte von den Bestrahlungsbedingungen lassen eine wesentliche Abhängigkeit der Objektverschmutzung von den Bestrahlungsbedingungen bei gleicher Stromdichte im Objekt erwarten. Mit den angegebenen Formeln läßt sich für ein gegebenes Objekt die Objektverschmutzung als Funktion von Stromstärke, Stromdichte und eventuell eingesetzter Kondensoraperturblenden berechnen. Die Rechnung liefert größenordnungsmäßig richtige Werte, doch ist die Übereinstimmung mit dem Experiment nicht so gut, daß eine Wiedergabe der Rechnung lohnend erscheint¹. Doch erlauben die Rechnungen, die an die allgemeinen Überlegungen von 1) und 2) anknüpfen, die gemessenen Ergebnisse qualitativ und auch weitgehend quantitativ zu verstehen.

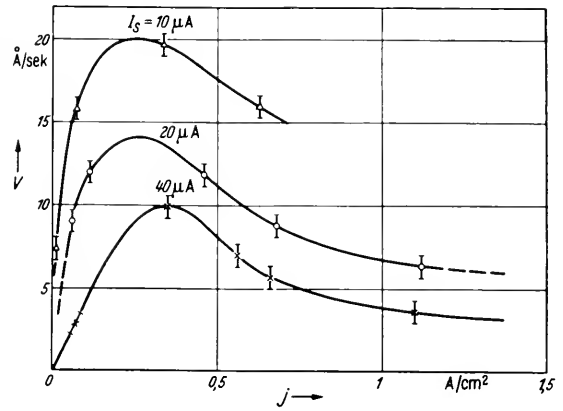


Bild 6. Objektverschmutzung V als Funktion der Stromdichte j . Parameter: Stromstärke I_s . Objekt: Etwa 400 \AA dicke Kohlefolie.

In Bild 6 sind experimentelle Ergebnisse wiedergegeben. Die Variation der Bestrahlungsbedingungen bei gleicher Stromdichte im Objekt wird hier erreicht durch Änderung des Strahlstromes I_s . Bei gleicher Stromdichte im Objekt wird bei größerem Strahlstrom ein größerer Bereich der Objektblende bestrahlt. Das führt zu höherer Objekttemperatur und damit zu geringerer Objektverschmutzung. Aus der Objektverschmutzung bei gegebener Stromdichte kann aus Bild 2 etwa die Temperatur des Objektes bestimmt werden. Bei genauer Kenntnis der in Bild 2 halb experimentell, halb theoretisch gewonnenen Funktion $V(j, T)$ bietet sich die Möglichkeit, aus der Objektverschmutzung, die eine einfach zu messende Größe ist, auf die Temperatur des Objektes zu schließen. Die sich aus Bild 2 und Bild 6 ergebende Objekttemperatur bei den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen ist in Bild 7 wiedergegeben. Außerdem wurde nach Formel (III,3) für $I_s = 40 \mu\text{A}$ die Temperatur der Folie aus den Bestrahlungsbedingungen berechnet. Der Gang der Rechnung ist in

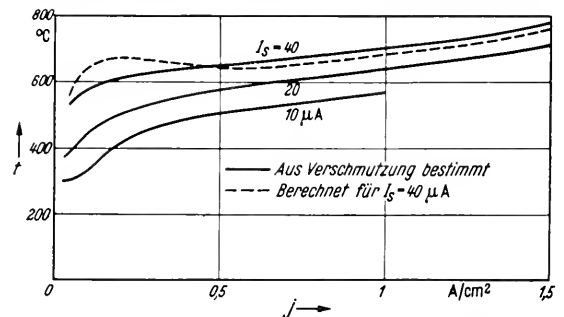


Bild 7. Temperatur t einer etwa 400 \AA dicken Kohlefolie als Funktion der Stromdichte j , berechnet aus der Objektverschmutzung $V(j, T)$. Parameter: Stromstärke I_s .

¹ Die Temperaturverteilung auf der Folie ist in Gl. (II,1) berechnet unter der Annahme, daß für $r < r_B$ die Stromdichte $j = \text{const}$, für $r > r_B$ die Stromdichte $j = 0$ ist. Tatsächlich hat die Stromdichte als Funktion von r eine Gaußverteilung $j(r) = j_0 \exp(-r/r_B)^2$. Die aus Gl. (II,1) berechnete Temperatur wird, solange $r_B \approx$ Blendenradius ist, merklich größer als die gemessene Temperatur.

Anhang IV wiedergegeben, das Ergebnis in Bild 7 als gestrichelte Kurve eingezeichnet. Die Übereinstimmung beider Kurven ist für $j_B > 0,4 \text{ A cm}^2$ recht gut, die Abweichungen für $j_B < 0,4 \text{ A cm}^2$ werden in Anhang IV diskutiert.

ANHANG I

Berechnung der Funktion $\tau(T)$

Annahmen: Für $V(j, T)$ gelte die Gleichung (12). Für $j = 0,01 \text{ A cm}^2$ gelte die Beziehung von Ennos (Gleichung 11). Dann folgt für die Verschmutzung als Funktion der Temperatur bei einer Stromdichte von $0,01 \text{ A cm}^2$:

$$V(0,01, T) = V(\infty, T_Z) \frac{\tau(T)}{\tau_Z} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{0,01}{j_0} \frac{\tau(T)}{\tau(Z)}\right) \right] \quad (1,1)$$

Aus dieser Gleichung ist $\tau(T)$ zu bestimmen. Es ergeben sich einfache Lösungen für den Fall, daß $(0,01/j_0) [\tau(T)/\tau_Z]$ sehr groß oder sehr klein gegen eins ist.

Es gilt in diesen beiden Fällen:

$$\left. \begin{aligned} \tau(T) &= \tau_Z \frac{V_0 e^{-T/T_0}}{V(\infty, T_Z)} \quad \text{für } 0,7 \frac{\tau(T)}{\tau_Z} > 1, \\ \tau(T) &= \tau_Z \sqrt{\frac{0,7 V_0}{V(\infty, T_Z)}} e^{-T/2 T_0} \quad \text{für } 0,7 \frac{\tau(T)}{\tau_Z} < 1, \end{aligned} \right\} \quad (1,2)$$

Als einfache Lösung für $\tau(T)$ sei eine Summe dieser beiden Grenzlösungen angenommen:

$$\tau(T) = \tau_Z \frac{V_0 e^{-T/T_0}}{V(\infty, T_Z)} \cdot \left[1 + \sqrt{\frac{0,7 \cdot V_0}{V(\infty, T_Z)}} \exp(-T/2 T_0) \right] \quad (1,3)$$

Aus der Bedingung, daß für $T = T_Z = 300 \text{ K}$ die Verweilzeit $\tau = \tau_Z$ sein soll, kann V_0 bestimmt werden. Es gilt dann für $\tau(T)$ die Beziehung:

$$\tau(T) = 6,2 \cdot 10^{-3} \exp(-0,12 T) \cdot [1 + 1,55 \exp(0,006 T)] \quad (1,4)$$

Durch Einsetzen dieser Werte für $\tau(T)$ in Gleichung (12) ergibt sich die gesuchte Beziehung für $V(j, T)$. Das Ergebnis der Rechnung zeigt Bild 2.

ANHANG II

Berechnung der Temperatur der Objektblende

Für die Temperatur auf einer dünnen Scheibe gilt die von v. Borries und Glaser [1] aufgestellte Differentialgleichung:

$$\frac{d^2 \tau(\varrho)}{d\varrho^2} + \frac{1}{\varrho} \frac{d\tau(\varrho)}{d\varrho} - \frac{\gamma^2}{4} (\tau^4(\varrho) - \bar{\tau}^4) = 0 \quad (11,1)$$

Dabei bedeuten

r Entfernung vom Mittelpunkt der Blende
 ϱ Radius, bei dem Zimmertemperatur erzwungen wird

$T(\varrho)$ Folientemperatur als Funktion von ϱ
 T_0 Zimmertemperatur

$$\bar{\tau}^4 = 1 - \frac{0,12 Q_T \cdot j}{C T_0^4}$$

mit Q_T der in der Folie in Wärme umgesetzte Teil des Energieverlustes eines Elektrons (V), bei dicken Folien gleich der Beschleunigungsspannung der Elektronen

j Stromdichte im Objekt (A cm^2)

C Strahlungskonstante ($\text{cal cm}^2 \text{ sec grad}^4$)

$$\gamma = \sqrt{\frac{8 C R^2 T_0^3}{\lambda x}}$$

x Foliendicke (cm), λ Wärmeleitzahl des Objektes (cal/cm sec grad).

In [4] werden zwei Näherungslösungen für Gleichung (11,1) angegeben. Der Geltungsbereich der Lösungen ist dadurch gegeben, daß $\gamma^2/4$ entweder sehr klein oder sehr groß gegen $|\bar{\tau} - 1| \bar{\tau}^4$ ist. Für $\gamma^2/4 - |\bar{\tau} - 1| \bar{\tau}^4$ haben beide Lösungen das gleiche Ergebnis, das für $\bar{\tau} = 8$ nicht mehr als 10% vom wahren Wert abweicht. Für den hier interessierenden Fall relativ dicker Blenden ($x \approx 5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$) mit guter Wärmeleitzahl ist die Bedingung $\gamma^2/4 < |\bar{\tau} - 1| \bar{\tau}^4$ allgemein erfüllt und $\gamma < 1$, so daß nur eine der Näherungslösungen betrachtet werden muß.

Für die Temperatur in der Mitte der Folie ergibt sich für den Fall, daß ein Bereich mit dem Radius r_B mit der Stromdichte j bestrahlt wird und auf einem Kreis mit dem Radius $R(r_B < R)$ Zimmertemperatur erzwungen wird (beispielsweise durch bei R stark zunehmende Dicke der Blende), die Beziehung:

$$\tau(\varrho_B, 0) = 1 - \frac{\bar{\tau}^4 - 1}{4} \left[1 - \frac{J_0(i\gamma)}{J_0(i\gamma)} \frac{J_1(i\gamma \varrho_B) H_0^1(i\gamma)}{H_1^1(i\gamma \varrho_B) J_0(i\gamma)} - \frac{H_1^1(i\gamma \varrho_B) J_0(i\gamma)}{H_1^1(i\gamma \varrho_B) J_0(i\gamma \varrho_B)} \right] \quad (11,2)$$

J_0, J_1 - Besselfunktionen, H_0^1, H_1^1 - Hankelfunktionen.

Da γ im vorliegenden Fall immer sehr klein gegen 1 ist, können die Zylinderfunktionen entwickelt werden und es ergibt sich für $T(\varrho_B, 0)$ die einfache Beziehung:

$$T(\varrho_B, 0) = T_0 + \frac{0,06}{\lambda x} Q_T j \cdot R^2 \varrho_B^2 (1 - 2 \ln \varrho_B) \quad (11,3)$$

$$\text{für } \gamma < 1 \text{ und } \gamma < 4\bar{\tau}^{-\frac{3}{2}}. \quad (\text{II,4})$$

Nach dieser Formel (II,3) ist die Temperatur in der Blendenmitte für eine Platinblende der in Bild 5 angegebenen Form für $Q_T = U = 80 \text{ kV}$ berechnet und in Bild 3 dargestellt. Bild 3 gilt in dieser Form ebenso für ein Kupfernetz mit 25μ Dicke und einem üblichen Wert von $R = 0,1 \text{ cm}$. Der Faktor $R^2/\lambda x$ unterscheidet sich um wenige Prozent von dem für die spezielle Platinblende des Bildes 5.

Die Temperatur der Blende ist, solange die Bedingungen (II,4) gelten, proportional zur Stromdichte j .

ANHANG III

Die Temperatur einer Objektfolie auf warmer Objektblende

Die Objektblende oder das Kupfernetz habe durch Bestrahlung die Temperatur T_B . Der bestrahlte Bereich auf der Objektblende sei groß gegenüber der Blendenbohrung, so daß ohne wesentlichen Fehler die Temperatur am inneren Blendenrand, auf dem die Objektfolie aufliegt, durch den Wert $T_B - T(\varrho_B, 0)$ der Formel (II,3) gegeben ist.

In die Rechnung geht die analog zu τ definierte Größe $\tau_B = T_B - T_0$ ein. Bei den gegenüber der Blende sehr dünnen Folien ist im allgemeinen die Bedingung $\gamma > 4 \sqrt{(\bar{\tau} - 1) \bar{\tau}^{-1}}$ erfüllt, so daß nach [4] für die Temperatur auf der Folie die Näherung gilt, bei der die Wärmeleitung in erster Näherung, die Wärmeabstrahlung voll berücksichtigt ist. Bei Bestrahlung der ganzen Folie mit gleicher Stromdichte gilt danach für $\tau(\varrho_F)$ die Beziehung:

$$\tau(\varrho_F) = \bar{\tau} + C_1 J_0 (i\gamma \bar{\tau}^{\frac{3}{2}} \varrho_F). \quad (\text{III,1})$$

Der relative Radius ϱ_F der Folie ist hier gegeben durch das Verhältnis von r zum Radius der Blendenbohrung = Radius der freitragenden Folie R_F , so daß gilt: $\varrho_F = r/R_F$.

Für $\varrho_F = 1$ oder $r = R_F$ soll $\tau(1) = \tau_B$ sein. Daraus folgt aus (III,1)

$$C_1 = \frac{\tau_B - \bar{\tau}}{J_0 (i\gamma \bar{\tau}^{\frac{3}{2}})} \quad (\text{III,2})$$

und für die Temperatur in der Folienmitte, $\tau(0)$:

$$\tau(0) = \bar{\tau} + \frac{\tau_B - \bar{\tau}}{J_0 (i\gamma \bar{\tau}^{\frac{3}{2}})}. \quad (\text{III,3})$$

Nach dieser Formel wurden die Kurven der Bilder 4 und 5 berechnet.

ANHANG IV

Daten zur Berechnung der Temperatur einer Kohlefolie

Die Kohlefolie liegt auf einer Platinblende der in Bild 5 gezeigten Form. Für die Erwärmung der Platinblende gelten die Tabelle 1 angegebenen Daten.

Für die Kohlefolie wurden folgende Daten eingesetzt:

$$\varrho = 2 \text{ g/cm}^3 \quad Q_T = 8,5 \text{ eV} \quad \lambda = 3 \cdot 10^{-3} \\ x = 6 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \quad R = 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \quad C = 1 \cdot 10^{-12}$$

Daraus folgt:

$$\bar{\tau}^4 = 1 + 0,2 x j; \quad \gamma^2 = \frac{8,6 \cdot 10^{-7}}{x}. \quad (\text{IV,1})$$

Zur Berechnung der Größe des bestrahlten Bereiches wird die Gl. (1) benutzt. Die Blendenbohrung wird dadurch berücksichtigt, daß ein Nutzeffekt H eingeführt wird. Dieser Nutzeffekt ist definiert durch die relative Zahl der Elektronen, die die massive Blende treffen.

$$H = 1 - \int_0^R [\exp - (r/r_B)^2] r dr. \quad (\text{IV,2})$$

An Stelle von $j r_B^2$ wird $H j r_B^2$ in Gl. (II,3) eingesetzt und daraus t_B bzw. τ_B berechnet. Aus Gl. (III,3) folgt dann die Temperatur in der Mitte der Folie. Die Rechnung wird für $I_s = 40 \mu\text{A}$ durchgeführt. Die folgende Tabelle 2 zeigt den Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Temperatur in der Mitte der Folie.

TABELLE 2. Berechnung der Temperatur einer 600 μ dicken Kohlefolie auf einer Platinblende mit 70 μ Blendenbohrung und einem Bereich von 600 μ Durchmesser mit der Dicke 50 μ bei 40 μA Strahlstrom.

t_B = Temperatur am inneren Rand der Platinblende
 t_0 = Temperatur der Folie für $t_B = 30^\circ\text{C}$
 t_F = Temperatur in der Mitte der Folie nach Gl. (III,3)

j A/cm ²	r_B μ	H %	t_B °C	t_0 °C	t_F °C
0,01	350	100	200	36	190
0,1	113	91	750	84	655
0,3	65	75	760	205	660
1	36,5	38	610	420	680
1,5	30	25	530	520	750

In Bild 7 ist das Endergebnis der Rechnung dargestellt. Die Abweichungen für kleines j (große r_B) sind verständlich durch die in die Rechnung nicht voll eingehende Gaußverteilung (siehe Anmerkung Seite 24) und durch die wegen der Blendenform (siehe Bild 5) nicht voll erfüllte Forderung $t_B = t_Z$ für $r = 300 \mu$. Die recht gute Übereinstimmung der Kurven für $j > 0,4 \text{ A cm}^2$ zeigt noch einmal, welchen großen Einfluß die Temperatur der Platinblende selbst auf die Objekttemperatur und damit auf die Objektverschmutzung hat.

LITERATUR

1. VON BORRIES, B. und GLASER, W., *Kolloid-Z.* 106, 123 (1944).
2. DUSHMAN, S., *Scientific Foundations of Vacuum Technique*. New York, 1949.
3. ENNOS, A. E., *Brit. J. Appl. Phys.* 5, 27 (1954).
4. LEISEGANG, S., Zur Erwärmung elektronenmikroskopischer Objekte bei kleinem Strahlquerschnitt. *Proc. Int. Conf. El. Microscopy*. London, 1954.
5. — Elektronenmikroskope. In: *Handbuch der Physik* 33. Springer, 1956.

Objektkühlung im Elektronenmikroskop

O. SCHOTT und S. LEISEGANG

Siemens & Halske AG., Wernerwerk für Meßtechnik, Berlin-Siemensstadt

VERSUCHE von S. Leisegang (1) mit einer gekühlten Objektpatrone zeigten, daß sich die Objektverschmutzung vermeiden läßt, wenn der Dampfdruck der restlichen Kohlenwasserstoffe im Vakuum des Mikroskops in unmittelbarer Umgebung des Objektes durch Ausfrieren bei Temperaturen um -80°C stark vermindert wird. Es wurde eine Objektkühlungseinrichtung gebaut mit dem Ziel, die verschmutzungsfreie Beobachtung der Objekte im Elektronenmikroskop zu erreichen, ohne dabei die Leistungsfähigkeit des Gerätes zu vermindern, wie das etwa durch eine thermisch oder mechanisch bedingte Objektwanderung geschehen könnte. Über den Aufbau der Objektkühlungseinrichtung und einige damit erzielte Ergebnisse soll hier berichtet werden.

Die kühlbare Objektpatrone ist in Bild 1 dargestellt. In dem normalen Patronenkonus sitzt thermisch isoliert ein Kupferzylinder, der beiderseits durch Blenden gegen den übrigen Mikroskopraum abgeschlossen wird. Die untere Blende aus Platin-Iridium von 4 mm \varnothing mit einer Bohrung von 150 μ \varnothing sitzt im Polschuh und befindet sich auf Zimmertemperatur, während das gekühlte Objekthütchen in einem Abstand von 0,2 mm bis 0,4 mm über der Blende bewegt werden kann. Das Hütchen hat eine Bohrung von 1 mm \varnothing , so daß ein ausreichendes Gesichtsfeld vorhanden ist. Durch die Blendenanordnung ist die Wahrscheinlichkeit des Ein-

dringens der Restmolekel in den Objektraum um den Faktor 10^4 herabgesetzt. Beim Kühlen wird dadurch der Dampfdruck der Restgase stark vermindert.

Der kühlbare Kupferzylinder der Objektpatrone besitzt eine Nase mit einer polierten Fläche, an die durch Federkraft der Kühlfinger angedrückt wird. In der Fläche sitzt ein Konstantanblock. Er bildet die eine Lötstelle des Thermoelements zur Temperaturmessung.

Der Kühlfinger ist in Bild 2 dargestellt. Er besteht aus einem durchbohrten Kupferstab, der vakuumdicht und thermisch isoliert in das Mikroskop durch die sonst für den Stereotrieb benutzte Bohrung eingeführt wird. Die Dichtung erfolgt durch eine Nutringmanschette, einen Gummihut und zwei Rundschnurringe. Da bei der Kühlung Gummi stärker schrumpft als Metall, mußte die Nutringmanschette so angeordnet werden, daß sie mit der inneren Lippe auf den gekühlten Stab aufschrumpten und mit der äußeren Lippe an einer auf Zimmertemperatur befindlichen Fläche gleiten kann. Es wird daher an das Objektiv vakuumdicht eine Eisenhülse angeschraubt, in der die Nutringmanschette bei einer Bewegung des Kühlstabes gleitet. In der Hülse ist außerdem die Führung und die Andruckfeder auf der Vakuumseite untergebracht, gefrorenes Kondenswasser kann daher die Bewegung des Stabes nicht hindern. Die Führung erfolgt in einer Teflonbuchse, die so bemessen ist, daß der Stab einer Tischbewegung folgen kann ohne an der Patronenfläche zu gleiten. Dadurch ist eine einwandfreie Tischverstellung gewährleistet. Mit einem Rückstellhebel kann der Kühlstab von der Patrone abgezogen werden.

Im Kühlstab läuft isoliert ein Konstantandraht für das Thermoelement, der durch eine vom Draht selbst gebildete Feder an die Patrone gedrückt wird. Der Draht wird durch den Gummihut, der den Kühlstab abschließt, vakuumdicht nach außen geführt.

Als Kühlmittel wird flüssige Luft verwendet, die sich in einem Dewargeäß befindet. Das Dewargeäß wird mit einem Schutzbehälter durch ein Spannband am Spulnmantel des Objektivs befestigt.

Die Wärmeübertragung auf den Kühlstab erfolgt durch einen Tauchbart aus Kupferlitze. Dieser Bart

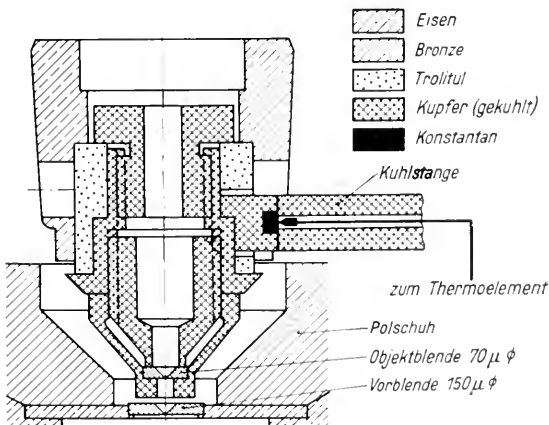


Bild 1. Kühlbare Objektpatrone.

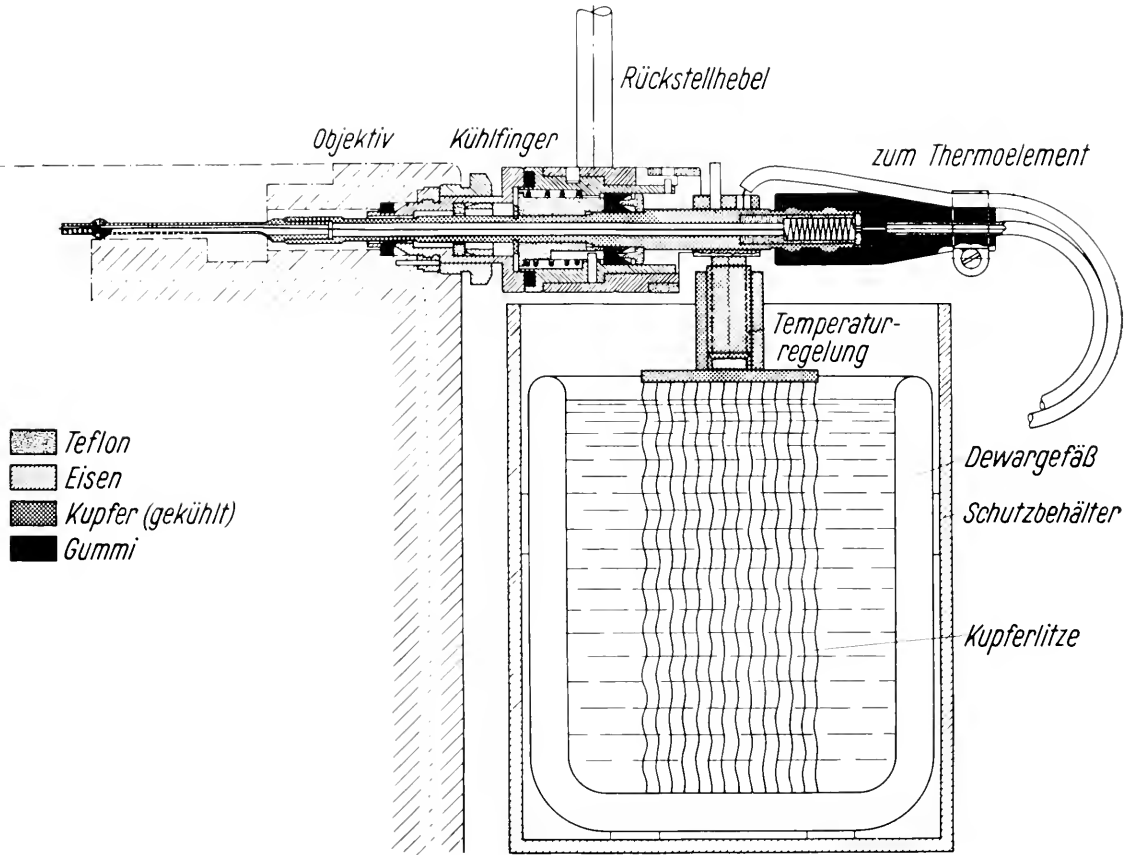


Bild 2. Kühlfinger.

verhindert, daß die Bewegung der flüssigen Luft auf die Objektpatrone übertragen wird und eine Objektunruhe verursacht, die eine Aufnahme bei Vergrößerungen ab 40 000 fach unmöglich machen würde.

Zwischen Tauchbart und Kühlstab ist die Temperaturregelung angebracht. Der Tauchbart sitzt an einem Bronzeyylinder, der federnd auf einem Gewindebolzen aufgeschraubt werden kann. Der Gewindebolzen ist mit dem Kühlstab verlötet. Durch Drehen des Bronzeyinders kann der Wärmeleitwiderstand und damit die Temperatur der Objektpatrone geändert werden. Mit dieser Anordnung ist

es möglich, die Temperatur von -60°C bis 110°C kontinuierlich zu regeln.

Der Verbrauch an flüssiger Luft beträgt im Durchschnitt $3\text{ cm}^3\text{ min}$. Der Tauchbart ist so bemessen, daß die Temperatur der Objektpatrone unabhängig von dem Stand der flüssigen Luft ist. Mit einer Füllung kann man etwa 30 Minuten arbeiten.

Die Temperaturmessung erfolgt mit einem Kupfer-Konstantan-Thermoelement, dessen eine Lötstelle an der Objektpatrone liegt. Die Vergleichslötstelle liegt auf Zimmertemperatur. Für die Messung der Thermospannung kann ein Millivoltmeter verwendet

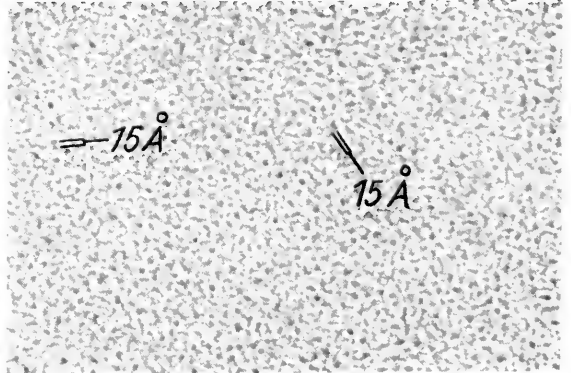
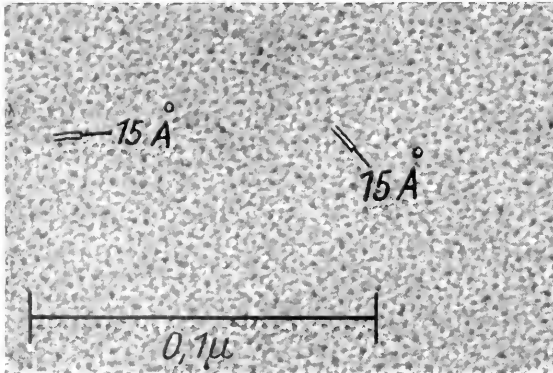


Bild 3. Auflösungstest bei -100°C . Objekt: Platin-Iridium-Aufdampfschicht. Elektronenopt. Vergrößerung: 80000:1. Gesamtvergrößerung: 450000:1. $U = 80\text{ kV}$.

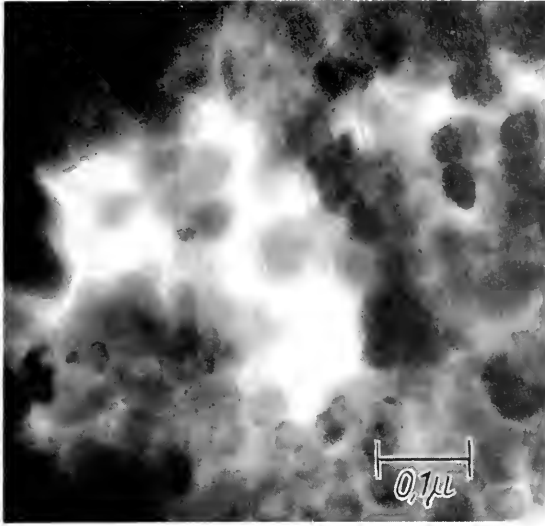


Bild 4. Aufnahme bei Zimmertemperatur. Objekt: Calciumcarbonat auf SiO. Bestrahlung 3 Minuten bei $5 \mu \text{A}$. Vergrößerung: 120000:1.

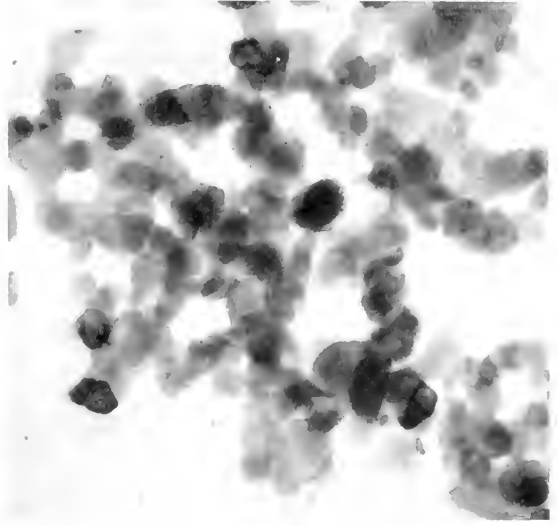


Bild 5. Aufnahme bei -100 C . Objekt: Calciumcarbonat auf SiO. Bestrahlung 10 Minuten bei $5 \mu \text{A}$. Vergrößerung: 120000:1.

werden. Dieses Instrument zeigt Temperaturschwankungen von $\pm 1 \text{ C}$ noch sicher an.

Für das Arbeiten mit der Objektkühlungseinrichtung ist es nötig, die Objekte so zu bestrahlen, daß der Durchmesser des bestrahlten Bereichs $\approx 15 \mu$ ist. Dadurch werden Störungen des Temperaturgleichgewichtes vermieden, die zu einer Objektwanderung führen könnten. Durch den Kühlbart wird die Amplitude der Bewegung beim Sieden der flüssigen Luft verkleinert und die Übertragung dieser Bewegung auf das Objekt verhindert. Erst dadurch wird es möglich, mit der Objektkühlungseinrichtung eine hohe Auflösung zu erreichen. Ein Auflösungstest (Bild 3) mit einer Platin-Iridium bedampften Kollodiumfolie läßt ein Auflösungsvermögen von 15 \AA in beiden Richtungen sicher erkennen.

Bei den hier verwendeten tiefen Temperaturen sind zwei Gruppen von Objekten zu unterscheiden:

- a) Objekte, die bei Temperaturen um 80 C keine Objektverschmutzung zeigen und bei tieferen Temperaturen sich nicht verändern. Zu dieser Gruppe gehören die anorganischen Objekte.
- b) Objekte, die bei Temperaturen um -80 C nicht verschmutzen und sich bei tieferen Temperaturen auflösen. Diese Erscheinung wurde bei verschiedenen organischen Objekten und Kollodiumfolien beobachtet (1).

Die anorganischen Objekte werden daher zweckmäßig auf SiO-Folien präpariert. Die Temperatur kann dann auf etwa -95 C eingestellt werden. Die Bilder 5 und 6 zeigen Aufnahmen von zwei stark verschmutzenden Vertretern dieser Gruppe, Calciumcarbonat und Molybdänoxyd. Die aufgenommenen Präparatbereiche wurden vorher zehn Minuten mit $0,6 \text{ A cm}^2$ bestrahlt. Der bestrahlte Bereich hatte

5μ . Eine Aufnahme von Calciumcarbonat unter diesen Bestrahlungsbedingungen bei Zimmertemperatur zeigt Bild 4. Die Objektverschmutzung beträgt hier etwa 8 \AA sec (2).

Beim Arbeiten mit organischen Präparaten ist eine bestimmte Temperatur einzuhalten, um Verschmutzung oder Auflösung des Objektes zu vermeiden. Diese Temperatur ist eine Funktion der Elektronenstromdichte im Objekt. An einer 400 \AA dicken Kollodiumfolie wurde mit Faradaykäfig und Elektrometer (2) die Objektverschmutzung V als Funktion der Stromdichte j und der Temperatur der Objektpatrone t gemessen. Das Ergebnis ist in Bild 7 dargestellt. Die Temperatur, bei der weder Verschmutzung noch Auflösung eintritt, ist bei kleinen Stromdichten stärker von der Stromdichte abhängig

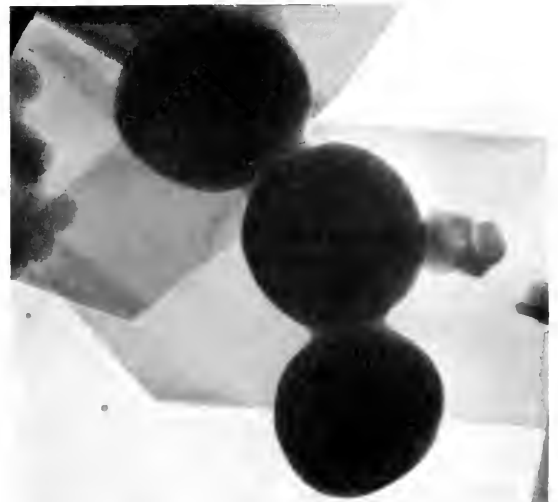


Bild 6. Aufnahme bei -100 C . Objekt: Molybdänoxyd auf SiO. Bestrahlung 10 Minuten bei $5 \mu \text{A}$. Vergrößerung: 120000:1

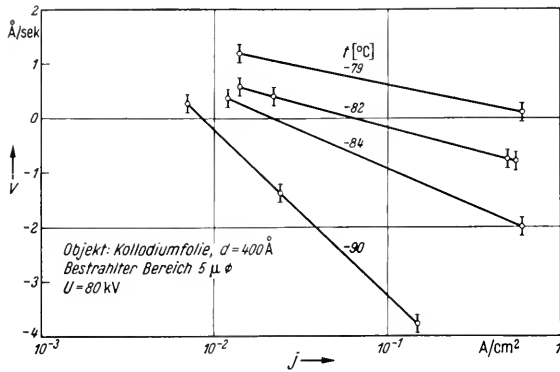


Bild 7. Objektverschmutzung V als Funktion der Stromdichte j und der Temperatur der Objektpatrone t . Objekt: Kollodiumfolie, $d = 400 \text{ \AA}$. Bestrahler Bereich $5 \mu \phi$. $U = 80 \text{ kV}$.

als bei größeren. Mit kleineren Temperaturen wächst die Stromdichteabhängigkeit der Verschmutzung bzw. des Abbaues. Diese Messungen geben einen Anhalt für die Arbeitsbedingungen bei organischen Objekten und werden erlauben, noch tiefer in den

Mechanismus von Verschmutzung und Abbau einzudringen.

bleiben die Objekte länger im gekühlten Zustand im Mikroskop, so bildet sich in etwa 50 % der beobachteten Fälle ein Kondensat auf den Objekten. Die Natur des Kondensates konnte noch nicht geklärt werden. Beugungsreflexe bei Durchstrahlung des Kondensates waren nicht zu beobachten. Das Kondensat löst sich im allgemeinen bei starker Elektronenbestrahlung auf, ohne einen sichtbaren Rückstand auf dem Objekt zu hinterlassen. Bei sehr schwacher Elektronenbestrahlung, die das Objekt gerade noch erkennen läßt und nicht wesentlich erwärmt, löst sich die Schicht beim Erwärmen der Kühlpatrone zwischen 0° und -10° C auf.

LITERATUR

1. LEISEGANG, S., Versuche mit einer kühlbaren Objektpatrone. *Proc. Int. Conf. El. Microscopy*, London, 1954.
2. — Der Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die Objektverschmutzung. *Proc. Stockholm Conf. El. Microscopy*, 1956, Almqvist & Wiksell, Stockholm, 1957, S. 20.

Über ein Elektronenmikroskop mit universeller Anwendbarkeit für Elektronenbeugung

H. BETHGE

Institut für experimentelle Physik, Halle a. d. S.

Das abbildende Linsensystem arbeitet mit drei elektrostatischen Linsen und einer magnetischen Zwischenlinse. Die drei elektrost. Linsen (Objektiv und 2 Projektive, die einzeln oder zusammen einzuschalten sind) ergeben drei feste Vergrößerungsstufen, die mit 1800fach, 5400fach und 12600fach festgelegt sind. Durch zusätzliches Einschalten der hierbei nur schwach zu beaufschlagenden Magnetlinse können zu den vorstehend gegebenen festen Vergrößerungen Zwischenwerte eingestellt werden. Insbesondere kann zum Anschluß an das Lichtmikroskop ein Bereich von etwa 200- bis 1800fach kontinuierlich erfaßt werden. Bei voller Durchflutung der Magnetlinse ($f = 46 \text{ mm}$) wird der Strahlengang nach Boersch (2) zur direkten Abbildung des Beugungsbildes ermöglicht. Eine dritte Aufgabe der Magnetlinse dient der Herstellung eines Strahlenganges für Präzisions-Elektronenbeugung. Hierzu wird unter Benutzung des bildseitigen Brennpunktes des Objektivs als neue punktförmige Elektronenquelle die Brennweite der Zwischenlinse so eingeregelt, daß diese einen schwach konvergenten Strahl erzeugt mit Fokussierung in der Platten- bzw. Leuchtschirmenebene. Das Mikroskop arbeitet jetzt als Beugungsapparatur, wobei die Objekte unterhalb der Projektive einzubringen sind.

Zum Aufbau des Linsentubus ist zu erwähnen, daß im Strahlensystem die Glühkathode gegenüber der Steuerhülse unter Vakuum zu zentrieren ist. Daneben ist, wie allgemein üblich, eine Verschiebung und Kippung des gesamten Strahlensystems vorgesehen. Das Prinzip des Objekt-Verschiebetisches mit reproduzierbarer Stereoeinstellung ist von dem früher vom Verf. beschriebenen Gerät (1) übernommen. Die unterhalb des Objektivs angeordnete Kontrastblende (mit mehreren Bohrungen) ist, ebenso wie ein Stigmator nach Scherzer und Rang (5), justierbar.

Eine in der unteren Brennebene der Magnetlinse angeordnete sogenannte Bereichsblende (verschiebbar und mit mehreren Bohrungen versehen) erfüllt wiederum einen mehrfachen Zweck.

Bei der direkten Beugungsabbildung wirkt die Blende einmal als Aperturblende und zum anderen als Bereichsblende zur Begrenzung des das Beugungsbild erzeugenden Objektbereiches. Bei schwacher Beaufschlagung der Linse für den Strahlengang zur Präzisionselektronenbeugung dient die Blende als Strahlbegrenzungsblende.

Die Plattenschleuse ist für ein Plattenformat von $6 \times 18 \text{ cm}$ ausgelegt, wobei beim mikroskopischen Betrieb drei Aufnahmen $6 \times 6 \text{ cm}$ aufzunehmen sind. Von außen, unter Vakuum zu verstellende

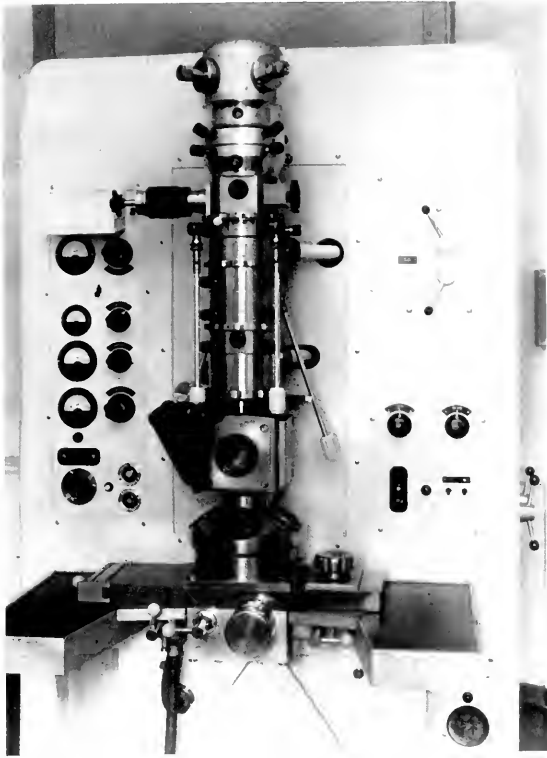


Abb. 1. Ansicht des Mikroskoptubus.

Abdeckrahmen dienen zur Wahl des „Belichtungsformates“ bei Anwendung des Mikroskopes als Beugungsapparatur. So können z. B. auch 18 Aufnahmen im Format 6×1 cm aufgenommen werden und bei der Elektronenbeugung an Oberflächen kann zur Erfassung des ganzen Beugungsbildes das Format 6×6 cm, jetzt asymmetrisch zur Geräteachse liegend, benutzt werden.

Unterhalb der Projektive müssen, wie schon erwähnt, die Objekt angeordnet werden, bei Betrieb des Gerätes als Elektronenbeugungsapparatur. Hierzu sind 4 Flansche (siehe Abb. 1) vorgesehen, die zur Einbringung spezieller Objekthalterungen, gegebenenfalls einer Präparatschleuse, oder Vorrichtungen zur Reinigung der Oberfläche durch Abblimmen, dienen. Die Abb. 1 zeigt die Ansicht der Mikroskopsäule.

An speziellen Zusatzgeräten zur Anwendung des Mikroskopes als Beugungsapparatur wurden zunächst (gemeinsam mit K. H. Brauer) ein Manipulator für streifende Elektronenbeugung und eine Anordnung zur kinematischen Elektronenbeugung nach Boettcher und Thun (3) gebaut und erprobt.

Der Manipulator für Elektronenbeugung bei streifendem Einfall unterscheidet sich von bekannten Konstruktionen (4) vor allem dadurch, daß der zu untersuchende Kristall in einem Goniometerkopf gehalten wird, welcher in reproduzierbarer Lage in den Manipulator einzusetzen ist. In einer einfachen Hilfsvorrichtung, unter Benutzung eines üblichen Lichtmikroskopes, wird zunächst ein geeigneter Be-

reich der zu untersuchenden Kristallfläche ausgesucht und durch die Verstellmöglichkeiten des Goniometerkopfes „polar“ zur azimutalen Drehachse des Manipulators einjustiert. Dies bietet den Vorteil, daß nach Auffinden des Beugungsbildes durch Verschiebung in der zum Strahl senkrechten Ebene und Einstellung des Glanzwinkels, das Beugungsbild bei azimuthaler Verstellung über alle Winkel erhalten bleibt und dadurch z. B. Winkelunterschiede von Netzebenen direkt gemessen werden können. Daß der Manipulator mit Stromdurchführungen für Aufheizung des Objektes, Bedampfung und Temperaturmessung versehen ist, sei erwähnt.

Für ein Zusatzgerät zur Herstellung von kinematischen Beugungsaufnahmen sei kurz an die Methode erinnert. Bei der Untersuchung kristalliner Schichten, die ein Debye-Scherrer-Diagramm ergeben, wird zentrisch durch einen Spalt ein sehr schmaler Bereich ausgeblendet. Die dadurch auf die darunter befindliche Photoplatte auffallende „Punktfolge“ wird bei einer Bewegung der Platte zeitlich aufgelöst. Auf die Struktur einwirkende Veränderungen des Präparates, wie z. B. Phasenumwandlungen bei Erwärmung, können damit in ausgezeichneter Weise verfolgt werden.

In der vorliegenden Anordnung wird zur Registrierung keine Platte, sondern ein auf eine Trommel aufgespannter Filmstreifen von 9×24 cm verwendet, da sich eine Drehbewegung gegenüber dem Vorschub einer Platte besser mit der erforderlichen Genauigkeit durchführen läßt. Ein gut regelbarer Motor in Verbindung mit einem einfachen Getriebe erlaubt eine Wahl der Filmgeschwindigkeiten im Bereich von 0,06 bis 0,7 mm/s. Ein unter Vakuum mittels Mikrometerschraube verstellbarer Spalt erlaubt Spaltbreiten von 0,01 bis 8 mm (die 8 mm

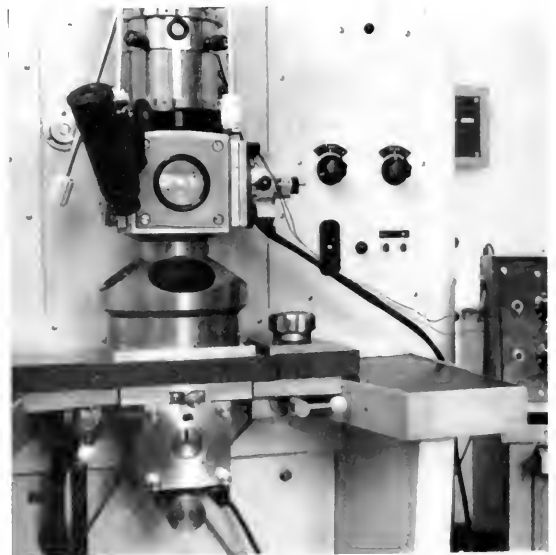


Abb. 2. Teilansicht des Mikroskoptubus mit Zusatzgeräten für Beugung an Oberflächen und zur kinematischen Strukturuntersuchung.

Breite dient für Übersichtsbilder) einzustellen. Zur Registrierung von Versuchsdaten dienen auf dem Rand des Films aufzubringende Lichtmarken. Zum Anbau an das Mikroskop (s. Abb. 2) wird das vorstehend beschriebene Gerät einfach gegen das den Mechanismus für den Plattentransport dienende Bauteil der normalen Plattenschleuse ausgetauscht.

Zum Gesamtaufbau des Gerätes sei bemerkt, daß die Einspeisung der Hochspannungsanlage durch einen stabilisierten Röhrengenerator (125 Hz) erfolgt. Die auf Kathodenpotential liegenden Hilfs- spannungen werden über HF-Sender erzeugt.

Eine ausführliche Publikation, die auch auf die konstruktiven Einzelheiten eingeht, erscheint in der Zeitschrift *Optik*.

LITERATUR

1. BETHGE, H., *Optik* **10**, 137 (1953).
2. BOERSCH, H., *Ann. Physik* **27**, 75 (1936).
3. BOETTCHER, A. und THUN, R., *Physik. Verhandlungen* **3**, 115 (1953); *Optik* **11**, 22 (1954).
4. HEISE, F., *Optik* **9**, 139 (1952).
5. RANG, O., *Optik* **5**, 518 (1949).

A New Universal Electron Microscope of High Resolving Power: Metro-Vick Type EM6

M. E. HAINE and R. S. PAGE

Metropolitan-Vickers Electrical Co. Ltd (R. S. P.) and A. E. I. Research (M. E. H.)

IN the course of the last few years research and development work at Aldermaston and Manchester has led to new conceptions in the design of electron microscopes. Some of this work has already been reported at earlier conferences or in published papers and a number of features have been in operation in experimental microscopes and in the Metro-Vick Type EM3A. A new instrument has now been designed and the prototype, which is the subject of this paper, has been in operation for several months. The principal objects in the new design have been the reliable attainment of a high resolving power coupled with ease of operation and versatility in application.

The most important components of an electron microscope, the electron gun, and the lenses have been the subjects of special attention. In order to provide sufficient illumination for focussing at high magnification it is necessary to operate the electron gun at a brightness approaching the theoretical limit (2) and, more important, to be able to maintain this performance without internal adjustments. A simple method of checking and adjusting the gun for optimum performance has been adopted which allows this operation to be carried out in a few seconds without dismantling.

The work of Liebmann (3) and Mulvey (4) has enabled lenses to be designed with the required focal characteristics which are free from undesirable characteristics such as tilting of the magnetic axis with change of excitation. It is now possible to align the image forming lenses using preset controls knowing that the alignment will be maintained over the full range of lens excitation. Other new features of the microscope will appear in the following description.

The instrument uses conventional principles in respect of the electron optical parts with a column mounted vertically on a wide desk, the power supplies being kept in a separate cabinet. This arrangement allows greater flexibility in installation than the single unit construction and provides more freedom of choice in the selection of suitably rated components for the power supplies since magnetic fields and heat from valves are well removed from the microscope.

The electron gun is of rugged and simple construction with the h.t. cable permanently sealed into the porcelain insulator. The upper half of the earthed anode cylinder is hinged to provide access to the cathode assembly which is removable, by a bayonet catch, from the end of the insulator. When replacing a filament, the cathode assembly is removed and the new filament tip centred in the cathode shield aperture by means of three adjusting screws. Centering the filament tip in the 1 mm diameter aperture by visual estimation provides sufficient accuracy of alignment. The anode aperture is adjustable by means of two screw controls outside the vacuum wall. It is this feature which allows the beam to be easily aligned with the condenser lenses to provide maximum gun brightness. This operation is further simplified by means of a current collecting probe which can be inserted into the beam below the condenser lens aperture. The current collected by this probe is a direct measure of the gun brightness which is adjusted using the anode aperture alignment, bias voltage and filament heating current. The anode aperture plate can be removed for cleaning as also can contamination screens through the bores of the condenser lenses.

Two condenser lenses, built as a single unit, are used to provide a small illumination spot size down

to about 5 microns in diameter. The first lens demagnifies the electron source while the second is the normal condenser lens. Three apertures are provided which can be adjusted by means of a rod control which is easily withdrawn for cleaning purposes. Molybdenum discs are used for the apertures as this metal contaminates at a lower rate than platinum. They are easily cleaned by vacuum heating on a molybdenum boat in a small evaporating plant. Many different sizes of aperture are available ranging from 25 microns to 1 mm in diameter.

In order to avoid the instability inherent in any form of mechanical beam alignment stage electric alignments are used. The system employed was described by Haine and Agar at the Reading Conference and consists of a combination of magnetic and electric fields. The advantage of this method is that large angles of tilt can be obtained in one direction when required for reflection microscopy with only two levels of deflection instead of the usual four. A two-level all-magnetic deflector system for normal small angles of tilt has also been designed.

The adaptability of a microscope depends very much on the design of the specimen stage and chamber and a considerable effort has been made in this model to make a design which combines sufficient mechanical stability for high resolution together with airlock insertion of specimens and accessibility for maintenance or special purpose stages. The transmission stage is designed to allow stereo-tilt angles of $\pm 5^\circ$ and is traversed by push rods operated through bell-cranks with special pivots which are free from backlash. The airlock mechanism is attached to the chamber through the medium of flanges and ports so that it can easily be detached. A special stage for reflection working can be inserted into a large port at the front of the chamber. This stage is accurately calibrated for specimen tilt and twist and is capable of accepting a wide range of specimens.

The design of the objective lens allows for low magnetic flux densities at all parts of the iron circuit resulting in a very low level of stray fields which would adversely affect accurate alignment and cause astigmatism. The construction is simple since the entire body including the lower pole piece is turned from solid steel. The iron circuit is completed with a steel lid which incorporates the upper pole piece. The only magnetic junction is therefore well removed from the electron path so eliminating another possible cause of stray fields. The lens is thus demountable and the winding, water cooling duct, and aperture mechanism can all be separately removed.

The focal length is 4 mm which allows the specimen to be just outside the magnetic field, and at this value the resolving power as limited by spherical aberration and diffraction is better than 5 \AA . The inherent astigmatism of this type of lens is usually not more than 1 micron. It is therefore necessary to improve this by a factor of at least 5 to attain a

resolving power of 10 \AA . A four pole rotating turret corrector is provided with which it is possible to attain this degree of correction by visual inspection of the fresnel fringe pattern through the $10\times$ viewing telescope (1).

The objective lens incorporates an adjustable aperture which is quickly and easily centred. The rod carrier contains three molybdenum disc apertures and a clear space and can be removed for changing apertures without breaking vacuum.

There is a preset alignment section between objective and projectors which includes the control for rotation of the astigmatism corrector and two sets of intermediate apertures for diffraction purposes. One of these provides for variable area selection of the field from which a pattern is required.

The projector system uses two water cooled lenses, again of integral pole construction similar to the objective. By variation of the power of the intermediate lens magnifications ranging from 1500 to

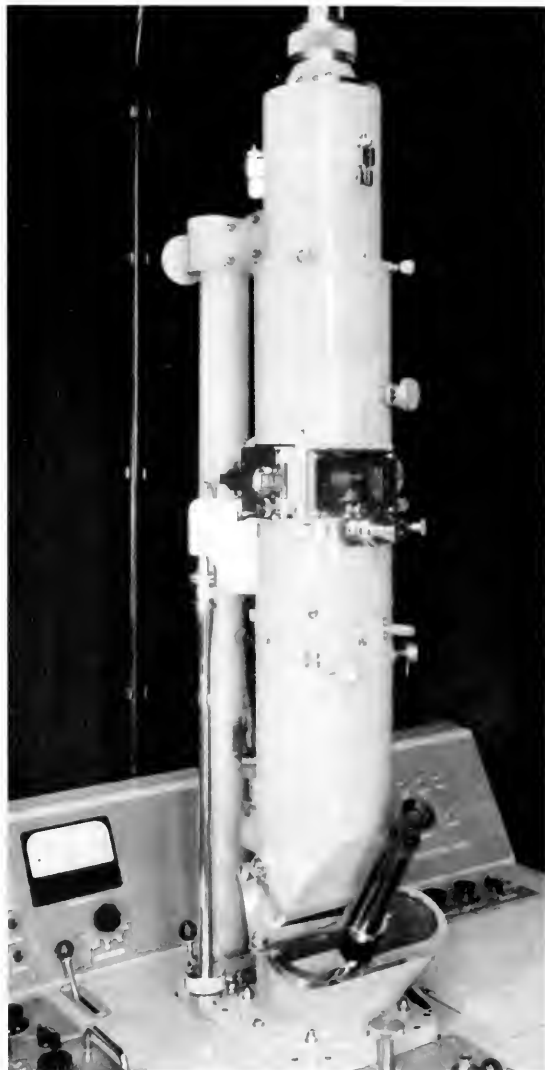


Fig. 1. Metro-Vick Type EM6 (prototype) electron microscope.

100,000 times are obtained directly. The range can be extended downwards when necessary by using a shorter specimen holder or by balancing the negative distortion of the intermediate lens under weak excitation against the positive distortion of the final lens under weaker than normal excitation.

The viewing chamber is fitted with a very wide aperture window which allows several observers, beside the operator, a clear view of the screen. A 10 times telescope is used for focussing. The camera is designed to provide six 7.5×7.5 cm or twelve 7.5×3.75 cm micrographs and is fitted with an airlock. The normal plate size is $3\frac{1}{2}'' \times 4\frac{1}{2}''$ ($\frac{1}{2}$ plate) or 6×9 cm plates can be used with suitable cassette adaptors. Other forms of recording including internal and external 35 mm photography are under development.

The vacuum system of the instrument consists of a 3" diffusion pump and rotary backing pump. A second rotary pump in the same casing is used for pumping airlocks. A reservoir system allows the rotary pumps to be switched off for considerable periods while operation is in progress.

Power supplies and stabilising circuits are contained in the separate cabinet while all circuit controls required for operation are mounted on panels in the microscope desk. Independent stabilisers and controls are used for each of the five magnetic lenses while the currents are switched in synchronism with the high tension value by means of a central reference potential source for all the stabilisers. As the h.t. is changed, therefore, the image remains at the set

magnification and usually only a small adjustment to the focussing is required.

The h.t. generator provides outputs of 50, 75 or 100 kV the circuit being based on the well known Cockroft and Walton voltage multiplier. 26 stages of multiplication, using selenium dry rectifiers and tubular condensers, are mounted in an oil filled tank. The multiplier stack is centre fed with current at 10 kilocycles from a valve oscillator so that the ripple voltages, developed in the two half stacks, are in antiphase and cancel in the output. Careful balancing of stray capacities results in an output ripple at the gun cathode of less than 1 volt in 100 kV. The direct current level is maintained to approximately 1 part in 100,000 by a negative feedback system in the conventional manner.

In overall performance the prototype microscope (Fig. 1) has proved to be capable of a resolving power of 10 \AA and it is believed that this can be improved upon since the experimental model is capable of a resolving power of 5 \AA under suitable conditions. However, the immediate aim is to provide a reliable resolution of 15 \AA and results obtained so far indicate that this has in fact been achieved.

REFERENCES

1. HAINE, M. E., *J. Sci. Inst.* **31**, 326 (1954).
2. HAINE, M. E. and EINSTEIN, P. A., *Brit. J. Appl. Phys.* **3**, 40 (1952).
3. LIEBMANN, G. and GRAD, E. M., *Proc. Phys. Soc. B* **64**, 956 (1951).
4. MULVEY, T., *Proc. Phys. Soc. B* **66**, 441 (1953).

Über ein neues elektrostatisches Gebrauchs-Elektronenmikroskop

H. MAHL, H. VOLKMANN und W. WEITSCH

Abteilung für Elektronenoptik, Firma Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.

Die Entwicklung des neuen Zeiss-Elektronenmikroskops (Fig. 1) wurde von dem Gedanken geleitet, ein Standard-Gerät zu schaffen, das als vielseitig anwendbares Gebrauchsgerät für einen möglichst großen Benutzerkreis in Betracht kommt. Als Forderungen wurden gestellt: raumsparender Aufbau, Einfachheit und Bequemlichkeit der Bedienung und ein Auflösungsvermögen von etwa 50 \AA , das zur Bearbeitung der weitaus überwiegenden Zahl der elektronenmikroskopischen Probleme ausreicht.

Fig. 2 zeigt den schematisierten Schnitt durch den optischen Aufbau des Gerätes, das nach dem elektrostatischen Prinzip arbeitet. Durch eine schräge Lage der Mikroskopsäule hat sich eine neuartige konstruktive Lösung ergeben, die die Vorzüge der horizontalen und der vertikalen Lagerung der Säule miteinander verbindet und die für die bequeme Benutzung und die einfache Bedienung des Gerätes mancherlei Vorteile bietet. Sämtliche Bedienungs-

handgriffe einschließlich der Strahljustierung und des Objektschleusens können im Sitzen ausgeführt werden. Das auf dem Leuchtschirm entstehende Bild kann durch 3 große Einblickfenster betrachtet werden. Das Leuchtschirmbild ist außerdem in 16facher Nachvergrößerung durch unser Stereo-Mikroskop binokular beobachtbar, dessen Helligkeit durch Verwendung eines Monokulartubus erhöht werden kann. Es ist oberhalb der Einblickfenster fest montiert und braucht nicht erst eingeschwenkt zu werden, wie es sonst allgemein für das Einblickmikroskop üblich ist.

Die Säule, die fest in einer optischen Bank ruht, besteht aus 3 Teilen: im obersten Teil befindet sich eine Fernfokuskathode nach Steigerwald (7), im mittleren das Objektiv mit elektrostatischem Stigmator und im unteren die Projektionsoptik. Die einzelnen Teile sind leicht zugänglich und einfach herausnehmbar, so daß eine gelegentliche Reinigung



Fig. 1. Das neue elektrostatische Elektronenmikroskop.

ohne besonderen Aufwand schnell durchgeführt werden kann.

Das Objektiv ist mit einem Zwischenbeschleuniger (3) ausgerüstet. Die Elektronen laufen nach dem Verlassen der Kathode auf eine käfigförmige Elektrode zu, die ebenso hoch positiv geladen ist, wie die Kathode negatives Potential gegenüber Erde besitzt. In ihrem Innern, also im feldfreien Raum, befindet sich das zu untersuchende Objekt. Beträgt die Kathodenspannung z. B. 35 kV, so durchsetzen die Elektronen das Objekt mit 70 keV. Anschließend laufen sie gegen eine geerdete Elektrode, wodurch ihre Geschwindigkeit wieder auf 35 keV vermindert wird. Wir haben damit hohe Geschwindigkeit der Elektronen nur im Objekt, wo sie wegen ihrer besseren Durchdringungsfähigkeit zweckmässig ist. Auf dem Leuchtschirm und auf der Photoplatte kommen die Elektronen dagegen mit geringerer Geschwindigkeit an, so daß sie dort einen günstigen Wirkungsgrad besitzen.

Die für den jeweiligen Zweck günstigste Elektronengeschwindigkeit am Objekt läßt sich bei dem Gerät einfach einstellen, da man sie zwischen 40 und 75 keV bequem variieren kann, ohne daß dabei eine Veränderung der elektronen-optischen Vergrößerung des Bildes eintritt.

Durch die Verwendung des Zwischenbeschleunigers hat man den weiteren Vorteil der geringeren

Isolationsschwierigkeiten, die sich sonst bei Spannungen über 50 kV unangenehm bemerkbar machen und die bisher die Elektronengeschwindigkeit der elektrostatischen Geräte auf 50 keV begrenzen.

Die Projektionsoptik besteht aus einer neuartigen Vierelektrodenlinse („Regellinse“) (6) sowie aus einer üblichen Dreielektrodenlinse („Projektiv“). Während das Projektiv nur eine spannungsführende Elektrode zwischen den beiden Erdelektroden besitzt, hat die Vierelektrodenlinse deren zwei, die wahlweise an Spannung oder auch an Erdpotential gelegt werden können. Zu ihrem Betrieb werden die in der Hochspannungskaskade (4, 5) vorhandenen Potentiale U_k , $\frac{2}{3} U_k$ und $\frac{1}{3} U_k$ benutzt. Legt man die obere Elektrode an volle Spannung und die darunter befindliche an Erdpotential, dann erhält man eine kürzere Brennweite, als wenn man umgekehrt die untere Elektrode an volle Spannung und die obere an Erde legt. Befinden sich beide Elektroden auf $\frac{2}{3}$ -Potential, so vergrößert sich die Brennweite gegenüber der ersten Schaltungsmöglichkeit etwa um den Faktor 10. Durch die angegebenen Schaltungsmöglichkeiten läßt sich ein einfacher Vergrößerungswechsel vornehmen.

Zusammen mit dem Projektiv können mit dieser Regellinse ohne Bildumkehr auf den Leuchtschirm oder auf die Photoplatte drei verschiedene Vergrößerungen, 1200-, 4000- oder 10000fach, wahlweise eingestellt werden. Mit einem zusätzlich lieferbaren Projektiv kürzerer Brennweite können diese Vergrößerungen verdoppelt werden, so daß man auf 20000fache elektronenoptische Vergrößerung auf dem Leuchtschirm bzw. der Photoplatte kommt. Die Formen der Projektivelektroden sind so gewählt,

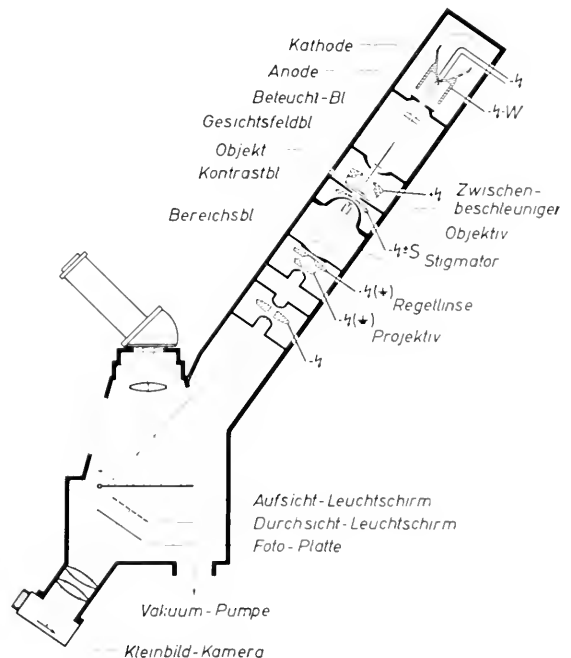


Fig. 2. Schema der optischen Anordnung.

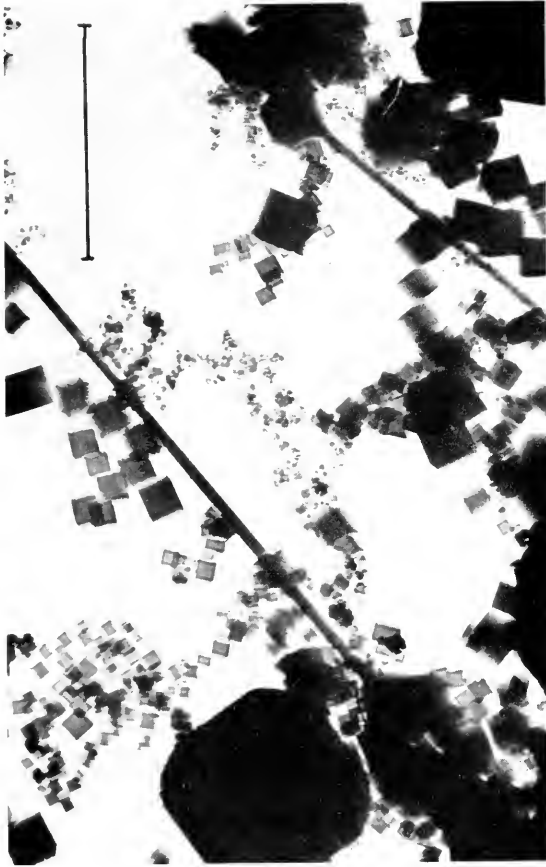


Fig. 3. MgO-Kristalle of CuO-Nadeln, 30 000:1.

daß das Endbild immer frei von Farbabhängigkeit der Vergrößerung und praktisch auch frei von Verzerrung ist.

Nach Abschalten der Regellinse kann durch das Projektiv in zweistufiger Abbildung außerdem eine 700fache Übersichtsvergrößerung erzeugt werden. Sonst ist die Abbildung immer dreistufig, was zugleich eine merkliche Verkürzung der Säule und damit eine Verkleinerung des ganzen Gerätes ermöglichte.

Außer den oben angegebenen Schaltungen bietet die Regellinse noch eine weitere Möglichkeit. Legt man ihre untere spannungsführende Elektrode auf halbes Potential, so erhält man auf dem Leuchtschirm ein vergrößertes Bild der hinteren Brennebene (1) des Objektivs, in der das Beugungsbild des Objekts vorliegt, das auf dem Leuchtschirm sichtbar wird, sobald die Kontrastblende herausgeklappt wird.

Zum raschen Einbringen der Objekte in das Vakuum besitzt das Gerät eine Schleuse, bei der der Objektträger auf einem isolierten Stab in das Innere der käfigförmigen Elektrode des Zwischenbeschleunigers gebracht wird, die sich auf positiver Spannung befindet. Das Objekt wird mittels eines Kreuztisches horizontal bewegt, wobei eine Fläche von 0,8 mm \varnothing abgesucht werden kann. Eine Drehung des Objektträgerstabes erlaubt die Herstellung von Ste-

reoaufnahmen, wobei eine kontinuierliche Verstellung des Stereowinkels unter gleichzeitiger Beobachtung des Bildes möglich ist.

Für die Erzeugung der Hochspannung wird die von Panzer (4, 5) entwickelte, mit Hochfrequenz gespeiste Greinacher-Kaskade verwandt. Da ihre Dimensionen gegenüber denen der im AEG-Zeiss-Elektronenmikroskop EM 8 benutzten verkleinert werden konnten, war es möglich, die gesamte Hochspannungsanlage einschließlich der Spannungsversorgung für die Heizung der Kathode, für den Wehnelt-Zylinder und für die elektrische Fokussierung des Objektes in das wesentlich kleinere Mikroskopgehäuse einzubauen.

Für den Betrieb des Zwischenbeschleunigers ist eine Doppelkaskade notwendig, aus der das erforderliche positive und negative Potential entnommen werden kann. Beide Kaskaden werden aus demselben Sender und demselben Netzgerät gespeist.

Zur Erzeugung und Erhaltung des Vakuums dient eine dreistufige Öldiffusionspumpe mit der dazugehörigen rotierenden Ölpumpe, die ebenfalls im Gerät eingebaut und erschütterungsfrei (federnd) aufgehängt ist. Durch ein programmgesteuertes Vakuumventil wird dafür gesorgt, daß die einzelnen Pumpvorgänge — vom Luftenlaß bis zur normalen Betriebsschaltung — mit einem Schalthebel in unverwechselbarer Reihenfolge betätigt werden.

Bei dem Gerät ist sowohl die Möglichkeit der Innenphotographie als auch der Außenphotographie vorgesehen.

Unterhalb des Leuchtschirmes liegt die Photoplatte. Aus einem seitlich angebrachten Magazin mit einem Vorrat von 8 Platten im Format $6\frac{1}{2} \times 9$ cm können wahlweise die einzelnen Platten unter den Leucht-

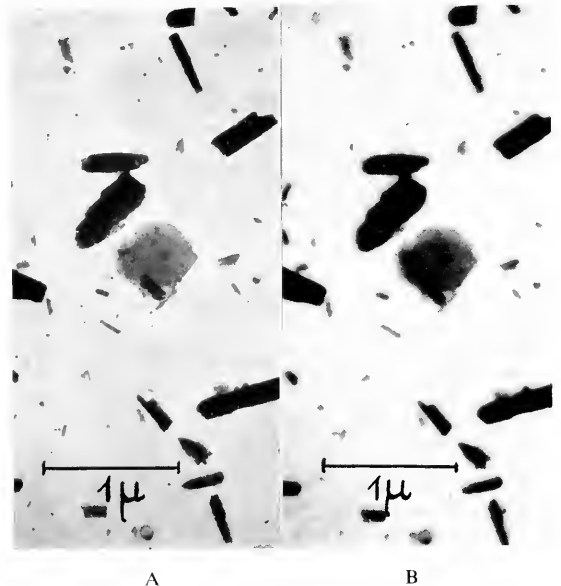


Fig. 4. Pigmentfarbstoff. Vergleich von a) Innen- und b) Außenphotographie. El.-opt. Vergr. 9000:1, Gesamtvergr. 18 000:1.

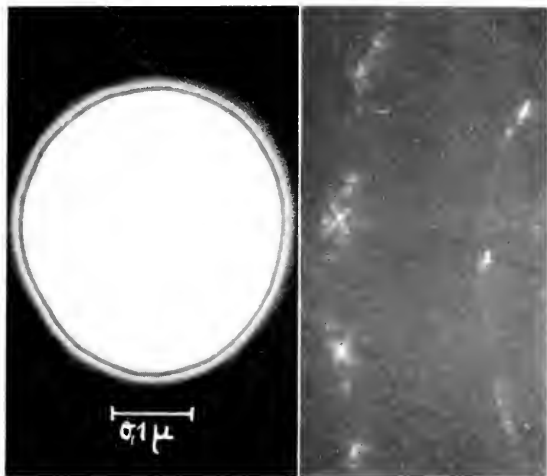


Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 5. Loch in Formvarfolie, überfokussiert. 100 000:1.

Fig. 6. Feinstruktur in MgO-Beugungsdiagramm, nachvergrößert 9:1.

schirm transportiert werden. Die Belichtung erfolgt durch Hochklappen des Leuchtschirmes.

Außenphotographie mittels einer Contax. Hierzu wird die Photoplatte aus dem Strahlengang entfernt und durch einen Durchsichtleuchtschirm ersetzt. Das dort nach Hochklappen des Aufsichtleuchtschirms entstehende Fluoreszenz-Bild wird, wie aus Fig. 2 zu ersehen ist, nach außen auf den Film der Contax im Verhältnis 1:2,5 verkleinert abgebildet. Zu diesem Zweck ist die Contax mit einem serienmäßigen Sonnar 1:1,5; $f = 50$ mm und einem Nahaufnahme-Vorsatzobjektiv ausgerüstet. In schneller Reihenfolge können damit 36 Aufnahmen im Format 24

36 mm gemacht werden. Das auf diese Weise erzeugte Bild erreicht wegen der mangelnden Feinheit der heute herstellbaren Durchsichtleuchtschirme allerdings nicht die Qualität der mittels Innenphotographie gewonnenen Aufnahmen (Fig. 4). Das Verfahren ist deshalb im allgemeinen nur für Reihenaufnahmen zu empfehlen, bei denen es nicht auf höchstes Auflösungsvermögen ankommt.

Es ist beabsichtigt, zusätzlich eine kleine Aufdampfapparatur (2) zu liefern, die direkt an die Photoplattenkammer angeschlossen werden kann. Sie ist so dimensioniert, daß die im Elektronenmikroskop vorhandene Vakuum-Einrichtung benutzt werden kann. Ihr Anwendungsbereich ist allerdings auf die übliche Schrägbedampfung, vorwiegend mit Wolframoxyd und Eisen, beschränkt.

Als weiterer Zusatz ist ein Lupenaufsatz vorgesehen, durch den das auf dem Leuchtschirm entstehende Bild von 3 Seiten in 1,6facher Vergrößerung betrachtet werden kann.

Die Abb. 3–6 geben einige mit dem hier beschriebenen Gerät gemachten Aufnahmen wieder.

Die konstruktive Bearbeitung des Gerätes wurde von den Herren H. Sonnberger und J. Leuschner durchgeführt.

LITERATUR

1. BOERSCH, H., *Ann. Physik* **26**, 631 und **27**, 73 (1936).
2. DEGENHARD, W. und MÖLLENSTEDT, G., *Optik* **14** (im Druck).
3. MÖLLENSTEDT, G., *Optik* **12**, 441 (1955).
4. PANZER, S., *Optik* **7**, 290 (1950).
5. — *ibid.* **10**, 107 (1953).
6. RANG, O. und WITTSCH, W., *Optik* **13**, 201 (1956).
7. STEIGERWALD, K. H., *Optik* **5**, 469 (1949).

Bolzenkathode als Objekt im Elektronen-Emissionsmikroskop

E. B. BAS

Institut für technische Physik, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

IN früheren Arbeiten [1–4] wurde die vom Verfasser entwickelte Bolzenkathode im Zusammenhang ihrer Anwendung in Elektronenkanonen näher behandelt. In folgender Arbeit soll gezeigt werden, daß diese Kathodenkonstruktion auch im Elektronen-Emissionsmikroskop als Objekt gute Dienste leisten kann.

Anhand von Fig. 1 wollen wir zuerst das Prinzip der Bolzenkathode mit einigen Worten kurz erläutern. Das als Bolzen bezeichnete Wolfram-Stäbchen 1 ist an einem Ende in einer Klemmbacke 2 fest eingeklemmt, während die Stirnfläche am anderen Ende als Emissionsfläche dient und in unserem Falle den zu untersuchenden Stoff 3 enthält. Um den Bolzen herum ist konzentrisch eine Wolfram-

Wendel 4 angeordnet, welche von den Stromzuführungsstiften 5 und 6 getragen wird. Diese Zuführungsstifte tragen zugleich einen Strahlungsschutz, bestehend aus zwei konzentrisch zum Bolzen angeordneten Molybdän-Zylindern 7. Kathodenblende 8 vervollständigt die Kathode, während 9 die erste und die zweite Blende des Immersionsobjektives darstellt.

Die Heizung des Bolzens erfolgt so, daß die Wendel durch Stromdurchgang geheizt wird und als Primärkathode dient. Sie erhält gegenüber dem Bolzen eine negative Spannung von einigen hundert Volt, womit die von der Wendel emittierten Elektronen auf den Bolzen aufrallen und ihn auf die ge-

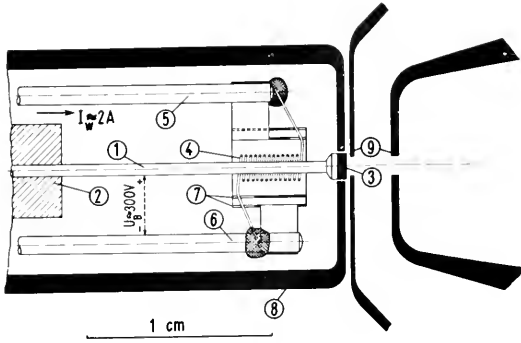


Fig. 1. Schnitt durch die Bolzenkathode als Objekt im Emissionsmikroskop.

wünschte Temperatur aufheizen. In der Heizschaltung ist dafür Sorge zu tragen, daß infolge des Rückheizeffektes vom Bolzen auf die Wendel keine Heizinstabilität auftritt. Bei niedrigeren Objekttemperaturen kann die Bombardierung völlig ausbleiben. Die Heizung des Bolzens erfolgt dann durch die Zustrahlung der Heizwendel.

Für die Anwendung der Bolzenkathode als Objekt im Emissionsmikroskop sind vor allem drei Dinge von Bedeutung: Axiale Ausdehnung des Bolzens, Schwingungen des Bolzens und das magnetische Störfeld der Heizwendel.

Die axiale Ausdehnung des Bolzens ist nicht zu vermeiden. Die Emissionsfläche der Bolzenkathode bei der in Fig. 1 dargestellten Konstruktion verschiebt sich beim Aufheizen auf 2000°K Objekttemperatur um ca. 0,1 mm und bei 1000°K beträgt die Verschiebung ca. 0,04 mm. Die Verschiebung des Objektes bei konstanter Objekttemperatur infolge Nichterreichen des Beharrungszustandes ist meistens so gering, daß Belichtungen bis zur 30 sec. Belichtungszeit nicht dadurch gestört werden.

Den mechanischen Schwingungen des Bolzens ist große Bedeutung beizumessen, da sie die erzielbare Auflösung stark beeinflussen können. Um hier einen Überblick zu bekommen, betrachten wir den idealisierten Fall eines einseitig eingespannten elastischen Stabes von der Länge l mit einem Massenpunkt m am Ende (Fig. 2). Die Transversal-Koordinate dieses Massenpunktes bezeichnen wir mit y^* und die laufenden Koordinaten des Stabes mit x , y . Dann läßt sich die Schwingungsgleichung dieses Systems wie in Fig. 2 formulieren. ξ ist der sogenannte normale Viskositätskoeffizient [5], I equatorielles Trägheitsmoment und E der Elastizitätsmodul.

Für die Anwendung dieser Betrachtungen auf die Bolzenkathode wollen wir folgende Vereinbarung treffen: als die Stablänge l soll derjenige Abschnitt gelten, welcher sich nicht auf hoher Temperatur befindet und dadurch seine Elastizität bewahrt. Als Masse m gilt die Masse des übrig bleibenden Endstückes des Bolzens. Nehmen wir als Beispiel für

$$m \frac{d^2 y^*}{dt^2} (l-x) - E I \frac{d^2 y}{dx^2} + \xi I \frac{d}{dt} \left(\frac{d^2 y}{dx^2} \right) = 0$$

$$y^* = y_0^* e \exp \left(-\frac{1}{2} \frac{\xi}{E} \omega_0^2 t \right) \cos \omega t$$

$$\omega_0^2 = \frac{3 I E}{m l^3} \quad t_0 = 2 \cdot \ln 2 \cdot \frac{E}{\xi} \cdot \frac{1}{\omega_0^2}$$

Fig. 2. Mechanische Schwingungen des Bolzens.

unsere in Fig. 1 dargestellte Konstruktion mit: $l = 7 \cdot 10^{-1}$ cm, $d_B = 6 \cdot 10^{-2}$ cm, $I_B - l = 6 \cdot 10^{-1}$ cm, $m = 3,27 \cdot 10^{-2}$ g, und für Wolfram $E \approx 3,5 \cdot 10^{12}$ Dyn/cm², $\xi \approx 10^8$ Dyn·sec/cm², so erhalten wir: $\omega_0 \approx 23$ kHz, $t_0 \approx 10^{-1}$ sec.

Nehmen wir weiterhin an, dass der Bolzen durch einen Stoß auf eine Amplitude von: $y_0^* = 10^{-2}$ cm angeregt wurde, so wird diese Amplitude in 1 m·sec. auf $10^{-2} \times 10^{-3} = 10^{-5}$ cm oder 0,1 μ absinken. Wir sehen hieraus, daß die Erschütterungsempfindlichkeit bis herab zu der Auflösungs-grenze des Emissionsmikroskopes ausreichen dürfte.

Die dritte uns hier interessierende Frage betrifft das magnetische Störfeld im Immersionsobjektiv, hervorgerufen durch den Wendel-Heizstrom. Dieses Störfeld kann man in zwei Anteile zerlegen; rotationssymmetrischer Anteil hervorgerufen durch die Windungen der Wendel und Querfeldanteil, hervorgerufen durch die Wendelzuleitungen.

Die rotationssymmetrische Komponente ist sofort aus der Feldstärkegleichung einer Zylinderspule anzugeben:

$$H_z = \frac{I_W \cdot W}{2 l_W} \left[\frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{d_W}{l_W + 2z} \right)^2}} - \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{d_W}{l_W - 2z} \right)^2}} \right] \text{ A/cm} \quad (6)$$

Hier bedeutet:

I_W = Wendelheizstrom

W = Anzahl der Wendelwindungen

l_W = Wendellänge

d_W = mittlerer Wendeldurchmesser

z = laufende Koordinate auf der Achse der Wendel von der Mitte der Wendel gezählt.

In unserer Anordnung hat die Heizwendel folgende Daten:

$l_W = 3,5$ mm

$d_W = 1,35$ mm

$W = 14$

$I_W \approx 2$ A.

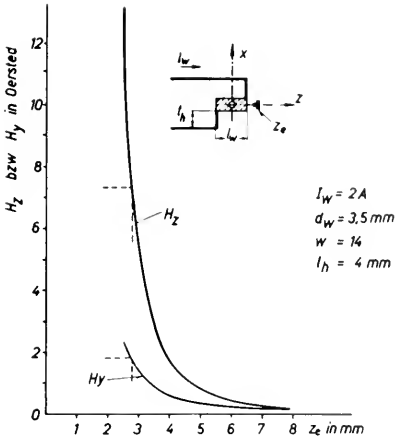


Fig. 3. Axialsymmetrische und transversale Anteile der magnetischen Störfeldstärke der Heizwendel.

Damit erhalten wir für die axiale Feldstärke die Beziehung:

$$H_z \approx 50 \left[\frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{1,35}{2z - 3,5}\right)^2}} - \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{1,35}{2z - 3,5}\right)^2}} \right] \text{ Oersted} \quad (7)$$

(z in mm).

Diese Beziehung ist in Fig. 3 graphisch dargestellt.

Die Querkomponente des magnetischen Wendel-Störfeldes, hervorgerufen durch die Wendel-Zuleitungen, rechnen wir aus einem vereinfachten Stromkreis. Nach dem Biot-Savartschen Gesetz läßt sich für jede einzelne Stromkreisstrecke für den in einem Punkt P erzeugten Feldanteil angeben:

$$H = \int_{\alpha_1}^{\alpha_2} \frac{I}{2\pi r^2} \sin \alpha \, dx. \quad (8)$$

Die Rechnung führt auf folgende Beziehung:

$$H_y = \frac{I_W}{4\pi l_h} \left[\sqrt{1 + \left(\frac{l_h}{z - l_W/2}\right)^2} - \sqrt{1 + \left(\frac{l_h}{z - l_W/2}\right)^2} - 2 \right] \text{ A cm} \quad (9)$$

Setzen wir wieder unsere obigen Wendeldaten und für die Länge des Zuleitungsdrahtes $l_h = 4 \text{ mm}$ ein, so erhalten wir:

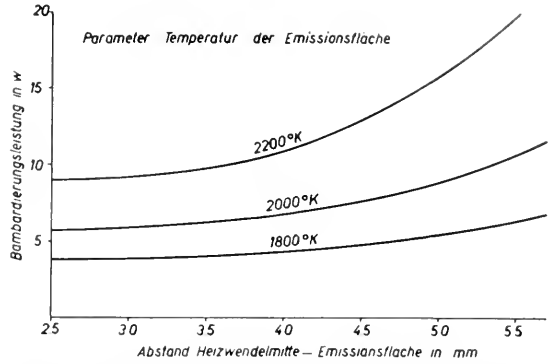


Fig. 4. Abhängigkeit der Heizleistung von der Entfernung der Emissionsfläche von der Heizwendelmittle. Bolzen β : 0,6 mm, Objekt γ : 1,5 mm.

$$H_y = 0,5 \left[\sqrt{1 + \left(\frac{4}{z - 1,75}\right)^2} + \sqrt{1 + \left(\frac{4}{z - 1,75}\right)^2} - 2 \right] \text{ [Oe]} \quad (10)$$

(z in mm).

In Fig. 3 finden wir auch H_y in Abhängigkeit von z graphisch aufgetragen. Aus konstruktiven Gründen beträgt der minimale Abstand der Emissionsfläche von der Wendelmittle ca. 2,8 mm. Für diesen Fall erhalten wir für die beiden Feldstärkenkomponenten folgende Werte:

$$H_z = 7,3 \text{ [Oe]},$$

$$H_y = 1,63 \text{ [Oe]}.$$

Der Einfluß dieses Störfeldes auf die Abbildungsgüte des Immersionsobjektives ist schwer zu beurteilen. Die obige Angabe für den Abstand zwischen Wendelmittle und Emissionsfläche von 2,8 mm ist der konstruktiven Ausführung der Bolzenkathode als Elektronenquelle für die Elektronenkanonen entnommen. Beim Emissionsmikroskop kann die Emissionsfläche bedeutend weiter von der Heizwendel weggerückt werden, wodurch nach Fig. 3 die Stör-

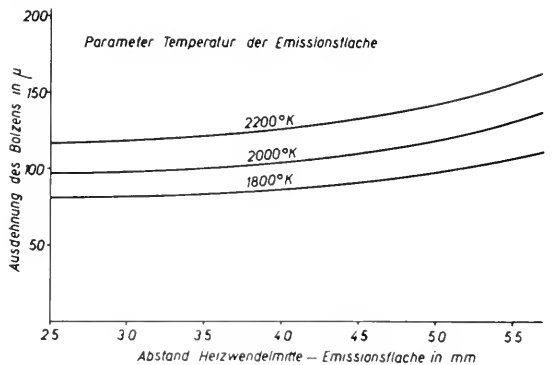


Fig. 5. Axiale Verschiebung der Emissionsfläche bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Abstandes Emissionsfläche Heizwendelmittle. Bolzen β : 0,6 mm, Objekt γ : 1,5 mm.

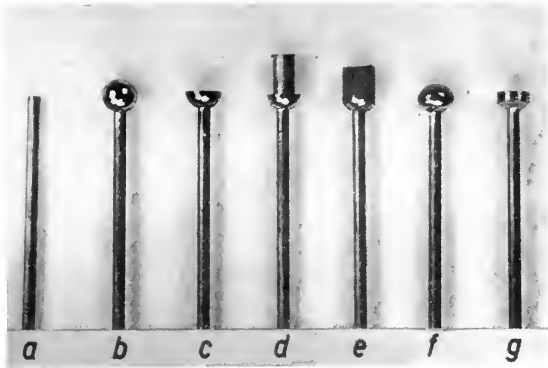


Fig. 6. Objektpräparation.

feldstärke der Heizwendel noch weitgehend vermindert werden kann.

Es erhebt sich nun die Frage, wie sich die Bombardierungs-Leistung des Bolzens für eine bestimmte Objekttemperatur beim Wegrücken der Emissionsfläche von der Heizwendel verändert. Diese Frage wurde experimentell geprüft, woraus die Kurvenschar in Fig. 4 resultiert. Die Messungen wurden mit einem W-Objekt durchgeführt und die Anordnung war so getroffen, daß der Abstand zwischen Wendelmitte und Einspannstelle des Bolzens stets 11,2 mm betrug. Bolzendurchmesser war $d_B = 0,6$ mm und Objektdurchmesser $d_K = 1,5$ mm. Durch die Verlängerung des hochgeheizten Bolzenendes wird nun auch die axiale Ausdehnung des Bolzens ausgeprägter. Die gemessenen Ausdehnungen sind durch die Kurvenschar in Fig. 5 graphisch dargestellt. Über den Einfluß des Abstandes Wendelmitte-Emissionsfläche auf die Abbildungsgüte wurden noch keine systematischen Versuche durchgeführt.

Wir wenden uns jetzt der Objektpräparation zu. Diese besteht aus drei Stufen: a) Präparation des Wolfram-Bolzens; b) Aufschmelzen des zu untersuchenden Stoffes auf den Wolfram-Bolzen; c) Präparation der Emissionsfläche.

Der Wolframbolzen wird aus dem handelsüblichen Wolframdraht hergestellt. Der meist angewendete Durchmesser beträgt 0,6 mm. Zuerst werden Drahtstücke von ca. 300 mm Länge in einer Streckvorrichtung im Schutzgas bei ca. 1000 C gestreckt. Aus so gerichtetem Draht werden Stücke von passender Länge herausgeschnitten und in einem Rekristallisationsofen bei 3000 K rekristallisiert (Fig. 6a). Nun werden die rekristallisierten Bolzen in einen Halter eingesteckt und in eine Kathodenstrahlröhre eingeschleust. Durch den auf die Stirnfläche des Wolfram-Bolzens konzentrierten Elektronenstrahl wird das Wolfram so weit geschmolzen, bis eine Kugel von gewünschtem Durchmesser entsteht (Fig. 6b). Es stand uns im Elektronenstrahl eine Leistung von 14 kV 10 mA – 140 W zur Verfügung, womit Kugeldurchmesser von ca. 2 mm ohne Schwierigkeit erzielt werden können. Schließlich wird die Wolframbolzenkugel bis auf die Hälfte abgeschliffen (Fig. 6c).

Der nächste Schritt ist das Aufschmelzen des zu



Fig. 7. Emissionsbild.

untersuchenden Stoffes. Dieser Stoff kann in massiver Form oder in Pulverform vorliegen. Liegt er in massiver Form vor, so wird ein Stück von geeigneter Größe auf die Stirnfläche eines wie oben vorbereiteten Wolframbolzens mit Hilfe von Kollodium angeklebt (Fig. 6d). Falls der zu untersuchende Stoff in Pulverform vorliegt, wird eine bestimmte Menge von diesem Pulver bzw. Pulvergemisch in einer kleinen Preßform auf die Planfläche der Halbkugelkalotte des Bolzens aufgepreßt (Fig. 6e). Es kann ein wenig Kollodium als Bindemittel zugegeben werden.

Der Wolframbolzen mit aufgeklebtem bzw. aufgepreßtem Präparat wird wieder in den Elektronenschmelzofen eingeschleust und durch Elektronenbeschuss auf das Wolfram aufgeschmolzen (Fig. 6f). Da Wolfram einen hohen Schmelzpunkt besitzt und das Aufschmelzen unter Umständen in Bruchteilen einer Sekunde erfolgt, besteht sehr geringe Wahrscheinlichkeit für eine Legierung mit Wolfram.

Schließlich kommt die Fertigstellung des Objektes. Dafür wird zuerst die Schmelzkugel auf dem Wolframbolzen auf den gewünschten Durchmesser rundgeschliffen und dann die Emissionsfläche plangeschliffen (Fig. 6g). Bei diesem letzten Schritt ist zu beachten, dass die resultierende Dicke des zu untersuchenden Stoffes auf dem Wolfram ausreichend ist. Die Schlußphase der Präparation bildet die feine Politur der Emissionsfläche.

Selbstverständlich können in vielen Fällen Bolzen aus vollem Material des zu untersuchenden Stoffes herausgearbeitet und in die Bolzenkathoden-Anordnung als Objekt eingebaut werden. Wir haben allerdings zurzeit diesbezügliche Erfahrungen nur mit hochschmelzenden Metallen Molybdän und Tantal gemacht.

Zum Schluß zeigt uns Fig. 7 ein emissionsmikroskopisches Bild, welches mit den Objekten in Bolzenkathodenform hergestellt wurde.

LITERATUR

1. BAS, E. B., Mitteilungen des Inst. f. techn. Physik a.d. Eidg. Technischen Hochschule Zürich, Nr. 1 (1950).

2. — G. F. F. Mitteilungen 10, 17 (1954).
 3. — Optik 12, 377 (1955).
 4. — Z. angew. Phys. 7, 337 (1955).
 5. HONDA, R. und KONNO, S., Phil. Mag. 42, 121 (1921).

Richtstrahlwerte der kalten Kathode

L. WEGMANN und M. GRIBI

Trüb, Täuber u. Co., Zürich

NACHDEM die Messungen des Geschwindigkeitspektrums durch Möllenstedt (2) den theoretischen Nachweis erbracht haben, daß die kalte Kathode nach Induni zur Speisung von Elektronenmikroskopen geeignet ist, konnte von der Anwendungsseite her gezeigt werden, daß es durchaus möglich ist, das Trüb-Täuber-Mikroskop für die histologische Forschung einzusetzen, wenn man als Kriterium dafür die Auflösung der Doppelstrukturen in den Mitochondrien und der Palladeschen Körner betrachtet. Was neben dem sicheren Vorteil der Einfachheit im Betrieb jedoch oft noch als Nachteil empfunden wird, ist die mangelnde Helligkeit der kalten Kathode bei höheren Vergrößerungen, was bei längerem Arbeiten mit Schnittpräparaten als ermüdend empfunden wird.

Diese Lage hat Anlaß gegeben, die Intensität des emittierten Elektronenstromes der kalten Kathode genauer zu untersuchen. Einige Ergebnisse sollen hier dargelegt werden.

Fig. 1 zeigt das im Trüb-Täuber-Mikroskop verwendete Beleuchtungssystem (1, 3). Der Kathode (K)

steht die eng anschließende Lochanode (A) gegenüber. Den Abschluß des Kathodenraumes mit erhöhtem Gasdruck bildet die Anodenblende (B_A). In der magnetischen Kondensorlinse mit der Kondensorblende (B_C) wird das Elektronenbündel gesammelt und — bei hellster Beleuchtung des Präparates — in die Objektebene (O) fokussiert.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden erzielt mit einer Lochanode von 8 mm Durchmesser in 9 mm Abstand von der Kathode. Der größere Abstand von der Kathode wurde nötig, weil die Untersuchungen auf höhere Spannungen (bis 80 kV) ausgedehnt wurden. Der Abstand Anode-Anodenblende ist für die Entladung nicht kritisch, sobald er oberhalb ca. 30 mm liegt.

Zur Messung der Richtstrahlwerte dieser Kathode wurden die Blenden B_A und B_C , sowie — bei ausgeschaltetem Kondensor — eine Blende (B_O) in der Objektebene benutzt.

Es zeigt sich rasch, daß man zu unterschiedlichen Werten kommt, wenn man die Apertur für die verschiedenen Blenden aus deren wirklicher Distanz zur Kathode berechnet. Dies ist aus dem Verlauf der Elektronenbahnen im Beschleunigungsfeld leicht erklärlich: nach Fig. 2, muß der virtuelle, für die

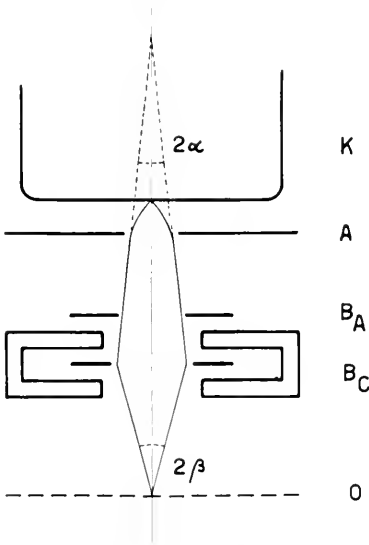


Fig. 1. Beleuchtungssystem mit kalter Kathode.

- | | |
|-------------------------|---|
| K = Kathode | α virtueller kathodenseitiger Öffnungswinkel |
| A = Lochanode | β maximale Beleuchtungsapertur |
| B_A = Anodenblende | |
| B_C = Kondensorblende | |
| O = Objektebene | |

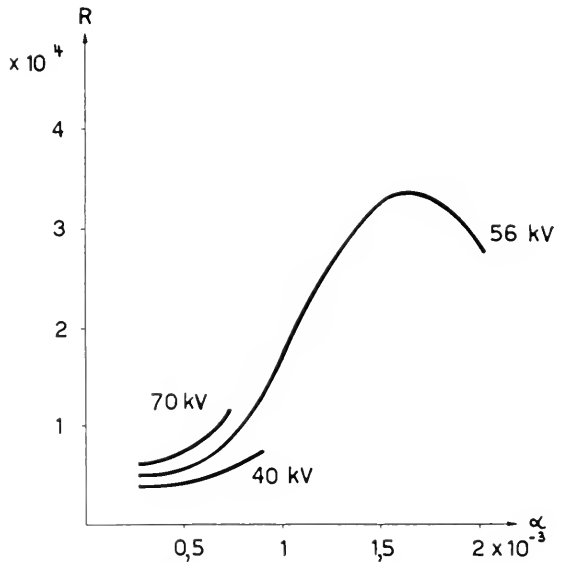


Fig. 2. Richtstrahlwerte der kalten Kathode in Amp., cm² als Funktion des kathodenseitigen Öffnungswinkels.

Berechnung der Aperturen maßgebende Emissionsfleck hinter der Kathode liegen.

Der Richtstrahlwert $R(x)$ für einen bestimmten Öffnungswinkel x ergibt sich aus dem durch eine Blende des Durchmessers $|2r$ fließenden Elektronenstrom i zu

$$R(x) = \frac{i}{\frac{\pi d^2}{4} \cdot \pi x^2}$$

wo x der zu r gehörige Öffnungswinkel und d der Durchmesser des Emissionsfleckes ist. Dieser Durchmesser wird am einfachsten festgestellt durch elektronenoptische Abbildung in die Objektebene (O). Von hier aus kann er durch Rechnung in den Emissionsfleck zurückprojiziert werden, und zwar in den virtuellen Emissionsfleck, dessen Abstand auch der Berechnung von x zugrunde liegt. Dabei wird der virtuelle Emissionsfleck in einem solchen Abstände von der Kathode gewählt, daß sich für Messungen mit Blenden in verschiedenen Abständen von der Kathode (z. B. B_A und B_O) dieselben Werte für $R(x)$ ergeben.

Für die vorliegende Anordnung ergab sich auf diese Weise ein Abstand zwischen wirklichem und virtuellem Emissionsfleck von 100 mm. Bei einem Totalstrom der Emission von 0,5 mA erhielten wir damit die in Fig. 3 eingetragenen Richtstrahlwerte. Die Messungen wurden an einem mehrere Tage eingebrannten und somit über lange Zeit stabilen Fleck durchgeführt.

Es ist auffallend, daß man es bei der Emission der kalten Kathode offenbar mit einem Hohlstrahl zu tun hat, welcher bei einer Apertur von $1,5 \times 10^{-3}$ seine größte Intensität ausstrahlt. Der Unterschied im Richtstrahlwert zwischen diesem Öffnungswinkel

und den bisher benutzten von 0,3 bis $0,5 \times 10^{-3}$ ist offensichtlich wesentlich größer als die durch Variation der Beschleunigungsspannung erzielten Unterschiede. Immerhin kann auch mit Steigerung der Beschleunigungsspannung noch eine Erhöhung des Richtstrahlwertes erreicht werden.

Da bei der in Fig. 2 gezeigten Anordnung die Flächendichte j des Elektronenstromes im Präparat und damit die Helligkeit im Bild gegeben ist durch

$$j = \pi \cdot R(x) \cdot \beta^2$$

und andererseits β gegeben ist durch die weiteren Abbildungsbedingungen, so kann die größte Helligkeit dadurch erreicht werden, daß $x = 1,5 \times 10^{-3}$ gemacht wird.

Es ist auf diese Weise gelungen, durch Abänderung der Distanzen zwischen virtueller Kathode und Kondensator auf den günstigsten Wert und durch gleichzeitige Erhöhung der Beschleunigungsspannung auf 60 kV im Trüb-Täuber-Mikroskop, Typ KM4 eine Helligkeitssteigerung im Endbild von einem Faktor 6 zu erzielen. Die Forderung der Histologen konnte also erfüllt werden, und zwar zeigt die mit der neuen Beleuchtungseinrichtung erzielte Auflösung, daß die Geschwindigkeitsverteilung der Elektronen auch über diese Winkel genügend ist.

Über weitere Experimente mit dem Ziel, die Richtstrahlwerte für kleinere Öffnungswinkel zu erhöhen, soll an anderem Orte berichtet werden.

LITERATUR

1. INDUNI, G., Comptes rendus du colloque CNRS à Toulouse 1955, S. 189.
2. MÖLLENSTEDT, G. und DÜKER, H., *Z. Naturforsch.* **8a**, 79 (1953).
3. WEGMANN, L., *Optik* **10**, 44 (1953).

Summary of the Proceedings of a Symposium on X-Ray Microscopy and Microradiography, Cambridge University, England, August 16—21, 1956

W. C. NIXON

Cavendish Laboratory, Cambridge

“DIE Röntgenstrahlen-Mikroskopie ist ein Stiefkind der Elektronenmikroskopie.” For several years the results of attempts at x-ray microscopy have been reported at electron microscopy meetings such as this one through the kindness and tolerance of the organizing committees. By 1956 sufficient work had been done in this field to justify a conference devoted to x-ray microscopy and divorced from electron microscopy. This is a very brief summary of the meeting, with facts first, followed by results

and conclusions. No micrographs are shown as it is impossible to choose one or two only from the large number presented.

The first International Symposium on X-Ray Microscopy and Microradiography was held at the Cavendish Laboratory, Cambridge University, England, August 16–21, 1956, with the sponsorship of the International Union of Pure and Applied Physics and assisted by funds from UNESCO, the Royal Society, and several industrial and private contri-

butions. The international aspects were emphasized by virtue of ten countries producing 66 papers and with 125 registered participants, several from countries not included in the program list. Almost equal thirds of the program were supplied by Great Britain and the United States, with Sweden the next largest contributor. The full program was completed with no parallel sessions by meeting from 9.00 a.m. to 7.00 p.m. with a few short breaks, and full attendance was continued till the end, helped somewhat by inclement Cambridge weather.

The program was generally divided among the three main methods of x-ray microscopy and started with a broad survey of the whole field by Dr. Cosslett, Cambridge. More detailed survey papers were read by Prof. Kirkpatrick, Stanford, on the grazing incidence mirror reflection x-ray microscope; by Prof. Engström, Stockholm, on the contact method of x-ray microscopy, where more normal x-ray tubes are used with fine grained emulsions and the specimen is in contact with the film; and by Dr. Nixon, Cambridge, on the point projection method where a special x-ray tube is used to produce initial x-ray enlargement from a point source of x-rays and the image is recorded on coarse grained film.

Instrumentation of the three methods was well developed since x-ray microscopy is still in the process of experimentation and research on the methods as well as with the methods. Dr. Fitzgerald, New York, and Mr. Ely, London, described special x-ray tubes for contact microradiography incorporating many desirable features for flexibility and constructed in their respective laboratories. A new gas discharge x-ray tube for long wavelength contact microradiography was described by Dr. Henke, California, and his method of total reflection of the x-rays inside an ellipsoidal mirror gives high intensity x-radiation in the 10–100 Å region. Dr. van den Broek, Eindhoven, described the commercially available Philips sealed-off x-ray tube for contact microradiography at 1–5 kV with a resolution of 0.5 micron and early delivery was promised.

Projection x-ray microscopes of several kinds were mentioned. Dr. Ong and Dr. Le Poole, Delft, discussed their magnetic lens point source tube for high intensity at 1 μ resolution and several micrographs using their $\times 2$ initial enlargement method (specimen equidistant from x-ray source and film and both distances only a few mm) were shown. Paper, blood cells, spermatozoa and replicas of deep fracture surfaces all gave excellent x-ray micrographs. Dr. Cosslett, Dr. Nixon and Mr. Pearson, Cambridge, described the recent changes to the series of point source tubes made there and Dr. Siegel and Dr. Knowlton, Cornell, discussed an ingenious conversion of an RCA EMU-2B electron microscope with a 15-minute change-over either way from electron to x-ray microscopy. This kit is produced by Canalco, 4934 St. Elmo Ave., Bethesda

14, Md., U.S.A. Mr. Newberry and Mr. Summers presented a paper, *in absentia*, on the latest version of the General Electric Co., U.S.A., electrostatic x-ray microscope and several still photographs of ciné x-ray micrographs taken at 5 frames per second were shown.

Two contributions from Drs. Rovinsky, Zutsau and Avdeyenko, Moscow, were also read from the chair. The first described a pin hole camera x-ray method using a 1 μ hole and exposure times of 30 minutes. The second method used an etched tungsten needle point, radius 0.1 μ , as an anode with a ring cathode. 1 μ resolution was shown with exposures as low as 3 minutes. Results from test grids were shown for both methods.

Low intensity limits the performance of projection x-ray microscopes and Dr. Pattee, Stanford, and Drs. Marton, Schrack and Placius, NBS, Washington, described the use of tungsten point field emitters as electron sources of high intensity for x-ray microscopy. The former has measured 1 μ A beam current at 9 kV through an angle of 2×10^{-2} rad from a field emitter and the latter authors have focussed their beam to a 5 μ x-ray source. Both feel confident that field emission will help to improve x-ray microscope resolution in the future.

Theoretical papers of projection x-ray microscopy were read by Dr. Langner, Düsseldorf, Mr. N. Dyson, Cambridge, and Dr. Cosslett, Cambridge. The first dealt with the variation of intensity and resolving power and confirmed other experimental results; the second discussed image formation, contrast and angular and spectral distribution of the x-rays emitted (both in theory and practice) from a point source tube; the third gave a critique of the $\times 2$ enlargement method and discussed umbra and penumbra methods of defining resolution.

The reflection mirror x-ray microscope was well represented by the Stanford school with other papers from Berlin, Paris and Dartmouth. Dr. Pattee, Stanford, described a 4-mirror compound reflection x-ray microscope computed for 500 Å resolution, field of 20 microns, at 4 Å x-ray wavelength. Difficulties of alignment have prevented use of this instrument. Dr. Hink, Berlin, described a special high intensity x-ray tube and 2 mirror system that gave 1 μ resolution in practice with 90 minute exposures. Dr. McGee, Stanford, reported results with an 8 Å (AlK α) x-ray wavelength 2 mirror microscope, also using a special aluminium anode x-ray tube. Dr. Montel, Paris, presented a different version of the 2 mirror system without astigmatism or anamorphism, by using the 2 mirrors in the same plane unlike the Stanford method.

Dr. Baez, Redlands, California, showed results of electronic computing of x-ray paths from mirrors of various surface shapes, and Dr. Rieser, Dartmouth, discussed the effect of surface finish on reflection of the x-rays.

Various techniques and methods of contact micro-

radiography were described and micrographs demonstrated the results obtained. Dr. Ehrenberg and Mr. White, London, spoke of their use of total reflection to select long wavelengths, 8–10 Å, for contact microradiography. Thin emulsions give a resolution approaching 0.1μ and yet the intensity is high enough for only 5 minute exposures. Prof. Engström and others from Stockholm discussed the use of the Henke source of soft x-rays (equal to 200–2000 volts) and excellent results were shown of the chromosomes in the onion root tip with a resolution equal to the light microscope. Dr. Recourt, Eindhoven, also used x-rays generated below 1000 volts with the Philips unit without a window. Again high resolution, less than 0.3μ , was shown and excellent contrast.

Dr. D. Jones, Tübingen, described a new method of x-ray microscopy, worked out with Prof. Möllenstedt, whereby the photoelectrons emitted after the x-rays pass through a specimen in the contact microradiographic method, strike a metal foil and emit low energy secondary electrons. These are then focused by an electrostatic lens to give an enlarged image of the x-ray contrast. This is contact radiography plus image conversion and brings the number of methods of x-ray microscopy up to ten. Again, a resolution of 1μ or better was shown.

Scanning x-ray microscopes were discussed by Dr. Pattee, Stanford, and Mr. Duncumb, Cambridge. Paper B 2 of this conference covers the same field, so no summary is given. The scanning method of microanalysis as shown by Duncumb was a high point of the symposium and future results are eagerly awaited.

The possibilities of extending the resolution of contact microradiography beyond the light microscope were shown by Mr. and Mrs. Ladd, New York, with their plastic process. A grainless plastic is exposed to x-rays and developed by acetone dissolving of the unaffected areas. A replica of the surface is then viewed by electron microscopy. The 24 hours' exposure times limit the process and Dr. Pattee and Mr. Warnes, Stanford, showed similar results using Saran plastic and a few hours' exposure.

Two papers of Gabor diffraction with x-rays were read by Dr. El-Sum, Stanford, and Dr. Baez, Redlands, California, and the difficulties of fringe formation discussed. Finite source size, wavelength spread and x-ray transparent objects all diffuse the fringe pattern and diffraction holograms are difficult if not impossible to make.

Microanalysis formed a large part of the program as this is one area where the use of x-rays is superior to light or electrons for many specimens. Microdiffraction cameras for the Hilger and Watts Ehrenberg and Spear microfocus tube were discussed by Dr. Ehrenberg, London, and Dr. Nixon, Cambridge, showed some results using the Cosslett-Nixon point source tube as a source for micro-beam x-ray diffraction.

Dr. Lindström, Stockholm, described quantitative methods of microchemical analysis by contact microradiography and showed an analysis of 1.3 % of sulphur in skin over a 10μ area. Dr. Wallgren, Stockholm, has studied developing embryonic bone in this way to discover the extent of mineralization. Dr. Hallén, Gothenburg, showed some aspects of automation in contact microradiography using a new scanning and computing microphotometer to analyse the microradiograph. Mr. Long and Mr. Duncumb, Cambridge, discussed quantitative projection methods of microanalysis.

Results of the various methods included botanical, biological and metallurgical samples primarily. With the contact method Dr. Salmon, Paris, presented a complete review of botanical microradiography on normal and cancerous leaves and stems and other areas. Correlation with autoradiography and polarization microscopy was made with the x-ray method giving the best indication of chemical structure. Dr. Bohatirchuk, Ottawa, discussed applied microradiography in medical research, particularly bone studies and Dr. Recourt, Eindhoven, was able to follow staining by osmium tetroxide by contact microradiography. Human cervical cancer has been studied by Dr. Fitzgerald, New York, and human breast cancer by Dr. Leborgne, Montevideo. Both are using contact microradiography in an exploratory way and need more results before interpretations can be made. Prof. Saunders, Halifax, presented two papers, one on dental pulp vessels using a suction-injection technique with thorotrast and the other on vascular patterns in muscle, also using contrast media. Both of these papers showed the excellent results possible with normal x-ray equipment and good specimen preparation. Dr. Carr, Bradford, discussed renal calculi observed by contact microradiography and other papers showed results on bone and the human eye.

Metallurgical contact microradiography was represented by fewer papers but showed the results of a great deal of work. Mr. Andrews and Mr. Johnson, Rotherham, discussed iron and steel research, particularly segregation and sintering. Mr. Sharpe, Bristol, showed many results of alloys and inclusions, and discussed metal specimen preparation. Drs. Votava, Berghezan, and Gillette, Brussels, found very strong Bragg reflection giving contrast from pure samples due to the different crystal orientations and used this to study imperfections in the crystals.

The projection method of x-ray microscopy was represented by Mr. Jackson, Cambridge, on wood sections, geological (pitch blende) and metallurgical (Al–3% Mn) samples, and by Mr. Smith, Cambridge, on insect flight musculature.

The main conclusions of the conference concerned the high degree of interest in this subject and a committee of three, Dr. Cosslett, Cambridge, Prof. Engström, Stockholm, and Prof. Kirkpatrick, Stanford, was formed to ensure continuance of the ties

made at this first symposium. There is no danger of an "X-Ray Microscope Society" being formed as it was felt that the subject belonged to a broader field of general micro investigation. However, another meeting has tentatively been set for the summer of 1959, in Stockholm, at the invitation of Prof. Engström. The three methods were characterized by (1) low voltages for contact microradiography, (2) new interest in reflection x-ray microscopy outside of Stanford, and (3) the extension of projection x-ray microscopy to other methods such as microdiffraction, scanning, and absorption and fluorescence analysis.

At present, x-ray microscopy is just emerging from the "grid and fly" stage and yet resolutions down to 0.1μ are shown. By 1959 there will undoubtedly be improvements and the general feeling at

this symposium would lead to an expectation of reflection x-ray microscopy resolution better than 1000 \AA , projection x-ray microscopy much better than 1000 \AA , vast amounts of contact microradiographic results from commercial models, some results from projection x-ray microscope commercial models, and an extension of quantitative microanalysis by all methods.

Summaries of this Symposium on X-Ray Microscopy and Microradiography have appeared in *Nature* by Dr. Cosslett (1) and in *Science* by Prof. Kirkpatrick, and the full volume of Proceedings will be published in 1957 by the Academic Press, New York.

REFERENCE

1. COSSLETT, V. E., *Nature*, **178**, 676 (1956).

II

ELECTRON OPTICS

Über asymptotische Bildfehler

F. LENZ

*Institut für Elektronenoptik und Feinmechanik der Technischen Hochschule Aachen und
Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf*

FÜR den elektronenoptischen Abbildungsmaßstab in einem zweistufig abbildenden System aus zwei Linsen (beispielsweise Objektiv- und Projektivlinse eines Elektronenmikroskops) gilt [8]

$$M = M_1 \cdot M_2 = \frac{b_1}{f} \frac{b_2}{v}, \quad (1)$$

wenn b_1 der Abstand der Zwischenbildebene vom Objektiv, b_2 der Abstand der Endbildebene vom Projektiv, f die Brennweite des Objektivs und v die asymptotische Brennweite (auch als „Vergrößerungsweite“ oder „virtuelle Brennweite“ bezeichnet) des Projektivs ist. Der Abbildungsmaßstab $M_2 = b_2/v$ des Projektivs errechnet sich also nach einem anderen Gesetz als der Abbildungsmaßstab $M_1 = b_1/f$ des Objektivs. Durch die Unterscheidung zwischen asymptotischer Brennweite v und gewöhnlicher Brennweite f wird berücksichtigt, daß die Elektronenbahnen im Feld des Projektivs schon gekrümmt werden, bevor sie die Zwischenbildebene erreicht haben. In Projektivlinsen, die so schwach sind, daß ihr Zwischenbild praktisch bereits im feldfreien Raum liegt, ist die Unterscheidung der asymptotischen Brennweite von der gewöhnlichen Brennweite nicht nötig.

Ähnlich wie bei der Berechnung des gesamten Abbildungsmaßstabs eines Systems aus mehreren Linsen steht es bei der Berechnung des Bildfehlers solcher Systeme. Der gesamte Bildfehler eines Systems aus zwei Linsen (beispielsweise Objektiv- und Projektivlinse eines Elektronenmikroskops) folgt nicht in einfacher Weise aus den Bildfehlern der einzelnen Linsen, wenn diese wie üblich [4] durch die Bildfehlerkoeffizienten im System mit Blende oder im System ohne Blende gekennzeichnet werden. Für den Bildfehler der Objektivlinse gilt beispielsweise im blendenfreien System

$$\begin{aligned} \frac{u_1}{V_0} - u_0 &= B_0 u_0'^2 \bar{u}_0' + 2(F_0 + i f_0) u_0 u_0' \bar{u}_0 + \\ & (F_0 - i f_0) u_0'^2 \bar{u}_0 + (D_0 + C_0) u_0 u_0' \bar{u}_0' + \\ & (C_0 + i c_0) u_0^2 \bar{u}_0' + (E_0 + i e_0) u_0^2 \bar{u}_0, \quad (2) \end{aligned}$$

wenn die komplexen Koordinaten $u_0 = x_0 + i y_0$ und $u_0' = (dx/dz)z_0 - i(dy/dz)z_0$ Durchstoßpunkt und Durchstoßrichtung der Elektronenbahn durch die Objektebene $z = z_0$ kennzeichnen, u_1 der Durchstoßpunkt der Bahn durch die zu z_0 konjugierte Bildebene $z = z_1$, V_0 die Objektivvergrößerung und B_0, C_0, D_0, \dots die Bildfehlerkoeffizienten des Ob-

jektivs im blendenfreien System sind. Daraus folgt in Seidelscher Dioptrik u_1 . In ähnlicher Weise läßt sich auch u_1' als Funktion von u_0 und u_0' ausdrücken. Es wäre nun aber nicht richtig, bei der Bildfehlerberechnung für das Projektiv die aus (2) folgenden Werte von u_1 und die entsprechenden Werte von u_1' für den Durchstoßpunkt u_p und die Durchstoßrichtung u_p' durch die Zwischenbildebene einzusetzen und damit aus der für das Projektiv gültigen, der Gleichung (2) entsprechenden Gleichung

$$\begin{aligned} \frac{u_2}{V_p} - u_p &= B_p u_p'^2 \bar{u}_p' + 2(F_p + i f_p) u_p u_p' \bar{u}_p + \\ & (F_p - i f_p) u_p'^2 \bar{u}_p + (D_p + C_p) u_p u_p' \bar{u}_p' + \\ & (C_p + i c_p) u_p^2 \bar{u}_p' + (E_p + i e_p) u_p^2 \bar{u}_p \quad (3) \end{aligned}$$

den Auftreffpunkt u_2 der Elektronenbahn in der Endbildebene zu berechnen. Wegen der Krümmung der Elektronenbahnen im Projektivfeld vor Erreichen der Zwischenbildebene stimmen nämlich die aus (2) folgenden Koordinaten u_1, u_1' nicht mit u_p, u_p' überein. Nur in Projektivlinsen, die so schwach sind, daß ihr Zwischenbild praktisch bereits im feldfreien Raum liegt, ist es näherungsweise erlaubt, u_p und u_p' durch u_1 und u_1' zu ersetzen. Will man im Fall starker Projektivlinsen die Bildfehlereigenschaften des Projektivs in einer Weise kennzeichnen, die auch das Projektivfeld außerhalb der Zwischenbildebene berücksichtigt, so empfiehlt sich die Einführung des Begriffs der „asymptotischen Bildfehlerkoeffizienten“, die die Abhängigkeit von Lage und Richtung der Ausfallsasymptoten von Lage und Richtung der Einfallasymptoten kennzeichnen.

Es seien $s(z)$ und $t(z)$ zwei linear voneinander unabhängige Lösungen der achsenahen Bahngleichung (wir beschränken uns im folgenden auf magnetische Linsen, da für elektrostatische die Unterscheidung der asymptotischen Kenngrößen von den gewöhnlichen im allgemeinen nicht interessiert, weil sich die Brennebene außerhalb des eigentlichen Linsenfeldes befindet)

$$s'' + \beta^2 s = 0; \quad t'' + \beta^2 t = 0 \quad (4)$$

$$\text{mit} \quad \beta = \sqrt{\frac{e}{8 m_0 U^*}} B(z) = \frac{e B}{2 m v} \quad (5)$$

und $u(z) = x(z) + i y(z)$ die komplexe Koordinate im gedrehten Koordinatensystem, so hat die Bahngleichung dritter Ordnung

$$\begin{aligned}
 & u'' + \beta^2 u \\
 &= \left(\frac{3}{2} i \beta^2 \beta' - \beta^4 - \frac{1}{2} \beta \beta'' - \frac{i}{8} \beta'''' \right) u^2 u' \\
 &+ (-i \beta^3 - \beta \beta') u^2 u' \\
 &+ \left(2 \beta \beta' + 2i \beta^3 - \frac{i}{2} \beta'' \right) u u' u' \\
 &+ (i \beta' - 2 \beta^2) u u' u' \\
 &- \left(\beta^2 - \frac{i}{2} \beta' \right) u^2 u - i \beta u^2 u' \quad (6)
 \end{aligned}$$

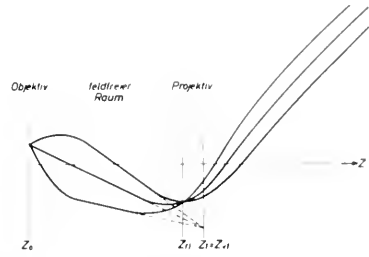


Abb. 2. Zur Veranschaulichung der Forderung, daß das virtuelle Zwischenbild in der asymptotischen Brennebene z_{v1} des Projektivs liegen soll. Dann entsteht das reelle Zwischenbild in der Ebene z_1 .

die allgemeine Lösung

$$\begin{aligned}
 u(z) &= A s(z) + B t(z) + \\
 &+ \int_{-\infty}^z \frac{s(z) t(\xi) - t(z) s(\xi)}{s'(\xi) t(\xi) - t'(\xi) s(\xi)} B_3(\xi) d\xi, \quad (7)
 \end{aligned}$$

wenn wir für die rechte Seite von (6) zur Abkürzung B_3 schreiben. Die Lösung (7) hat dieselbe Einfall asymptote wie die paraxiale Lösung $A s(z) + B t(z)$. Man macht daher nur einen Fehler von fünfter Ordnung in u , wenn man in dem Integral auf der rechten Seite von (7) in B_3 überall u durch $A s + B t$ ersetzt. A und B sind im allgemeinen Fall komplexe Größen.

Wir wollen für $s(z)$ und $t(z)$ speziell diejenigen Lösungen von (4) wählen, für die (vergl. Abb. 1)

$$\left. \begin{aligned}
 \lim_{z \rightarrow -\infty} s(z) &= 1; & \lim_{z \rightarrow -\infty} s'(z) &= 0; \\
 \lim_{z \rightarrow -\infty} t'(z) &= 1; & \lim_{z \rightarrow -\infty} t(z) &= 0
 \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

ist. Dann lautet die Definition der asymptotischen Brennweite v und der asymptotischen Brennpunkt-lagen z_{v1} und z_{v2} (der „asymptotischen paraxialen Kenngrößen“)

$$\left. \begin{aligned}
 \lim_{z \rightarrow +\infty} \left[s(z) - \frac{z - z_{v2}}{v} \right] &= 0; \\
 \lim_{z \rightarrow -\infty} [t(z) - (z - z_{v1})] &= 0;
 \end{aligned} \right\} \quad (9)$$

und es gilt

$$s't - t's = -1. \quad (10)$$

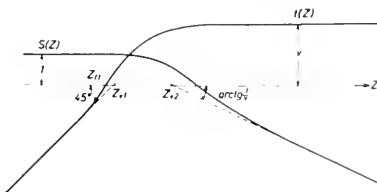


Abb. 1. Zur Festlegung der Lösungen $s(z)$ und $t(z)$ der paraxialen Bahngleichung und zur Definition der paraxialen asymptotischen Kenngrößen.

Bei dieser Wahl von s und t geben die beiden komplexen Zahlen A und B Durchstoßpunkt und Durchstoßrichtung der Einfall asymptoten durch die asymptotische Brennebene $z = z_{v1}$ des Projektivs an. Wenn man also (und das muß man tun, wenn man das reelle Bild des Objektes in die Brennebene des Projektivs bringen will) $z_1 = z_{v1}$ wählt, also die Ebene des virtuellen Zwischenbildes (d. h. des Bildes, das das Objektiv erzeugen würde, wenn das Projektiv ausgeschaltet wäre) mit der asymptotischen Brennebene des Projektivs zusammenfallen läßt (vergl. Abb. 2), ist

$$u_1 = A; \quad u_i = B. \quad (11)$$

Für die Ausfall asymptote, d. h. für große positive z gilt nach (7)

$$\begin{aligned}
 u(z) &= -A \frac{z - z_{v2}}{v} - B v \\
 &+ \frac{z - z_{v2}}{v} \int_{-\infty}^{+\infty} t(\xi) B_3(\xi) d\xi + v \int_{-\infty}^{+\infty} s(\xi) B_3(\xi) d\xi. \quad (12)
 \end{aligned}$$

Wir definieren die asymptotischen Bildfehlerkoeffizienten $B^*, C^*, c^* \dots$ durch

$$\begin{aligned}
 \lim_{z \rightarrow +\infty} u(z) &= A \frac{z - z_{v2}}{v} - B v \\
 &= B^* u_1'^2 u_1' + 2(F^* - i f^*) u_1 u_1' u_1' \\
 &= (F^* - i f^*) u_1 u_1'^2 + (D^* - C^*) u_1 u_1' + \\
 &+ (C^* - i c^*) u_1^2 u_1' + (E^* - i e^*) u_1^2 u_1. \quad (13)
 \end{aligned}$$

Der auf der linken Seite von (13) stehende Ausdruck ist die durch die Projektivvergrößerung dividierte Abweichung der Seidelschen Bahn von ihrer paraxialen Näherung in der weit vom Projektiv entfernten Endbildebene.

Man kann durch Vergleich von (12) und (13) unter Berücksichtigung von (6) in bekannter Weise Integralausdrücke für die asymptotischen Bildfehler-

koeffizienten gewinnen. Beispielsweise gilt für die asymptotische Verzeichnung

$$E^* = - \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\left(-\beta^4 + \frac{1}{2} \beta \beta'' \right) s^3 t + \beta \beta' s^2 s' t - \beta^2 s s'^2 t \right] dz, \quad (14)$$

$$e^* = - \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\left(\frac{3}{2} \beta^2 \beta' - \frac{1}{8} \beta'''' \right) s^3 t + \left(\beta^3 - \frac{1}{2} \beta \beta'' \right) s^2 s' t + \frac{1}{2} \beta' s s'^2 t + \beta s s'^3 t \right] dz \quad (15)$$

oder nach Vereinfachung durch einige partielle Integrationen

$$E^* = \frac{3}{8 v^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{4}{3} \beta^4 - \frac{1}{12} \beta \beta'' + \frac{5}{12} \beta'^2 \right) s^3 t dz, \quad (16)$$

$$e^* = \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\beta^3 + \frac{1}{8} \beta'' \right) s^2 dz. \quad (17)$$

Als Beispiel wollen wir für den Grenzfall hoher Vergrößerung die asymptotische Verzeichnung im Glaserschen Glockenfeld [5]

$$\left. \begin{aligned} B &= \frac{B_0}{1 + \left(\frac{z}{d}\right)^2}; \\ \text{d. h. } \beta &= \frac{k}{d} \frac{1}{1 + \left(\frac{z}{d}\right)^2} \quad \text{mit } k^2 = \left(\frac{e B_0 d}{2 m v}\right)^2 \end{aligned} \right\} \quad (18)$$

berechnen und mit der üblichen Verzeichnung im System ohne Blende vergleichen. Wir erhalten für die isotrope asymptotische Verzeichnung mit der Abkürzung $\omega = \sqrt{1 + k^2}$

$$d^2 E^* = - \frac{2 k^2 + 3}{4 \omega^2 (4 k^2 + 3)} + \frac{3}{2 (4 k^2 + 3)} \sin^2 \pi \omega + \frac{\pi k^2}{4 \omega} \cotg \pi \omega \quad (19)$$

und für die anisotrope asymptotische Verzeichnung

$$d^2 e^* = \frac{\pi k}{8 \omega^2} (2 k^2 + 1) - \frac{k^2 + 2}{16 k \omega^3} \sin 2 \pi \omega, \quad (20)$$

während die Berechnung der in (2) bzw. (3) eingehenden Verzeichnungskoeffizienten e , E im System ohne Blende

$$d^2 E = \frac{\pi k^2}{4 \omega^3} \left(1 + k^2 \sin^2 \left(\frac{\pi}{\omega} \right) \right) \cotg \frac{\pi}{\omega} + \frac{1}{24} \frac{4 k^2 - 3}{4 k^2 + 3} \cdot \left[6 + (6 k^2 - 3) \sin^2 \frac{\pi}{\omega} - k^2 \sin^4 \frac{\pi}{\omega} \right] + \frac{3}{8} \sin^2 \frac{\pi}{\omega} - \frac{5 k^2}{24} \sin^4 \frac{\pi}{\omega} \quad (21)$$

und

$$d^2 e = \frac{(2 k^2 + 1) \pi k}{8 \omega^3} \left(1 + k^2 \sin^2 \frac{\pi}{\omega} \right) - \frac{k^2 - 1}{4 k} \sin \frac{\pi}{\omega} \cos \frac{\pi}{\omega} - \frac{k \omega^2}{4} \sin^3 \frac{\pi}{\omega} \cos \frac{\pi}{\omega} \quad (22)$$

ergibt. In Abb. 3 sind zum Vergleich die asymptotischen Verzeichnungskoeffizienten zusammen mit den gewöhnlichen Verzeichnungskoeffizienten im System ohne Blende graphisch dargestellt.

Die experimentelle Bestimmung der Verzeichnungskoeffizienten geschieht meist durch Ausmessung der Aberration Δu_2 im elektronenoptischen Bild (vergl. Abb. 4; dort ist zur Vereinfachung der Zeichnung nur die radiale Komponente von $\Delta u_2 = \Delta r$ gezeichnet). Haben dabei die in die Projektivlinse einfallenden Elektronenbahnen achsenparallele Einfallsasymptoten, so gilt in unserer Bezeichnungsweise

$$\frac{\Delta r}{r} = E^* v^2 \alpha^2. \quad (23)$$

Wären dagegen die Elektronenbahnen beim Durchgang durch die Ebene des reellen Zwischenbildes (der Ebene $z = z_1$) achsenparallel, so würde

$$\frac{\Delta r}{r} = E f^2 \alpha^2. \quad (24)$$

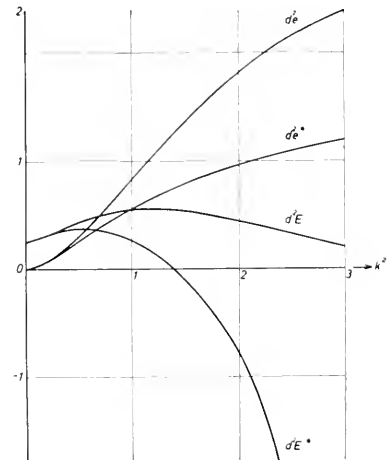


Abb. 3. Die asymptotischen und die üblichen Bildfehlerkoeffizienten der isotropen und anisotropen Verzeichnung für das Glasersche Glockenfeld.

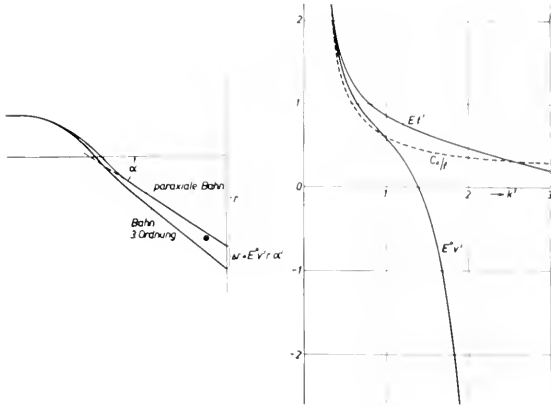


Abb. 4.

Abb. 5.

Abb. 4. Zur Veranschaulichung der Bedeutung des isotropen asymptotischen Verzeichnungskoeffizienten E^* .

Abb. 5. In dieser Abbildung wird veranschaulicht, in welchem Linsenstärkenbereich die Annäherung von E^*v^2 durch $C_{\bar{\beta}}/f$ brauchbar ist.

In Abb. 5 sind E^*v^2 , $E'f^2$ und die in der Literatur häufig näherungsweise anstelle von E^*v^2 verwandte Größe $C_{\bar{\beta}}/f$ für das Glasersche Glockenfeld als Funktion der Linsenstärke k^2 aufgetragen.

In der Literatur sind mehrfach [1, 2, 3, 6] Methoden zur experimentellen Bestimmung der Bildfehler durch Ausmessung verzerrter Schattenbilder beschrieben worden. Wenn das schattenwerfende Objekt im feldfreien Raum vor oder hinter der Linse liegt, mißt man dabei in Wirklichkeit nichts anderes als die asymptotischen Bildfehler. Am bekanntesten ist die Messung des „Öffnungsfehlers“ aus der Schattenbildverzeichnung. In Wirklichkeit wird dabei aber nicht der Öffnungsfehlerkoeffizient gemessen, sondern der Koeffizient der isotropen asymptotischen Verzeichnung. Da aber für schwache Linsen wegen

$$C_{\bar{\beta}} \approx E^*v^3 \approx E'f^3 \tag{28}$$

besteht, sind die entsprechenden Messungen nur mit einem relativ geringen Fehler behaftet und durchaus zur näherungsweise Bestimmung des Öffnungsfehlerkoeffizienten $C_{\bar{\beta}}$ geeignet, und zwar umso besser, je schwächer die Linse ist.

Die von Liebmann [7] durchgeführten numerischen Berechnungen der Verzeichnungskoeffizienten beziehen sich auf die asymptotische Verzeichnung. Es ist aus diesem Grund nicht verwunderlich, daß ihre Abhängigkeit von der Linsenstärke einen grundsätzlich anderen Verlauf hat als die, die sich aus den Glaserschen Bildfehlerintegralen ergeben würde. Die Abhängigkeit der von Liebmann berechneten Verzeichnungskoeffizienten von der Linsenstärke ist vielmehr von demselben Typus wie die Kurven für E^* und e^* in Abb. 3; d. h. E^* hat für $k^2 = 0$ einen positiven endlichen Wert, steigt mit zunehmender Linsenstärke zunächst etwas an, durchläuft bei etwa einem Sechstel der teleskopischen Linsenstärke ein Maximum, wechselt etwa bei der halben teleskopischen Linsenstärke sein Vorzeichen und geht mit Annäherung an die teleskopische Linsenstärke gegen $-\infty$.

Als Beispiel für das Zusammenwirken der Bildfehler zweier Linsen werde die isotrope Verzeichnung eines aus zwei Linsen bestehenden Systems berechnet. Durch Beschränkung auf die isotrope Verzeichnung wird aus (2) und (13)

$$u_1 = V_0 u_0 - V_0 E_0 u_0^2 u_0^-, \tag{29}$$

$$u_2 = V_p u_1 + V_p E^* u_1^2 u_1^-. \tag{30}$$

Setzt man u_1 aus (29) in (30) ein und vernachlässigt Glieder von höherer als 3. Ordnung in u_0 , so erhält man

$$u_2 = V_0 V_p u_0 + (V_0^2 E^* + E_0) V_0 V_p u_0^2 u_0^-. \tag{31}$$

Für hohe Objektivvergrößerungen ($|V_0| \gg 1$) wird in (31) das Glied, das die Objektivverzeichnung E_0 enthält, nur eine vernachlässigbar kleine Rolle spielen. Die Gesamtverzeichnung des Systems ist in diesem Fall also praktisch nur durch die asymptotische Verzeichnung des Projektivs bestimmt. Liegt dagegen in einem System aus mehreren Linsen vor dem letzten Projektiv noch eine oder mehrere Linsen geringer Vergrößerung, so ist auch deren Verzeichnung (wenn es sich um Projektivlinsen handelt, deren asymptotische Verzeichnung) zu berücksichtigen.

LITERATUR

1. VON ARDENNE, M., *Z. Physik* **117**, 602-611 (1941).
2. BOERSCH, H., *Z. tech. Phys.* **20**, 346-350 (1939).
3. DOSSI, J., *Z. Physik* **117**, 722-753 und **118**, 375-383 (1941).
4. GLASER, W., *Grundlagen der Elektronenoptik*, Springer-Verlag, Wien, 1952.
5. — *Z. Physik* **117**, 285-315 (1941).
6. HILSE, F., *Optik* **5**, 479-489 (1949).
7. LIEBMAN, G., *Proc. Phys. Soc. B* **65**, 94-108 (1952).
8. RUSKA, E., *Arch. Elektrotech.* **38**, 102-130 (1944).

$$C_{\bar{\beta}} \approx \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{4}{3} \beta^4 + \frac{5}{12} \beta'^2 - \frac{\beta \beta''}{12} \right) dz}{\left(\int_{-\infty}^{+\infty} \beta^2 dz \right)^4} \tag{25}$$

$$E^* \approx \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{4}{3} \beta^4 + \frac{5}{12} \beta'^2 - \frac{1}{12} \beta \beta'' \right) dz}{\int_{-\infty}^{+\infty} \beta^2 dz} \tag{26}$$

$$f \approx v \approx \frac{1}{\int_{-\infty}^{+\infty} \beta^2 dz} \tag{27}$$

der auch in Abb. 5 erkennbare Zusammenhang

Zur Errechnung elektronenoptischer Feldverteilungen mit geforderten Abbildungseigenschaften

K. W. J. PICTH

Institut für theoretische Physik der Päd. Hochschule, Potsdam-Griebnitzsee

In der Elektronenoptik ist es bisher im allgemeinen üblich, von einer gewählten Feldverteilung längs der Symmetrieachse auszugehen — z. B. von der sogenannten Glockenkurve — und für diese zunächst Brennweite und Lage der Hauptpunkte sowie dadurch gleichzeitig die Lage der Brennpunkte zu berechnen. Aus diesen Größen findet man auch sofort die für eine gewünschte Vergrößerung der Abbildung erforderliche Lage der Objekt- sowie der Bildebene. Anschließend lassen sich dann für diese Bildebene auch die Abbildungsfehler berechnen.

Wählt man die Feldverteilung längs der Achse — aus der sich ja die Feldverteilung im Raume berechnen läßt — so, daß ihre mathematische Darstellung noch einige zunächst in ihrer Größe nicht festgelegte Parameter enthält, so werden diese Parameter auch in den Ausdrücken für die Abbildungsfehler auftreten. Sie können dann gegebenenfalls nachträglich so gewählt werden, daß die oder doch einige der für den gedachten Anwendungszweck des elektronenoptischen Abbildungssystems besonders störenden Abbildungsfehler möglichst kleine Beträge annehmen.

Ob dies Verfahren bisher in der Literatur bereits vorgeschlagen oder praktisch tatsächlich benutzt wurde, entzieht sich meiner Kenntnis.

Auf der 6. Tagung der deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Münster im März 1955 hatte ich zur systematischen Errechnung der Feldverteilung von Abbildungsfeldern, die bestimmte Abbildungseigenschaften sowohl bez. der Vergrößerung und des Abstandes zwischen Objekt- und Bildebene als auch mit Bezug auf eine möglichst geringe Größe der bei dieser Abbildung auftretenden Abbildungsfehler besitzen, eine andere Berechnungsmethode vorgeschlagen, die in der Zeitschrift *Optik*, 12, 433, 1955 veröffentlicht wurde.

Bei dieser damals vorgeschlagenen Berechnungsmethode war ich ausgegangen von der 1932 von mir angegebenen¹ Form der Differentialgleichung paraxialer Elektronenstrahlen

$$P'' + \frac{3}{16} \left(\frac{\Phi'}{\Phi^-} \right)^2 P = 0$$

für elektrische Felder, bzw.

$$\hat{W}''' + \hat{W}'(z) \left[\frac{3}{16} \left(\frac{\Phi'(z)}{\Phi^-} \right)^2 + \frac{1}{\Phi^-} \frac{-e}{8m} \mathfrak{B}^2(z) \right] = 0$$

für magnetisch-elektrische Felder,

In diesen Gleichungen ist $-e$ (mit $e > 0$) = Ladung der Elektronen,

$$P(z) = Q(z) | \Phi^-(z) |^4$$

bzw.
$$\hat{W}(z) = \hat{w}(z) | \Phi^-(z) |^4$$

mit $\hat{w}(z) = Q(z) \cos \chi(z) + i Q(z) \sin \chi(z) = Q(z) e^{i\chi}$,

$$\chi = \varphi - \omega$$

$$\begin{aligned} \omega &= \omega_0 + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{-e}{2m}} \int_{z_0}^z \frac{f \mathfrak{B}(z)}{|\Phi^-(z)|} dz = \\ &= \frac{-e}{2m} \int f \mathfrak{B}(z) dt, \end{aligned}$$

[$d\omega/dt$ = Larmor-Präzession,]

$$\Phi^-(z) = \Phi(z) - U = \frac{1}{2} \frac{m}{-e} v^2,$$

$\Phi(z)$ = elektrische Potentialverteilung längs der z -Achse,

$f \mathfrak{B}(z)$ = magnetische Feldstärke \mathfrak{B} längs der z -Achse.

Q, φ, z = raumfeste Zylinderkoordinaten (der Bahn der Elektronen), deren z -Achse mit der Symmetrieachse des Feldes zusammenfällt,

q, χ, z = Bahnkoordinaten der Elektronen in einem sich um die z -Achse (Symmetrieachse des Feldes) mit der Larmor-Präzession drehenden Zylinderkoordinatensystem.

Die Methode der Berechnung bzw. Errechnung einer geeigneten Feldverteilung, die bei vorgegebenem Abstand zwischen Objektenebene und Bildebene und einer hierbei geforderten Vergrößerung einer Abbildung mit möglichst geringen Bildfehlern liefert, besteht darin, eine von mindestens einem, besser von mehreren Parametern p_i abhängende Kurve

$$1) \quad P = P(z) = P(z, p_1, p_2, \dots, p_n) = 0$$

als Bahnkurve der paraxialen Elektronenstrahlen so zu wählen, daß sie die z -Achse in zwei Punkten schneidet, deren Abstand dem Abstand zwischen

¹ J. Picht, *Ann. Physik* (5) 15, 926-964 (1932). J. Picht, *Einführung in die Theorie der Elektronenoptik* (E Th EO). Johann Ambr. Barth, 2. Auflage, 1957, § 14 u. § 20.

Objektpunkt ($z = z_g$) und Bildpunkt ($z = z_b$) entspricht, daß also

$$2) \quad \mathbf{P}(z_g) = 0 \quad \text{und} \quad \mathbf{P}(z_b) = 0$$

und daß sie die z -Achse in diesen Punkten so schneidet, daß

$$3) \quad \frac{\mathbf{P}'(z_g)}{\mathbf{P}'(z_b)} = \mathbf{B} \sqrt{\frac{\Phi_b^-}{\Phi_g^-}}$$

mit \mathbf{B} = laterale Vergrößerung.

Außer diesen drei Forderungen muß das zu wählende $\mathbf{P}(z)$ [bzw. $\hat{W}(z)$] noch folgende Bedingungen erfüllen:

$$4) \quad \frac{\mathbf{P}''(z)}{\mathbf{P}(z)} \leq 0 \quad \text{für} \quad z_g \leq z \leq z_b.$$

Aus Forderung 2) und Forderung 4) folgt, daß auch gelten muß:

$$4a) \quad \mathbf{P}''(z_g) = \mathbf{P}''(z_b) = 0 \quad \text{mit} \quad \lim_{\substack{z \rightarrow z_g \\ z \rightarrow z_b}} \frac{\mathbf{P}''(z)}{\mathbf{P}(z)} = C < 0$$

mit C = constans

5) Die mit diesem $\mathbf{P}(z)$ [bzw. $\hat{W}(z)$] berechnete Feldverteilung $\Phi(z)$ bzw. (oder: und) $\mathfrak{B}(z)$ muß praktisch — u. zw. möglichst einfach — realisierbar, also herstellbar sein.

Die vorgeschlagene Berechnungsmethode wurde inzwischen unter meiner Anleitung von einem meiner Schüler, meinem derzeitigen Assistenten Herrn Dipl.-Phys. Horst Hänsel, in einer als Doktor-Dissertation eingereichten Arbeit für ein Magnetfeld auf ein spezielles Beispiel angewandt, über das zunächst kurz berichtet sei.

Sind z_g und z_b wieder die längs der Symmetrieachse des Feldes gemessenen Koordinaten der (achsen-senk-rechten) Objekt- bzw. Bildebene, so wird in der Arbeit von Herrn Hänsel für den paraxialen Strahlverlauf zunächst angenommen, daß er mit Bezug auf ein sich mit der Larmor-Präzession um die Systemachse (z -Achse) drehendes Koordinatensystem darstellbar ist durch die drei folgenden, abschnittsweise geltenden Gleichungen

$$\hat{W}_1(z) = a(z - z_g) \quad \text{mit} \quad z_g \leq z \leq z_1 \quad \left(-a \frac{c}{b} z_g \right),$$

$$\hat{W}_2(z) = a z_1 + \frac{b}{c} z \sin \left(\frac{\tau}{c} (z - z_1) \right) \quad \text{mit} \quad z_1 \leq z \leq z_2 \quad (z_2 = z_1 + c),$$

$$\hat{W}_3(z) = -\frac{1}{\mathbf{B}} a(z - z_b) \quad \text{mit} \quad (z_1 + c) \leq z \leq z_b.$$

Die drei für die angegebenen Teilabschnitte zwischen $z = z_g$ und $z = z_b$ geltenden Bahnfunktionen gehen — wenn man die eingeklammerten $-$ -Zeichen als gültig annimmt und noch

$$z_1 = -a \frac{c}{b} z_g \quad \frac{2z_b - \tau \mathbf{B}}{a(3\mathbf{B} - 1)} = \frac{2}{1 - \mathbf{B}} z_g$$

$$\text{und} \quad c = \frac{2\tau}{a(\mathbf{B} - 1)}, \quad b = \tau \frac{\mathbf{B} - 1}{\mathbf{B} + 1},$$

ferner:

$$z_2 = (z_1 + c) = c \left(1 + \frac{a}{b} z_g \right) = \frac{2\tau}{a(\mathbf{B} - 1)} = \frac{2}{\mathbf{B} - 1} z_g$$

wählt, also

$$\hat{W}_2(z) = \frac{2z_b - \tau \cdot \mathbf{B}}{1 - 3 \cdot \mathbf{B}} \frac{\mathbf{B} - 1}{2a} z + \sin \left[\frac{a}{2} (\mathbf{B} - 1) (z - z_1) \right],$$

$$\hat{W}_3(z) = -\frac{1}{\mathbf{B}} a(z - z_b)$$

schreibt — an der Stelle $z = z_1$ bzw.

$$z = z_1 + c = z_2$$

stetig ineinander über, so daß $z = z_1$ und

$$z = z_1 + c = z_2$$

als „Nahtstellen“ der drei Teilkurven angesehen werden können.

Geometrisch besagt dies, daß der Strahlverlauf zwischen z_g und z_1 einerseits, zwischen z_2 und z_b andererseits als geradlinig angenommen wird, ($z_2 = z_1 + c$) also gewissermaßen die eigentliche „Feldlänge“ darstellt. Da dies bedeuten würde, daß das magnetische bzw. magnetisch-elektrische Feld an den Stellen $z = z_1$ und $z = z_2$ abbricht, dies aber in der Praxis nicht der Fall sein kann, mußte der Strahlverlauf und damit auch die Feldverteilung noch etwas modifiziert werden. Zu diesem Zwecke wurde der zunächst vorgegebene Strahlverlauf dahin geändert, daß die oben angegebenen Funktionen $\hat{W}_j(z)$ mit $j = 1$ bzw. 3 nicht bis z_1 (für $j = 1$) und auch nicht von $z_2 = z_1 + c$ ab (für $j = 3$) gelten, sondern nur bis zu (bzw. von) diesen benachbarten Werten (ϵ_1 , ϵ_2). Aus diesem Grunde sind oben bei Angabe der Gültigkeitsgrenzen der Teilfunktionen die Gleichheitszeichen bereits eingeklammert.

Bezeichnen wir die neue obere Grenze für $\hat{W}_1(z)$ durch $z_1 - \epsilon_1$, die neue untere Grenze für $\hat{W}_3(z)$ durch $z_2 + \epsilon_2$, so ist der gewählte paraxiale Strahlverlauf jetzt darstellbar durch

für $\Phi = e^{\pm 2p A | z |}$

die Funktion

$$\mathbf{P} = |z| \cdot \{ C_1 \cdot J_p (\pm 2p A |z|) + C_2 \cdot N_p (\pm 2p A |z|) \}$$

ist.

Geht man nun umgekehrt von dieser Bahngleichung $\mathbf{P} = \mathbf{P}(z)$ aus und modifiziert sie so, daß sie einem vorgegebenen Abstand $z_b - z_g$ zwischen (paraxialer) Bildebene und (paraxialer) Objektebene sowie einer gewünschten Vergrößerung \mathbf{B} angepaßt ist, so wird man — wie wir hier ohne Beweis mitteilen! — zu folgenden Gleichungen geführt:

$$J_p \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_g - c}{z_b - z_g}} \right) + C^* \cdot N_p \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_g - c}{z_b - z_g}} \right) = 0,$$

$$J_p \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_b - c}{z_b - z_g}} \right) + C^* \cdot N_p \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_b - c}{z_b - z_g}} \right) = 0,$$

$$J_{p-1} \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_g - c}{z_b - z_g}} \right) + C^* \cdot N_{p-1} \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_g - c}{z_b - z_g}} \right) = 0,$$

$$J_{p-1} \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_b - c}{z_b - z_g}} \right) + C^* \cdot N_{p-1} \left(\pm 2p A^* \sqrt{a \frac{z_b - c}{z_b - z_g}} \right) = 0.$$

$$\begin{aligned} & \cdot \sqrt{\left(\frac{z_b - c}{z_g - c} \right)^{p-1}} \\ & \cdot \exp \left[\pm \frac{2}{3} | 3 p A^* \left(\sqrt{a \frac{z_g - c}{z_b - z_g}} - \sqrt{a \frac{z_b - c}{z_b - z_g}} \right) \right] \\ & = \mathbf{B}_p^b. \end{aligned}$$

Diese Gleichungen enthalten die 7 (bzw. 8) Parameter

$$A^* | a \text{ (bzw. } a, A^*), C^*, p, c, z_g, (z_b - z_g) b, \mathbf{B}_p^b,$$

von denen die beiden letzten, nämlich $z_b - z_g$ und \mathbf{B}_p^b durch die Aufgabenstellung vorgegeben sind. 3 weitere Größen sind dann durch das Bestehen der 3 Gleichungen bestimmt, so daß noch 2(3) der Größen — z. B. a, c oder z_g, A^* oder c, C^* oder A^*, p, z_g usw. — frei wählbar sind und so bestimmt werden können, daß die Abbildungsfehler möglichst gering werden. Das zugehörige Feld, das die den Betrachtungen zugrundegelegte Elektronenbahn liefert, ist dann bestimmt

1. im rein elektrischen Fall durch

$$\Phi(z) = C \exp \left[\pm \frac{8}{3} | 3 A^* \sqrt{a \frac{z - c}{b}} \right] + \frac{m}{2e} \tau_0^2$$

2. im elektrisch-magnetischen Fall durch

$$\Phi(z) = \frac{m}{-2e} [(\tau(z))^2 - \tau_0^2]$$

$$\mathfrak{R}(z) = \sqrt{\frac{8m\Phi}{-e}} \left[\frac{\hat{W}''}{\hat{W}} - \frac{3}{16} \left(\frac{\Phi'}{\Phi} \right)^2 \right]$$

$$\text{mit } \frac{\hat{W}''}{\hat{W}} = \frac{\mathbf{P}''}{\mathbf{P}}$$

Setzt man speziell $p = 1$, also $p - 1 = 0$, so muß man, um für \mathbf{B}_p^b einen möglichst großen negativen Wert zu erhalten, für C^* einen möglichst kleinen (positiven) Wert wählen.

Lentilles électroniques magnétiques

Règles de leur construction et expressions universelles de leurs caractéristiques électro-optiques

P. DURANDEAU

Laboratoire d'Optique Electronique

La construction rationnelle des lentilles électroniques magnétiques demande la connaissance : (a) des règles qui découlent de l'étude de leur aimantation; (b) des expressions de leurs caractéristiques électro-optiques.

Circuit magnétique — forme de la topographie du champ. — Il est essentiel de rassembler les ampères-

tours d'excitation d'une lentille magnétique selon un champ presque uniquement localisé dans la région de l'entrefer : ce résultat n'est pas obtenu avec un circuit magnétique mal étudié (fig. 1). On aboutirait à cette concentration si la perméabilité magnétique était infinie mais, en pratique, il suffit que l'induction soit inférieure à 12.000 gauss.

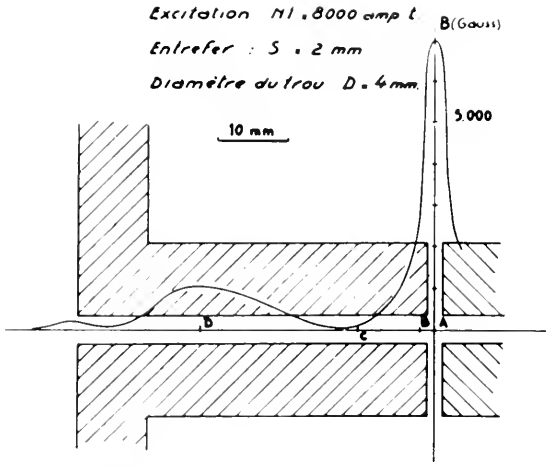


Fig. 1. Pour un circuit magnétique mal étudié un champ non négligeable existe dans le canal des pièces polaires. Ce champ doit être éliminé pour plusieurs raisons (2).

La forme à donner (fig. 2) au circuit magnétique (2) pour qu'il en soit ainsi, tient compte de la variation du flux le long des noyaux polaires, et du circuit (2, 11).

C'est l'induction dans le nez des pièces polaires qui conditionne ensuite l'étalement de la topographie du champ.

(a) Si l'excitation est inférieure à 1000 S ampères-tours (S, entrefer en millimètres) l'expérience montre (2) que, quel que soit le diamètre des pièces polaires, la topographie fournie par la lentille est celle qui correspond à une perméabilité magnétique infinie (fig. 3), cas pour lequel le calcul est aisé (1, 6, 7, 9).

Dans ce cas la topographie du champ est assimilable à celle que donnerait un solénoïde de même longueur S que l'entrefer (3) de rayon égal aux deux tiers du canal et évidemment de même excitation que la lentille (fig. 4).

La valeur du champ maximum est alors :

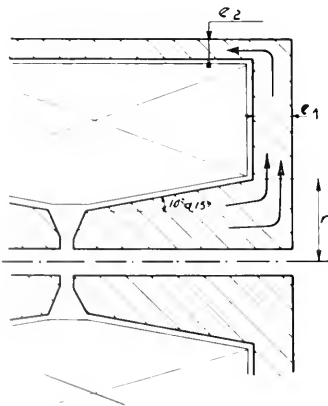


Fig. 2. Forme du circuit magnétique qui permet d'obtenir le rassemblement des ampères-tours d'excitation de la lentille comme si la perméabilité du fer était infinie : (a) forme tronconique des noyaux polaires : angle de 10 à 15°. (b) Epaisseur e_1 au moins égale à $r/2$. (c) Epaisseur e_2 telle que l'aire de la section de l'enveloppe extérieure soit du moins égale à $7r^2$.

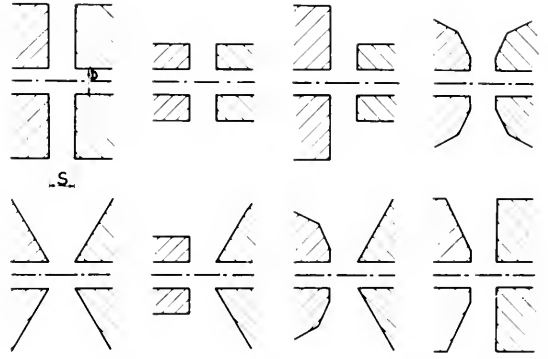


Fig. 3. Ces pièces polaires percées d'un canal de même diamètre D et espacées d'un même entrefer S donnent même topographie pour une même excitation inférieure à 1000 S ampère-tours (S, en millimètres). Cette topographie est celle qui correspond à une perméabilité magnétique infinie.

$$B_M = \frac{4\pi NI}{\sqrt{S^2 + 0,45D^2}}$$

Le principal intérêt de cette assimilation est de faire apparaître un paramètre géométrique caractéristique de la lentille :

$$L = \sqrt{S^2 + 0,45 D^2}$$

L'expression de la topographie qui résulte de cette assimilation est généralisable à une lentille dissymétrique (fig. 5).

(b) Si l'excitation est supérieure à 1000 S tout se passe comme si S et D étaient multipliés (fig. 6) par le facteur :

$$1 + m \frac{NI - 1000 S}{1000 S}$$

m est un coefficient numérique qui dépend de la forme des faces polaires. Il est minimum et proche

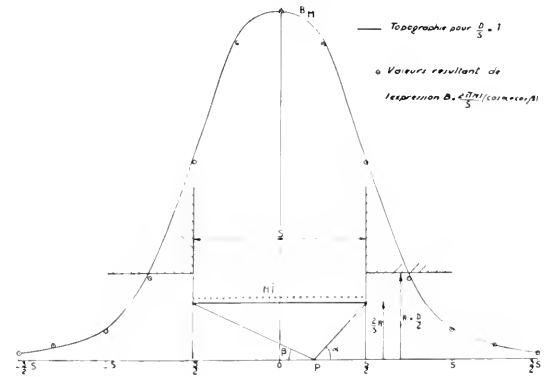


Fig. 4. Pour une perméabilité infinie et en pratique pour une excitation inférieure à 1000 S ampères-tours, la topographie obtenue est assimilable à celle d'un solénoïde de longueur S, de diamètre $\frac{2}{3} D$ et d'excitation NI. En tout point de l'axe l'induction a pour expression

$$B = \frac{2,7 NI}{S} (\cos \alpha + \cos \beta)$$

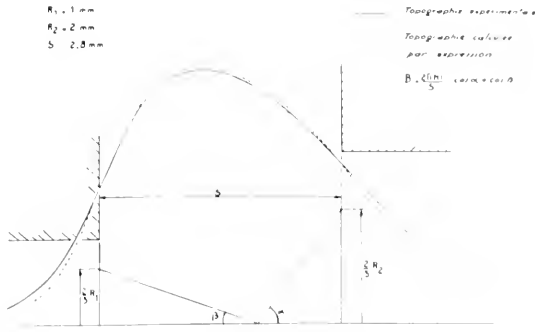


Fig. 5. Généralisation à une lentille dissymétrique de l'expression de la topographie qui résulte de l'assimilation de la lentille symétrique à un solénoïde. Le paramètre caractéristique est :

$$| S^2 \pm 0,45 D_1 \cdot D_2.$$

de 0,15 dans les conditions données par la figure 7 (2).

(c) La figure 7 donne également la condition que doit satisfaire la distance à partir de laquelle il est possible d'élargir le canal percé dans les pièces polaires, sans affecter la forme de la topographie (2).

Expressions universelles des caractéristiques électro-optiques.—Les caractéristiques électro-optiques des lentilles ont été calculées par différents auteurs (7, 8, 9). Les résultats de ces calculs sont donnés par des faisceaux de courbes assez mal commodes à consulter, aussi a-t-on cherché une représentation unique d'utilisation aisée (10). Dans cet ordre d'idées nous avons proposé des expressions universelles utilisant la notion de lentilles dans des états d'excitation correspondants (3, 4).

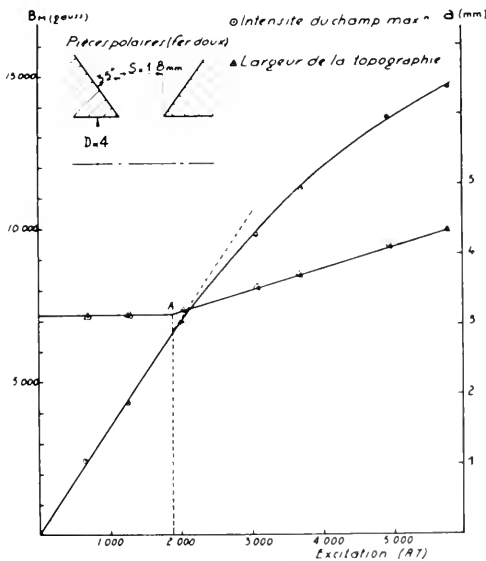


Fig. 6. Pour les excitations inférieures à 1000 S ampères-tours l'étalement de la topographie est invariable. Pour les excitations supérieures à 1000 S il varie linéairement en fonction de l'excitation.

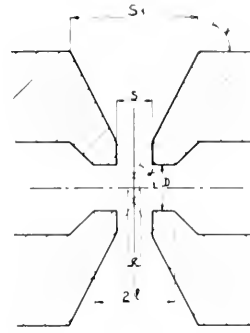


Fig. 7. Pour $NI = 1000 S$ la topographie est de largeur minimum si :

- (a) α compris entre 55° et 65°
- (b) e proche de $D/4$,
- (c) $S_1 = NI/500$.

Par ailleurs si $NI = 1000 S$ il faut

$$2l \cdot | S^2 + D^2;$$

si $NI = 1000 S$ il faut

$$2l \cdot | S^2 + D^2 \left[1 + m \frac{NI - 1000 S}{1000 S} \right].$$

Ces expressions sont fournies par le cas type du champ uniforme limité à l'intervalle entre deux plans (fig. 8).

Soit NI_0 l'excitation pour laquelle la lentille utilisée en projecteur fournit la longueur focale minimum f_m . Les caractéristiques électro-optiques principales ont alors les expressions suivantes, NI étant l'excitation de la lentille.

(1°) f_1 , longueur focale de la lentille utilisée en projecteur

$$\frac{f_1}{f_m} = \frac{NI \sin 2,03}{NI_0 \sin 2,03} \quad \frac{NI}{NI_0} \quad 2,03 \text{ radians} = 116^\circ$$

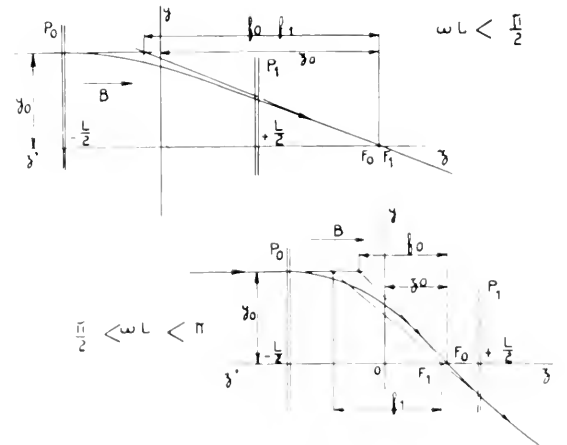


Fig. 8. Trajectoire d'un électron dans un champ uniforme B limité à l'intervalle entre les plans P_0 et P_1 .

$$\omega = \sqrt{\frac{e B^2}{8 m_0 I^*}}$$

(2°) f_0 , longueur focale de la lentille utilisée en objectif ;

(a) si $NI < 0,77 NI_0$,

$$\frac{f_0}{f_m} = \frac{f_1}{f_m} = \frac{\sin 2,03}{\frac{NI}{NI_0} \sin 2,03 \frac{NI}{NI_0}};$$

(b) si $NI > 0,77 NI_0$,

$$\frac{f_0}{f_m} = \frac{\sin 2,03}{\frac{NI}{NI_0}}.$$

(3°) z_0 , distance du foyer F_0 au plan median :

(a) si $NI < 0,77 NI_0$,

$$\frac{z_0}{f_m} = \frac{1}{0,55} \left(\frac{1}{2} - \cotg 2,03 \frac{NI}{NI_0} \right);$$

(b) si $NI > 0,77 NI_0$,

$$\frac{z_0}{f_m} = \frac{1}{0,55} \left(\frac{\pi}{2} - \frac{1}{2,03 \frac{NI}{NI_0}} - \frac{1}{2} \right).$$

(4°) C_c , coefficient d'aberration chromatique

(a) si $NI < 0,77 NI_0$,

$$C_c = \frac{1}{2} f_0 \left(\frac{2,03 \frac{NI}{NI_0}}{\sin 2,03 \frac{NI}{NI_0}} - \cos 2,03 \frac{NI}{NI_0} \right);$$

(b) si $NI > 0,77 NI_0$,

$$C_c = 0,785 f_0.$$

Pour le champ uniforme limité à l'intervalle entre deux plans :

$$NI_0 = 10,0 | V^* \text{ et } f_m = 0,55 L.$$

Ces expressions sont valables avec une approximation inférieure à 5% dans tous les cas, à condition de donner à NI_0 et à f_m les valeurs qui correspondent à la topographie fournie par la lentille donnée.

Dans les cas usuels ($0,5 < D/S < 2$) on a :

$$NI_0 = 13,5 | V^* \quad f_m = 0,5 | S^2 + 0,45 D^2.$$

La figure 9 donne, pour ces cas usuels, la valeur des rapports des caractéristiques électro-optiques au paramètre $| S^2 + 0,45 D^2$. Pour la commodité pratique il est préférable d'utiliser ce paramètre plutôt que f_m .

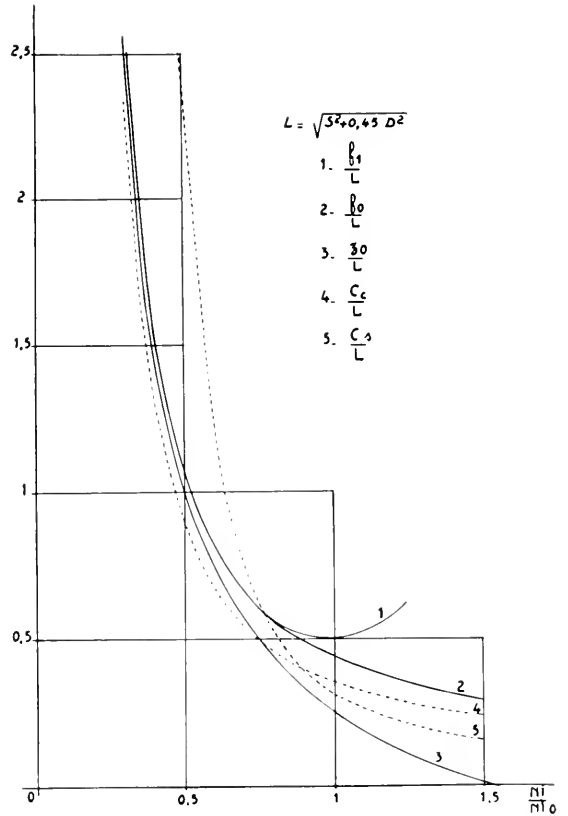


Fig. 9. Variations du rapport des caractéristiques électro-optiques fondamentales au paramètre de la lentille pour les cas usuels ($0,5 < D/S < 2$).

La courbe de variation du coefficient d'aberration de sphéricité C_s est celle qui résulte de la réduction de la valeur de ce rapport calculé pour les cas usuels et non la valeur donnée pour le cas type du champ uniforme (5).

En introduisant dans les expressions ci-dessus, le facteur d'élargissement $1 + m [(NI - 1000 S)/1000 S]$ faisant intervenir le degré de saturation des faces polaires on montre que la longueur focale f_1 est minimum pour un entrefer S calculable en fonction de D et de m (5).

Conclusion. — Le problème de la construction des lentilles électroniques magnétiques semble ainsi résolu dans ses lignes essentielles pour toutes les tensions d'accélération.

BIBLIOGRAPHIE

1. DURAND, E., *Ann. phys.* 12^e série, **10**, Nov. Déc. 1954.
2. DURANDEAU, P., *J. phys. radium* 1956, 17, 18 A.
3. — *ibid.* 1956, 17, 33 S.
4. — *Compt. rend. acad. sci.* **242**, 1710 (1956).
5. — Thèse à paraître.
6. HESSE, M. B., *Proc. Phys. Soc. B* **63**, 386 (1950).
7. LENZ, F., *Z. angew. Phys.* **2**, 448 (1950).
8. — *Optik* **7**, 243 (1950).
9. LIEBMAN, G., *Proc. Phys. Soc. B* **68**, 737 (1955).
10. LIEBMAN, G. and GRAD, E. M., *Proc. Phys. Soc. B* **64**, 956 (1951).
11. MULVEY, T., *Proc. Phys. Soc. B* **64**, 441 (1953).

III

ELECTRON-SPECIMEN INTERACTION

Über die Entstehung des Kontrastes im elektronenmikroskopischen Bild

B. v. BORRIES † UND F. LENZ

*Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf, und Institut für
Elektronenoptik und Feinmechanik der Technischen Hochschule Aachen*

Zusammenfassung.—Es wird über neuere Fortschritte in den Vorstellungen über die elektronenmikroskopische Bildentstehung berichtet. Die innerhalb und am Rande genau und ungenau fokussierter Bilder amorpher oder kristalliner Körper auftretenden Kontraste lassen sich unter einheitlichen Gesichtspunkten als Folge von kohärenter und inkohärenter Streuung der Elektronen an den Objektatomen betrachten. Der Zusammenhang zwischen der kohärenten Streuung, dem inneren Potential der Körper, das auch in relativ einheitlichen Objekten örtlich beträchtlichen Schwankungen unterworfen sein kann, und dem Phasenkontrast wird erörtert. Beispiele für reinen Phasenkontrast, reinen Amplitudenkontrast und gemischten Kontrast werden gezeigt und diskutiert.

(Der endgültige Text dieses Vortrages, der als Übersichtsvortrag auf der Ersten Europäischen Konferenz der Elektronenmikroskopie in Stockholm, September 1956 gehalten wurde, wurde nach dem Tode von Herrn Prof. v. Borries formuliert. Über den Inhalt und seine Darstellungsweise haben jedoch noch zu Lebzeiten von Herrn Prof. v. Borries viele ausführliche Diskussionen zwischen den beiden Verfassern stattgefunden.)

Mein verehrter Lehrer Bodo von Borries hat sich während seines wissenschaftlichen Lebens immer wieder mit den Fragen der Bildentstehung und des Kontrastes beschäftigt. In der Tat ist es nötig, daß der Anwender des Elektronenmikroskops richtige Vorstellungen von der Bildentstehung hat, damit er die erhaltenen Elektronenbilder richtig deuten und die vielfältigen technischen Mittel zur Verbesserung des Auflösungsvermögens und des Kontrastes richtig anwenden kann. Nun sind aber die Anwender des Elektronenmikroskops nicht immer Physiker und fast nie theoretische Physiker. Man wird von ihnen daher nicht erwarten dürfen, daß sie die Theorie der Bildentstehung in der Form verwerten, wie sie die theoretischen Physiker liefern. Hier hat von Borries, der selbst ja auch seiner Ausbildung nach kein Physiker, sondern Elektrotechniker war, immer wieder nach Wegen gesucht, das Verständnis der Bildentstehung in anschaulicher Weise frei von komplizierten Berechnungen dem Anwender zugänglich zu machen. In den zahlreichen Unterhaltungen, die wir wenige Wochen vor seinem Tode über Form und Inhalt des von ihm für die Stockholmer Tagung angekündigten Übersichtsvortrags hatten, hat er immer wieder den Standpunkt vertreten, daß es vor allem auf eine anschauliche, aber dennoch in ihren wesentlichen Zügen richtige, auch für die Nichtphysiker unter den Anwendern verständliche Darstellung unserer heutigen Vorstellungen von der Bildentstehung ankomme.

Eine solche Darstellung folgt wohl am besten der historischen Entwicklung dieser Vorstellungen, die

von der Analogie zur Lichtoptik ihren Ausgang nahmen. In der Lichtmikroskopie geht die Theorie der Bildentstehung eines nicht selbst leuchtenden Objektes folgendermaßen vor: Aus den als bekannt vorausgesetzten Eigenschaften des Beleuchtungssystems folgt die Intensitäts- und spektrale Verteilung des auf das Objekt auffallenden Lichtes. Kennt man ferner die Verteilung des Absorptionskoeffizienten und des Brechungsindex im Objekt, so kann die durch das Objekt bewirkte Modifikation des bestrahlenden Lichtes berechnet werden. Man kann nun das aus dem Objekt austretende Licht auf seinem weiteren Wege durch Linsen, Blenden und andere optische Elemente bis zur Bildebene hin rechnerisch verfolgen und erhält so die Verteilung der Helligkeit im Bild als Funktion der Objekteigenschaften, d. h. also die Antwort auf die Frage der Bildentstehung.

Handelt es sich dabei um die genau fokussierte Abbildung eines durchstrahlten Objektes, werden nicht allzuleine Blenden verwandt und sind die Objekteinheiten hinreichend groß gegen die Wellenlänge des abbildenden Lichtes, so ist in der Lichtmikroskopie die Helligkeitsverteilung im Bild im wesentlichen durch die Verteilung des Absorptionskoeffizienten im Objekt bestimmt. Die Untersuchungen der Kontrastentstehung im elektronenmikroskopischen Bild begannen daher konsequenterweise mit einer Abschätzung der Elektronenabsorption im Objekt. Über die Absorption, d. h. die Verringerung der Elektronenzahl beim Durchgang durch das Objekt lagen aber schon in der Frühzeit der Elektronenmikroskopie experimentelle Ergebnisse vor [12], denen zufolge die Absorption bei der Kontrastentstehung nur eine ganz untergeordnete Rolle spielen konnte. Zu einer besseren Deutung der Kontrastentstehung kommt man dagegen, wenn man annimmt [15], daß ein Teil der Strahlelektronen durch Streuung an den Objektatomen in so große Winkel abgelenkt wird, daß sie „keinen Beitrag zur Helligkeit des Bildpunktes“ mehr leisten, sei es, weil sie hinter eine Kontrastblende fallen, sei es, weil sie wegen der Bildfehler der Objektivlinse den durch die ungestreuten Elektronen gezeichneten Bildpunkt verfehlen. Auf Grund dieser Vorstellungen läßt sich eine anschauliche Deutung des Bildkontrastes aufbauen [4], die weitgehend mit dem Begriff des auf Bahnen bewegten geladenen Massenpunktes auskommt und zur Kontrastbestimmung lediglich nach den Gesetzen der klassischen Mechanik berechnen muß, wie groß die mittlere Anzahl geladener Mas-

senpunkte ist, die auf ein Flächenelement der Bildebene (Leuchtschirm oder Photoplatte) in einem Zeitelement auftreffen.

Dieses erste Stadium der Theorie bedurfte der weniger anschaulichen Wellenmechanik nur zur Berechnung der Streu-Wechselwirkung zwischen Strahlelektronen und Objektatomen [5]. Es kann aber für die genau fokussierte Abbildung eines durchstrahlten Objektes, dessen Objekteinheiten groß gegen das Auflösungsvermögen sind, eine brauchbare Beschreibung der Kontrastverhältnisse geben. An Stelle des Absorptionskoeffizienten der Lichtoptik, der bei Verwendung des Bildes des bewegten Massenpunktes als der Kehrwert der mittleren freien Weglänge eines „Lichtpartikels“ aufgefaßt werden kann, tritt hier ein „Streuabsorptionskoeffizient“. Er ist in weitgehender Analogie zur Lichtoptik der Kehrwert der mittleren freien Weglänge („Aufhellungsdicke“) eines Elektrons im Objekt zwischen zwei Streuakten. Man kann im Rahmen dieses Bildes etwa sagen, daß für die Elektronenstromdichte j in einem Bildpunkt

$$j = j_0 e^{-N\sigma x} \quad (1)$$

gilt, wenn j_0 die Bild-Stromdichte bei Abwesenheit des Objektes (also etwa in einem Folienloch), x die Objektstärke, N die Atomzahldichte im Objekt und

$$\sigma(\theta_{\text{eff}}) = \int_{\theta_{\text{eff}}}^{\pi} \frac{d\sigma}{d\Omega} 2\pi \sin \vartheta d\vartheta \quad (2)$$

der Wirkungsquerschnitt eines Objektatoms für Streuung in Winkel größer als die „effektive Apertur“ θ_{eff} ist, d. h. der Wirkungsquerschnitt für Streuakte, nach denen das gestreute Elektron nicht mehr zur Bildhelligkeit beitragen kann. Nach v. Borries (5) kann man für $\sigma(\theta_{\text{eff}})$ näherungsweise den elastischen Gesamtquerschnitt

$$\sigma_{\text{el}}(0) = \int_0^{\pi} \frac{d\sigma_{\text{el}}}{d\Omega} 2\pi \sin \vartheta d\vartheta \quad (3)$$

setzen. Der exponentielle Abfall der Bildstromdichte mit der Schichtdicke wurde von mehreren Autoren experimentell nachgewiesen [7, 8, 10, 14]. Die von Hall [7] an verschiedenen Objektsubstanzen durchgeführten Kontrastmessungen ergeben, daß die Streuquerschnitte der Objektatome in guter Näherung proportional ihrer Ordnungszahl Z sind, und zwar erhält er für eine Strahlspannung von 65 kV

$$\sigma = 0,14 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2 \cdot Z. \quad (4)$$

Nach theoretischen Berechnungen auf Grund des Atommodells von Thomas und Fermi müßte σ proportional zu $Z^{1/2}$ zunehmen. Legt man dagegen für die Elektronendichteverteilung in den Objektatomen die genaueren Berechnungen von Hartree zugrunde [13], so ergibt sich auch ein ungefähr pro-

portionales Ansteigen von σ mit Z . Da die Atomzahldichte N dem Verhältnis aus Dichte γ der Objektsubstanz und Atomgewicht A direkt proportional ist, folgt, daß der Streuabsorptionskoeffizient $N\sigma$ proportional zu $\gamma Z/A$ ist. Die „Aufhellungsdicke“ $\gamma/N\sigma$, d. h. diejenige Massendicke, innerhalb deren ein Strahlelektron im Mittel einmal gestreut wird, wird damit proportional zu A/Z , d. h. sie hängt von der Ordnungszahl kaum ab. In anderen Worten: Die Abhängigkeit des Kontrastes durch Streuabsorption von der Massendicke des Objektes und der Strahlspannung ist für alle Objektsubstanzen praktisch die gleiche.

Die geometrisch-anschauliche nur die Streuabsorption berücksichtigende Theorie versagt,

- wenn das Bild nicht scharf fokussiert ist,
- wenn der Kontrast von Objekteinheiten untersucht werden soll, deren Abmessungen von der Größenordnung $\lambda/\theta_{\text{eff}}$ oder kleiner sind,
- im Bild der nahen Umgebung von Objektorten, in denen die relative Massendicke $N\sigma x$ stark variiert,
- bei der Abbildung von Einkristallen.

In diesen Fällen ist es notwendig, die Modifikation des Elektronenstrahls durch das Objekt als Beugungserscheinung aufzufassen und die von den verschiedenen Objektbereichen herkommenden Anteile der gebeugten Elektronenwelle unter Berücksichtigung ihrer Phase zu superponieren. Auf diese Weise ist es gelungen, die zuerst von Boersch [2] im Elektronenmikroskop aufgenommenen Fresnelschen Beugungserscheinungen an Kanten qualitativ und quantitativ richtig zu deuten [2, 9] und Abschätzungen über den Kontrast im defokussierten Bild einzelner Atome durchzuführen [16], der erheblich höher sein kann als im scharf fokussierten Bild. Über die Möglichkeit, Atome im Elektronenmikroskop abzubilden, sind eine Reihe von Untersuchungen angestellt worden. So kommt beispielsweise Boersch [3] am Modell eines phasenschiebenden kreisförmigen Schirms von atomaren Abmessungen zu dem Ergebnis, daß unter der Voraussetzung einer weiteren Verbesserung des Auflösungsvermögens eine Sichtbarmachung von einzelnen Atomen nicht zu hoher Ordnungszahl nicht an unzureichenden Kontrast zu scheitern braucht. Eine Erschwerung der Abbildung von Einzelatomen liegt aber auch darin [1, 3], daß die zur Abbildung benutzte Elektronenzahl so groß sein muß, daß der durch die statistischen Schwankungen der Elektronenzahl verursachte Kontrast in den Bildpunkten des Endbildes kleiner als der eigentliche Bildkontrast infolge Beugung am Atom sein muß. Diese wegen der Kleinhaltung statistischer Helligkeitsschwankungen im Bild zu fordernde „Abbildungsdosis“ darf nicht größer sein als die „Platzwechseldosis“, d. h. nicht größer als diejenige Zahl von Elektronen, die ausreicht, um das Atom

durch Impulsübertragung von seinem ursprünglichen Platz zu entfernen.

Die Auffassung der Strahlmodifikation durch das Objekt als Beugungserscheinung hat es ferner ermöglicht, die verschiedenartigen Erscheinungen im elektronenmikroskopischen Bild von Einkristallen (Streifen gleicher Neigung, Streifen gleicher Dicke etc.) in befriedigender Weise zu deuten.

Eine Darstellung der Bildentstehungstheorie, die sowohl die Erscheinung des Phasenkontrastes als auch die Kontrastentstehung infolge Streuabsorption in eleganter und zwangsloser Weise aus der Streuung an den einzelnen Objektatomen ableitet und sowohl auf amorphe wie auch auf kristalline Objekte angewandt werden kann, wurde von R. Uyeda [18] gegeben. In dessen vereinheitlichter Theorie enthält der mathematische Ausdruck für die vom Objekt ausgehende Streuwelle mehrere Glieder: die (elastische und unelastische Streuung enthaltenden) „inkohärenten“ Glieder, die im wesentlichen mit dem übereinstimmen, was sich durch additive Überlagerung der Streuquerschnitte der Einzelatome nach der anfänglich geschilderten geometrischen Streuabsorptionstheorie ergeben hätte.

Zusätzlich tritt aber ein „kohärentes“ Glied auf, das formal im wesentlichen mit dem übereinstimmt, was sich bei Beugung der Elektronenwelle an einem Körper von der Form des Objekts ergeben hätte, dessen inneres Potential den Wert

$$U_0 = \frac{Ne}{6\epsilon_0} \Theta \quad (5)$$

besitzt. Hierbei ist N die Atomzahldichte, und

$$\Theta = \int_0^\infty \varrho(r) 4\pi r^2 dr \quad (6)$$

kennzeichnet eine durch die Elektronendichteverteilung $\varrho(r)$ in den Objektatomen gegebene Eigenschaft, die auch bei der Berechnung der Streuabsorptionskoeffizienten eine wichtige Rolle spielt [13].



Abb. 1. „Streu sternchen“ nach Scheffels als Beispiel für Kontrast, der durch Schwankungen der Stromdichte im Objekt verursacht wird.

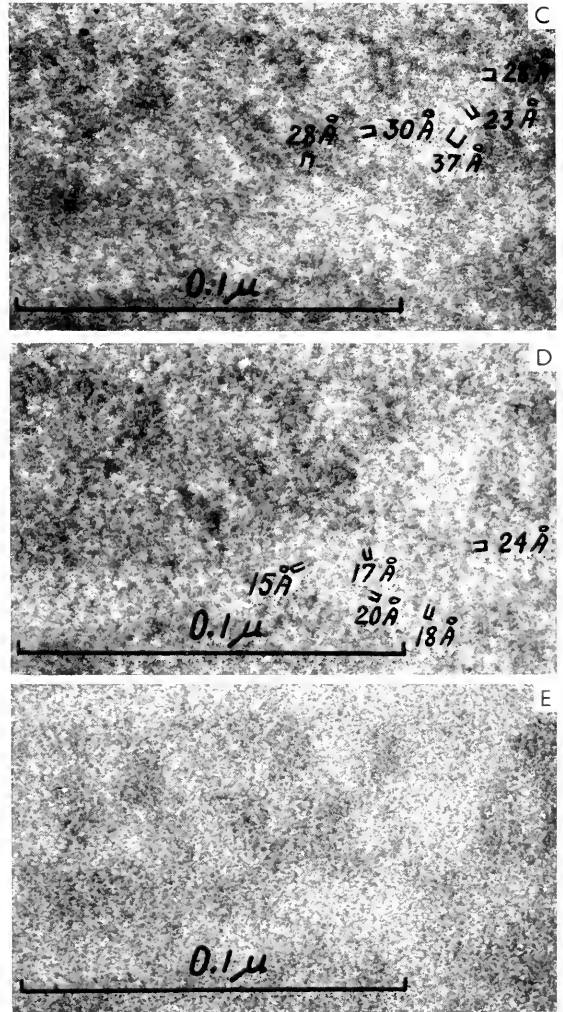


Abb. 2. Phasenkontrast durch Defokussierung nach Sjöstrand, welcher dieses Bild freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Man kann sich also die Bildentstehung ganz analog zu der des Lichtmikroskops unter weitgehender Verwendung der in der Lichtoptik verwandten Begriffe vorstellen. Anstelle des Absorptionskoeffizienten der Lichtoptik tritt in der Elektronenoptik der Streuabsorptionskoeffizient, und anstelle des Brechungsindex tritt das mittlere Potential im Objekt, welches nach (5) von der Elektronendichteverteilung in den Objektatomen und der Atomzahldichte im Objekt abhängt. Daß dieses mittlere innere Potential über die Elektronendichteverteilung auch von der Stromdichte abhängt, mit der der abbildende Strahl das Objekt durchsetzt, sieht man an den Schattenbildern von „Streu sternchen“ (vergl. den Vortrag von W. Scheffels). Diese „Streu sternchen“ sind ein interessantes neues Beispiel für Abbildungen, bei denen gleichzeitig der Phasenkontrast und der Streuabsorptionskontrast eine Rolle spielt (Abb. 1).

Nun soll noch ein Beispiel für reinen Phasenkontrast und seine Deutung gebracht werden. Es ist

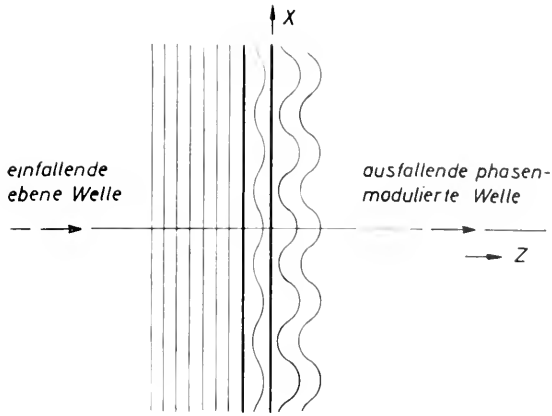


Abb. 3. Phasenmodulation der abbildenden Elektronenwelle infolge von Potentialschwankungen im Objekt.

Ihnen bekannt, daß die meisten Objekte bei optimaler Fokussierung merklich weniger Kontrast liefern als bei schwacher Defokussierung. Beispielsweise zeigt eine leere Objektfolie von gleichmassiger Dicke, die bei guter Fokussierung so gut wie gar keinen Kontrast liefert, im defokussierten Bild eine deutliche Körnung. Sjöstrand [17] hat kürzlich seine Beobachtung mitgeteilt, daß diese Granulation mit zunehmender Defokussierung immer grobkörniger wird (Abb. 2). Diesen Effekt kann man verstehen, wenn man annimmt, daß das innere Potential in der Objektfolie kleinen örtlichen Schwankungen unterworfen ist, sei es infolge von Schwankungen der Atomzahl-dichte, sei es infolge von Schwankungen der Konzentration chemischer Verunreinigungen oder aus noch anderen Gründen. Solche Schwankungen des inneren Potentials und damit des Brechungsindex bewirken eine Phasenmodulation der auf das Objekt auftreffenden Elektronenwelle (Abb. 3). Unter der vereinfachenden Annahme, daß die örtlichen Schwankungen des Brechungsindex nur von einer Koordinate abhängen und eine sinusförmige Modulation bewirken (jede andere Verteilung des Brechungsindex läßt sich nach dem Fouriertheorem in Komponenten dieser Art zerlegen und dann in entsprechender Weise behandeln, bietet also nichts grundsätzlich anderes), kann die Elektronenstromdichte in einer beliebigen Ebene hinter dem Objekt berechnet werden. Die Rechnung ergibt, daß es eine von der Wellenlänge λ der Potentialschwankungen abhängige Ebene maximalen Kontrastes (Abb. 4)

$$z = \frac{\Lambda^2}{2\lambda} \quad (7)$$

gibt, wenn λ die Elektronenwellenlänge ist. Je nach dem Grade der Defokussierung z werden also aus den im Objekt vorhandenen Potentialschwankungen jeweils gerade die zu deutlichem Phasenkontrast führen, für die die Beziehung (7) erfüllt ist. In anderen Worten: Die mittlere Korngrößen und -abstände Λ im granulierten Bild nehmen mit der Wurzel aus

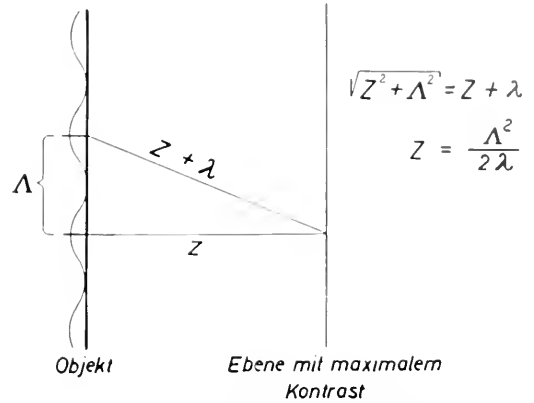


Abb. 4. Anschauliche Ableitung des Zusammenhangs (7) zwischen Defokussierung z und Granulation Λ des defokussierten Bildes.

der Defokussierung z zu. Bei Sjöstrand [17] sind leider keine Zahlenwerte für die Stärke der Defokussierung angegeben. Ähnliche Bilder bei Leisegang [11], die bei einer Defokussierung von $z = 0,4 \mu$ bei 80 kV ($\lambda = 0,042 \text{ \AA}$) aufgenommen sind, zeigen eine Granulation mit einer Korngröße von etwa 20 \AA . Setzt man in (7) die Werte für z und λ ein, so erhält man $\Lambda = 18 \text{ \AA}$. Eigene Experimente, in denen nachgeprüft werden sollte, ob der durch (7) gegebene funktionelle Zusammenhang zwischen z und Λ bestätigt wird, sind leider infolge der durch den plötzlichen Tod von Herrn Professor von Borries verursachten Schwierigkeiten nicht mehr durchgeführt worden.

Man kann Gleichung (7) auch noch anders interpretieren: Wenn man mit seinem Elektronenmikroskop ein Auflösungsvermögen von beispielsweise 20 \AA nachweisen will, tut man gut daran, um $0,4 \mu$ zu defokussieren. Dann werden nämlich gerade Objekteinheiten, die Strukturen einer Periode von 20 \AA enthalten, infolge Phasenkontrast besonders hervorgehoben. Voraussetzung für die Sichtbarmachung ist natürlich, daß das Objektiv des Mikroskops auch wirklich ein entsprechendes Auflösungsvermögen besitzt. In der Ebene maximalen Kontrastes ergeben sich die relativen Stromdichteschwankungen zu

$$\frac{\Delta j}{j} = \frac{4\pi l}{\lambda} \frac{\Delta U_0}{U} \quad (8)$$

wenn l die Dicke des Objektes, λ die Elektronenwellenlänge, U die Strahlspannung und ΔU_0 die Schwankungsamplitude des inneren Potentials ist.

Nach diesen Beispielen für die Modifikation des Strahls durch das Objekt, die sich in jedem Fall durch die kohärenten und inkohärenten Glieder in der Streuformel von Uyeda ausdrücken läßt, wollen wir nun noch darauf eingehen, wie die Objektivlinse die in dem derart modifizierten Elektronenstrahl enthaltene Information verwertet.

Glaser [6] hat eine wellenmechanische Theorie der

elektronenmikroskopischen Abbildung entwickelt, welche im Prinzip zu berechnen gestattet, wie sich die vom Objekt ausgehenden Elektronenwellen durch das Feld der Linse und im Bildraum ausbreiten. Diese Theorie geht insofern über die ältere Theorie von Scherzer [16] hinaus, als sie auch den Fall starker Linsen zu behandeln gestattet, bei dem das Objekt im Feld liegt und der elektronenoptische Brechungsindex eine stetige Funktion des Ortes ist. Für das qualitative Verständnis des Abbildungsvorgangs genügt es aber auch, den einfacheren Gedankengängen von Scherzer zu folgen: Die Elektronenwellenfunktion in der Bildebene ergibt sich einfach, indem man die von der hinteren Brennebene des Objektivs herkommenden Wellen nach dem Huygensschen Prinzip nach Amplitude und Phase überlagert. Da die vereinfachende Scherzersche Theorie den Bildraum zwischen der hinteren Brennebene und der Bildebene als feldfrei ansieht, bietet diese Überlagerung keine schwierigen mathematischen Probleme. Die für diese Überlagerung erforderliche Kenntnis der Wellenfunktion in der hinteren Brennebene ergibt sich aus der Tatsache, daß in der hinteren Brennebene, im Korpuskelbild gesprochen, alle Elektronen fokussiert werden, die das Objekt in gleicher Richtung verlassen. Sie folgt daher direkt aus der Winkelverteilung der vom Objekt herkommenden Streuwelle.

Wir fassen zusammen: Im elektronenmikroskopischen Bild wird der Kontrast im Innern von Objektbereichen, die groß gegen das Auflösungsvermögen sind, praktisch allein durch die Streuabsorption d. h. die „inkohärenten“ Glieder der Theorie von Uyeda verursacht. Objekteinheiten, die von der Größenordnung des Auflösungsvermögens oder kleiner sind, zeigen dagegen ebenso wie die nahe Umgebung der

Randgebiete zwischen zwei Objektbereichen mit verschiedenen physikalischen Eigenschaften typische Interferenzkontraste, die nur durch Mitberücksichtigung der „kohärenten“ Glieder erklärt werden können. Solche Interferenzkontraste können im defokussierten Bild erheblich stärker als im fokussierten sein. Für jede Fourierkomponente der im Objekt vorliegenden räumlichen Verteilung des Brechungsindex gibt es einen bestimmten Betrag der Defokussierung, der zu maximalem Kontrast führt.

LITERATUR

1. BIBERMAN, L. M., *Izvest. Akad. Nauk SSSR* **15**, 429–433 (1951).
2. BOERSCH, H., *Phys. Z.* **44**, 202–211 (1943).
3. — Proceedings of the NBS Semicentennial Symposium on Electron Physics. Washington, 1951 (erschienen 1954).
4. VON BORRIES, B. und RUSKA, E., *Z. tech. Phys.* **19**, 402–407 (1938).
5. VON BORRIES, B., *Z. Naturforsch.* **4a**, 51–70 (1949).
6. GLASER, W., *Optik* **11**, 101–117 (1954).
7. HALL, C. E., *J. Appl. Phys.* **22**, 655–662 (1951).
8. HILLIER, J. und ELLIS, S. G., *Comptes Rendus du Premier Congrès International de Microscopie Electronique*. Paris, 1950 (erschienen 1953).
9. HILLIER, J. und RAMBERG, E. G., *J. Appl. Phys.* **18**, 48–71 (1947).
10. ITO, K., *Denshikembikyō (Electron Microscopy)* **3**, 224–228 (1954).
11. LEISEGANG, S., in: *Handbuch der Physik* **33**, 396–545 (1956).
12. LENARD, P., *Quantitatives über Kathodenstrahlen aller Geschwindigkeiten*. Heidelberg, 1925.
13. LENZ, F., *Z. Naturforsch.* **9a**, 185–204 (1954).
14. LIPPERT, W., *Optik* **11**, 412–421 (1954).
15. RUSKA, E., *Z. Physik* **87**, 580–602 (1934).
16. SCHERZER, O., *J. Appl. Phys.* **20**, 20–29 (1949).
17. SJÖSTRAND, F. S., *Science Tools* **2**, 25–31 (1955).
18. UYEDA, R., *J. Phys. Soc. Japan* **10**, 256–264 (1955).

The Differential Scattering Cross Section of Atoms at Small Angles

M. E. HAINE and A. W. AGAR

IN a paper read at the British Group Conference at Reading in July by Haine [6], a wave-optical derivation of phase and amplitude contrast due to coherent scattering was described. In addition, the contrast due to incoherent scattering was explained. The latter arises from the coherently scattered wave from the “gap” left in the wavefront by the electrons suffering energy loss which is partly nullified by the focused patch due to the latter electrons. For small objects, the electrons suffering energy loss are defocused to such an extent that they contribute only negligibly to the contrast.

Table I shows the results of these calculations. The four components of contrast, as derived by Haine, are tabulated as a function of atomic number for two values of instrumental resolving power for

single atoms. For multiple atom objects, these figures should be multiplied by the number of atoms in each resolution area. For objects large compared with the resolution, the values so calculated refer approximately to the edge contrast to be expected. The amplitude contrast is that contrast arising from coherent scatter, which would be obtained with an instrument in focus. The phase contrast is that which would be obtained if an ideal phase plate were used, though Haine shows that 50 % of this should be obtainable by defocusing the normal instrument through only half the depth of focus. Because the phase contrast is so large compared with the amplitude contrast, the latter becomes relatively unimportant since a very small departure of focus from Gaussian will cause it to be swamped.

TABLE I. Contrast due to various scattering phenomena.

$$\phi_0 = 100 \text{ kV}$$

Based on Lenz's scattering formulae

Z	C_A %	C_{ph} %	C_{in} %	C'_{in} %
<i>Microscope resolution 10 Å</i>				
4	0.005	0.3	0.25	0.001
16	0.02	0.3	0.25	0.001
64	0.09	0.3	0.25	0.001
<i>Microscope resolution 3 Å</i>				
4	0.038	3	2.6	0.1
16	0.22	3	2.8	0.1
64	0.94	3	2.9	0.1

The contrast labelled C_{in} is that arising from the coherent wave produced as a result of the loss of the inelastically scattered electrons from the coherent illuminating wavefront. It will be seen that this is comparable with the phase contrast, and therefore contributes to a very important extent to the microscope contrast. The last figure C'_{in} represents the annulling effect of the electrons which have suffered energy loss. Even with a mean energy loss of 10 kV, as assumed by Haine, these are spread by the chromatic aberration over so large an area as to make their effect negligible.

These calculations are based on wave-optical calculations which require for their solution knowledge of the scattering cross sections of the atoms. Haine has used for this the data of Massey and Bullard, and also the more recent modifications introduced by Lenz [7]. The contrast figures here given are based on Lenz's data. It appears desirable to consolidate the situation by some more extensive experimental data on scattering, particularly at small angles. We should like to have more explicit experimental checks on the elastic and inelastic differential cross sections, as well as the velocity loss distribution. It is also desirable to check just how close the differential cross sections, as deduced from experiments on thin films, agree with the single atom calculations, as this would indicate the extent to which coupling between atomic fields in a lattice affect the scattering.

Elastic cross sections at small angles are not at all easy to measure because the inelastic scattering is so predominant. There have been no reliable theoretical predictions on energy loss, so that only experimental data can here be used.

The present experiments are restricted to measurements on the total scattering cross section, which, for small angles, differs little from the inelastic differential cross section. For angles relevant to the electron microscope, a simple analytic expression can be derived for the inelastic cross section from

Lenz's theoretical results. After applying one or two fully justifiable approximations, this expression is:-

$$I_0 = 8.8 \cdot 10^{-15} q_0 \theta^2, \quad (1)$$

where $e q_0$ is the electron energy in electron volts, and θ the scatter angle. It will be noted that the cross section is independent of atomic number.

In the present experiments, the angular scatter measurements were made directly in the electron microscope. The arrangement was even simpler than that of Biberman *et al.* [2], who had to remove the projector polepieces and certain screens. The microscope was unmodified, except that the objective was worked at long focal length (1 cm), and a small screening aperture immediately above the object was employed. The condenser lenses were switched off, so that a relatively low beam intensity was employed. This reduced the contamination rate of the specimen, and facilitated the timing of the exposures. The angular scattering distribution of the electrons after passing through the film under test was reproduced in the back focal plane of the objective lens. The projector lenses were used to project an enlarged image of this distribution onto the photographic plate.

The photographic plates used (Ilford Thin Film Half Tone) were known to have a linear density current density response over the range 0.2 to 1.0 blackening density, from the work of Digby, Firth and Hercock [4]. A series of exposures (covering the range 1-60 sec) enabled the whole scatter pattern to be recorded at densities falling between these limits. The incident electron intensity was found by allowing the beam to pass through a hole in the specimen, and by photographing the patch of illumination at a known instrumental magnification. It was then unnecessary to know the characteristics of the photographic material, as the scattered intensity could be related directly to the incident intensity in terms of the blackening density on the photographic plate. The scatter patterns were analysed with a microphotometer.

In order to minimise the effect of contamination, a small screening aperture was placed immediately above the object, thus restricting the illumination to the area under observation. It was thus possible to search for a clean and undamaged portion of film without building up a layer of contamination on the specimen. The area of film from which the scatter was recorded was defined by an intermediate aperture of known size corresponding to an area of 5 sq. micron at the object.

The first experiments were carried out with thin carbon films of known thickness [1]. By measuring the scatter intensity before and after a timed exposure to the electron beam, it was possible to calibrate the contamination rate under the conditions under which the film was being examined. This was found to agree very well with the figures given by Ennos

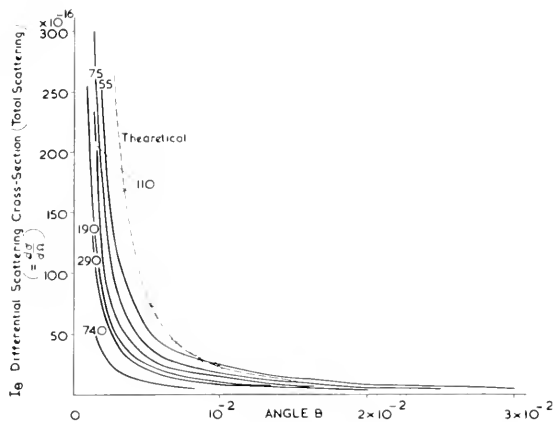


Fig. 1. Differential scattering cross section for carbon films of differing thickness.

[5] and amounted to about 3 Å min. Thus, except for the thinnest films, the scatter pattern could be recorded before the film thickness had changed appreciably.

The angular distribution of scattered intensity as obtained from the blackening of the photographic plates was converted into the differential scattering cross section by dividing by the number of atoms per sq. cm of the scattering film, i.e. assuming single scattering conditions, which are the basis of the scattering theory.

The additional scatter due to a thicker film should be exactly balanced by the dividing factor which includes the film thickness provided that the scattering mechanism remains unchanged.

A series of carbon films of different thickness were analysed in this way, and the calculated differential scattering cross-section plotted in figure 1. The dotted curve shows the theoretical curve, based on Lenz's expressions for elastic and inelastic scatter, the approximate expression (1) being used for calculation of the inelastic cross section. It will be seen that, while the results agree within a factor of 2 with the theoretically predicted ones, the curves do not lie on top of one another, but show a definite gradation with the film thickness employed. The difference between the curves is too great to be ascribed to faulty measurement of film thickness or incorrect contamination rate (the results for the thinner films have been corrected for the measured contamination rate).

The "reference thickness" or "transparency thickness" defined by von Borries as the thickness of film in which every incident electron is, on the average, scattered once elastically, is about 450 Å for carbon. It might be expected that carbon films thinner than this would give similar results for scattering cross section. Since they do not, it suggests that, at each thickness, there is a rather higher proportion of electrons scattered outside the effective aperture than is allowed for in the theory.

Since the inelastic cross section was expected to be

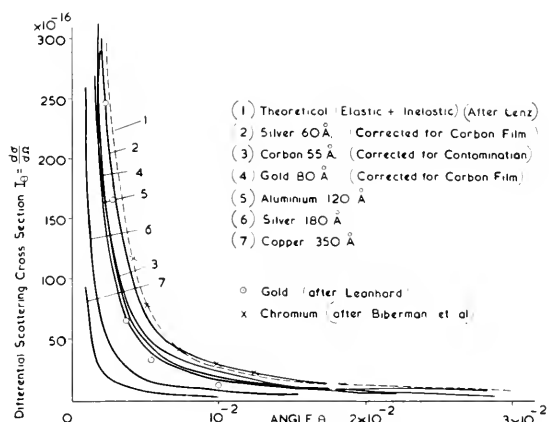


Fig. 2. Differential scattering cross sections for different materials.

independent of atomic number, the experiment was repeated with films of aluminium, copper, silver and gold. The results are shown in Figure 2. The theoretical curve is shown dotted—it is calculated with the addition of the elastic scattering cross section due to silver; this only affects the curve significantly at angles greater than 10^{-2} .

In the region of the curve where the inelastic scatter is predominant, it will be noted that similar values of scattering cross section are obtained for carbon, aluminium, silver and gold films. Thick, unsupported films of copper and silver gave much lower results, but, in each case, the film thickness considerably exceeded the transparency thickness. The very thin films of silver and gold had to be supported on thin carbon films, and the curves shown have been corrected to allow for the extra scattering due to the carbon films.

The results obtained by Biberman *et al.* [2] and by Leonhard [8] are shown by a number of points. It will be seen that the present results are in good agreement with them.

The measurements support the theory of Lenz giving good agreement in magnitude and distribution and showing the scattering to be largely independent of atomic number in the angular range 10^{-3} – 10^{-2} . The marked dependence of cross section on film thickness in the case of carbon is not explained. The results suggest that the single atom scattering theory and results can be applied to lattices of atoms.

REFERENCES

1. AGAR, A. W., (in press).
2. BIBERMAN, L. M. *et al.*, *Dokl. Akad. Nauk* **69** (4), 519 (1949).
3. VON BORRIES, B., *Z. Naturforsch.* **4a**, 51 (1949).
4. DIGBY, N., FIRTH, K., and HERCOCK, R., *J. Phot. Sci.* **1**, 194 (1953).
5. ENNOS, A. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **4**, 101 (1953).
6. HAINE, M. E., (in press).
7. LENZ, F., *Z. Naturforsch.* **9a** (2), 185 (1954).
8. LEONHARD, F., *Z. Naturforsch.* **9a** (12), 1019 (1954).

Experimentelle Untersuchung der Streuung von 70-kV-Elektronen an Kohlenstoff in kleinste Winkel

G. KEMPF und F. LENZ

*Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie und
Institut für Elektronenoptik und Feinmechanik an der Technischen Hochschule Aachen*

ÜBER die Streuung von Elektronen an Atomen und amorphen Körpern (Gase, Flüssigkeiten oder amorphe Festkörper) sind bereits viele experimentelle und theoretische Untersuchungen angestellt worden. Da die Öffnung eines Elektronenstrahls genügend hoher Intensität mit einfachen Hilfsmitteln nicht wesentlich kleiner als etwa ein Grad gemacht werden kann, liegen bei den meisten Experimenten die kleinsten gemessenen Streuwinkel bei einigen Graden. Die Mehrzahl der theoretischen Arbeiten [1, 3, 4] ist ebenfalls nur für Streuwinkel von mindestens der genannten Größenordnung zuverlässig, da die Autoren für die Dichteverteilung der Atomelektronen das Thomas-Fermi-Modell benutzten, das sich für die Berechnung der Röntgenstreuung sehr gut bewährt hat und auch bei der Elektronenstreuung für nicht zu kleine Streuwinkel mit dem Experiment gut übereinstimmende Ergebnisse liefert. Für sehr kleine Streuwinkel ($\approx 10^{-1}$) versagt das Thomas-Fermi-Modell deshalb, weil es die Elektronendichteverteilung in großem Kernabstand, die für die Streuung in sehr kleine Winkel maßgebend ist, nicht richtig wiedergibt. Bei diesem Atommodell geht die Elektronendichte wie r^{-6} gegen Null, während in Wirklichkeit für große Kernabstände ein exponentieller Abfall der Elektronendichte vorliegt. Bei der Berechnung der Wirkungsquerschnitte für die Kleinwinkel-Streuung von Röntgenstrahlen an Atomen kommt es dagegen auf die genaue Kenntnis der Elektronendichteverteilung im Atom weniger an.

Für die Elektronenmikroskopie, bei der die Strahlöffnung wegen der Bildfehler der Elektronenlinsen nicht größer als einige 10^{-2} sein darf, interessieren gerade die sehr kleinen Streuwinkel. Der Strahlerzeuger eines Elektronenmikroskops muß also Strahlen sehr kleiner Apertur erzeugen können. Wegen dieser Eigenschaft seines Strahlerzeugers ist das Elektronenmikroskop für die experimentelle Untersuchung der Kleinstwinkelstreuung besonders geeignet.

Bisher ist uns erst eine experimentelle Arbeit über die Winkelverteilung der Kleinstwinkelstreuung von Elektronen bekannt geworden [2]. Die Autoren benutzten als Streusubstanz eine Chromfolie und variierten die Strahlspannung zwischen 20 und 80 kV. Lenz [7] hat eine theoretische Streuformel abgeleitet, die besonders auf die richtige Wiedergabe der Streuquerschnitte für kleinste Streuwinkel ($\approx 10^{-1}$) Wert legt. Dabei wird als Näherung für die Elektronen-

dichteverteilung das Wentzelsche Atommodell verwendet, bei dem die Elektronendichte im Gegensatz zum Thomas-Fermi-Modell in großem Kernabstand exponentiell abfällt. Die erhaltenen Streuformeln sind mathematisch einfacher und stimmen in dem interessierenden Bereich kleinster Winkel besser mit den Experimenten von Bibermann und Mitarbeitern überein [2] als die früheren auf dem Thomas-Fermi-Modell basierenden Theorien. In der vorliegenden Arbeit wird die Winkelverteilung bei der Streuung von 70-kV-Elektronen an dünnen Kohlenstoff-Folien in Winkel zwischen 10^{-1} und 10^{-1} und ihre Abhängigkeit von der Dicke der Streufolie experimentell untersucht und mit der Theorie von Lenz [7] verglichen.

Herstellung der Streufolien.—Die meisten übermikroskopischen Objekte sind organische Substanzen, die nach einer gewissen Bestrahlungszeit im Elektronenmikroskop in Kohlenstoff umgewandelt werden. Darum ist die Streuung an Kohlenstoff von besonderem Interesse. Kohlenstoff-Folien neigen auch nicht so sehr wie Metallfolien zur Kristallbildung und lassen sich auf verschiedene Arten herstellen, z. B. außer durch Bedampfung auch durch Beglimmen oder durch Reduktion von Folien aus organischen Substanzen. Das letztere Verfahren wurde hier angewandt. Als Ausgangssubstanz wurde Kollodium benutzt. Kollodium hat die Eigenschaft, auch in sehr dünnen Schichten bis hinab zu etwa 100 Å mechanisch widerstandsfähig zu sein. Aus diesem Grund wird es als Trägerfolie für elektronenmikroskopische Präparate verwandt.

Die Herstellung der Folien geschah auf die in der übermikroskopischen Präparationstechnik übliche Weise.

Das Elektronenbeugungsdiagramm zeigte nur sehr schwache Debye-Scherrer-Ringe, so daß die Streuverteilung an den Stellen ohne Beugungsringe als ungestört betrachtet werden konnte.

Bei Bestrahlung mit Elektronen werden die Nicht-Kohlenstoff-Atomgruppen des Kollodiums abgespalten und es bleibt in der Folie nur Kohlenstoff übrig, was von König [6] auf Grund des Beugungsdiagramms nachgewiesen und von Broekes [5] durch Wägung und Ultrarot-Absorptionsmessung quantitativ untersucht worden ist. Da während des Abdampfens der verschiedenen Atomgruppen die Anzahl der Streuzentren kleiner wird, ändert sich auch die Streuverteilung und man kann daraus auf die Zeit, die das Kollodium zu seiner Umwandlung in Kohlenstoff braucht, schließen. Es zeigte sich an

den Streuaufnahmen, die nach verschiedenen Bestrahlungszeiten mit derselben Folie gemacht wurden, daß sich die Streukurven nach 4 Minuten Bestrahlung mit derselben Intensität, mit der auch die Aufnahmen gemacht wurden (1 bis einige $\mu\text{A cm}^{-2}$), bei einer Folie von etwa 1600 \AA Dicke nicht mehr änderten (Abb. 12 und 13). Bei einer 140 \AA dicken Folie war überhaupt keine Änderung nachzuweisen (Abb. 11). Die Folien, deren Streukurven ausgewertet werden sollten, wurden vor der Aufnahme solange bestrahlt, daß ihre Umwandlung in Kohlenstoff mit Sicherheit beendet war.

Messung der Foliendicke.—Die Dicke der Kolloidumfolien wurde nach dem Verfahren der Vielfachinterferenzen nach Tolansky [8] bestimmt. Die Meßanordnung war die gleiche, wie sie von Weber und v. Fragstein [9] beschrieben worden ist. Als Beobachtungsmikroskop wurde ein „Ortholux“ der Firma Leitz benutzt.

Für die Streuung maßgebend ist nicht die nach dem Tolansky-Verfahren allein meßbare geometrische Dicke der Kolloidumfolien, sondern die Massendicke (die Massendicke ist als Produkt aus Dichte und Dicke definiert, hat also die Dimension g cm^{-2}) der Kohlenstoff-Folien, die nach der Bestrahlung mit Elektronen aus dem Kolloidium entstehen. Das verwendete Kolloidium bestand wahrscheinlich aus einem Gemisch von $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{ONO}_2)_2\text{OH}]_n$ (Kolloidium) und $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{ONO}_2)_3]_n$ (Schießbaumwolle), enthält also nach den chemischen Formeln zwischen 24 % und 28 % Kohlenstoff. Nimmt man für das Kolloidium eine Dichte von 1,3 bis 1,4 g cm^{-3} an, so würde nach der Bestrahlung, unter der Annahme einer dabei unverändert gebliebenen Objektdicke, die Objektdichte etwa

$$\rho_C = 0,35 \text{ g cm}^{-3} \quad (1)$$

betragen. Diese Größe, mit der gemessenen Dicke multipliziert, ergibt die gesuchte Massendicke des Kohlenstoffs.

Die Strahlapparatur.—Als Strahlapparatur wurde ein Siemens-Elektronenmikroskop für maximal 100 kV Strahlspannung, Baujahr 1939 bis 1943, verwendet. Die Folien konnten somit vor und nach der Streuaufnahme im selben Gerät, einfach durch Einschalten der Magnetlinsen, betrachtet und auf Fehler, d. h. auf Löcher und ungleichmäßige Dicke, untersucht werden, sodaß die Gewähr gegeben war, daß nur die Aufnahmen fehlerfreier Folien zur Auswertung kamen. Die Öffnung des Primärstrahls konnte in weiten Grenzen durch Veränderung der Brechkraft der Kondensorlinse geregelt werden. Durch Einschalten der Projektivlinse (Abb. 1) konnte die bereits in der Zwischenbildebene registrierbare Streuverteilung in die Aufnahmeebene vergrößert werden, was eine bequeme Auswertung auch für sehr kleine Streuwinkel erlaubte. Die Projektivvergrößerung konnte durch Auswechseln der Polschuhe mittels eines von außen zu bedienenden Polschuhre-

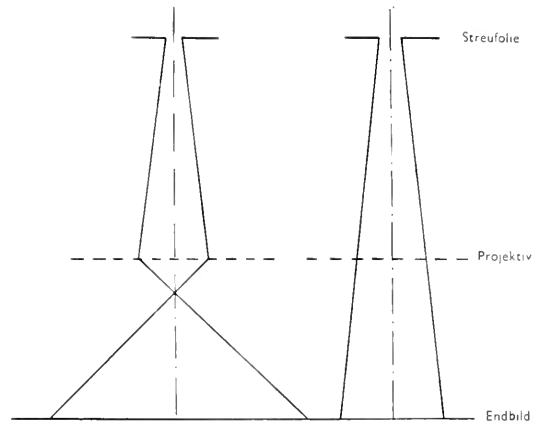


Abb. 1: Aufnahme der Streuverteilung bei ein- und ausgeschaltetem Projektiv.

volvers in weiten Grenzen geregelt werden. Das Gerät besitzt weiterhin eine Kamera für 12 Platten $6 \times 9 \text{ cm}$, die während des Betriebes ohne Zerstörung des Vakuums im Gerät gewechselt werden konnten. Die Strahlspannung konnte in vier Stufen eingestellt werden, die für 40, 60, 80 und 100 kV vorgesehen waren. Messungen der Spannung der 60-kV-Stufe mit einem Röhrevoltmeter einerseits und durch Aufnahme eines Debye-Scherrer-Diagramms einer Eichsubstanz (Thalliumchlorid) andererseits ergaben eine wirkliche Spannung von etwa 70 kV. Diese Spannung wurde bei allen Streuaufnahmen benutzt, da sie in der Nähe der in der Elektronenmikroskopie am meisten benutzten Spannungen von 60 und 80 kV liegt.

Zur Messung der Konstanz des Strahlstroms wurde der Strahl in einem Faraday-Käfig aufgefangen und über einen Verstärker einem Galvanometer zugeleitet. Nach einer Zeit von etwa 10 Minuten nach dem Einschalten blieb die Schwankung des Stroms unter $\pm 6 \%$, wobei die durchschnittliche Periode der Schwankung einige Minuten betrug. Durch Aus- und Wiedereinschalten der Kathodenheizung änderte sich jedoch der Strahlstrom in nicht reproduzierbarer Weise. Auch während des Brennens der Kathode traten, jedoch relativ selten, plötzliche Stromänderungen durch Überschläge im Mikroskop auf.

Bei kleinen Vergrößerungen mit dem schwächsten Projektivpolschuh war eine deutliche Verzeichnung zu erkennen, d. h. die Vergrößerung war vom Achsenabstand in der Zwischenbildebene abhängig. Zur Ausmessung der Verzeichnung wurde ein Drahtnetz mit etwa 3 Maschen pro Millimeter in die Zwischenbildebene noch außerhalb des Projektivfeldes gebracht und das Objektiv und Projektiv eingeschaltet. Die Netzmaschenabstände auf den Aufnahmen mit verschiedenen Projektivvergrößerungen wurden ausgemessen und mit den wirklichen Abständen verglichen. Dabei zeigte sich, daß schon bei der geringsten bei den Streuaufnahmen benutzten Projek-

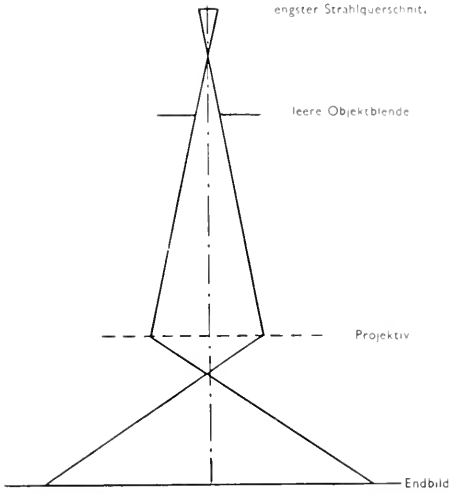


Abb. 2: Strahlengang zur Aufnahme der Primärstrahlapertur.

tivvergrößerung die Verzeichnung so gering war, daß sie vernachlässigt werden konnte.

Die Träger für die Streufolien waren übermikroskopische Objektblenden. Um die wirksame Strahlapertur und auch die Quelle der Streuelektronen, nämlich die Fläche der Streufolie, möglichst klein zu halten, wurden die kleinsten handelsüblichen Blendenbohrungen von rund 25μ Durchmesser verwendet. Dieser, obgleich sehr geringe Blendendurchmesser bewirkt noch in einem Abstand von 264 mm, nämlich in der Zwischenbildebene, deren Intensitätsverteilung bei Benutzung des Projektivs als Streuverteilung ausgewertet wird, eine Winkelunschärfe von etwa $\pm \frac{1}{2} \times 10^{-1}$.

Die wirksame Strahlapertur wurde folgendermaßen bestimmt: Anstelle der Streufolie wurde eine leere 25μ -Blende in das Mikroskop gebracht und das Projektiv mit der größtmöglichen Vergrößerung eingeschaltet (Abb. 2). Dadurch wurde der Strahlquerschnitt auf etwa 1 cm^2 vergrößert und konnte so bequem photometriert werden. Die kleinste Apertur hatte der Strahl bei ausgeschaltetem Kondensator was aus der Größe des Leuchtschirmflecks leicht ersichtlich war. Als Maßstab wurde ein Drahtnetz in der Zwischenbildebene unter den gleichen Umständen wie der Strahlquerschnitt aufgenommen. Wegen der hohen Vergrößerung mußte ein sehr feines Netz verwendet werden; hierfür war ein Silbernetz mit einem Maschenabstand von 25μ geeignet. Die Maßgenauigkeit und Gleichmäßigkeit der Maschenabstände wurde in einem Lichtmikroskop mit einem Mikrometer nachgeprüft. Die Schwankungen um das Sollmaß betragen nur wenige Prozent. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, betrug der halbe Öffnungswinkel des Strahls, der sich aus der Öffnung α des Primärstrahls, der Apertur β der Blende gegenüber dem engsten Strahlquerschnitt und dem Blendendradius zusammensetzte (Abb. 4), in der Zwischenbildebene etwa $1,5 \cdot 10^{-1}$. Da die Stromdichte am

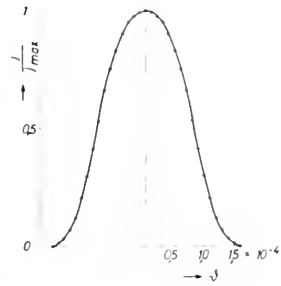


Abb. 3: Intensitätsverteilung des Strahlquerschnitts.

Rand des Strahls wesentlich geringer als in der Mitte ist, tragen die Randbezirke nicht wesentlich zur Verunschärfung der Streuverteilung bei, deshalb kann die Messung derselben von einem Winkel von $2 \cdot 10^{-1}$ an als sinnvoll angesehen werden.

Die obere Grenze der registrierbaren Winkel war durch den größten Projektivdurchmesser bestimmt und lag bei $5 \cdot 10^{-2}$. Die Streuung in größere Winkel ist für die Elektronenmikroskopie weniger interessant und außerdem durch zahlreiche Experimente bereits bekannt. Die Objektblende mußte vor den Streuexperimenten entfernt werden, da sie das Streuelektronenbündel auf $1 \cdot 10^{-2}$ begrenzt hätte.

Registrierung der gestreuten Elektronen.—Für die Registrierung der Streuelektronen wurden photographische Platten benutzt. Die photographische Methode hat gegenüber der direkten Strommessung mit einem Faraday-Käfig den Vorteil, daß sie eine genauere Ausmessung der Stromdichten gestattet, als es mit dem Faraday-Käfig möglich ist, da dieser aus Empfindlichkeitsgründen eine mehrere Quadratmillimeter große Öffnung haben mußte. Weiterhin können auch sehr kleine Intensitäten durch lange Belichtungszeiten noch registriert werden. Schließlich werden alle Streuwinkel gleichzeitig aufgenommen, wodurch auch bei Stromänderungen während der Belichtung die relative Stromdichteverteilung die glei-

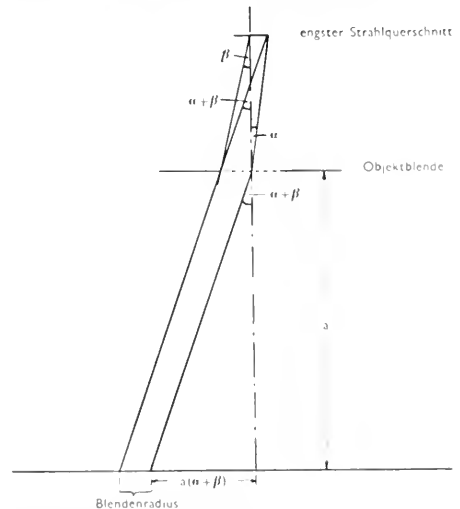


Abb. 4: Zur Berechnung des Radius der Primärstrahlspur im Abstand a von der Blende.

che bleibt. Ein Nachteil besteht darin, daß die Stromdichten auf dem Umweg über die Plattenschwärzung erhalten werden, wodurch eine zusätzliche Fehlermöglichkeit entsteht.

Als Aufnahmematerial wurde die Perutz-Silbercosinplatte wegen ihrer günstigen Empfindlichkeit verwendet. Ihre Gradationskurve hat eine mittlere Steilheit; einerseits ist sie flach genug, daß bei einem Belichtungsintervall von einer Zehnerpotenz die Schwärzungen in einem bequem auszumessenden Bereich lagen, andererseits aber auch steil genug, um kleine Belichtungsunterschiede noch genügend deutlich wiederzugeben.

Die Aufnahme der Gradationskurve geschah durch stufenweise Belichtung einer Platte im Elektronenmikroskop. Durch einen verstellbaren Anschlag für die Transportkurbel für die Plattenkassetten wurde der Kassettendeckel während der Bestrahlung stufenweise geöffnet und so auf der Platte Streifen bei der gleichen Bestrahlungsintensität mit verschiedenen Zeiten belichtet. Die gleichmäßige Stromdichteverteilung in der Registrierebene wurde durch starke Vergrößerung des Strahlquerschnitts mittels der Elektronenlinsen hergestellt. Die Platten wurden dann zu je 12 Stück in einem Plattenkorb in jeweils frisch angesetztem Agfa-Methol-Hydrochinon in der Verdünnung 1:10 bei 20°C 10 Minuten lang unter ständiger Bewegung entwickelt. Die Temperatur schwankte nicht mehr als $\pm 0,1$ C. Die jeweils gleiche Entwicklerkonzentration wurde durch genaues Abmessen des konzentrierten Entwicklers und des Wassers zur Verdünnung eingehalten.

Das absolute Maß der Stromdichte, mit der die Stufenkeile belichtet wurden, wurde nicht ermittelt, da bei den Streuexperimenten der Primärstrom nicht gemessen werden konnte, sodaß nur die relative Verteilung der Streuintensitäten auf die verschiedenen Winkel bestimmt werden konnte. Darum kam es auch bei der Gradationskurve nur auf die Kenntnis des relativen Maßes der Bestrahlung an.

Für die Streuaufnahmen wurden eine größere Menge der Platten derjenigen Emulsionsnummer, auf die die Stufenkeile für die Gradationsbestimmung aufgenommen worden waren, aufbewahrt. Später stellte sich heraus, daß während der Lagerung die Gradation der Platten mit der Zeit erheblich flacher und der Schleier stärker wurde. Es wurden deshalb für die Streuaufnahmen immer frische Platten verwendet und bei der Entwicklung zusammen mit diesen jeweils einige neu aufgenommene Stufenkeile mitentwickelt. Ein Nachteil dabei war, daß jeweils nur wenige Stufenkeile neben den Streuaufnahmen in einem Plattenkorb Platz hatten und die Größe des Entwicklungstanks im Hinblick auf einen nicht zu großen Entwicklerverbrauch nur als ausreichend für einen Plattenkorb gewählt war. Es konnte daher aus den wenigen, meist etwas voneinander abweichenden Schwärzungen der Stufenkeile die Gradationskurve nur entsprechend weniger genau ermittelt werden.

Aufnahme der Streuverteilung.—Die Streuintensitäten in dem zu untersuchenden Winkelbereich gehen über etwa vier Zehnerpotenzen. Da auf einer Platte nur ein Intensitätsumfang von wenig mehr als einer Zehnerpotenz mit genügend großer Genauigkeit ausgemessen werden konnte, wurde der gesamte Winkelbereich in vier Intervalle aufgeteilt, die mit verschiedener Projektivvergrößerung aufgenommen wurden. Die Belichtungszeiten wurden so gewählt, daß der günstigste Schwärzungsbereich ($S = 0,1$ bis 1) auf der Platte in dem betreffenden Winkelintervall lag. Meist wurden bei derselben Projektivvergrößerung zwei Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten gemacht, damit die Einzelkurven sich überlappten. Das gute Zusammenpassen der Einzelkurven ist ein Kriterium einerseits für die Konstanz des Strahlstroms, andererseits für die Richtigkeit der verwendeten Gradationskurve. Das Auseinanderklaffen in immer der gleichen Richtung bei den Einzelkurven der ersten ausgewerteten Streuaufnahme war der Anlaß zur Nachprüfung der Gradationskurve und führte zur Entdeckung der Gradationsverflachung bei den lange aufbewahrten Platten. Die gleiche Streuaufnahme mit Hilfe der berichtigten Gradationskurve ausgewertet lieferte die sehr gut zusammenpassenden Kurven der Abb. 5. Die Belichtung erfolgte nach einer Stoppuhr durch Auf- und Zuklappen des den Leuchtschirm tragenden Deckels der Plattenkamera. Bei den angewandten Belichtungszeiten zwischen 2 und 30 Sekunden konnte die Belichtung mit genügender Zeitgenauigkeit mit der Hand vorgenommen werden. Die genaue Kenntnis der Belichtungszeit und der Projektivvergrößerung war für die Umrechnung der gemessenen Plattenschwärzungen in die relativ zu den unvergrößerten Aufnahmen richtigen Stromdichten wichtig.

Die absoluten Streustromdichten sind bei einer bestimmten Folie proportional zum Primärstrahlstrom. Eine Kenntnis der Absolutwerte der Streuintensität ist also nur dann von Wert, wenn auch der Primärstrahlstrom gemessen werden kann. Bei dem verwendeten Elektronenmikroskop war dies aber nicht möglich, weil bei eingeschaltetem Strahl die Streufolie nicht gegen eine leere Blende ausgewechselt werden konnte, um den durch Streuung nicht geschwächten Strahl aufnehmen zu können, und weil nach dem Aus- und Wiedereinschalten der Kathodenheizung der Strahlstrom im allgemeinen einen anderen Wert annimmt (die Größenordnung des Strahlstroms war 10^{-11} A). Die an die Streukurven geschriebenen Absolutwerte der Stromdichte im Verhältnis zum Primärstrahlstrom wurden der Theorie von Lenz [7] entnommen, was insofern berechtigt erschien, als die Form der Streukurven sehr gut mit der nach der genannten Theorie berechneten Kurvenform übereinstimmte.

Jeweils unmittelbar vor der betreffenden Einzelaufnahme mit einem bestimmten Projektivpolschuh wurde die Projektivvergrößerung bestimmt.

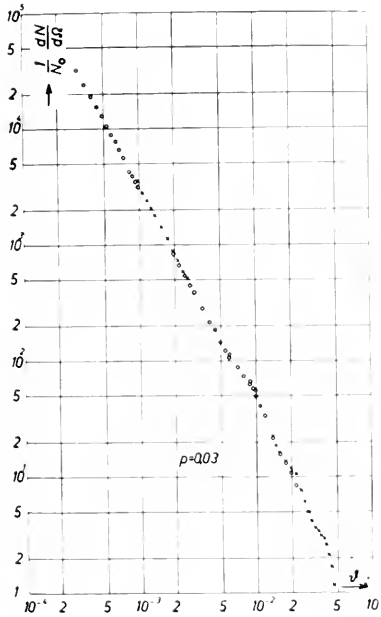


Abb. 5.

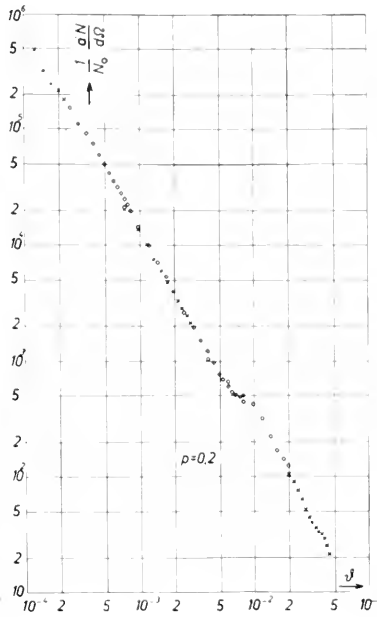


Abb. 6.

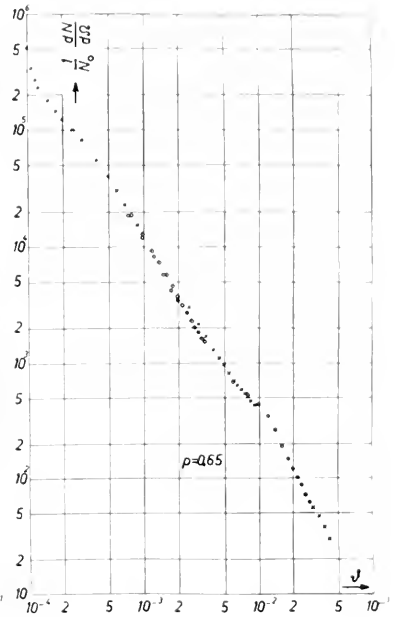


Abb. 7.

Abb. 5-7: Kurven der Streuverteilung von Kohlenstoff verschiedener Massendicke. Die durch unterschiedliche Zeichen (—) dargestellten Meßpunkte wurden von verschiedenen Platten der betreffenden Aufnahmeserie gewonnen. N_0 ist die Anzahl der die Folie treffenden Elektronen, dN die Anzahl der in das Raumwinkelement $d\Omega$ gestreuten Elektronen.

Diskussion der Experimentalergebnisse.—Die Abbildungen 5 bis 7 zeigen die Kohlenstoff-Streuverteilung bei verschiedenen Foliendicken. Etwa bei $\theta = 10^{-2}$ tritt der erste Beugungsring auf. Das entspricht einem Atomabstand von 4 bis 5 Å. Infolge des logarithmischen Abszissenmaßstabes liegen die folgenden Beugungsringe dicht hinter dem ersten und lassen die Streuverteilung im Bereich $\theta > 10^{-2}$ nicht mehr gut erkennen. Dagegen sind die Streukurven im Winkelbereich zwischen 10^{-1} und 10^{-2} ungestört und die Meßpunkte liegen hier recht genau auf einer Geraden, deren Steigung von der Massendicke abhängt. Die Massendicke γl wird zweckmäßig in Einheiten der Aufhellungsdicke $\gamma l'$ gemessen; für Kohlenstoff beträgt deren Wert nach Lenz [7] etwa

$$\gamma l' = 2,51 \cdot 10^{-10} \frac{U(1 - e^{-U/2m_0c^2})}{(1 - e^{-U/m_0c^2})^2} \frac{g}{V \text{ cm}^2} \quad (2)$$

für $U = 70 \text{ kV}$ also etwa

$$\gamma l' = 1,46 \cdot 10^{-6} \text{ g cm}^{-2}. \quad (3)$$

In der Theorie [5] wird für $p \ll Z^2$ ($p = \gamma l / \gamma l'$ Verhältnis von Massendicke zur Aufhellungsdicke) der Ausdruck für die Streuelektronendichte in zwei Summanden aufgespalten, von denen einer zu θ^{4p-2} proportional ist und für $\theta = 10^{-2}$ groß gegen den anderen Summanden ist, so daß er nur allein berücksichtigt zu werden braucht. Wegen der reinen Potenzabhängigkeit von θ ist die theoretische Streukurve im doppelt logarithmischen Koordina-

tensystem ebenfalls eine Gerade. Ihre Steigung beträgt $4p/Z^2$, ist also eine lineare Funktion von p . In Abb. 8 ist diese Funktion für $Z = 6$ dargestellt und dazu die Werte, die sich aus den experimentellen Kurven ergeben. Wie man sieht, liegen die Meßwerte bei den Folien mit glatter Oberfläche in der Nähe der theoretischen Werte. Die Punkte, die zu den Folien mit weniger ebener Oberfläche gehören, liegen höher. Es ist anzunehmen, daß die unebene Oberfläche ihre Ursache darin hat, daß durch zu schnelle Verdunstung des Lösungsmittels Blasen in der Folie entstanden sind, wodurch dann die Massendicke geringer ist, als es sich aus der Dickenmessung ergab. Die höher liegenden Werte der Abb. 8 können hierdurch erklärt werden.

Bei Winkeln $\theta \approx 3 \cdot 10^{-1}$ werden die Streukurven

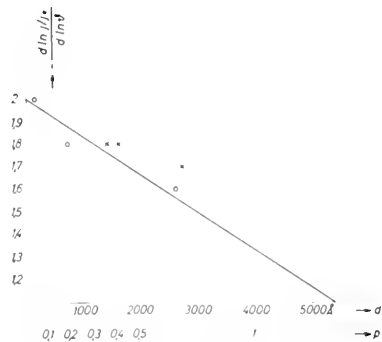


Abb. 8: Abhängigkeit der Steigung der Streukurven der Abbildungen 5 bis 7 und zwei weiterer von der Massendicke p bzw. Foliendicke d nach Theorie (—) und Experimenten mit den Folien mit ebener (○) und unebener (●) Oberfläche.

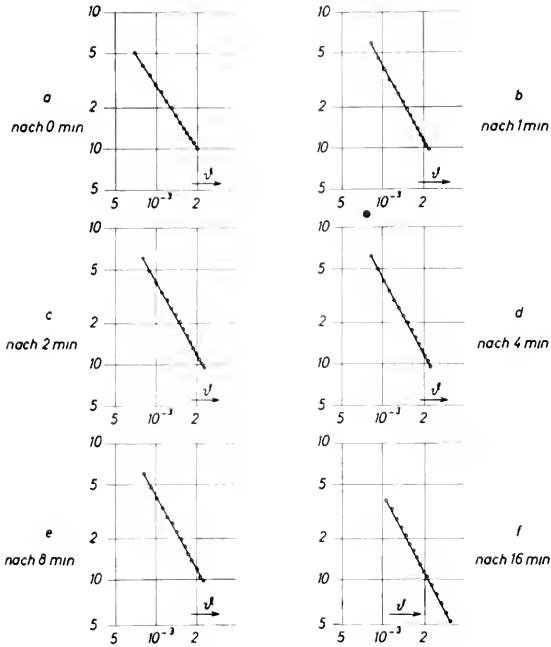


Abb. 9: Streukurven nach verschiedenen Bestrahlungszeiten einer 1400 Å dicken Folie.

Steigung der Kurven: a) 1,5, b) 1,71, c) 1,76, d) 1,8, e) 1,8, f) 1,8.

flacher. Diese Tatsache folgt auch aus der Theorie für die Einfachstreuung (vergl. Abb. 6 aus [7]); aus der in [7] durchgeführten Theorie der Mehrfachstreuung geht sie nicht hervor. Das liegt daran, daß dort für den unelastischen differentiellen Streuquerschnitt auf eine Berücksichtigung von dessen endlichen Grenzwert für $\vartheta \rightarrow 0$ zur Vereinfachung der Rechnung verzichtet wurde, was sich bei der Streuverteilung von 70-kV-Elektronen für Streuwinkel $\vartheta \lesssim 10^{-1}$ bemerkbar macht.

Bei Abbildung 6 kann man bei $\vartheta < 1,5 \cdot 10^{-1}$ den Übergang der Streustromdichte in den ungestreuten Anteil des Primärstrahls beobachten.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der Massendicke ist das Aufwachsen einer Kohlenstoffschicht bei der Bestrahlung im stets etwas kohlenwasserstoffhaltigen Vakuum des Elektronenmikroskops. Abbildung 9 zeigt, daß nach 16 Minuten langer Bestrahlung die massendickenabhängige Stei-

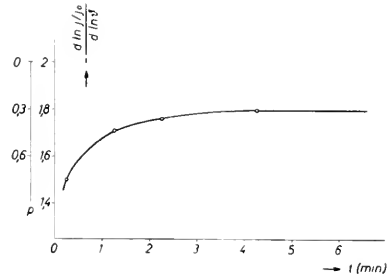


Abb. 10: Änderung der Steigung der Kurven der Abbildung 9 in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit. Da die Belichtungszeit jeweils 30 Sekunden betrug, liegen die Meßpunkte 15 Sekunden hinter der auf Abbildung 12 in vollen Minuten angegebenen Zeit, die den Beginn der Belichtung angibt.

gung der Kurven im Winkelbereich zwischen 10^{-1} und 10^{-2} keine merkliche Änderung erfährt, daß bei den vorliegenden Versuchsbedingungen eine merkliche Zunahme der Massendicke durch Aufwachsen einer Kohlenstoffschicht also nur sehr langsam erfolgt. Die Abnahme der Massendicke zu Beginn der Bestrahlung ist durch das Abdampfen der Nicht-Kohlenstoff-Atomgruppen verursacht (vergl. Abb. 10), wie eben bereits erwähnt wurde.

Für die Themenstellung, sein ständiges Interesse und zahlreiche Diskussionen sind wir unserem kurz nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit verstorbenen Lehrer, Herrn Prof. Dr.-Ing. Bodo von Borries zu tiefem Dank verpflichtet. Bei der Durchführung der Experimente hat uns ferner Herr Dipl.-Phys. W. Scheffels manchen wertvollen Hinweis gegeben.

LITERATUR

1. BIBERMANN, L. M., *Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. Fiz.*, **15**, 429 (1951).
2. BIBERMANN, L. M., WTOROW, E. N., KOWNER, I. A., SSUSCHKIN, N. G., und JAWORSKIJ, B. M., *Compt. rend. acad. sci. URSS* **69**, 519 (1949).
3. BOERSCH, H., *Z. Naturforsch.* **2a**, 615 (1947).
4. VON BORRIES, B., *Z. Naturforsch.* **4a**, 51 (1943).
5. BROCKES, A., Vortrag gehalten auf der 6. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Münster 1955.
6. KÖNIG, H., *Z. Physik* **129**, 483 (1951).
7. LENZ, F., *Z. Naturforsch.* **9a**, 185 (1954).
8. TOLANSKY, S., *Multiple-Beam Interferometry of Surfaces and Films*. Oxford, 1948.
9. WEBER, K. und VON FRAGSTEIN, C., *Optik* **11**, 511 (1954).

Experimentelle Untersuchungen zum Kontrast dünner Schichten im Elektronenmikroskop

W. LIPPERT

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.

Die elektronenmikroskopische Durchlässigkeit dünner Schichten ist sowohl von der theoretischen als auch von der praktischen Seite von gewissem Interesse. Neuere theoretische Untersuchungen von Lenz (3) haben ältere Ergebnisse (1, 2) modifiziert, und es erscheint zweckmäßig einmal zu prüfen, inwieweit diese Theorien die Verhältnisse bei praktisch vorkommenden Schichten wiedergeben. Zum anderen besteht immer wieder einmal der Wunsch, aus der elektronenmikroskopischen Durchlässigkeit Rückschlüsse auf die Schicht- bzw. Massendicke zu ziehen.

Das Ziel der Untersuchungen war also festzustellen, ob bei einigermaßen definierten Schichten eine eindeutige Beziehung zwischen Schichtdicke und elektronenmikroskopischer Durchlässigkeit, die natürlich noch von der Objektivapertur und der Strahlspannung abhängt, besteht. Ferner sollte geprüft werden, ob die Meßresultate den theoretischen Berechnungen folgen. Wenn auch die Zielsetzung der Untersuchungen sehr klar war, darf doch nicht verschwiegen werden, daß sowohl bei der experimentellen Durchführung, als auch bei dem Vergleich der Messungen mit der Theorie eine Reihe von prinzipiellen Schwierigkeiten zu diskutieren war, auf die hier aber leider nicht näher eingegangen werden kann. Es ist aber z. B. offensichtlich, daß man keine strenge Übereinstimmung erwarten darf, da die hier in Frage kommenden theoretischen Ansätze die Struktur der Materie nicht berücksichtigen, sondern sich strenggenommen nur auf einzelne Atome beziehen.

Die Meßmethode war kurz folgende: An einem mit Zwischenlinse versehenen Siemens-Mikroskop wurde die photographische Platte durch einen Auffänger für Elektronen ersetzt. Die Objektivapertur wurde — vor allem zum Vergleich mit der Theorie — ungefähr in dem Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-2}$ und $9 \cdot 10^{-2}$ verändert. Die benutzten Spannungen waren 50 und 110 kV. Die Zwischenlinse gestattete die einwandfreie Justierung des Elektronenstrahls und die durch die Kontrastblende eingestellte Objektivapertur zu kontrollieren.

Bezüglich der untersuchten Schichten bestand die Absicht, amorphe und kristalline und auch leicht- und schweratomige Schichten zu untersuchen. Genauere Messungen wurden an Kohle-, Aluminium-, Palladium- und Wolframoxydschichten durchgeführt. Die Kohleschichten wurden dabei nach dem Königschen Verfahren in einer Glimmentladung in Benzoldampf hergestellt. Die übrigen Schichten waren Aufdampfschichten. Der Auffänger für die Elek-

tronen war so dimensioniert, daß bei kristallinen Schichten über eine große Zahl von Kristalliten gemittelt wurde.

Bei dem Vergleich mit der Theorie haben wir uns bei den relativ großen Aperturen darauf beschränkt, die elastische Streuung zu berücksichtigen. Benutzt man die Wentzelsche Streuformel (1927), so läßt sich die elektronenoptische Durchlässigkeit in allgemeiner Form als Funktion einer zunächst noch unbestimmten Dicke — wir haben dazu die Aufhellungsdicke gewählt — und eines ebenfalls zunächst noch unbestimmten Winkels angeben.

Mathematisch ergibt sich folgender Ausdruck:

$$D(\gamma, \rho) = \int_0^{\infty} \exp \left[-\rho \left(1 - \frac{\pi}{2} \gamma H_1^{(1)}(i\gamma) \right) \right] \cdot I_1 \left(\gamma \frac{\gamma'}{\delta_0} \right) \cdot d \left(\gamma \frac{\gamma'}{\delta_0} \right).$$

Dabei ist

γ die durch die Kontrastblende bedingte Objektivapertur

ρ die relative Massendicke der Schicht, ausgedrückt in Vielfachen der von v. Borries (1951) eingeführten Aufhellungsdicke

δ_0 die Winkelkonstante der Wentzelschen Streuformel

$I_1, H_1^{(1)}$ die Besselsche bzw. Hankelsche Zylinderfunktion.

Die Auswertung der Formel zeigt Bild 1: Die Kurven zeigen den Verlauf der elektronenmikroskopischen Durchlässigkeit als Funktion der Apertur für konstante Dicke. Um diese Kurven mit den Experimenten in Beziehung setzen zu können, ist es notwendig, numerische Werte für Aufhellungsdicke und Winkelkonstante anzunehmen. Um einen Über-

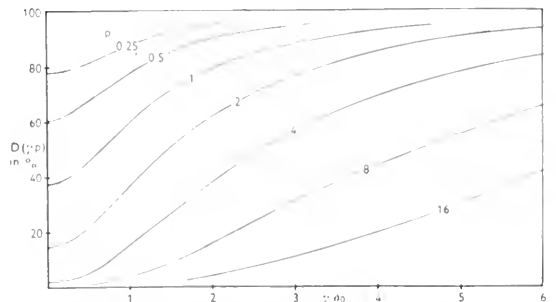


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Durchlässigkeit als Funktion der Apertur für konstante Dicke.

TABELLE 1. *Aufhellungsdicken in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.*

	C	Al	Pd	W	
50 kV	9,1	7,3	5,4	4,9	(v. Borries)
	21,4	17,4	12,6	11,5	(Leisegang)
	11	10,5	10	10	(Lenz)
110 kV	17,2	13,8	10,2	9,2	(v. Borries)
	40,8	32,6	24,1	21,9	(Leisegang)
	20	19,5	19	19	(Lenz)

blick über die in der Literatur benutzten Werte zu geben, haben wir die für die durchgemessenen Substanzen in Frage kommenden Aufhellungsdicken nach drei verschiedenen Arbeiten, der Arbeit von v. Borries (1), der von Leisegang (2) und der von Lenz (3) berechnet.

Während v. Borries und Leisegang für die Aufhellungsdicken Formeln benutzen, die aus der Molièreschen Theorie abgeleitet sind und von der Ordnungszahl abhängen, berechnet Lenz mit Hilfe von Hartreefeldern die Aufhellungsdicken nur für einige Substanzen. Die in der Tabelle nach Lenz angegebenen Werte für Al, Pd und W sind interpoliert. Eine solche Interpolation ist nicht ohne weiteres zu rechtfertigen. Wir haben es trotzdem getan, um die Lenzschen Rechnungen mit für die Diskussion benutzen zu können.

Für die Berechnung von δ_0 wird meistens eine Formel der Art

$$\delta_0 = \frac{\lambda}{2\pi \cdot a} \cdot Z^{\frac{1}{2}}$$

benutzt. λ ist dabei die Wellenlänge, Z die Ordnungszahl. a bedeutet bei einigen Autoren die Thomas-Fermi-Länge für Wasserstoff, bei anderen den Bohrsche Wasserstoffradius. Da der Unterschied beider Werte nur 11,4 % beträgt, scheint zum Zwecke des Vergleichs mit den vorliegenden Messungen eine nähere Diskussion nicht notwendig. Wir benutzen als Vergleichswert für δ_0 denjenigen Wert, der sich durch Benutzung des Bohrschen Radius ergibt.

Resultate: Es sollen zunächst die Meßresultate für Kohle, und zwar für die beiden Spannungen 50 und 110 kV diskutiert werden: Auf der Abszisse der Abb. 2a und 2b ist dabei die Apertur, auf der

TABELLE 2. *Winkelkonstanten für die untersuchten Substanzen.*

	C	Al	Pd	W
50 kV	0,029	0,038	0,057	0,067
110 kV	0,019	0,025	0,038	0,044

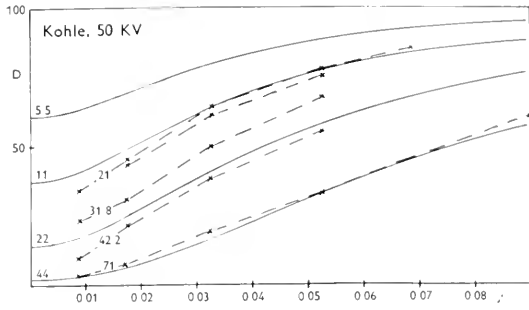
Ordinate die „Durchlässigkeit“ angegeben. Die aus der Theorie erhaltenen Kurven sind ausgezogen, die mit Kreuzen gekennzeichneten Meßpunkte durch gestrichelte Geraden verbunden. Die an die Kurven geschriebenen Zahlen geben die Massendicke in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ an. Als theoretische Werte haben wir hier die Zahlen nach Lenz benutzt. Man sieht, daß die Meßpunkte einigermaßen die von der Theorie verlangte Abhängigkeit von der Apertur wiedergeben. Abweichungen lassen sich meistens durch Ringe im Beugungsdiagramm erklären. Keine Übereinstimmung besteht aber zwischen den gemessenen und den nach Lenz errechneten Massendicken. Die experimentellen Massendicken sind bei 50 kV etwa 1,7- bis 1,8mal, bei 110 kV etwa 1,8- bis 1,9mal so groß wie die errechneten.

Ähnlich sind die Resultate bei Aluminium (Abb. 2c): Die Aperturabhängigkeit wird, eventuell unter Berücksichtigung der Unregelmäßigkeiten im Beugungsspektrum, einigermaßen befriedigend wiedergegeben, die experimentelle Massendicke ist aber etwa um den Faktor 1,4 bis 1,5 größer als die aus der Theorie interpolierten Werte.

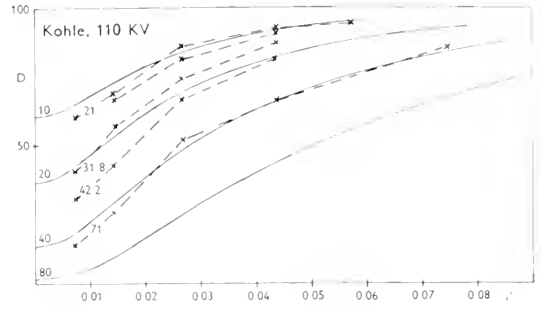
Mg-F₂, von dem wir auch einige Proben vermessen haben, verlangt etwa das 1,6fache der errechneten Massendicke.

Bei den schweratomigeren Substanzen sieht es bei Pd (Abb. 2d) zunächst so aus, als ob eine relativ befriedigende Übereinstimmung zwischen Experiment und Rechnung sowohl bezüglich der Winkelabhängigkeit als auch bezüglich der Massendicke vorliegt. Doch ist auch hier schon das angedeutet, was bei Wolframoxyd (Abb. 2e) deutlich sichtbar wird: Der Verlauf der errechneten Kurven würde sich besser dem Experiment anpassen, wenn der Verlauf steiler, d. h. die Winkelkonstante kleiner wäre. Die Vergleichskurven für Wolframoxyd beziehen sich auf reines Wolfram. Der Gewichtsanteil des Sauerstoffs beträgt bei dem in die Verdampfungsapparatur gebrachten WO₃ nur etwa 20 %. Da bei der Verdampfung eine Reduktion stattfindet, dürfte bei der eigentlichen Schicht der Sauerstoffgewichtsanteil noch kleiner sein. Auch wenn man z. B. versucht, die Wolframoxyschicht als aufeinanderliegende Schicht von W und O aufzufassen, bleibt diese charakteristische Abweichung im Prinzip bestehen. Auch bei Wismut- und Platinschichten zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Die Winkelkonstante sollte bei beiden Substanzen etwa um 40 % kleiner sein.

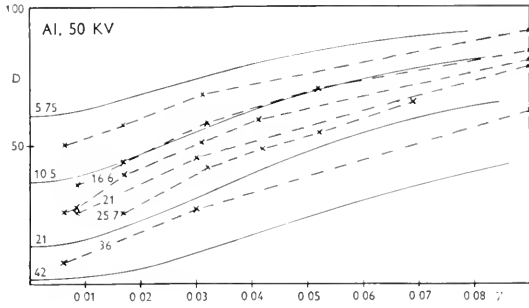
Die Messungen haben als wichtiges Resultat gezeigt, daß bei den bisher genannten Substanzen eine eindeutige Beziehung zwischen elektronenmikroskopischer Durchlässigkeit und Schichtdicke, die i. a. recht gut durch eine e -Funktion wiedergegeben wird, besteht. Abb. 3 zeigt als Beispiel hierfür die Abhängigkeit der Durchlässigkeit von der Schichtdicke für Kohle bei 50 kV und einer Apertur von 0,03. Allerdings gibt es auch Schichten, für die diese einfachen und reproduzierbaren Verhältnisse nicht zutreffen. Dies ist der Fall bei Substanzen, bei denen die



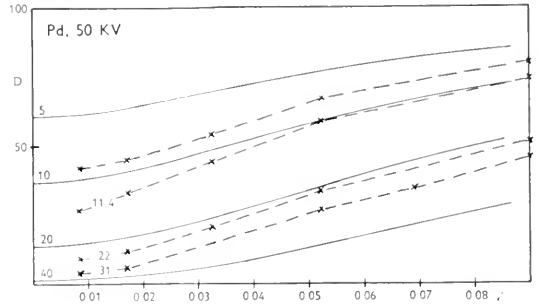
2 a



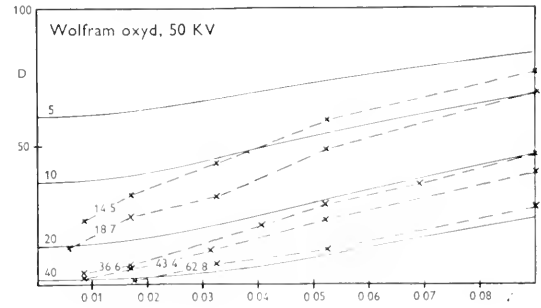
2 b



2 c



2 d



2 e

Abb. 2 a-e. Die Durchlässigkeit als Funktion der Apertur bei verschiedenen Massedicken in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ angegeben. Ausgezogene Kurven aus der Theorie erhalten; gestrichelte Kurven durch die Meßpunkte gezogen.

Massendicke im Sublichtmikroskopischen sehr ungleichmäßig ist wie z. B. bei Gold und Silber.

Das Elektronenmikroskop läßt sich also bei Substanzen mit einigermaßen gleichmäßiger Schichtdicke nach Eichung zur Dickenmessung benutzen. Der Meßbereich läßt sich dabei durch Veränderung der Objektivapertur in gewissen Grenzen verändern.

Leider läßt sich aber die Abhängigkeit der Durch-

lässigkeit von der Schichtdicke nicht ohne weiteres aus dem hier benutzten einfachen Ansatz und den in der Literatur bekannt gewordenen Berechnungen entnehmen. Die Abweichungen liegen bei den leichtatomigen Elementen in der Richtung, daß die Lenzschen Werte für die Aufhellungsdicke zu klein sind, man muß vielmehr für die Aufhellungsdicke Zahlen einsetzen, die in der Nähe der Leisegangschen Werte liegen. Bei den schweratomigen Elementen lassen sich die Abweichungen in erster Linie so deuten, daß man für die Winkelkonstante gegenüber dem theoretischen Wert einen kleineren Wert einzusetzen hat, um zu einer besseren Angleichung der Messungen an die Theorie zu kommen.

LITERATUR

1. VON BORRIES, B., *Z. Naturforsch.* **6a**, 51 (1951).
2. LEISGANG, S., *Z. Physik* **132**, 183 (1952).
3. LENZ, F., *Z. Naturforsch.* **9a**, 185 (1954).
4. WENTZEL, G., *Z. Physik* **40**, 590 (1927).

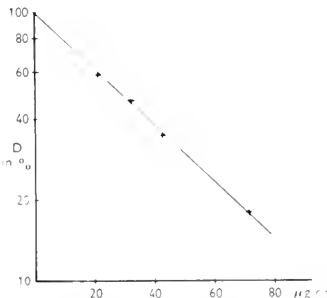


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Durchlässigkeit von der Schichtdicke für Kohle bei 50 KV, Apertur 0,03.

Zur Veränderung des Streuvermögens eines Festkörpers gegenüber mittelschnellen Elektronen infolge Ionisation und Anregung

W. SCHEFFELS

Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf

DIE früher beschriebenen Versuche mit dünnen Folien im Schattenbildstrahlengang (7, 8, 9) wurden fortgeführt in dem Bestreben, quantitative Ergebnisse zu erhalten über die Änderung des Streuvermögens durch die Bestrahlungsstromdichte. Zunächst soll kurz der Strahlengang in dem benutzten permanentmagnetischen Elektronenmikroskop nach von Borries (2) geschildert werden (Abb. 1). Der etwa $4 \cdot 10^{-3}$ cm im Durchmesser große engste Strahlquerschnitt des Strahlerzeugers (*a*) wird mit der Projektivlinse (*b*) und weiter mit der Objektivlinse (*c*) auf beispielsweise $6 \cdot 10^{-6}$ cm verkleinert. So entsteht hinter dem Objektiv eine scharfe Kaustik, die lediglich über den Durchmesser des verkleinerten Bildes der Strahlquelle verschmiert ist. Befindet sich eine dünne Folie zwischen Objektivlinse und hinterer Brennebene, so schneidet sie die Kaustik, und infolge der erhöhten Stromdichte in den Schnittlinien (Kaustikstern und Kaustikmantel) lassen sich diese mittels Kohlenstoffauftragung auf die Folie aufzeichnen.

Im Schattenbild kann man diese aufwachsenden Kohlelinien gleichzeitig beobachten (Abb. 2*a*). Die achsennahen Strahlen projizieren den Kaustikstern in die Mitte des Bildes, aber die Strahlen, die in der Folienebene zum Aufbau des Kohlesterns beitragen, projizieren ihn ebenfalls weiter außen im Bild. Der Kaustikmantel wird scharf nach ganz außen projiziert. Eine Theorie dieser Schattenprojektion von F. Lenz (4) ermöglicht eine quantitative Deutung dieser Aufnahmen.

Wartet man mit der Aufnahme des Schattenbildes aber nicht bis sich die Kohle aufgetragen hat, oder bewegt man gar die Folie während der Aufnahme mit der Objektverstellung in der Folienebene, so erhält man ebenfalls eine Projektion von Linien, wie

in Abb. 2*b* auf einer Kollodiumfolie. Die mittelste Figur wurde früher als „Streustern“ beschrieben. Im Gegensatz zu der Kohleauftragung ist die Änderung des Kontrastes der Kollodiumfolie völlig reversibel und hat seine Ursache nur in der erhöhten Stromdichte in der Kaustik und nicht in einer Änderung der Massendicke der Folie. Bemerkenswert sind die hellen Säume an der Seite der dunklen Linien. Sie lassen sich als Beugungssäume erklären, wenn man annimmt, dass in der Objektfolie an dieser Stelle eine sprunghafte Änderung der elektronenoptischen Brechungsindex oder des Absorptionskoeffizienten stattfindet.

Wie man auf der gerechneten Darstellung (Abb. 3) der Stromdichte im Kaustikquerschnitt auf einer Geraden durch die Taille des Sterns sieht, fällt die Stromdichte sowohl im Stern wie im Mantel nach außen viel schroffer ab als nach innen. Bei einer idealen Kaustik d. h. bei Verwendung einer punktförmigen Elektronenquelle, würde die Stromdichte unendlich werden, aber da diese über das verkleinerte Bild der Strahlquelle verschmiert ist, erhält man durch Mitteilung endliche Maxima in Stern und Mantel (beispielsweise $5 \cdot 10^{-2}$ A cm² in der Sterntaille). Man kann annehmen, daß infolge der stark unterschiedlichen Stromdichte auf der Folie auch die Ionisation und Anregung der Objektatome und damit das mittlere innere Potential in der Folie örtlich stark verschieden ist. Rechnet man für eine Abschätzung bei einem scharfen Sprung zwischen zwei konstanten Werten des inneren Potentials die Intensitäten der in der Schattenprojektion entstehenden Fresnelschen Beugungslinien aus und mittelt diese Intensitätsverteilung über den Durchmesser des Bildes der Strahlquelle, so erhält man — als Phasenkontrast — eine Intensitätsverteilung, wie sie bei den in Abb. 2*b* gezeigten dunklen Linien mit hellem Saum vorliegt. Vergleicht man diese gerechnete Verteilung der

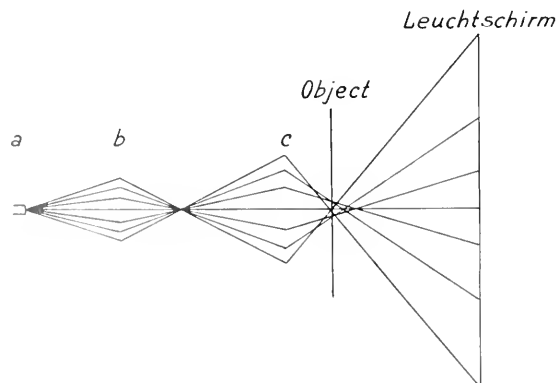


Abb. 1. Registrierung der Kaustikquerschnitte.

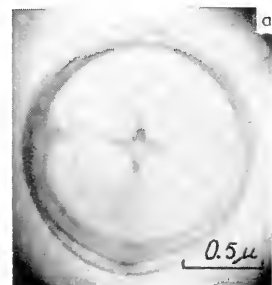


Abb. 2*a*. Schattenbild eines Kaustikquerschnittes auf Kollodiumfolie. Kohlestern. $f = 2,2$ mm; $C_a = 2\mu$; $Z = -9$.

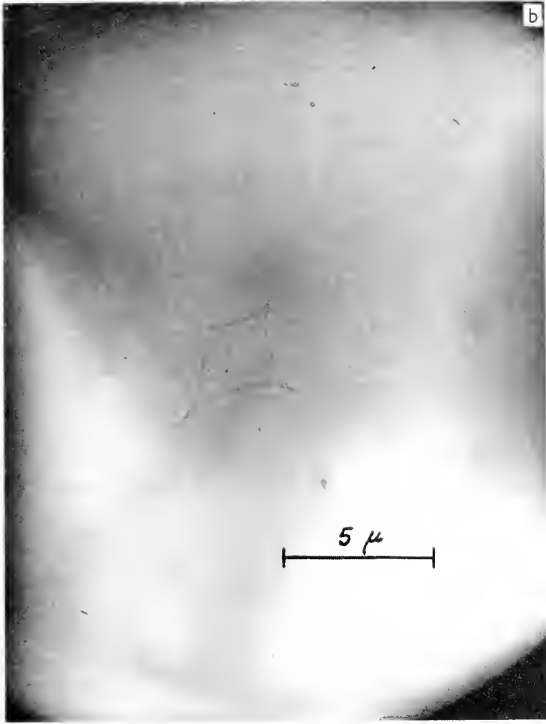


Abb. 2b. Streuern. $f = 6 \text{ mm}$; $C_a = 8 \mu$; $Z = 12$.

Stromdichte im Schattenbild mit der durch Mikrophotometrierung der Platten gemessenen, so erhält man Übereinstimmung, wenn man einen Sprung des mittleren inneren Potentials von etwa 10 Volt annimmt.

Es ist kaum zu erwarten, daß sich das innere Potential um einen so hohen Wert verändert, so daß man zur Erklärung des Phasensprunges in der Folie auch Aufladungen annehmen muß, wie es Le Poole (6) schon früher vorgeschlagen hat. Jedoch bleibt zu klären, wie sich Aufladungen in einem so kleinem Objektbereich halten können. Außer der Phase ändert sich aber auch die Amplitude der durchgehenden Elektronenwelle, wie weiter unten ausgeführt wird. Doch läßt sich noch nicht sagen, welche von den drei genannten Ursachen für die Entstehung des

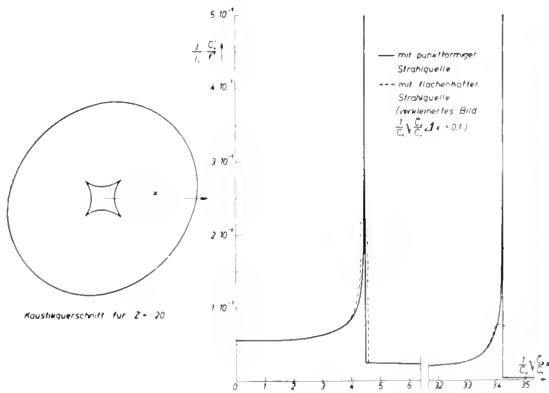


Abb. 3. Kauistikquerschnitt für $Z = 20$.

Kontrastes der Kaustiklinien die größte Rolle spielt. Es wurde noch versucht, die mittlere Lebensdauer des kontrastverursachenden Zustandes der Folie zu bestimmen (Abb. 4). Dazu wurde die Folie in der Folienebene, also senkrecht zur Strahlrichtung, mit Ultraschall 22,1 kHz oszilliert. Das Ergebnis zeigen die beiden Aufnahmen Abb. 4b und c bei verschiedener Oszillationsamplitude A . Bei hinreichend großer Amplitude wird der Weg, den ein Objektelement während der mittleren Lebensdauer des kontrastverursachenden Zustandes zurücklegt, größer als die natürliche Breite der beobachteten Kaustiklinie. Dann wird die Kaustiklinie im Schattenbild unscharf und kontrastärmer. Aus den Aufnahmen läßt sich eine mittlere Lebensdauer von 10^{-5} sec. schließen.

Außer den Linien läßt sich noch eine andere Kontraständerung beobachten, bei der sicher nur Amplitudenkontrast und kein Phasenkontrast vorliegt. Man sieht auf der Aufnahme Abb. 4a, daß die Fläche innerhalb des Sternes deutlich dunkler ist als außerhalb. Dies kann weder durch Beugungsercheinungen noch durch Aufladungen verursacht sein. Aus der berechneten Stromdichteverteilung (Abb. 3) ergibt sich, daß über der Fläche innerhalb des Sternes auf der Folie die Stromdichte konstant größer ist als außerhalb. Der dadurch hervorgerufene Unterschied des inneren Potentials in der Folie ist der Grund für den Unterschied des Streuabsorptionskoeffizienten. Um nicht an den speziellen Kaustikquerschnitt der Abb. 3 gebunden zu sein, wurden in Abb. 5 die verschiedenen Stromdichten innerhalb (b) und außerhalb (c) des Sterns, das Maximum auf der Sterntaille (a) und die Stromdichte der projizierenden Strahlen (d) in Abhängigkeit von der axialen Lage des Querschnitts berechnet.

Es bleibt als Ergebnis, daß eine Änderung der Stromdichte auf der Kollodiumfolie um z. B. $5 \cdot 10^{-3} \text{ A cm}^2$ eine Änderung des Kontrastes um 10^{-2} bewirkt, verursacht durch eine Änderung des inneren Potentials in der Folie um 0,2 Volt. Dieser Wert folgt daraus, daß nach den Streuformeln von Lenz (3) die Größe

$$G = \int_0^{\infty} g(r) 4\pi r^2 dr$$

ein Maß sowohl für die Streuquerschnitte wie für das mittlere innere Potential ist. Eine Änderung des

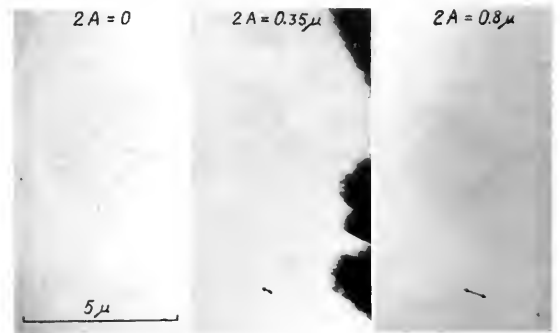


Abb. 4. Streuern auf Kollodiumfolie bei Oszillation der Objektfolie mit Ultraschall 22,1 kHz.

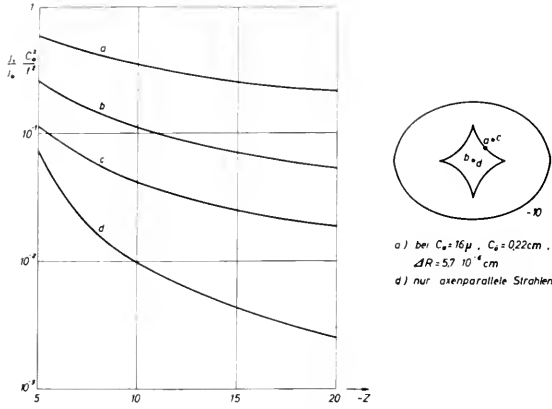


Abb. 5. Stromdichten auf dem Kaustikquerschnitt in Abhängigkeit von dessen axialer Lage $-Z = z/C_0$, j_z = Stromdichte im Kaustikquerschnitt, j_0 = Stromdichte in der Mitte der Linse.

inneren Potentials, wie sie hier durch Ionisation und Anregung der Objektatome hervorgerufen wird, ist also verbunden mit einer Änderung der Streuquerschnitte.

Der Zusammenhang zwischen der Änderung des inneren Potentials und der Stromdichte auf der Folie läßt sich qualitativ in folgender Weise beschreiben (5): Die Berechnung des inneren Potentials aus Θ nach H. Bethe (1) gilt nur, wenn der Festkörper aus einander gleichen, kugelsymmetrischen Atomen besteht, was hier nicht der Fall ist, da in der Folie infolge unelastischer Streuung ein Teil der Atome ionisiert oder angeregt ist. Wenn der Festkörper aber im Ganzen neutral ist, so kann man ihn auffassen als eine lineare Überlagerung des mittleren Potentials der N im Grundzustand befindlichen

Atome mit der durch die ΔN angeregten bzw. ionisierten Atome verursachten Störung. Dann ergibt sich, daß die Änderung des mittleren inneren Potentials nicht zu $\Delta N/N$ sondern zu $(\Delta N/N)^{\frac{1}{2}}$ proportional ist. Wenn also beispielsweise jedes tausendste Atom durch unelastischen Stoß ionisiert ist, steigt das innere Potential nicht um ein Promille, sondern um 10 ‰. Eine solche Zunahme kann aber schon zu erkennbarem Kontrast führen. Diese dritte Wurzel bewirkt aber auch, daß eine sehr starke Erhöhung der Stromdichte im Objekt über den normalen Wert hinaus das innere Potential und damit den Kontrast nur um einen geringen Betrag über den Wert erhöhen kann, wie er bei der normalen Stromdichte bereits gegeben ist.

Herrn Prof. Dr. B. v. Borries sowie Herrn Dr. F. Lenz danke ich für wertvolle Anregungen und Diskussionen zur vorliegenden Untersuchung.

LITERATUR

1. BETHE, H., *Ann. Physik*, Lpz., **87**, 55 (1928).
2. VON BORRIES, B., *Z. wiss. Mikroskop.* **60**, 329 (1952).
3. LENZ, F., *Z. Naturforsch.* **9a**, 185 (1954).
4. — eingereicht zur „First Regional Conference on Electron Microscopy in Asia and Oceania, Tokyo“, Oktober 1956.
5. LENZ, F. und SCHEFFELS, W., *Z. Naturforsch.* **11 a**, 656 (1956).
6. LE POOLE, J. B., Diskussionsbemerkung zum Vortrag von W. Scheffels, B. v. Borries und F. Lenz. Proceedings of the Conference on Electron Microscopy, London, 1954.
7. SCHEFFELS, W., VON BORRIES, B., und LENZ, F., Rapport Europees Congres Toegepaste Electronenmicroscopie Gent 1954, 293.
8. — *Naturwissenschaften* **41**, 83 (1954).
9. — Proceedings of the Conference on Electron Microscopy, London, 1954.

Contraste de phase et contraste interchromatique Etude comparée des méthodes

M. LOCQUIN

Muséum, Paris

Le fonctionnement du dispositif comportant un cône creux d'électron tangent au bord d'un diaphragme à bords amincis se révèle différent suivant :

- a) la plus ou moins grande tangence du cône sur les bords du diaphragme;
- b) l'épaisseur de l'objet.

Dans le cas des objets minces et lorsque le faisceau n'empiète pas sur les bords du diaphragme on a une image dont la structure ressemble exactement à l'image en contraste de phase d'un microscope photonique, c'est à dire que les contrastes dans certaines limites sont approximativement proportionnels à l'épaisseur de l'objet multipliée par son indice, c'est à dire dans le cas des électrons par les pots atomiques des structures traversées.

Dans le cas des objets épais pour un réglage du cône d'éclairage traversant les bords amincis du diaphragme la structure de l'image est totalement différente.

Avant de procéder à l'analyse détaillée de cette structure étant donné que les images possédaient un intervalle de contraste sur le négatif trop grand pour être aisément copiable sur un positif à l'aide de photons sans perte des détails nous avons mis au point avec MM. Mollinat et Weber un procédé de transposition en couleurs qui triple l'intervalle des densités copiables et dont voici le principe :

Du négatif unique on tire par voie photographique trois positifs correspondant à trois branches de densités croissantes du négatif. La première tranche est

obtenue par copie sur une émulsion à grand contraste à l'aide d'un temps de pose juste suffisant pour enregistrer les faibles lumières du négatif. Les grandes densités sont obtenues de la même façon mais en travaillant sur un positif intermédiaire.

La tranche moyenne est obtenue après confection d'un masque des grandes lumières du négatif que l'on superpose à celui-ci et tirage sur émulsion dure de l'image complexe ainsi obtenue.

A partir de ces trois clichés on tire trois matrices en gélatine qui sont imprégnées des trois couleurs fondamentales et déchargées successivement après repérage sur papier.

On obtient ainsi une transposition en couleurs des contrastes de l'image. Suivant l'ordre d'imprégnation des trois matrices on peut obtenir six images physiquement équivalentes mais donnant physiologiquement à l'œil de l'observateur une impression fort différente.

Seules deux images sont aisément interprétables, l'une dans le cas des fortes densités de l'objet, l'autre dans le cas des faibles densités. L'examen de ces images montre immédiatement que les contrastes ne sont pas comme dans le cas du contraste de phase proportionnels aux épaisseurs optiques de l'objet. Les contrastes semblent parfaitement indépendants de l'épaisseur de l'objet et liés uniquement aux poids atomiques des structures traversées. Pour en être certains nous avons effectué des microincinérations par bombardement électronique dans le corps du microscope lui-même des fibres observées et pris des images successives jusqu'au squelette minéral final.

Ainsi on a pu mettre en évidence que les parties de fibre dans lesquelles se trouvaient concentrés les

atomes de calcium étaient celles qui présentaient le plus grand contraste et que ce contraste était pratiquement indépendant de l'épaisseur de la fibre ou de ses détails.

Nous avons baptisé ce phénomène nouveau du nom de contraste interchromatique rappelant ainsi que le contraste naît entre des faisceaux d'électrons ayant subi d'abord au niveau de l'objet puis au niveau du diaphragme des pertes chromatiques approximativement équivalentes; le diaphragme objectif étant supposé homogène et l'objet hétérogène les pertes chromatiques subies à la traversée de l'objet diffèrent statistiquement suivant les points de celui-ci des pertes chromatiques moyennes en quelque sorte compensatrices subies à la traversée du bord mince du diaphragme.

La compensation parfaite ne pourra se faire que pour les quelques points de l'objet dont les poids atomiques seront en principe égaux aux poids atomiques des constituants du diaphragme.

L'augmentation et la différenciation des contrastes aura donc pour origine la plus au moins grande compensation des pertes chromatiques produites au passage à travers le diaphragme. Il en résulte un contraste proportionnel aux poids atomiques des structures traversées et pratiquement indépendant de l'épaisseur de l'objet.

Ceci n'est vrai en toute rigueur que pour une ouverture du système optique électronique non finie. Comme l'ouverture des objectifs est petite il faut superposer à ce phénomène l'effet de la diaphragmation et les contrastes deviennent alors liés aux poids moléculaires plus qu'aux poids atomiques de l'objet.

Der Einfluß von Temperatur, Unterlage und Bedeckung auf die Veränderung elektronenmikroskopischer Präparate

K.-J. HANSZEN

Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig

JEDER optische Abbildung ist mit einem Eingriff der abbildenden Strahlung in das untersuchte Objekt verbunden. Je kleiner die abzubildende Einzelheit um so größer die Wirkung des Eingriffs auf sie. Dieses grundlegende Gesetz läßt erkennen, wie sehr das Problem der Objektschäden im Elektronenmikroskop mit wachsender Vergrößerung an Tragweite gewinnt, da die unverfälschte Wiedergabe von Struktureinheiten, die auf Grund des apparativ erreichbaren Auflösungsvermögens noch möglich sein sollte, durch diese wesentlich behindert werden kann.

Die primäre Folge der Wechselwirkung zwischen den einfallenden Elektronen und dem Objekt bestehen in Anregung, Ionisation und anderen quantenhaften Veränderungen der getroffenen Moleküle, die

sekundäre Folge in einer pauschalen Erwärmung des ganzen Objekts. Durch vergleichende Betrachtung der im Elektronenstrahl und der bei Temperaturbehandlung hervorgerufenen Veränderungen in organischen Präparaten konnten König und Mitarb. (5, 6) die thermischen Schäden von denjenigen trennen, die auf spezifisch elektronische Wechselwirkungen zurückzuführen sind.

Aber auch die rein temperaturbedingten Schäden können im Elektronenmikroskop wesentlich anders verlaufen als die thermischen Umwandlungsvorgänge in reinen Substanzen (3, 4), da die Präparate im Elektronenstrahl einerseits mit der Trägerfolie, andererseits mit den sich auf ihnen niederschlagenden „Kohle“-Bedeckungen reagieren können. Aus

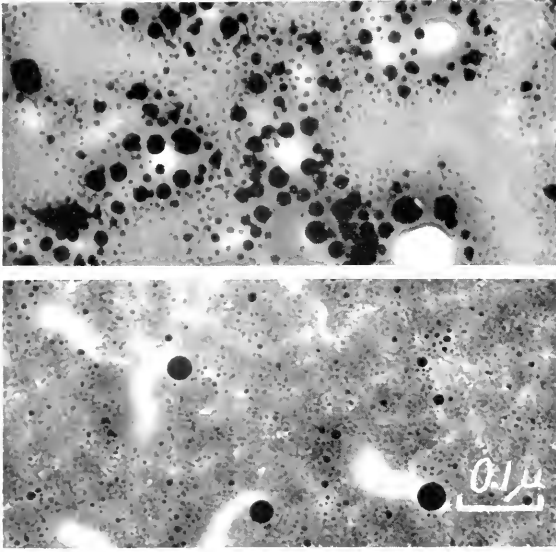


Fig. 1. Löcherbildungen in einer SiO₂-Trägerfolie durch Reaktion mit Kupferoxyd (oben) und mit Eisen (unten) bei hohen Bestrahlungsintensitäten.

diesem Grunde kommt z. B. der Temperaturbestimmung im Elektronenmikroskop durch Beobachtung von Schmelzprozessen und anderen thermischen Umwandlungen nur ein beschränkter Anwendungsbereich zu.

Ein Beispiel für eine Reaktion mit der *Unterlage* stellt die in Fig. 1a wiedergegebene Zerstörung einer SiO₂-Trägerfolie durch ein Kupfer(I)Oxydpräparat dar, die bei höheren Bestrahlungsintensitäten eintritt. Während der Reduktion des Oxyds im Elektronenstrahl reagiert dieses unter Löcherbildung mit der Unterlage. Da ähnliche Erscheinungen auch nach Tempern im Vakuumofen, hier allerdings erst über 900 °C, d. h. nach vollständiger Reduktion des Oxyds zu Kupfer beobachtet wurden, liegt es nahe, auch im Elektronenmikroskop einen hauptsächlich durch die Temperaturerhöhung bedingten Reaktionsablauf anzunehmen, der jedoch durch quantenbedingte Ursachen früher in Gang kommen kann, als auf Grund der pauschalen Temperaturerhöhung des Präparats zu erwarten ist. Ein weiteres Beispiel für die Löcherbildung in einer SiO₂-Unterlage durch Reaktion mit dem Präparat zeigt die Fig. 1b. Hier haben verdampfende Eisenkügelchen die Trägerfolie auf ihrem Weg angegriffen.

Von weitaus größerer Bedeutung ist der Einfluß der erwähnten „Kohle“-*Bedeckungen* auf die Präparatveränderungen. Ihre Mitwirkung bei den temperaturbedingten Umwandlungen wurde durch Vakuumtempn von Objekten ermittelt, die im Elektronenstrahl oder durch Bedampfen mit einer Kohledeckschicht versehen waren. Durch Vergleich der nach den Erhitzungen im Ofen beobachteten Veränderungen mit den im Elektronenmikroskop durch die Elektronenbestrahlung hervorgerufenen Schäden konnten Rückschlüsse auf den Einfluß der Bedek-

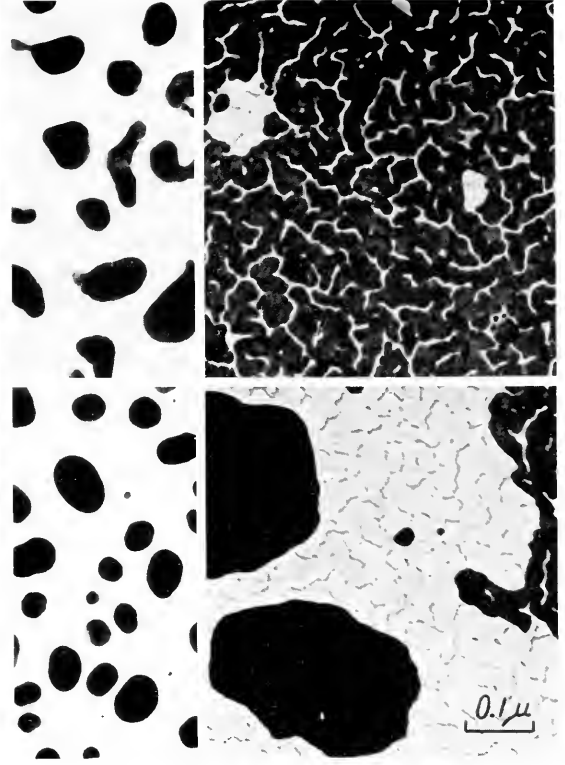


Fig. 2. Zerstörung einer 100 Å dicken Silberaufdampfschicht auf SiO₂-Unterlage durch Tempern im Vakuumofen. Linke Spalte: unbedeckte Schichten; oben: nach Tempern auf 200 °C; unten: auf 500 °C. Rechte Seite: Schichten mit einer im Elektronenmikroskop entstandenen Kohlebedeckung; oben: nach Tempern auf 200 °C; unten: auf 500 °C.

kungen bei den Veränderungen im Elektronenmikroskop gezogen werden.

Fig. 2 zeigt in der linken Spalte *Silberaufdampfschichten*, die vor der elektronenmikroskopischen Aufnahme einer kurzzeitigen Erhitzung unterworfen waren. Auf Grund von Adsorptionsschichten auf der Unterlage und der Schicht selbst besitzen die Atome an den Oberflächen der Silberpartikel eine so große Beweglichkeit, daß sich die Teilchen bei den Erhitzungen auf die angegebenen Temperaturen bereits vollständig abgerundet haben.

Ganz anders verhalten sich Präparate, die schon vor dem Tempern dem Elektronenstrahl ausgesetzt waren, also mit „Kohle“ überdeckt waren (Fig. 2, rechte Spalte). In diesen Fällen vermag die Kohle die morphologische Schichtstruktur noch bei 200 °C praktisch vollständig zu schützen. Bei höheren Temperaturen tritt dagegen eine vermehrte Aggregation der Silberschicht zu groben Klumpen ein. Es sieht so aus, als ob jetzt durch die Kohlebedeckung eine weitere Lockerung der Atome an den Oberflächen der Silberpartikel verursacht wird, die sich in einer gesteigerten *Beweglichkeit* dieser Atome auswirkt. Für die Möglichkeit einer solchen Herabsetzung der Bindungsfestigkeit der Oberflächenatome gegenüber dem Kristallgitter spricht auch die Tatsache, daß selbst in den durch die Bedeckung geschützten

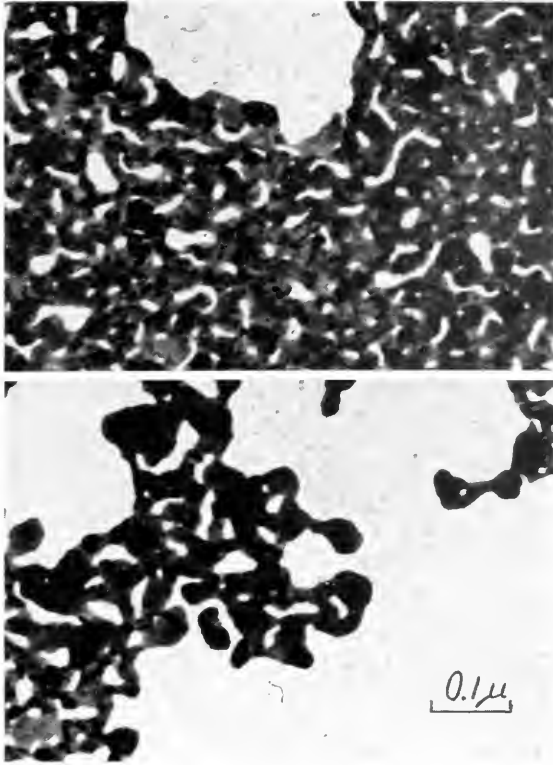


Fig. 3. Zerstörungen einer 100 Å dicken Silberaufdampfschicht durch Bestrahlungen im Elektronenmikroskop. Unter den gewählten Fokussierungsbedingungen sublimiert die Schicht ohne Aggregation.

Schichten an einzelnen Stellen eine Lückenbildung durch *Sublimation* der Silberpartikel eingetreten ist (s. Fig. 2). Die Vorstellung, daß es sich hier um eine bevorzugte Oberflächenverdampfung des Silbers unter der Einwirkung der Umhüllung handelt, wird durch die Tatsache bestätigt, daß Lückenbildungen dieser Art bei einer Zerstörung der Schicht durch Bestrahlung im Elektronenmikroskop in erhöhtem Maße auftreten; denn in diesem Fall ist die Wirkung der Bedeckung besonders stark, da sie sich während der „Verdampfung“ auf der frisch gebildeten Silberoberfläche immer wieder neu niederschlagen kann. So erklärt es sich, daß Silberschichten im Elektronenstrahl unter geeigneten Umständen ohne vorherige Aggregation vollständig abdampfen können (Fig. 3).

Zur Klärung der Ursache für die vermehrte Sublimation der Aufdampfschichten durch die Bedeckungen soll Fig. 4 herangezogen werden. Sie zeigt einen im Verdampfungsstand mit 200 Å Kohle überdeckten Silberkeil nach Tempern auf 185 C. In diesem Bild fällt auf, daß die größten Zerstörungen nicht im dünnsten Schichtbereich auftreten, sondern bei einer Schichtdicke, die mit der Stärke der Kohlebedeckung korrespondiert. Hieraus glauben wir, den Verdampfungsmechanismus nach folgender Vorstellung erklären zu können:

Während die aufgedampfte Kohle die Schichtstrukturen am dünnen Ende des Silberkeils lückenlos

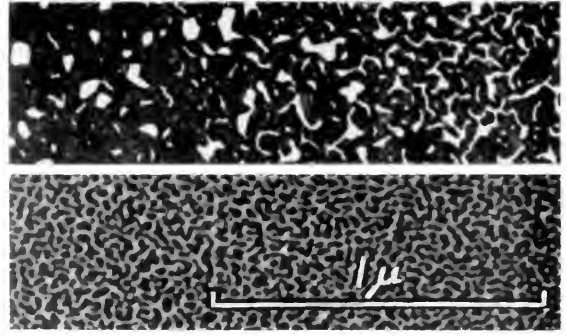


Fig. 4. Zerstörungen in einer keilförmigen Silberschicht, die durch Bedampfung mit einer 200 Å dicken Kohleschicht bedeckt wurde, durch Tempern auf 185 C. Die Lückenbildung tritt vornehmlich bei einer Silberdicke von 200 Å auf.

zudeckt und konserviert, liegt bei den größeren Schichtdicken nur eine unvollständige, schneehäubchenartige Bedeckung vor (Fig. 5). Vor allem an den Rissen in der Silberschicht tritt eine Unterbrechung der Bedeckung auf. Die Kohle wandert aber an diesen Stellen auf Grund ihrer großen Oberflächenbeweglichkeit weit in das geometrische Schattengebiet hinein und überzieht dort das Silber mit einer extrem dünnen Absorptionsschicht, die zu der besprochenen Lockerung der Oberflächenanome des Silbers Anlaß geben kann, so daß die beobachtete Sublimation möglich ist. Bei stärkerer Erhitzung lösen sich schließlich, von diesen Stellen ausgehend, die Hüllen vollständig auf und geben zu den gefundenen Aggregationen Anlaß. Eine Bestätigung für diese Erklärung bietet die Tatsache, daß unter wechselndem Winkel bedampfte Silberschichten nach dem Tempern we-

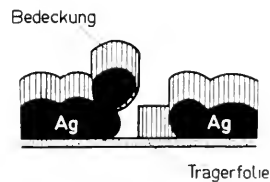


Fig. 5. Querschnitt durch eine kohlebedeckte Silberschicht.

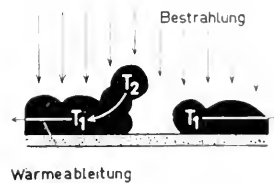


Fig. 6 a.

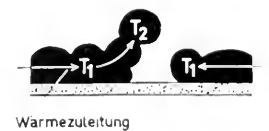


Fig. 6 b.

Fig. 6. Schema der Wärmezuleitung und -ableitung. a) im Elektronenstrahl, b) im Vakuumofen.

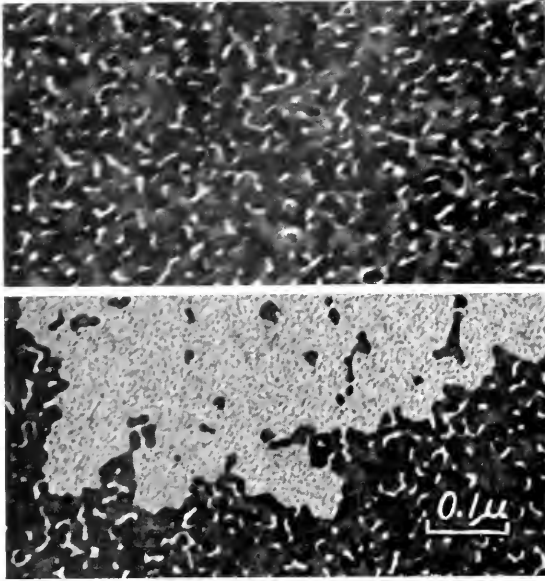


Fig. 7. Zerstörungen in einer Wismutaufdampfschicht auf SiO₂-Unterlage durch Vakuumtempern auf 200 C. Oben: Unbedeckte Schicht mit Verschmutzung; unten: Schicht, mit einer im Elektronenmikroskop entstandenen Kohlebedeckung.

niger Lücken aufweisen als nur senkrecht bedampfte Silberschichten.

Lückengebilden der besprochen Art sind von Bryant und Mitarbeiter (1) erstmalig an *Wismut* beobachtet worden. Sie erklärten diese Erscheinung als eine Verdampfung der Schicht an Stellen herabgesetzter Wärmeleitfähigkeit durch mangelnden Kontakt mit der Unterlage. Daß jedoch diese Erklärung den wesentlichen Kern des Vorgangs nicht trifft, lehrt die Tatsache, daß die gleichen Schäden auch beim Tempern im Ofen auftreten, wo ganz andere Wärmeerzeugungs- und -ableitungsbedingungen vorliegen und nach solchen Überlegungen der beobachtete Effekt nicht auftreten dürfte (Fig. 6).

Der Dampfdruck des Wismuts liegt um mehrere Zehnerpotenzen höher als der von Silber. Aus diesem Umstand erklärt es sich, daß bei diesem Metall auch Lückengebilden durch Tempern unbedeckter Schichten, bevorzugt an verunreinigten Stellen, auftraten. Daß auch hier die Verdampfung durch die Kohlehülle wesentlich gefördert werden kann, ist aus Fig. 7 zu entnehmen.

Während beim Tempern von Silber auf niedrigere Temperaturen noch der schützende Einfluß der Umhüllung vorherrscht, tritt an *Kupferschichten* schon unter den gleichen Bedingungen der gegenteilige Effekt ein: Bedeckte Kupferaufdampfschichten auf SiO₂-Träger weisen bereits bei niedrigeren Temperaturen Lücken auf, während unbedeckte Schichten noch nicht verändert sind. Ebenso findet bei höheren Temperaturen unter der Bedeckung eine vorzeitige Aggregation statt¹ (Fig. 8).

Bei der Interpretation dieser Befunde ist zu beden-

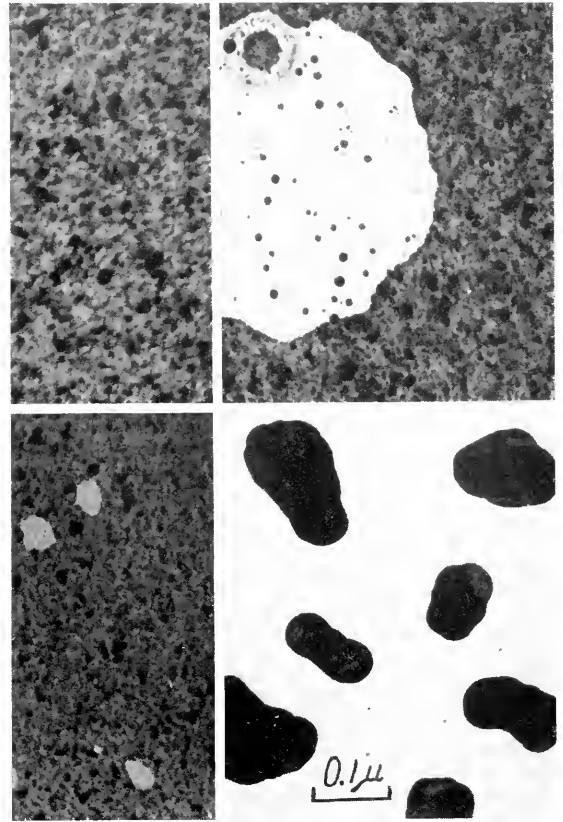


Fig. 8. Zerstörungen in einer Kupferaufdampfschicht auf SiO₂-Unterlage durch Tempern im Vakuumofen. Oben: Auf 350 C; unten: Auf 400 C. Linke Spalte: Unbedeckte Schichten, im unteren Bild beginnt Sammelkristallisation; rechte Spalte: Schichten, mit einer im Elektronenmikroskop entstandenen Kohlebedeckung.

ken, daß das Kupfer mit seiner starken Affinität zum Sauerstoff einen Reaktionsmechanismus aufweist, der beim Silber unbekannt ist. In den Elektronenbeugungsdiagrammen der Kupferaufdampfschichten traten stets neben den Cu-Reflexen diejenigen von Cu₂O auf. Daraus ist zu schließen, daß die Aufdampfschichten von einer dünnen Oxydulschicht überzogen sind, die eine ähnliche Schutzwirkung auf das darunter liegende Kupfermetall ausübt, wie es oben von den Kohlebedeckungen auf Silber dargelegt wurde. An Hand der Beugungsdiagramme kann man belegen, daß die Zerstörungen der Kupferschicht erst dann beginnen, wenn durch die eintretende Temperaturerhöhung die Oxydulschicht zerstört ist. Nun findet aber, wie Erdmann-Jesnitzer und Günther (2) darlegten, das Verschwinden dieses Oxyds nicht erst bei Überschreiten der Dissoziationskurve statt. Vielmehr liegt der Dampfdruck des Oxyduls so hoch, daß bereits bei niedrigeren Temperaturen seine Sublimation eintritt. Nach dieser Verdampfung der Deckschicht hat aber der restliche

¹ Auf Kohleunterlage ist die Beweglichkeit des Kupfers so groß, daß die Aggregation bereits auftrat, bevor eine Lückenbildung zu beobachten war.

Sauerstoff in der Vakuumapparatur Zutritt zu der reinen Kupferoberfläche und kann mit dieser wieder zu Cu_2O reagieren, da wir uns noch oberhalb der Dissoziationsdruckkurve befinden. Hiermit kann das Spiel von neuem beginnen, bis das ganze Kupfer verdampft ist. Die Oxydulschicht hat also bezüglich der Verdampfung eine Art katalytische Wirkung.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, daß bei den hier behandelten Mikrostrukturen wesentliche Verschiebungen der Gleichgewichtskurven auftreten können, bedingt durch die bekannten Effekte „kleiner Tröpfchen“ usw. Temperungsversuche an zu CuO durchoxydierten Kupferaufdampfschichten, die unter gleichen Bedingungen wie die Kupfererhitzungen angestellt wurden, bestätigten dieses: Die Reduktion zu Oxydul tritt schon bei etwa 270 C, die zu Kupfer kurz unterhalb 400 C ein¹, letztere also in dem Temperaturbereich, in dem sich die ersten Zerstörungen an unbedeckten Kupferschichten bemerkbar machten. Im Gegensatz zu den Verhältnissen an unbedeckten Schichten hat man es bei Vorhandensein von Kohlebedeckungen nicht mit echten Gleichgewichtszuständen, sondern mit reaktionsfähigen Partnern im gehemmten Gleichgewicht zu tun. Hier kann also bereits vor der besprochenen Sublimation des Oxyduls seine Aufzehrung durch die Kohle eintreten. Ausschließend vermag die Bedeckung auf Kupfer ähnliche Wirkungen wie auf Silber auszuüben. Dieses steht im Einklang mit unserer Erfahrung, daß die Lückenbildung und Aggregation bedeckter Schichten bei niedrigeren Temperaturen eintritt als von unbedeckten Schichten.

¹ Es est zu beachten, daß die Oxyde mit der SiO_2 -Unterlage in Berührung stehen. Veränderungen der Trägerfolie, wie sie anfangs beschrieben wurden, treten bei den hier benutzten Temperaturen allerdings noch nicht auf.

Eine Angabe des Zersetzungsmechanismus nach stöchiometrisch festgelegten Umsetzungen, wie sie im vorliegenden Beispiel versucht wurde, scheint nur in wenigen Fällen möglich. Wie verwickelt aber auch die Umstände im Einzelfall liegen, der wesentliche Vorgang all dieser Erscheinungen scheint in der Lockerung der Oberflächenatome durch dünnste Adsorptionsschichten zu liegen.

Die mitgeteilten Ergebnisse beziehen sich in der Hauptsache auf Präparatveränderungen durch Tempern, unter Berücksichtigung der möglichen Reaktionen mit Unterlage und Bedeckungen. Es wurde also Thermodynamik — oder besser gesagt Thermo- statik — elektronenmikroskopischer Präparate betrieben. Neben den allgemeinen Bedenken, die man bei der Anwendung der Gleichgewichtslehre auf reale Verhältnisse hegen muß, ist besonders zu beachten, daß die Objekte im Gegensatz zu den Versuchen im Vakuumofen unter dem Elektronenstrahl nur noch sehr bedingt thermodynamische Systeme darstellen. Vor allem sind die unter diesen Umständen auftretenden spezifisch elektronischen Effekte auf dem oben beschrittenen Wege nicht erfassbar. Um ihren Einfluß zu beschreiben, bedarf es noch zahlreicher Versuche auf anderer Grundlage.

LITERATUR

1. BRYANT, P. J., RHOADS, U. H., und WEBER, A. H., *J. Appl. Phys.* **25**, 13, 43 (1954).
2. ERDMANN-JESNITZER, F. und GÜNTHER, F., *Z. Metallkunde* **45**, 407 (1954).
3. HANSZEN, K.-J., *Physik. Verhandl.* **6**, 36 u. 58 (1955). (Kurze Sitzungsber.)
4. — *Z. Naturforsch.* **11a**, 878 (1956). *Z. VDI* **98**, 1709 (1956).
5. KÖNIG, H., *Z. Physik* **129**, 483 (1951).
6. KÖNIG, H., KNOCH, M., und BROCKES, A., *Z. wiss. Mikroskop.* **62**, 450 (1955).

IV

HIGH RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPY AND
ELECTRON DIFFRACTION

Der Durchgang von Elektronenstrahlen durch das Kristallgitter und seine Folgen für das elektronenmikroskopische Bild

H. NIEHRS

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem

VOR kurzem sind von Menter (2) die ersten elektronenmikroskopischen Abbildungen von Kristallgitterstrukturen gezeigt worden. Sie mögen insofern noch als recht roh erscheinen, als nicht die Anordnung der einzelnen Moleküle oder Atome sichtbar wird, sondern nur das streifenförmige Bild einer bestimmten Netzebenenschar auftritt. Jedoch scheint der Zeitpunkt nicht fern zu sein, da die Elektronenmikroskopie systematisch als Mittel zur Aufklärung von Kristallgitterstrukturen und ihren Störungen eingesetzt wird.

Bei diesem Stande der elektronenoptischen Auflösung, der in einigen weiteren Vorträgen am heutigen Nachmittag zur Sprache kommen wird, ist es wohl auch von Interesse, sich darüber klar zu werden, welches Bild ein ideales, ungestörtes Kristallgitter im Elektronenlicht überhaupt zeigen kann; welche *Elektronenstromverteilung in der beobachteten Strahlaustrittsfläche* des Kristalls auftritt, und wie sie von der Bestrahlung und der Objektdicke abhängt. Bei den in Frage kommenden Schichtdicken von bis zu einigen Hundert Å ist es wesentlich die *elastische Streuung im inhomogenen Potentialfeld* des Kristallgitters, die die Inhomogenität der Strahldichte in der Austrittsfläche hervorruft und das Aussehen des Kristallgitters bestimmt. Daher ist grundsätzlich die *dynamische Theorie der Elektroneninterferenzen* berufen und instande, über die oben gestellten Fragen Auskunft zu geben; denn gerade sie beschreibt das Verhalten von Elektronenstrahlen beim Durchgang durch das periodische Potentialfeld des Kristallgitters. Auf diese Bedeutung der dynamischen Beugungstheorie für die Deutung von elektronenmikroskopischen Kristallstrukturbildern möchte ich hinweisen und die Aussagen der Theorie in groben Umrissen darlegen.

Von dieser dynamischen Theorie unterscheidet sich die bekanntere *geometrische Theorie* im wesentlichen durch die Voraussetzung, daß die abgelenkten Strahlen — verglichen mit dem Primärstrahl — sehr schwach sind, so daß einerseits alle Elementarbereiche des Kristalls von der gleichen Primärintensität getroffen werden, und daß andererseits abgelenkte Strahlen keine nennenswerte weitere Abbeugung erleiden. Erfüllt ist diese Voraussetzung in sehr dünnen Kristallen oder bei mangelhaft erfüllter Interferenzbedingung. Infolge ihrer Annahme braucht die geometrische Theorie für ihr Ziel, die Beschreibung des Beugungsbildes, nicht die *Vorgänge im Kristallgitter selbst* in Betracht zu ziehen.

Die *dynamische Theorie* geht grundsätzlich anders vor. Sie untersucht zunächst, in welcher Form die

Elektronen das Kristallgitter überhaupt durchlaufen können, d. h. die möglichen sog. Wellenfelder. In einer zweiten Stufe liefert das Studium der Grenz- und Abstrahlungsbedingungen an der Strahleneintrittsfläche sodann die Stärken der hier abgestrahlten Wellenfelder. In einer dritten Stufe werden schließlich die von der Strahlaustrittsfläche abgestrahlten Interferenzstrahlen bestimmt. Die dynamische Theorie betrachtet also wesentlich das dynamische Gleichgewicht der im Kristall auftretenden Wellenfelder, wenn eine primäre Erregung vorliegt. Diese Behandlung hat den Vorzug, daß sie 1. auch *starke* Interferenzwirkungen beschreiben kann, und daß sie 2. auch Aussagen über das Geschehen *im* Kristallgitter macht. In Übereinstimmung mit den Beugungsbeobachtungen ergibt sich, daß schon für Kristalldicken von etwa 100 Å bei bestimmten Kristallorientierungen die dynamischen Wechselwirkungen erheblich sein können, sodaß die geometrische Theorie dann recht unzulänglich wird, während die dynamische Theorie alle experimentellen Ergebnisse der Elektronenbeugung zu erklären erlaubt. Diese Tatsache scheint mir zu rechtfertigen, daß sich auch die Elektronenmikroskopie ihrer vertrauensvoll bedient, wenn es sich um Abbildungen des Kristallgitters handelt.

Die Grundaussage der dynamischen Theorie ist, daß die Elektronen das Kristallgitter im allgemeinen nicht in Form von ebenen Wellen, sondern nur in Form von Wellengruppen besonderer Struktur

$$\Psi(\mathbf{K}, \mathbf{r}) = \text{const.} \sum_{\mathbf{h}} u_{\mathbf{h}} \cdot e^{-2\pi i(\mathbf{K} + \mathbf{h}_{\mathbf{h}} \cdot \mathbf{r})},$$

den schon erwähnten *Wellenfeldern* durchlaufen. Sie können gedanklich als Superpositionen ebener Wellen mit den Wellenvektoren $\mathbf{K} + \mathbf{h}_{\mathbf{h}}$ aufgefasst werden, worin $\mathbf{h}_{\mathbf{h}}$ den reziproken Gittervektor zum Indextripel $h = (h_1, h_2, h_3)$ bedeutet, d. h. einen Vektor senkrecht zur Netzebenenschar h , dessen Betrag gleich dem Reziproken des Netzebenenabstands ist. \mathbf{K} ist ein für das betreffende Wellenfeld charakteristischer Grundvektor, durch den auch die Partialamplituden $u_{\mathbf{h}}$, also die Struktur des Wellenfeldes, eindeutig festgelegt ist, allerdings bis auf den voranstehenden konstanten Faktor, der die Stärke des Wellenfeldes beschreibt. (\mathbf{r} ist der Ortsvektor im Kristall.)

Trifft ein Primärstrahl einheitlicher Richtung und Energie auf die Grenzfläche des Kristalls, so setzt er sich in diesem in einer Linearkombination

$$\sum_{\mathbf{f}} \Psi(\mathbf{K}_{\mathbf{f}}, \mathbf{r})$$

solcher Wellenfelder fort, wobei die verschiedenen Grundvektoren \mathbf{K}_j der einzelnen Wellenfelder sich selbst zwar sehr wenig voneinander und von dem primären Wellenvektor unterscheiden, die Amplitudenstruktur der Wellenfelder aber sehr unterschiedlich sein kann. Die Anzahl der in dieser Linearkombination enthaltenen Wellenfelder ist eng verknüpft mit der Anzahl ($N + 1$) der Partialwellen je eines Wellenfeldes, wobei N zugleich die *Multiplizität der Interferenz* ausdrückt. Tatsächlich würde im interferenzfreien Fall $N = 0$ nur 1 Wellenfeld bestehend aus nur 1 Partialwelle $h = (000)$ auftreten. Dieser interferenzfreie Fall kommt aber praktisch nie vor, und es sei sogleich bemerkt, daß es besonders bei der Bestimmung der Stromverteilung in der Strahlaustrittsfläche des Kristalls meistens wesentlich auch auf die zahlreichen schwachen Interferenzen ankommt. Bei einer N -fachen Interferenz treten, von Sonderfällen abgesehen, als Fortsetzung des Primärstrahls bei Durchstrahlung $N + 1$ Wellenfelder auf, von denen jedes eine *unabgebeugte* Partialwelle zum Indextrüpel $h = (000)$, sowie N *abgebeugte* Partialwellen zu Indextrüpelele $h \neq (000)$ umfasst.

Die gruppenweise Zusammenfassung der insgesamt $(N + 1)^2$ Partialwellen im Kristall zu $N + 1$ Wellenfeldern mag zunächst recht willkürlich und sinnlos erscheinen; sie hat aber einen sehr realen physikalischen Grund. Die partiellen Lösungen der Schrödingergleichung im Kristallraum sind eben nicht die einzelnen ebenen Partialwellen, sondern nur die kompletten Wellenfelder. Nicht die einzelnen ebenen Partialwellen, wohl aber die einzelnen Wellenfelder können im Kristall unabhängig voneinander fortschreiten. Das *Wellenfeld* ist mithin Träger der Elektronenströmung, und bei genügend engem Strahlquerschnitt stellt es einen Elektronenstrahl mit eigener Strombahn bestimmter Richtung dar. Die *Fortschreitungsrichtung* eines Elektronenstrahls im Kristall ist daher nicht unmittelbar durch die Wellenvektoren $\mathbf{K} + \mathbf{b}_h$ gegeben, sondern durch den *Stromdichtevektor* des kompletten Wellenfeldes. Es ist daher besser, den Elektronenstrahl im Kristall nicht als Superposition von ebenen Wellen, sondern als eine *Elektronenströmung, die mit der Periodizität des Gitters moduliert* ist, aufzufassen.

Die Multiplizität der Wellenfelder andererseits bedeutet, daß der Primärstrahl sich beim Eintritt in den Kristall unter *Mehrfachbrechung*, bei N -fach-Interferenz unter $(N + 1)$ -fach-Brechung, fortsetzt. Ebenso erleidet das einzelne Wellenfeld im Kristall beim Auftreffen auf eine Grenzfläche eine Mehrfachreflexion in neue Wellenfelder, die jedoch praktisch stets zu vernachlässigen sind. Beim Austritt aus dem Kristall freilich zerfällt das Wellenfeld (unter gleichzeitiger Brechung) in seine Partialwellen, da diese *im Vakuum unabhängig voneinander* als Interferenzstrahlen weiterlaufen können. Erst hier bestimmt der (durch Brechung modifizierte) Wellenvektor $\mathbf{K} + \mathbf{b}_h$ wieder die Strahlrichtung.

Unter den üblichen experimentellen Bedingungen

haben die von den verschiedenen Wellenfeldern j umfaßten Partialwellen *gleichen* Indextrüpele h nur sehr wenig verschiedene Wellenvektoren $\mathbf{K}_j + \mathbf{b}_h$. Zusammen liefern sie nach Austritt einen *aufgespaltenen* Interferenzstrahl h , wobei die Stärke der Aufspaltung sehr wesentlich auch von der Lage der Austrittsfläche abhängt. *Beim planparallelen Kristall* setzen sie sich gerade zu *einem unaufgespaltenen* Interferenzstrahl zusammen.

Die Superposition der Partialwellen zu verschiedenen Indextrüpele h erzeugt in der Strahlaustrittsfläche eine charakteristische Elektronenstromverteilung, die die periodische Struktur des Kristallgitters widerspiegelt. Hinsichtlich der Intensitäten jedoch besteht keine einfache Korrelation mit der Potentialverteilung im Kristallgitter. Lediglich wenn die Primärstrahlrichtung in eine *Symmetrieachse* des Kristalls fällt, darf man erwarten, daß vor den Atomen der Austrittsfläche sich auch *Symmetriezentren* (Maxima oder Minima) *der Intensität* ausbilden. Die Multiplizität der Wellenfelder äußert sich beim planparallelen Kristall ferner in einer Abhängigkeit der Stromverteilung von der Kristalldicke. Diese Abhängigkeit ist bei N -facher Interferenz darstellbar durch Superposition von N periodischen Funktionen der Kristalldicke. Über die Ergebnisse einer solchen Berechnung der Stromverteilung in der Strahlaustrittsfläche des MgO-Kristalls wird andernorts berichtet (3).

Bei Durchstrahlung *keilförmiger Kristallbereiche* von Polyedern erscheint diese Dickenabhängigkeit bereits *innerhalb eines* elektronenmikroskopischen Bildes, da der Strahlweg im Kristall dann von Objektpunkt zu Objektpunkt variiert. Im Falle der einfachen Interferenz z. B., bei der im Kristall 2 Wellenfelder laufen, tritt im Bild die bekannte einfach-periodische Streifung parallel zu den brechenden Kanten auf, wie sie erstmals von Heidenreich und Kinder (1942 43) beobachtet und von Kossel (1943) als „Linien gleicher Kristalldicke“ gedeutet worden ist. Bei der Auflösung von Kristallgitterstrukturen im elektronenmikroskopischen Bild würde sich diese Streifung mit ihren Periodenbreiten von etwa 100 Å der gitterperiodischen Stromverteilung überlagern, wodurch sich unter Umständen ein ziemlich kompliziertes Bild ergibt.

Zum Abschluß sei noch ein Hinweis auf die *Absorption* der Elektronenstrahlen, genauer die Schwächung der kohärenten Bündels, im Kristall gestattet. Eine der Optik analoge Erweiterung der dynamischen Theorie unter Berücksichtigung der Absorption läßt vermuten, daß die verschiedenen, als Folge der Interferenzen auftretenden Wellenfelder sich nicht nur hinsichtlich der Brechung, sondern auch hinsichtlich der Absorption verschieden verhalten. Dies läßt sich im einfachsten Falle am Beispiel optimaler Einfachinterferenz anschaulich in folgender Weise verstehen: Die beiden in diesem Falle auftretenden Wellenfelder enthalten je 2 Partialwellen und stellen Elektronenstrahlen dar, die

quer zu der die Interferenz hervorruhenden *Netzebenen* *schar moduliert* sind und *parallel* zu dieser Netzebenen *schar fortschreiten*. Die Modulation des *einen* Wellenfeldes ist derart, daß die Stromdichte *maxima*, die Schwebungsbäuche, *genau in* den Netzebenen, die Stromdichteminima, Schwebungsknoten, in der Mitte *zwischen* den Netzebenen liegen. Genau umgekehrt ist die Modulation des *anderen* Wellenfeldes: *Maxima zwischen*, *Minima in* den Netzebenen. Das erste Wellenfeld führt seinen Elektronenstrom also hauptsächlich *in den Atomebenen*, das zweite Wellenfeld hauptsächlich *zwischen* den Atomebenen durch das Kristallgitter. Es ist verständlich, daß der Elektronenstrom des ersten Wellenfeldes von der Absorption durch die Atome stärker betroffen wird als der des zweiten Wellenfeldes. Theorie und Beugungsbeobachtungen (1) zeigen übereinstimmend — quantitative Messungen liegen freilich nicht vor —, daß von den beiden bei Einfachinterferenz beobachteten Wellenfeldern das eine übernor-

mal stark, das andere übernormal schwach im Kristallgitter absorbiert wird. In der elektronenmikroskopischen Beobachtung sollte sich dieser Effekt in einer *übernormalen Durchlässigkeit* von Kristallen größerer Dicke *bei Interferenzstellungen* kundtun. Vielleicht bietet sich dadurch die Möglichkeit bei hinreichender elektronenmikroskopischer Auflösung, den Strahlweg im Kristall zu demonstrieren oder auch Kristallgitter größerer Dicke abzubilden.

Ich möchte nicht versäumen zu erwähnen, daß die Entwicklung, der hier skizzierten Theorie weitgehend gefördert worden ist durch analoge Beobachtungen und Überlegungen von v. Laue und von Borrmann auf dem Gebiet der Röntgeninterferenzen.

LITERATUR

1. ALTENHEIN und MOLIERE, *Z. Physik* (1954).
2. MENTER, J. W., *Proc. Roy. Soc. A* **236**, 119 (1956).
3. NIEHRS, H., *Optik* (1956).

The Resolution of Crystal Lattices

J. W. MENTER

Tube Investments Research Laboratories, Hinxton Hall, Essex.

THE possibility of resolving atoms in the electron microscope has been discussed by a number of workers including Hillier (4), Schiff (8), Boersch (2), Scherzer (7) and Haine (3). The basic assumption of their treatments has been to consider two isolated atoms each forming its own Airy disc pattern in the image. It is assumed that there is no coherence between the electrons scattered from these two point objects and the criterion for resolution is that the intensity dip between the Airy disc patterns shall just be perceptible. If the atoms or molecules are arranged in a regular array, as in a crystal lattice, for example, resulting in definite phase relationships between electrons scattered from neighbouring atoms then the mechanism of image formation is rather different. Strong diffracted beams are formed and it

has been pointed out by some of these workers that under these conditions the instrumental resolution required to resolve regular arrays of atoms or molecules is not so high as in the case of isolated noncoherent objects. The resolving power of the Siemens Elmiskop I as limited by the diffraction error and spherical aberration alone is 2.8 \AA . This is worsened in practice by the chromatic error and astigmatism to 7 \AA . We were thus encouraged to attempt the direct observation of crystal lattices in crystals with relatively large lattice parameters. After the macromolecular crystals of viruses and proteins, the structures of which have been beautifully demonstrated by Wyckoff (9) using replica methods, the most likely class of compounds with smaller lattice parameters are organic molecules

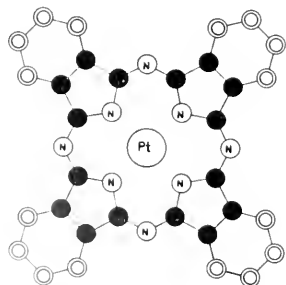


Fig. 1. Schematic projection of platinum phthalocyanine molecule normal to the phthalocyanine ring (after Robertson and Woodward 1940). ● C; ○ CH; ○, N.

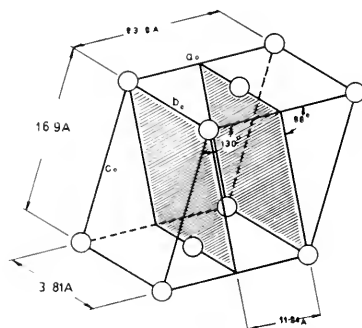


Fig. 2. Unit cell of platinum phthalocyanine crystal. Circles represent molecules, the metal atoms being situated at the centre of the circle.

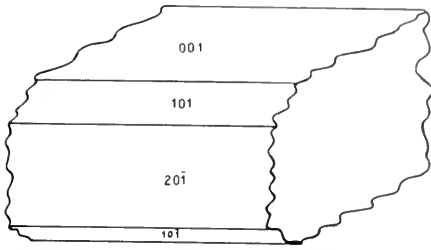


Fig. 3. Crystal habit of copper phthalocyanine (after Robertson, 1934).

with intermediate molecular weights. Among these the phthalocyanines appeared a promising group to study and most of our work so far has been carried out on copper and platinum phthalocyanine.

The metal phthalocyanines have a number of favourable properties. The molecule of platinum phthalocyanine is shown in figure 1, and the unit cell of the crystal lattice in figure 2. From these it is apparent that we may idealise the structure into widely spaced planes of heavy metal atoms ($d_{201} = 11.94 \text{ \AA}$) embedded in a matrix of the light elements carbon, nitrogen and hydrogen. We would expect to obtain strong diffracted beams from these planes even in very thin crystals since the scattering from the heavy metal atoms swamps that from the organic parts of the unit cell. The crystals grow as long thin ribbons with (001) as the habit plane of the ribbon surface as shown in figure 3, so that crystals supported on a specimen grid will be oriented with (001) perpendicular to the electron beam and (20 $\bar{1}$) almost

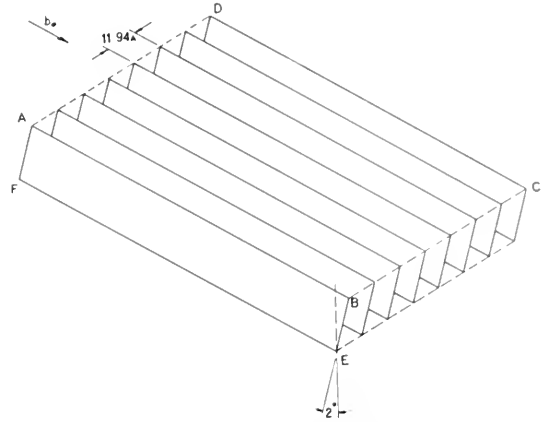


Fig. 4. Schematic representation of (20 $\bar{1}$) planes in platinum phthalocyanine in relation to crystal habit. ABCD is a (001) plane. The almost vertical sheets such as ABEF are (20 $\bar{1}$) planes.

parallel to the beam, since $(001) \wedge (20\bar{1}) = 88^\circ$. The (20 $\bar{1}$) planes are thus in a favourable orientation for diffraction, which is essential in order to form an image of the planes. A schematic representation of the nearly vertical (20 $\bar{1}$) planes is shown in figure 4. In copper phthalocyanine the corresponding parameters are $(001) \wedge (20\bar{1}) = 80^\circ$, $d_{201} = 9.8 \text{ \AA}$.

Preparation of specimens and method of examination.—The crystals were prepared by sublimation from the powder after the method of Barrett, Dent & Linstead (1). After mechanical breaking down to reduce their size they were suspended in ethyl alcohol, and a drop of the suspension dried down on to a

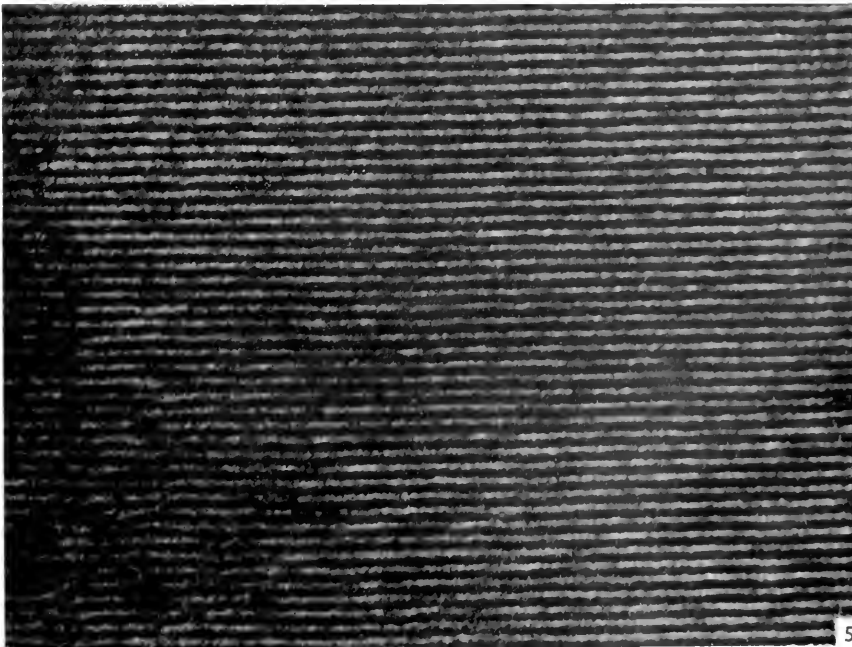


Fig. 5. Portion of platinum phthalocyanine crystal showing perfect structure of (20 $\bar{1}$) planes ($\times 1,500,000$).

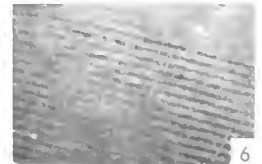


Fig. 6. Single edge dislocation in platinum phthalocyanine crystal ($\times 1,000,000$).

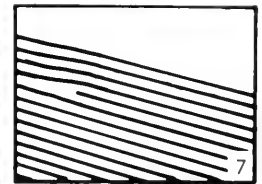


Fig. 7. Guide to figure 6 showing exact position of edge dislocation.

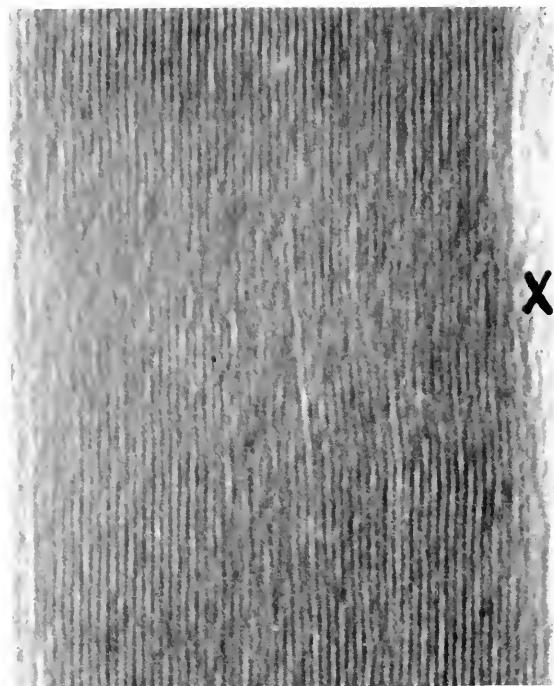


Fig. 8. Copper phthalocyanine crystal showing dislocated region associated with change in width of crystal.

nitrocellulose supporting film, containing a large number of holes. It was found that the image was seen to the best advantage when not overlaid with the structure of the supporting film. The specimens were examined in the Elmiskop I operated at 80 kV, using the fine focus condenser (aperture 200μ) and a 50μ objective aperture (unless otherwise stated) and recorded on Ilford Contrasty Lantern plates at a magnification of 77,000 times.

Results. Platinum phthalocyanine.—A considerable number of plates revealed the structure shown in figure 5, consisting of a series of parallel lines in the $[010]$ direction, the spacing of which was 12.0 \AA , averaged from measurements on 26 crystals with a standard deviation of 0.2 \AA (see Table 1). These lines may be regarded as the image of the projection of $(20\bar{1})$ planes seen edge on. Bent crystals have been observed in which the bending of the crystal planes follows the external form of the crystal as would be expected. Imperfections are sometimes seen in the structure in the form of edge dislocations. A particularly simple example is shown in figure 6, the exact position of the incomplete plane being clarified by the sketch in figure 7 which has been copied from the micrograph.

Copper phthalocyanine.—Similar results have been obtained with copper phthalocyanine, although less frequently, since the probability of finding a crystal in a suitable orientation for diffraction is lower on account of the smaller value of $(001) \cdot \Delta(20\bar{1})$. Two values have been obtained for the spacing of the planes. The first $10.30 \pm 0.3 \text{ \AA}$ averaged from eight measurements differs significantly from the x-ray

value of 9.8 \AA , and a few isolated values of about 13 \AA have been observed. There are a number of possible reasons for this discrepancy which are discussed more fully elsewhere (5). A particularly good example of a dislocated lattice is shown in figure 8 where a severe disturbance of the lattice is associated with a change in width of the crystal at the point X. Cracks have been observed in crystals in which the crack may be seen to propagate from one plane to its neighbour as it traverses the lattice.

Sodium faujasite.—This is the first inorganic material in which the crystal planes have been resolved. It is a network silicate structure with the composition $2\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{CaO} \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot 10 \text{SiO}_2 \cdot 20 \text{H}_2\text{O}$, being cubic with $a_0 = 24.84 \text{ \AA}$. The (111) spacing is 14.37 \AA and the mean of measurements from 16 micrographs gives $d_{(111)} = 14.4 \pm 0.2 \text{ \AA}$ (see Table 2). Figure 9 shows a crystal of this compound revealing the (111) planes. Fig. 10 shows a crystal viewed along the $[110]$ axis in which two sets of (111) planes intersecting at 70° are resolved.

Mechanism of image formation.—The crystals being thin, form a cross-grating diffraction spectrum since the third Laue condition for diffraction from

TABLE 1. Spacing of lines in platinum phthalocyanine. (All plate magnifications 77,000 \times .)

Plate no.	No. of spaces measured	Average distance between lines on plate (mm)	Distance between lines in crystal (\AA)
1508	220	0.0935	12.1
1481	80	0.0914	11.9
1498	50	0.0916	11.9
1517	20	0.0955	12.4
1532	100	0.0926	12.0
1582	80	0.0920	11.9
1518	30	0.0950	12.3
1525	40	0.0950	12.3
1573	30	0.0933	12.1
1670	50	0.0934	12.1
1630	100	0.0917	11.9
1626	40	0.0907	11.8
1625	40	0.0900	11.7
1624	50	0.0910	11.8
1652	116	0.0919	11.9
1400	200	0.0919	11.9
1445	30	0.0917	11.9
1446	20	0.0925	12.0
1449	20	0.0895	11.6
1442	100	0.0935	12.1
1171	20	0.0935	12.1
1196	20	0.0890	11.6
1213	50	0.0932	12.1
1173	100	0.0900	11.7
1204	30	0.0940	12.2
1192	30	0.0927	12.0

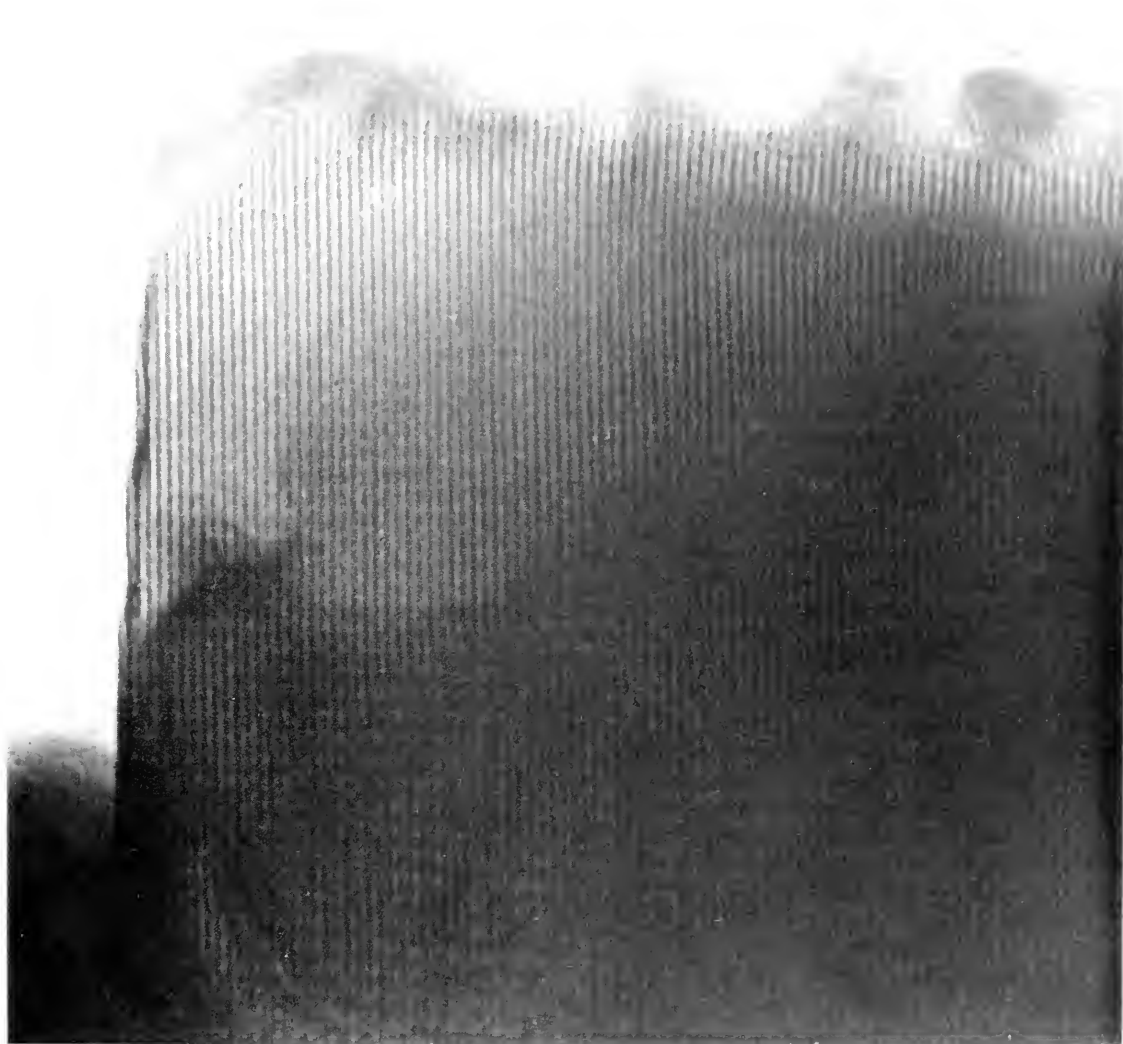


Fig. 9. Sodium faujasite crystal showing (111) planes.

lattice rows in the direction of the beam is highly relaxed. With a 50μ objective aperture, the spectra contributing to the image from the phthalocyanine crystals are the $(20\bar{1})$, $(40\bar{2})$, 201 and $(\bar{4}02)$. These spectra are assumed to recombine with the zero order beam in the image plane and form an image of the crystal grating in accordance with the simple Abbe theory of image formation by a lens. This has been confirmed by excluding all spectra except the zero order from the image by using a 10μ objective aperture when it is found that the image of the planes disappears. Further confirmation of this mechanism is obtained from the fact that an array of parallel lines rather than a cross grating of dots is seen in the image. The projection of the lattice in the direction of observation should show a series of planes (010) perpendicular to the $(20\bar{1})$ planes. The spacing of

these planes however is 3.81 \AA and the first permissible spectrum from them, (020) , corresponds to a Bragg spacing of 1.905 \AA . This is excluded from the image by a 50μ aperture so that the image of these planes is not seen.

It is doubtful on other grounds whether such a small spacing could be resolved. Firstly, the permissible misorientation of the crystal with respect to the electron beam, arising from the relaxation of the third Laue condition becomes smaller as the spacing to be resolved is reduced. Secondly the effect of spherical aberration in distorting the wavefront of a beam diffracted at a wide angle through the lens becomes so severe as to cause the diffracted beam to be no longer able to interfere coherently with the zero order beam and form the image. The effect of spherical aberration may already be severe even

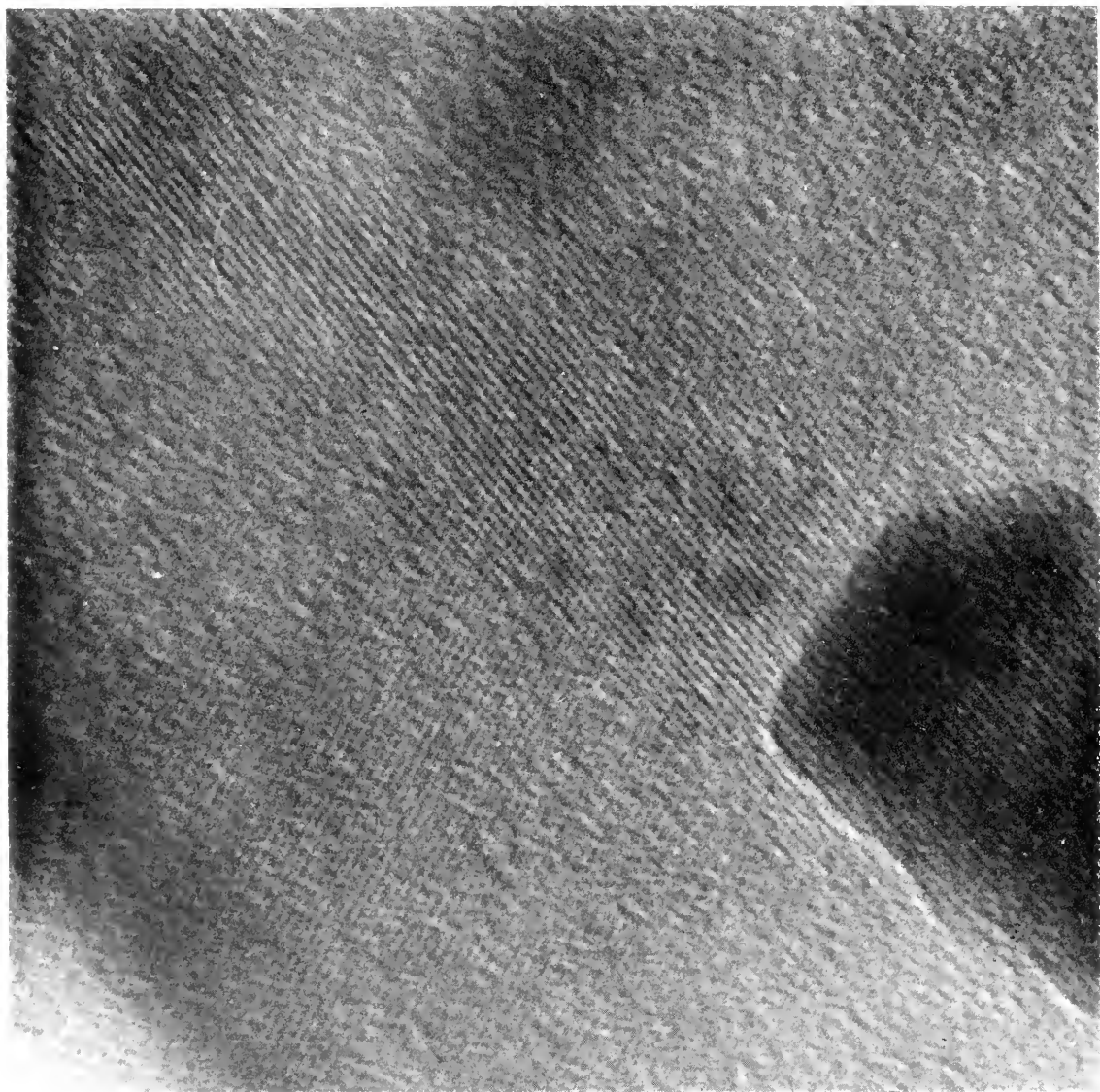


Fig. 10. Sodium laujasite crystal viewed along [110] showing two sets of (111) planes intersecting at 70° .

with the (402) reflection corresponding to $d = 5.97 \text{ \AA}$ since a microphotometer trace across the image shows that the intensity distribution follows fairly closely a function of the form $\cos^2 \theta$. This would be expected from interference between two beams, i.e. the zero order and the first order (20 $\bar{1}$) indicating that although the (402) beam passes through a 50μ aperture to the image it is making no useful contribution to the image of the planes.

Resolution of image. The high resolution apparent in the image can be explained in terms of simple lens theory; neglecting effects of chromatic aberration and astigmatism, the phase delay imposed on a ray passing through a lens at an angle α is given by $\alpha^2 \frac{1}{2} C \alpha^2$, where C is the spherical aberration constant. The diffracted beams from the crystal lattice may be regarded as plane parallel beams approxi-

mately equal in width to the width of the specimen (neglecting the finite divergence of the incident illumination). Thus provided α and C are small the distortion of the wave front of the narrow diffracted beam in passing through the lens may be very small (7). A simple calculation shows that the difference in phase between the two ends of a wavefront of width Δr is given by $C r^3 \Delta r / f^3$, where f is the focal length of the lens and r the distance of the beam from the axis in the lens plane. Inserting values for the (20 $\bar{1}$) reflection from platinum phthalocyanine, $r = 10^{-3} \text{ cm}$, $C = 0.28 \text{ cm}$, $f = 0.3 \text{ cm}$, $\Delta r = 10^{-5} \text{ cm}$, we find that the phase difference across the wavefront $\Delta \epsilon = 3 \times 10^{-10} \text{ cm}$, i.e. $\Delta \epsilon \ll \lambda$, since $\lambda = 4 \times 10^{-10} \text{ cm}$. Thus the wavefront remains virtually undistorted in passing through the lens and is able to form an image of the (20 $\bar{1}$) planes by interference with the

TABLE 2. Spacing of lines in sodium faujasite.

(All plate magnifications 77,000)

Plate no.	No. of spaces measured	Average distance between lines on plate (mm)	Distance between lines in crystal (Å)
2020	100	0.1125	14.6
	20	0.1135	14.7
2025	24	0.109	14.15
	20	0.107	13.9
1959	40	0.110	14.3
	80	0.112	14.55
	70	0.114	14.8
1827	30	0.113	14.65
	30	0.111	14.4
1826	20	0.1125	14.6
1834	30	0.111	14.4
1962	20	0.106	13.8
	20	0.108	14.0
2030	30	0.111	14.45
2032	30	0.112	14.55
2036	20	0.1135	14.7

zero order beam. Calculations suggest that it should be possible to resolve planes with spacings considerably smaller than 10 Å providing that the divergence of the illuminating beam is made sufficiently small.

Should this prove to be true in practice there are many possibilities opened up in the study of crystal structures and their imperfections. The images obtained are, of course, very poor Fourier projections and show none of the detail obtained by x-ray analysis but they have the essential advantage of revealing the exact location of imperfections, thus permitting the direct study of the behaviour of dislocations under a variety of physical conditions.

The idea of these experiments germinated in the course of a discussion with Mr. J. E. Gordon. I wish to thank Mr. G. A. Bassett for his careful attention to the performance of the microscope, Mr. R. W. Gooding for preparing the platinum phthalocyanine, Professor R. M. Barrer and Mr. J. A. Gard for providing samples of sodium faujasite. This paper is published by permission of the Chairman of Tube Investments Ltd.

REFERENCES

1. BARRER, P. A., DENT, C. E., and LINSHEAD, R. P., *J. Chem. Soc.* 1719 (1936).
2. BOIRSCH, H., *Z. Naturforsch.* 2a, 615 (1947).
3. HAINE, M. E., *Advanc. Electronics Electron Physics* 6, 295 (1954).
4. HILFEL, J., *Phys. Rev.* 60, 743 (1941).
5. MENTER, J. W., *Proc. Roy. Soc. A* 236, 119 (1956).
6. ROBERTSON, J. M., *J. Chem. Soc.* 615 (1934).
7. SCHERZER, O., *J. Appl. Phys.* 20, 20 (1949).
8. SCHIFF, L. I., *Phys. Rev.* 61, 721 (1942).
9. WYCKOFF, R. W. G., Les techniques récentes en microscopie électronique et corpusculaire. Coll. Int. du CNRS, 135 (1956).

Elektronenmikroskopische Abbildung von Kristallgitterstrukturen

R. NEIDER

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem

DIE von der dynamischen Theorie der Elektroneninterferenzen ausgehenden Überlegungen von Niehrs, welche dieser im vergangenen Jahr in unserem Institut begonnen hatte, führten zu Beginn dieses Jahres zu dem Ergebnis, daß die periodische Struktur des Kristallgitters eine ebensolche Struktur der Strahlendichte in der Austrittsfläche hervorruft, und — dies ist das bemerkenswerteste Ergebnis der Niehrsschen Arbeit — daß Atome oder Netzebenen mit völlig ausreichendem Kontrast abgebildet werden können. Voraussetzung ist natürlich, daß die abzubildenden Netzebenenscharen von dem benutzten Elektronenmikroskop aufgelöst werden, d. h. daß die zugehörigen Interferenzstrahlen bei der Bildentstehung mitwirken und die Störung durch Linsenfehler genügend klein ist.

Da uns das Elmiskop I der Siemens & Halske AG zur Verfügung stand, suchten wir nach Kristallen, die Netzebenenabstände der Größenordnung 10 Å und für die Abbildung geeignete Kristalltracht

haben und schließlich als Untersuchungsobjekt genügend beständig sind. Hierbei stießen wir — ebenso wie Menter — auf die Gruppe der Metallderivate des Phthalocyanins. Wir erhielten Nickel-Phthalocyanin von Drechsler und Wolff, welche in unserem Institut diese Substanz auch bei ihren Untersuchungen im Feldemissionsmikroskop verwendet hatten. Kupfer-Phthalocyanin erhielten wir von der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik.

Während wir mit Elektronenbeugungsuntersuchungen und ersten Abbildungsversuchen beschäftigt waren, erhielten wir durch private Mitteilung Kenntnis von den schönen elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die Menter ebenfalls mit dem „Elmiskop I“ von Pt- und Cu-Phthalocyanin erhalten hatte.

Experimentelle Ergebnisse.—Da man schon aus dem Beugungsbild eines Einkristalles entnehmen kann, ob Netzebenen dieses Kristalles elektronenmikroskopisch abbildbar sind, untersuchten wir zuerst die Beugungsbilder von Ni- und Cu-Phthalocyanin.

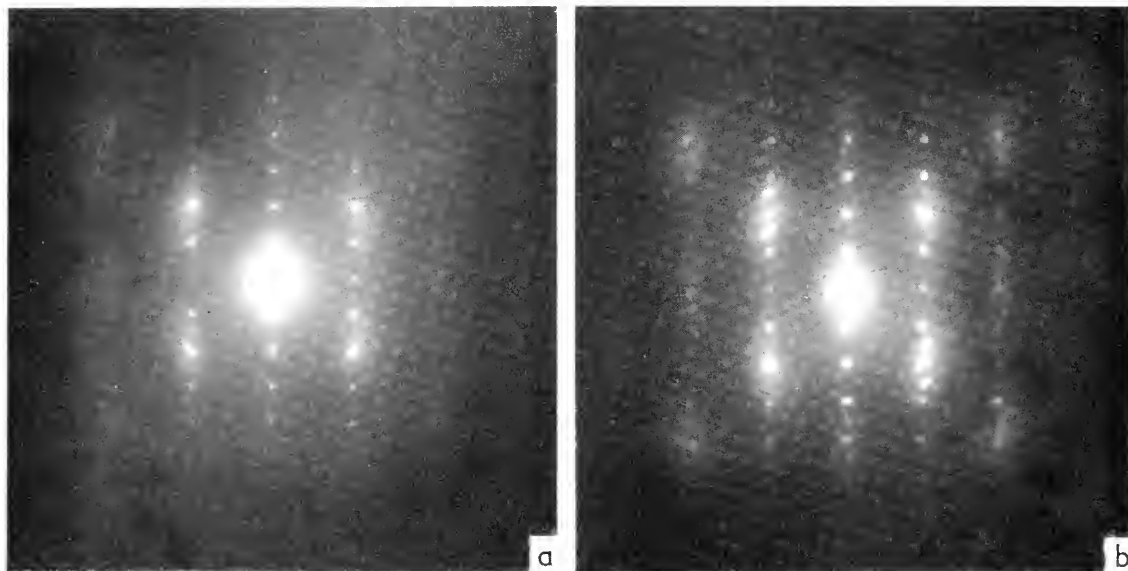


Abb. 1. *a*. Elektronenbeugung von Ni-Phthalocyanin. Beugungslänge: $45,1 \text{ (mm} \cdot \text{Å)}$. *b*. Elektronenbeugung von Cu-Phthalocyanin. Beugungslänge: $45,1 \text{ (mm} \cdot \text{Å)}$.

cyanin, und zwar wegen der Kleinheit der Kristalle mit der Methode der Kleinfeldbeugung mittels Selektorbende.

Abb. 1 *a, b* zeigt Elektronenbeugungsdiagramme von Ni- und Cu-Phthalocyanin. Durch Vergleich mit der Röntgenstrukturanalyse von Robertson und Woodward (2, 3) wurden die engsten Reflexe in beiden Diagrammen als $20\bar{1}$ bzw. $\bar{2}01$ ($9,86 \text{ Å}$) und die dazu senkrecht liegenden Reflexe als 110 bzw. $\bar{1}\bar{1}0$ ($4,65 \text{ Å}$) identifiziert. Die beiden Verbindungen Ni- und Cu-Phthalocyanin unterscheiden sich in ihrem kristallographischen Aufbau nur sehr wenig. Beim Cu-Phthalocyanin wurde aber auch noch ein anderes Beugungsbild gefunden: Abb. 2*b*.

Abb. 2*a* zeigt die Mikrophotographie von zwei Einkristallen aus Cu-Phthalocyanin, von denen das Beugungsbild aufgenommen wurde. Im Diagramm (Abb. 2*b*) sehen wir einmal die oben schon gezeigten Reflexe $20\bar{1}$ bzw. $\bar{2}01$ und 110 bzw. $\bar{1}\bar{1}0$ von Cu-Phthalocyanin. Zusätzlich tauchen aber in der Nähe von den Reflexen $20\bar{1}$ bzw. $\bar{2}01$ noch ein paar enger liegende Reflexe auf, die einem Netzebenenabstand von $12,12 \text{ Å}$ entsprechen und von dem schmalen Kristall stammen, wie durch Abdecken des anderen Kristalls festgestellt wurde. Nimmt man an, daß es sich bei dem schmalen Kristall auch um Cu-Phthalocyanin und um die gleiche Modifikation wie bei den anderen Kristallen handelt, so entsprechen diese Reflexe den 001 bzw. $00\bar{1}$ -Netzebenen. Das Erscheinen dieser Reflexe legt den Schluß nahe, daß der schmale Kristall eine andere Tracht als der breite Kristall besitzt. Auch aus einigen anderen elektronenmikroskopischen Bildern ziehen wir den Schluß, daß für Cu-Phthalocyanin nicht immer die Tracht vorliegt, wie sie Robertson angegeben hat. Auf anderen Beugungsaufnahmen mit den Reflexen 001

bzw. $00\bar{1}$ fanden wir in der senkrechten Richtung dazu Reflexe, die einem Netzebenenabstand von $3,78 \text{ Å}$ entsprachen und mit 310 bzw. $\bar{3}\bar{1}0$ indiziert werden können. Schließlich wurde bei manchen Cu-Phthalocyaninkristallen noch ein drittes von den beiden vorhergehenden Beugungsbildern verschiedenes Beugungsdiagramm gefunden: Abb. 3.

Dieses Diagramm weist die gleichen Reflexe wie das Diagramm mit der Kombination $001 \ 310$ auf, aber zwischen den verschiedenen Ordnungen von 001 erscheinen noch zusätzliche Reflexe. Sie entsprechen dem doppelten Netzebenenabstand, nämlich $22,6 \text{ Å}$, und sind mit den bekannten kristallographischen Daten des Cu-Phthalocyanins nicht vereinbar. Die

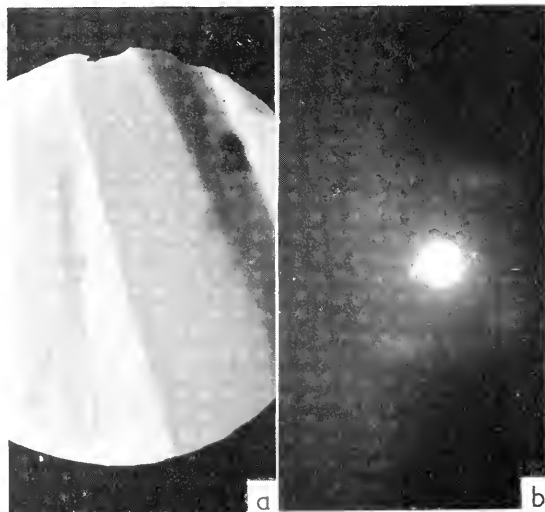


Abb. 2*a, b*. Elektronenbeugung von Cu-Phthalocyanin mit dem die Beugung erzeugenden Objektbereich. Vergrößerung: 39000 . Beugungslänge $43,1 \text{ (mm} \cdot \text{Å)}$.

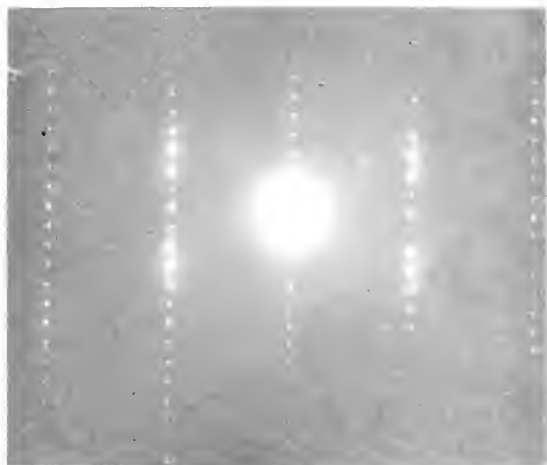


Abb. 3. Elektronenbeugung von Cu-Phthalocyanin. Beugungslänge: $56,5 \text{ (mm} \cdot \text{Å)}$.

zusätzliche Reflexe verschwinden nach gewisser Zeit der Elektronenbestrahlung, so daß nur noch die 001-Reflexe übrig bleiben. Die entsprechende Erscheinung konnten wir im elektronenmikroskopischen Bild beobachten: Während zuerst Netzebenen mit einem Abstand von $22,4 \text{ Å}$ abgebildet wurden, halbierte sich dieser Abstand nach 2–3 Minuten, so daß die Netzebenen nun einen Abstand von $11,5 \text{ Å}$ hatten. Die Erklärung für diese bemerkenswerte Erscheinung steht noch aus.

Bei der Abbildung der Netzebenen kommt es in erster Linie darauf an, daß die entsprechenden In-

terferenzstrahlen bei der Abbildung mitwirken und nicht durch die Aperturblende abgelenkt werden. Eine Aperturblende von 50μ läßt in den Diagrammen von Abb. 1a, b und 2b jeweils die 1. und 2. Ordnung von 201 bzw. 201 und 001 bzw. 001 durch. In Abb. 3 werden auf jeder Seite vom Nullstrahl fünf von den eng liegenden Reflexen durchgelassen. Zur Kontrolle wurde vor den Aufnahmen jeweils das Beugungsbild der Kristalle betrachtet.

In Abb. 4a, b, c sind 201-Netzebenen von Ni-Phthalocyanin mit einem Abstand von $9,8 \text{ Å}$, 001-Netzebenen von Cu-Phthalocyanin mit einem Abstand von $11,5 \text{ Å}$ und Netzebenen des Cu-Phthalocyanins mit $22,4 \text{ Å}$ Abstand zu sehen. Die Kristalle wurden durch Sublimieren an Luft hergestellt und in Alkohol oder Äther suspendiert. Für die Abbildung wurden 7-Loch-Blenden mit graphitisierten Kolloidumfolien, die vorher im Elektronenmikroskop einer intensiven Elektronenbestrahlung ausgesetzt wurden, oder netzartig aufgerissene Formvarfolien benutzt, so daß die Kristalle an Stellen abgebildet werden konnten, an denen sie über ein Loch ragten, und so der Folienuntergrund nicht störte. Aufgebracht wurden die Kristalle durch Verneblung der Alkohol- oder Äthersuspension mit 3 MHz Ultraschall.

Bei den Aufnahmen wurde mit Rücksicht auf möglichst geringe Erwärmung meist nur ein kleiner Objektbereich mit dem Feinstrahlkondensator durchstrahlt. Um bei der Beobachtung und Aufnahme unmittelbar vom Beugungsbild zum mikroskopischen Bild mit aufgelösten Netzebenen übergehen zu kön-

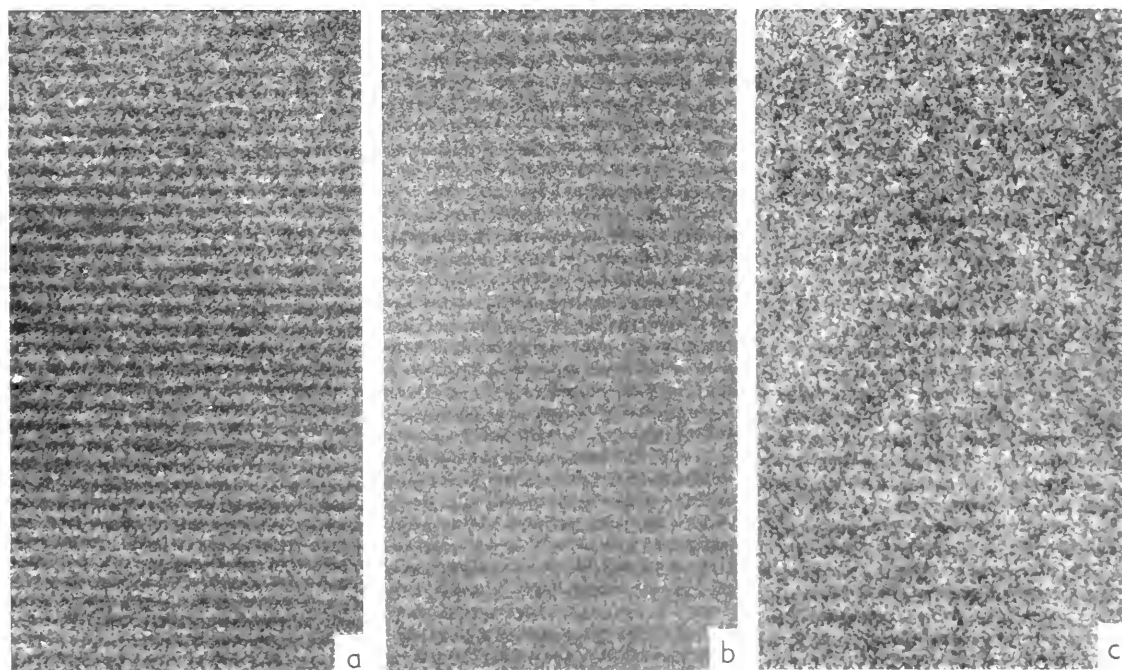
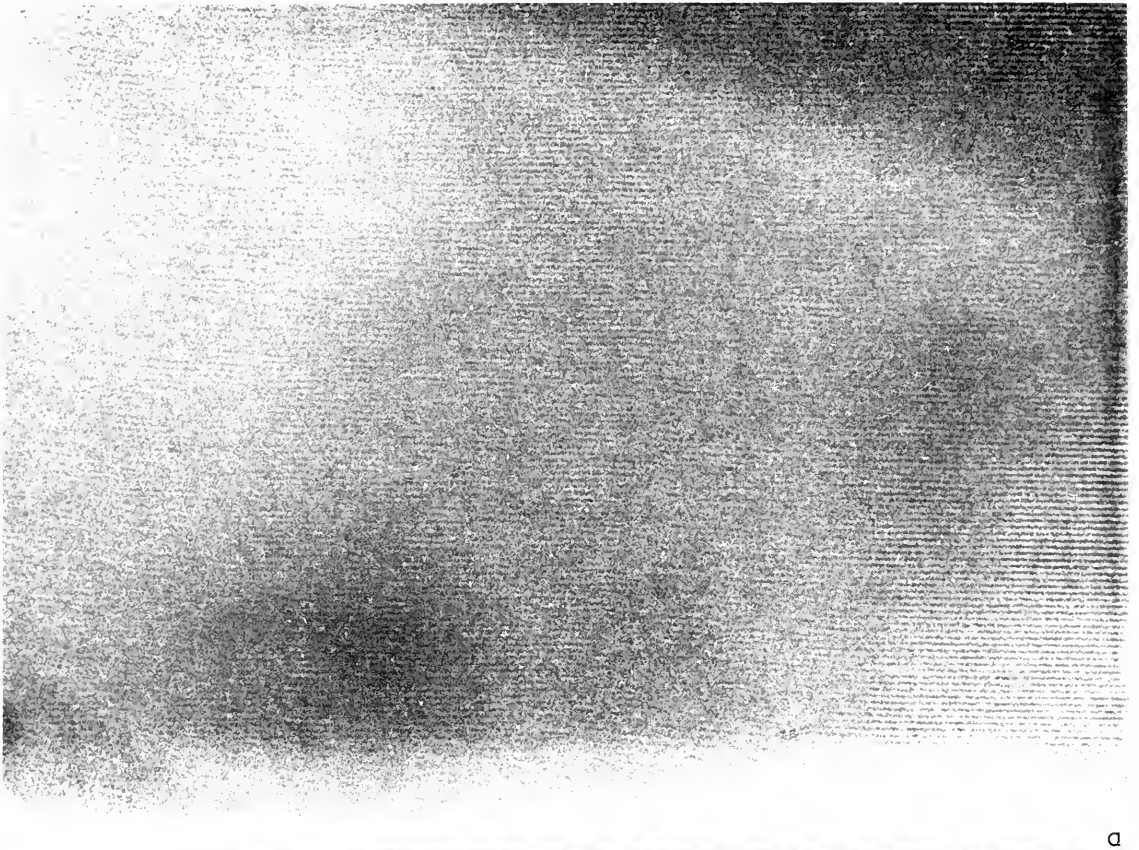
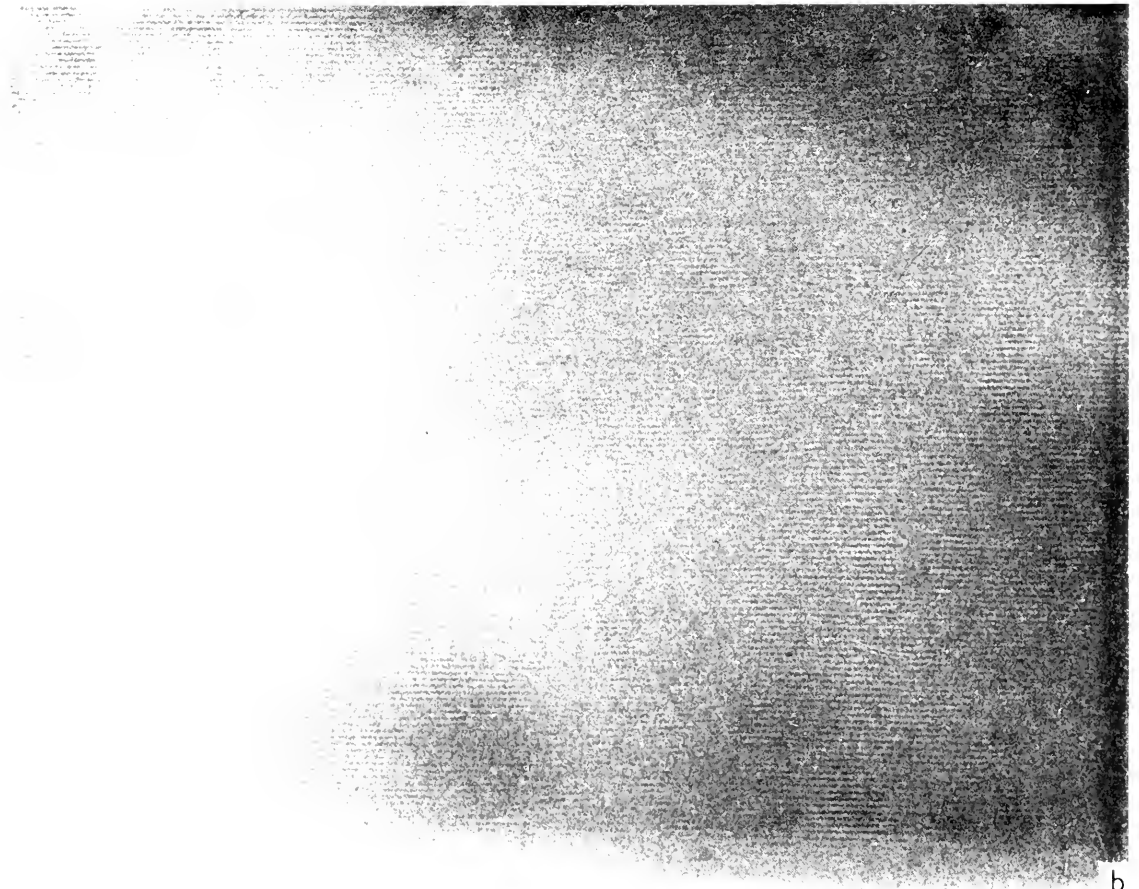


Abb. 4. a. 201-Netzebenen ($9,8 \text{ Å}$) von Ni-Phthalocyanin, Vergrößerung 2 600 000, elektronenmikroskopisch: 150 000. b. Netzebenen von Cu-Phthalocyanin ($11,5 \text{ Å}$ Abstand), Vergrößerung 2 600 000, elektronenmikroskopisch: 150 000. c. Netzebenen von Cu-Phthalocyanin ($22,4 \text{ Å}$ Abstand), Vergrößerung 1 300 000, elektronenmikroskopisch: 39 000.



a



b

Abb. 7. a) Lattizstruktur eines Einkristalls aus Cu-Phthalocyanin. Stereopaar mit Stereowinkel $\approx 3^\circ$, Netzebenenabstand $0,5 \text{ \AA}$. Vergrößerung $\times 75000$, elektronenmikroskopisch: 150000 .

nen, wurde die Schaltung des Elmiskop I abgeändert. Der Kondensator K I wurde aus dem Stromkreis des Mikroskops herausgenommen, durch eine unabhängige Spannungsquelle von 120 V gespeist und mit einem einfachen Schiebewiderstand eingestellt. Es wurde bei möglichst schwachen Intensitäten am Objekt ($10^{-8} \text{ A cm}^{-2} = 10^{-5} \mu\text{A } \mu^2$) gearbeitet, weil die Kristallage sonst nicht stabil genug war oder die Kristalle gar verdampften. Die Aufnahmen wurden auf Kranz-Feinkorn-Platten (15 10 DIN) mit Belichtungszeiten von 1 min gemacht.

Abbildung der Netzebenen bei Abweichung vom Bragg-Winkel.—Wir untersuchten weiterhin die Frage, wie weit der Winkel zwischen Netzebene und einfallendem Strahl abweichen darf, ohne daß der Kontrast in der Abbildung der Netzebenen allzu stark abnimmt. Ein Cu-Phthalocyanin-Einkristall, dessen 001-Netzebenen sich in Interferenzstellung befanden, wie mit Hilfe der Kleinfeldbeugung festgestellt wurde, wurde bei 150000facher Vergrößerung photographiert. Dann neigten wir das gesamte Präparat mit der Stereoeinrichtung um 3° . Der Kippwinkel um eine Achse parallel zu den Netzebenen betrug daher keinesfalls mehr als 3° , wahrscheinlich sogar weniger. Nach dieser Neigung wurde der Kristall noch einmal photographiert (Abb. 5a, b). Man erkennt auf dem oberen Bild, daß die Netzebenen nur in einem Teil des Kristalles mit hohem Kontrast abgebildet werden. Auf dem unteren Bild hat sich der Bereich, in dem die Netzebenen mit hohem Kontrast abgebildet werden, verlagert. Daraus muß geschlossen werden, daß der Kristall verbogen oder geknickt ist. In einem Bereich des Kristalls, der sich dem Gebiet guter Abbildung der Netzebenen anschließt, erkennt man auf beiden Bildern eine Krümmung von Netzebenen und Unregelmäßigkeiten im Gitter. An dieser Stelle liegt offensichtlich der Knick im Kristall.

Die Bilder beweisen, daß die Abbildung der Netzebenen schon bei einer Abweichung von etwa 3° vom Bragg-Winkel fast gänzlich verloren geht. Menter (1), der sich experimentell und theoretisch ebenfalls mit dieser Frage beschäftigt hat, kommt zu dem Ergebnis, daß die Intensität des Interferenzstrahls $20\bar{1}$ erstmals bei $1,2^\circ$ Abweichung vom Bragg-Winkel für 600 \AA Kristalldicke und bei 100 \AA Kristalldicke erstmals bei 7° Abweichung verschwindet. Daraus darf man unserer Meinung nach nicht den Schluß ziehen, daß die Netzebenen bei einer Neigung von 7° gegen den Primärstrahl noch mit genügend hohem Kontrast abgebildet werden, wenn nur die Kristalldicke klein genug ist. Unsere Berechnung der Interferenzintensität bei optimaler Kristalldicke ergibt bei einer Abweichung von $2,5^\circ$ vom Bragg-Winkel einen Abfall der Intensität auf weniger als 4 % des Maximalwertes, bei 10° auf 0,1 %. Da der Bragg-Winkel $0,5^\circ$ ist, muß angenommen werden, daß bei Abbildung der Netzebenen diese annähernd parallel zum Primärstrahl liegen.

Die Tatsache, daß die sehr dünnen Kristalle ver-

bogen oder geknickt sein können und so nicht über den gesamten Bereich des Kristalles die gleichen Interferenzbedingungen erfüllt sind, erklärt auch das gleichzeitige Erscheinen der Reflexe $20\bar{1}$ und 110 in den ersten beiden Beugungsbildern, die wir sahen. Bei einem unverbogenen Kristall wäre dies nämlich gar nicht möglich. Es muß daher angenommen werden, daß die $20\bar{1}$ - und 110 -Netzebenen des Ni- oder Cu-Phthalocyanins nicht gleichzeitig an denselben Stellen des Kristalls reflektieren, sondern wegen einer Verbiegung oder Knickung des Kristalls an verschiedenen Stellen, die aber immer noch im Bereich des zur Beugung gelangenden Objektfeldes liegen.

Theoretische Ergebnisse.—Um wenigstens einen groben qualitativen Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der Theorie durchführen zu können, wurden die zu erwartende Dichteverteilung des Elektronenstroms an der Strahlaustrittsfläche eines Ni-Phthalocyanin-Einkristalls unter folgenden vereinfachenden Annahmen nach der dynamischen Theorie berechnet.

1. Absorption und inkohärente Streuung werden gegenüber der kohärenten Streuung vernachlässigt, weil es sich um eine sehr dünne Schichtdicke handelt.

2. An Stelle des Ni-Phthalocyanin-Moleküls werden im Kristallgitter je ein Ni-Atom angenommen, denn obwohl die Kohlenstoff- und Stickstoffatome alle zusammen ein größeres Streuvermögen gegenüber der Elektronenstrahlung haben als ein einziges Ni-Atom, wirkt sich dieses nicht so stark aus, weil sie auf einen viel größeren Raum verteilt sind und sich daher wahrscheinlich erst bei Interferenzen höherer Ordnung bemerkbar machen.

3. Während im Mikroskop erst durch die Aperturbende alle Interferenzstrahlen bis auf die 1. und 2. Ordnung von $20\bar{1}$ künstlich zu Null gemacht werden, setzen wir voraus, daß nur die Interferenzstrahlen

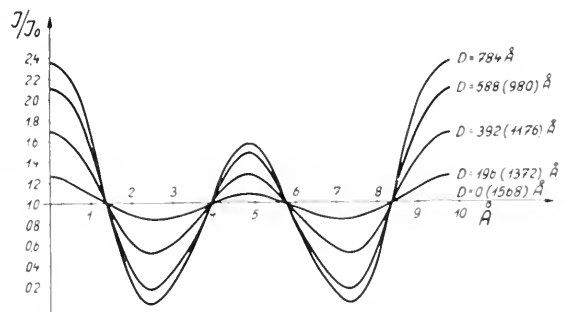


Abb. 6a. Intensitätsverteilung der Elektronenstrahlendichte in der Austrittsfläche eines Ni-Phthalocyanin-Einkristalls für verschiedene Kristalldicken (theoretisch).

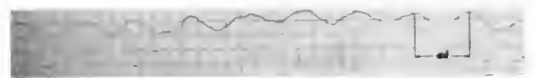


Abb. 6b. Experimentelle Kurve, gewonnen durch Photometrierung senkrecht zu den $20\bar{1}$ -Netzebenen des Ni-Phthalocyanins im Negativ.

$20\bar{1}$ und $\bar{2}01$ auftreten. Dabei werden die entsprechenden Interferenzstrahlen 2. Ordnung vernachlässigt, die oft sehr schwach sind und, wie experimentell festgestellt werden konnte, für die Abbildung von Netzebenen nicht unbedingt notwendig sind.

Abb. 6a, b zeigt das Ergebnis der Rechnung für eine Einstrahlung parallel zu der Netzebene $20\bar{1}$ zusammen mit einer experimentellen Kurve, die durch Photometrierung des Elektronenbildes von Ni-Phthalocyanin senkrecht zu der Netzebene $20\bar{1}$ gewonnen wurde.

Aus den theoretischen Kurven, die für die Intensitätsverteilung verschiedener Kristalldicken gelten und dabei gleichzeitig ein anschauliches Bild der Änderung der Intensitätsverteilung beim Fortschreiten durch den Kristall liefern, ersieht man, daß der Kontrast, mit dem die Netzebenen abgebildet werden, in dieser Näherung eine periodische Funktion der Kristalldicke ist. Weiter folgt daraus, daß die Netzebenen bzw. Potentialmaxima in diesem speziellen Fall sich im Bild nicht an den Linien minimaler, sondern genau an denjenigen maximaler Intensität befinden.

Schließlich sehen wir als wesentlichstes Ergebnis der Rechnung, daß zwischen zwei Intensitätsmaxima an den Stellen der Netzebenen jeweils noch ein weiteres schwaches Maximum auftaucht, das von der Überlagerung von $20\bar{1}$ und $\bar{2}01$ herrührt. Daß wir dieses im Experiment nicht sehen, ist kaum durch eine ungenügende Näherung der Theorie erklärbar, sondern durch eine ungenügende elektronenmikroskopische Auflösung oder Fokussierung.

Herrn Prof. Dr. E. Ruska danke ich für die Anregung und Ermöglichung dieser Arbeit sowie für sein förderndes Interesse. Herrn Dr. H. Niehrs verdanke ich zahlreiche anregende Diskussionen und Hinweise.

LITERATUR

1. MENTER, J. W., *Proc. Roy. Soc. A* **236**, 119 (1956).
2. ROBERTSON, J. M., *J. Chem. Soc.* **1935**/1, 615.
3. ROBERTSON, J. M. und WOODWARD, I., *J. Chem. Soc.* **1937**/1, 219.

Investigation of High Resolution Electron Diffraction Patterns from Individual Micro-Crystals by Using a Three-Stage Electron Microscope

W. D. RIECKE

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem

BESIDES the visual examination of individual sub-microscopic crystals in bright and dark field micrographs, the observation of their diffraction patterns will be of interest. As is well known, the chemical nature or the lattice structure of the crystal can be determined under favourable experimental conditions. Moreover, as will be shown in this paper, diffraction experiments in the submicroscopic region may be carried out by combining micro-diffraction and high resolution diffraction. Apart from the diffraction pattern, shape, size, and orientation of the scattering crystal may be visually observed on the final screen. It thus became feasible to examine the fine structures at the undiffracted beam, which had hitherto escaped observation. For an interpretation of the diffraction effects, the defocused diffraction pattern may furnish valuable clues.

Electron diffraction patterns of small specimen areas.—Up to now, three methods have been employed to produce electron diffraction patterns of small specimen areas: (i) v. Ardenne (1) used a small stop, 6μ in diameter, which he placed just above the specimen. Thus, the area irradiated by the condenser lens was limited to this size. (ii) v. Ardenne and co-workers (2), Hillier and Baker (4) as well as Ruska and Wolff (11) produced a considerably de-

magnified image of the electron source in the plane of the specimen. They obtained illuminated areas of the order of 1μ . (iii) Boersch (3) placed an aperture of a diameter D in the plane of the first-stage image of the specimen. Thus, all the rays were screened except those emanating from an object area $d = D/M$ in diameter. Here M is the magnification of the objective lens.

The experiments to be carried out required the production of high resolution diffraction patterns of specimen areas about 1μ in diameter. Moreover, the scattering region had to be identified precisely by visual observation of the final screen or examination of the electron micrograph. Method (iii) seemed to be the best suited for this purpose. The reasons are as follows: With method (i) v. Ardenne (1) used stops of very small diameter, which contaminate rapidly. Apart from this, it is mechanically difficult to obtain well rounded bores less than 5μ in diameter. Ruska and Wolff (11) (method ii) employed a double condenser to obtain a demagnified image of the cross-over in the specimen plane. The angle of illumination in this plane is kept low by inserting small-diameter stops into the bore of the second condenser lens. A diffraction resolution of 500 to 1000 can be obtained with this arrangement. Unfortu-

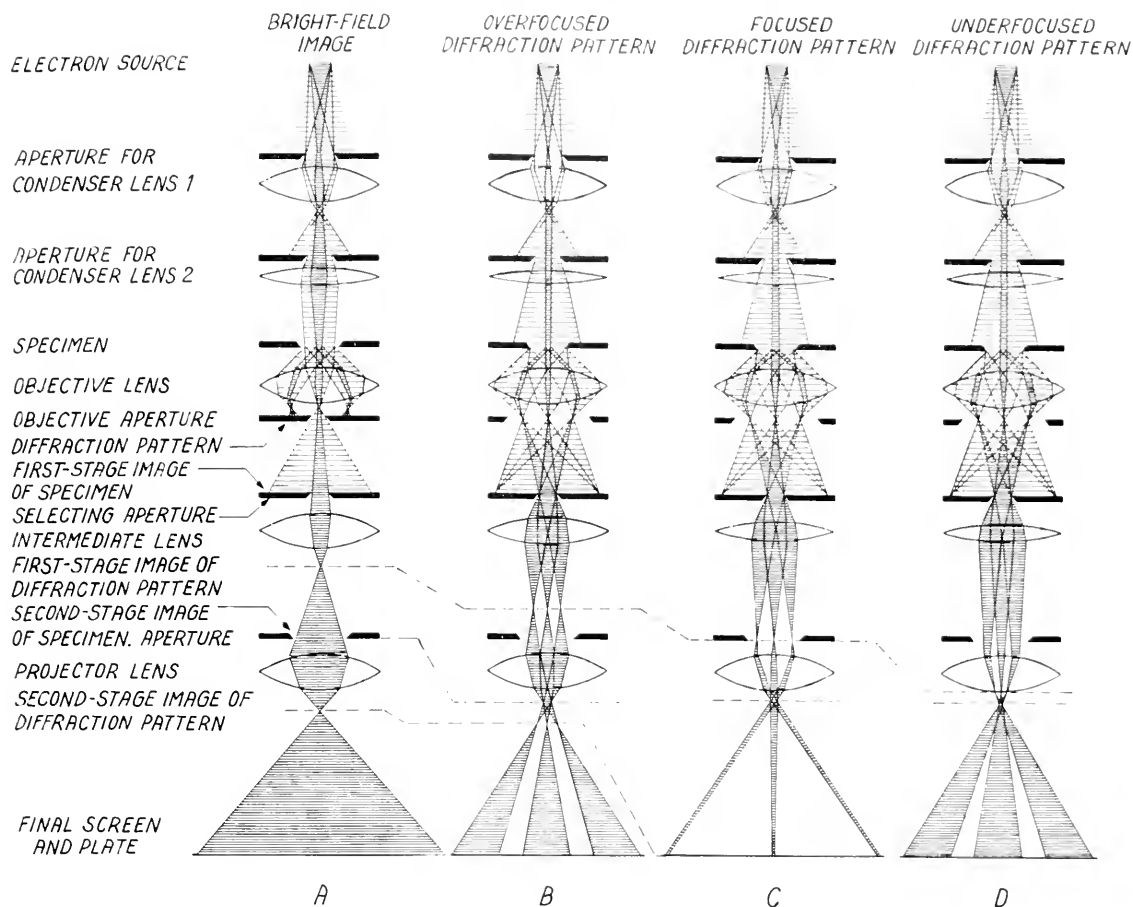


Fig. 1. Ray paths in high resolution micro-diffraction.

nately, the scattering area cannot be located with sufficient accuracy, as, in order to procure the diffraction pattern, the objective lens current is cut off. Due to this, the stray magnetic fields between the second condenser and the specimen are reduced. These had previously caused a slight deflection of the illuminating beam, and thus a displacement of the image of the electron source relative to the undisturbed position by a distance large against its own diameter. Now, the deflection is equally reduced, which also reduces the displacement of the image of the source, and the identity of the scattering area with the selected field of the electron optical image is lost. This effect may only be overcome by a tedious and elaborate adjustment of the microscope, the success of which is not guaranteed. The arrangements of v. Ardenne and co-workers (2) and of Hillier and Baker (4) only permit shadow-microscopic observation of the specimen and moderate diffraction resolution ($R \approx 150$).

Experimental arrangements and technique.—We have used an electron microscope type "Elmiskop I" of Siemens & Halske AG (11). Objective lens and intermediate lens are operated independently. The diameters of the apertures selecting the specimen

field, which are situated just above the intermediate lens, were chosen as to permit the examination of areas 2.2 and 0.9 μ in diameter. A diagram of ray paths is given in fig. 1. The precision of the reproduction of the camera length (57.5 cm) in routine operation has been discussed (10).

For high resolution diffraction work, a small angle of illumination is indispensable. This was realized by using the first condenser lens to obtain a 50 times demagnified image of the electron source (fig. 1, B, C, D). The lens was fed by a 220 V battery, as its feeding by the microscope power supply is not provided when the intermediate lens is operated independently. This was feasible, because the requirements regarding current stability are not stringent for demagnification work. With the second condenser lens operating at a very long focal length, the angle of illumination is $5 \cdot 10^{-6}$ rad, giving a diffraction resolution of 8350 at 80 kV. To obtain electron optical images on the final screen, which are sufficiently bright for visual observation, the angle of illumination was enlarged by increasing the current of the second condenser lens (fig. 1, A).

Axial astigmatism of the intermediate lens is detrimental to the diffraction resolution (10). When

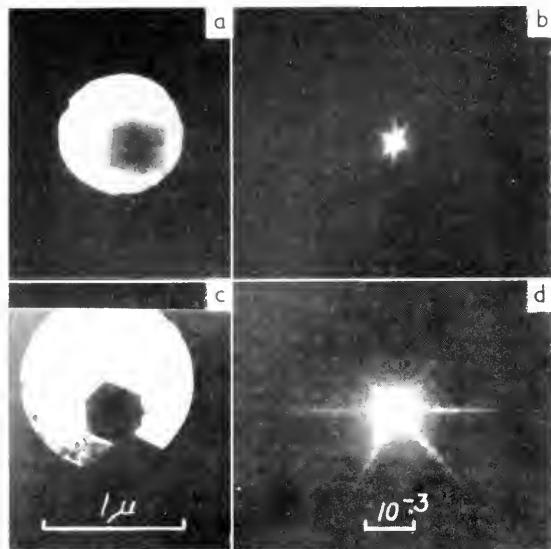


Fig. 2. Fine structures in the undiffracted beam in the diffraction pattern from individual MgO crystals. (b) Pattern from the crystal shown in (a), and (d) that of the crystal (c). (H.T. = 80 kV.)

this lens was used to form an image of the diffraction pattern, existing in the back focal plane of the objective lens, within the object plane of the projector lens, it had a focal length of 4.8 cm and an astigmatic difference of focal lengths of 0.02 cm. This limits the diffraction resolution to $R = 1120 d$, which shall be discussed in detail elsewhere. d is the diameter of the selected specimen area in μ . As to the resolution of fine structure in a reflection, the first-stage image of the scattering crystal practically acts as the aperture for the intermediate lens. The other rays, which pass the selecting aperture, do not contribute to this reflection. Even for a crystal size of 1μ , an adequate resolution $R \approx 1100$ may be expected. Under these conditions, astigmatism and spherical aberration of the objective lens have no detrimental influence on the diffraction resolution.

Apart from bright-field images or dark-field images taken with definite reflections, defocused diffraction patterns are useful for the interpretation of the focused ones (fig. 1, B, D). The overfocused diffraction pattern may be considered as a pin-hole projection of the second-stage image of the specimen onto the final screen. The "pin-holes" are formed by the reflections in the second stage image of the diffraction pattern (fig. 1, B). At this, the undiffracted beam produces a "bright-field" shadow image, and each reflection a corresponding "dark-field" shadow image. In a similar way, the underfocused diffraction pattern may be regarded as a point-projection image of the second-stage image of the specimen. The projecting rays emanate from the reflections of the first-stage image of the diffraction pattern (fig. 1, D). The shadow images in the underfocused diffraction pattern are correctly orientated to the focused one, apart from a slight rotation corres-

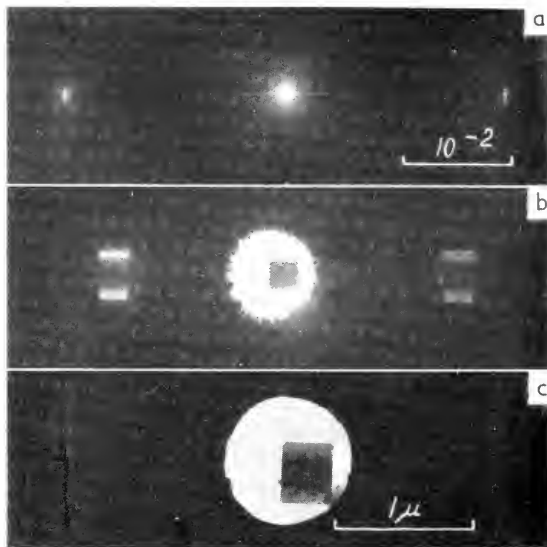


Fig. 3. Focused (a) and overfocused (b) diffraction pattern as well as micrograph (c) of an individual MgO crystal. (H.T. = 80 kV.)

ponding to the defocusing of the intermediate lens. Those of the overfocused pattern are rotated with respect to the focused one by 180° .

Experimental results.—We have examined the diffraction patterns of MgO and ZnO crystals. The specimens were prepared by burning magnesium or zinc ribbon and exposing platinum specimen carriers to the smoke. Although the holes of the carriers were not covered by the usual collodion film, in order to avoid additional scattering, a great number of perfectly grown crystals were found to adhere to the rim of the holes.

First, we looked for those types of fine structures that are predicted by the dynamical theory of electron diffraction. In the diffraction patterns, that had been published hitherto, the fine structures in the undiffracted beam were masked by the well-known extensive spot of intense halation, which is caused by the superposition of the scattered intensities of a great number of crystals. This effect was eliminated with our method by producing diffraction patterns of only one crystal. In the undiffracted beam of the patterns of individual MgO crystals we have obtained fine structures, which are caused by interference double refraction, provided that strong Bragg reflections occur (fig. 2, b). This has been predicted by Molière and Niehrs (7). At longer exposure times, even more weak spots are found on straight lines drawn through the doublets corresponding to each crystal wedge. A great number of spots is obtained with relatively large crystals some 1000 \AA in size (fig. 2, d). By using the selecting aperture to screen the first-stage image of the crystal, with the exception of a single wedge-shaped part at an edge of the MgO cube, the figure is reduced to (i) the double-refraction doublet, and (ii) some weak spots on the

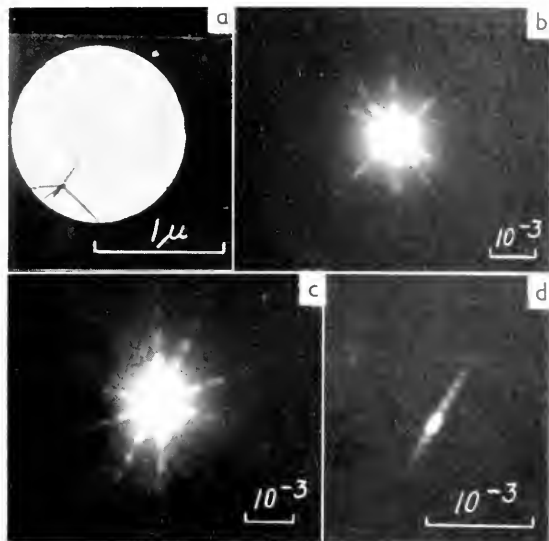


Fig. 4. Fine structures in the diffraction pattern from individual ZnO crystals. (b) Undelected beam in the diffraction pattern of the crystal (a). (c) Central beam with fine structures, and (d) reflection with subsidiary maxima from other patterns. (H.T. = 80 kV.)

straight line drawn through the doublet. These spots are deviated to larger angles than the doublet itself. Their intensity is two to three orders of magnitude lower than the intensity of the doublet. As the interference figure observed is frequently not symmetric to the center of the diagram, the effect cannot be interpreted as an extension of the reciprocal lattice point (5) or as Fraunhofer diffraction. In both cases, the crystal size obtained from the micrographs would result in spots of much narrower spacing than that found in the diffraction pattern. In our opinion, the weak spots may be caused by beams belonging to further wave fields disregarded in interference double refraction.

Some fine structures in (hk0) reflections from MgO crystals are most probably subsidiary maxima, caused by the extensions of the scattering amplitude around each reciprocal lattice point, which are normal to the boundary faces of the crystal. The fine structure shown in fig. 5, a, corresponds to a crystal 500 Å in cube length. Unfortunately the spherical aberration of the objective lens introduces an uncertainty of about 0.1μ into the exact location of the scattering area when the beams are deflected about larger Bragg angles. Therefore, diffraction patterns of individual crystals of this size cannot be obtained. Nevertheless, the defocused diffraction pattern permits an estimation of the upper limit of the crystal size, which is 0.1μ . The above supposition is thus confirmed indirectly.

On defocusing a diffraction pattern, darkfield shadow-images of the scattering crystal regions are obtained from the strong reflections. In the case of a wedge-shaped part of a crystal, two waves and correspondingly two rays are present for each reflection. Therefore, in the overfocused pattern, two

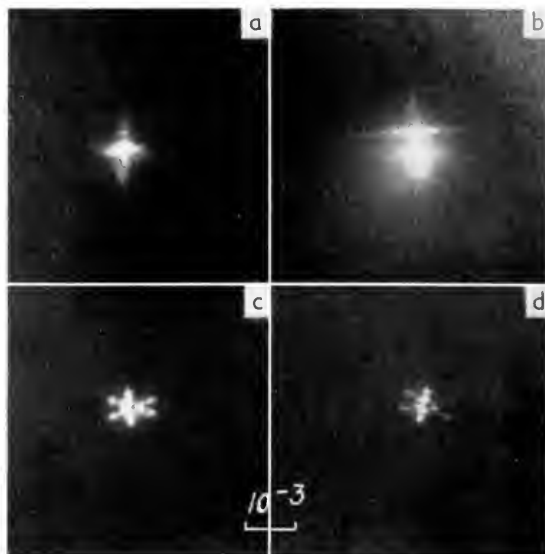


Fig. 5. (a) Subsidiary maxima and (b), (c), (d) new types of fine structures in diffraction patterns from MgO crystals. In (c) and (d) each spot of a quartet is split up into two spots.

close lying shadow images of the wedge are obtained for each strong reflection (fig. 3). This may be regarded as a "double" projection of the second-stage image of the wedge, produced from the spots of the corresponding double-refraction doublet, which appears in the second-stage image of the diffraction pattern.

In the diffraction patterns of individual ZnO crystals, fine structures in the undiffracted beam have also been observed (fig. 4, a, b, c). Contrary to the subsidiary maxima, which are found at Bragg reflections (fig. 4, d) and have already been obtained (8), they are not symmetrical to the center of the pattern. For an interpretation of the effect, it is most probable that the dynamical theory of electron diffraction will have to be considered.

Finally, some other diffraction effects were observed, which have not been interpreted up to now (fig. 5, b, c, d). The splitting up of a double refraction quartet into two spots occurs rather frequently, and has also been obtained by Molière (6).

REFERENCES

1. VON ARDENNE, M., *Kolloid-Z.* **108**, 195 (1944).
2. VON ARDENNE, M., SCHIBOLD, E., and GÜNTHER, F., *Z. Physik* **119**, 352 (1942).
3. BOIRSCH, H., *Ann. Physik* (5) **27**, 75 (1936).
4. HILIER, J. and BAKER, R. F., *J. Appl. Phys.* **17**, 12 (1946).
5. VON LAUE, M., *Ann. Physik* (5) **26**, 55 (1936).
6. MOLIÈRE, K., personal communication (1956).
7. MOLIÈRE, K. and NIJHRS, H., *Z. Physik* **140**, 581 (1955).
8. REES, A. E. G. and SPINK, J. A., *Acta Cryst.* **3**, 316 (1950).
9. RIECKE, W. D., *Phys. Verh.* (2) **6**, 20 (1955).
10. RIECKE, W. D. and RUSKA, E., *Z. wiss. Mikroskop.* (1957, in press).
11. RUSKA, E. and WOLFF, O., *Z. wiss. Mikroskop.* **62**, 465 (1956).

An Electron Microscope Examination of Freshly Prepared Silver Iodide Sols

R. OTTEWILL and R. W. HORNE

Dept. of Colloid Science and Cavendish Laboratory, University of Cambridge

ALTHOUGH silver iodide, which forms a typically hydrophobic sol, has been extensively investigated in the field of colloid chemistry, very little research has been devoted to an examination of this material in the electron microscope. Of the numerous hydrophobic sols which can be prepared the gold sols are the only ones to have received any considerable attention by this method, primarily as standards of resolution. In connexion with other physicochemical work on silver iodide sols, this material has been examined in a high resolution electron microscope. Numerous small particles of the order of 10 to 25 Å have been resolved and particles of below 10 Å have been detected. Since the resolution of such particles is of extreme interest in the field of electron microscopy and colloid science and probably constitutes the first resolution of colloidal particles approaching atomic dimensions, it is thought worthwhile to submit a preliminary report of the work at this stage, although a more extensive investigation is still in progress.

100 ml of a solution of silver nitrate (1.25 mM) were added with continuous stirring to 100 ml of a solution of potassium iodide (1.38 mM). The silver iodide sol formed under these conditions is a negatively charged sol, stabilized by the adsorption of I^- ions. The sol was freed from potassium nitrate formed during the reaction and from excess potassium iodide by continuous electro dialysis against distilled water. During this process the K^+ gegenions are removed to give a sol which may be represented as $(AgI)I \cdot H^+$ (1). The sol obtained after electro dialysis was diluted with an equal volume of distilled water to give a concentration of ca. 0.3 mmoles of silver iodide, and used at this strength for the preparation of the electron microscope grids. Silver iodide sols are reasonably stable to daylight, but specimens were always stored in the dark, as a precautionary measure.

Distilled water was always treated before use with an ion-exchange column to remove any remaining ions, and both reagents were recrystallised from this water. All glass ware was steamed for half an hour before use to remove any adhering grease film.

The sol was freshly prepared in order that aging phenomena, a process which includes possible changes in the form of the particles and changes in the size of particles owing to recrystallisation or slow flocculation, should not become important. However, only a small change in the mean diameter of a silver iodide sol after aging is found (2).

An examination of silver and silver iodide sols in

the electron microscope at instrumental magnifications of 40,000 and 80,000 revealed the presence of a large range of particle sizes from ca. 180 Å down to particles which were only just resolved by the microscope in the range of 6–10 Å. Only such particles were measured which were clearly resolved from the background structure and capable of being produced on separate electron micrographs. A preliminary analysis of diameters of 300 particles from a 400,000 times enlargement gave a distribution curve giving a mean particle diameter of 25 ± 5 Å.

The fact that the solubility of silver iodide is very small, $5 \cdot 10^{-7}$ mmoles litre compared with 0.3 mmoles litre present in the sol form, suggests that the small particles are colloidal in nature and are not formed during the drying down process by crystallisation of the silver iodide in molecular solution.

The shape of the silver and silver iodide particles in the electron micrographs appear to take many different forms. In the present work particles having a cubic face of side of 25 Å have been clearly resolved, also hexagonal particles are visible in the 50 Å region, whilst the larger particles (125 Å upwards) appear to be either approximately spherical or have irregular shapes.

The formation of a colloidal particle is almost certainly that of rapid growth from a nucleus, the latter consisting of only a few atoms, and it is possible

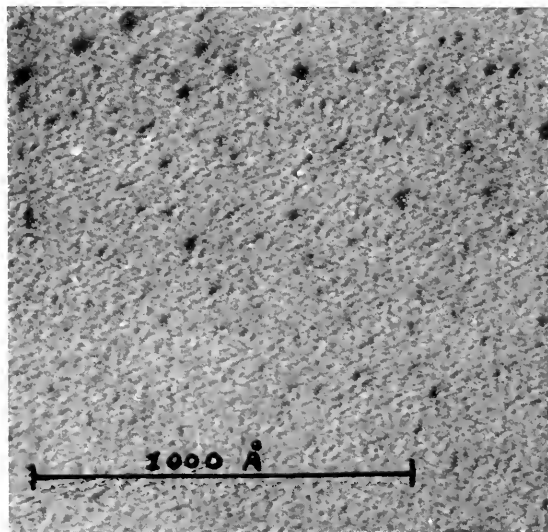


Fig. 1. Electron micrograph of silver iodide sol. Instrumental magnification 80,000. Final magnification 500,000.

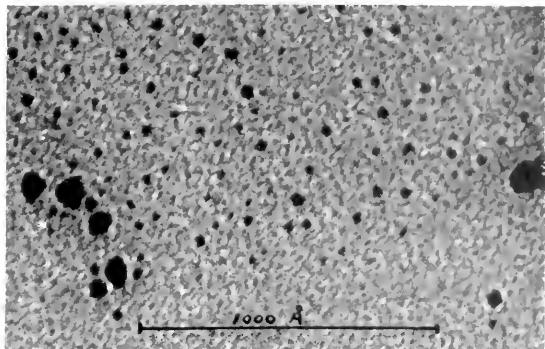


Fig. 2. Electron micrograph of silver sol. Instrumental magnification 40,000. Final magnification 400,000.

that the state observed here is that of a large number of small nuclei which may eventually grow to larger particles.

It is of interest to determine whether such particles disappear during the aging process or to some extent remain in "equilibrium" with the larger particles. The irregularity of many of the larger particles may to some extent be attributed to the angle at which the particle is resting on the supporting film and, or alternatively, to irregular growth during formation.

A serious limiting factor in determining the size and shape of particles below 10 \AA is the presence of background effects due to supporting films and also optical effects caused by focusing.

The relationship between the true crystal structure and the form of particles observed in the electron microscope is not easy to interpret because of the "shadowing" effect which occurs. However, it is of interest that J. J. Trillat and A. Laloef (3), in the electron diffraction study of silver iodide smokes, found that the particles present existed in both hexagonal and cubic crystal forms. The unit cell of the hexagonal form had the dimensions, $c = 7.94 \text{ \AA}$, $a = 4.58 \text{ \AA}$, and the unit cell of the cubic form had $a = 6.47 \text{ \AA}$.

It thus appears possible that colloidal silver iodide exists in both crystal forms, a fact which is being

further investigated by micro-diffraction techniques where it is possible to select areas down to 5μ diameter.

The presence of very small particles in the sol shows clearly the fact that colloidal particles may exist in size almost down to the range of atomic dimensions, and indicates that there is no strict boundary between atomic and colloidal particles. The distribution of particles of very small size also appears to extend much further than had been recognised hitherto using electron microscopes with a resolution of the order of 30 \AA . Comparison of silver with silver iodide sols strongly suggests that the dense scattering material is probably silver.

The mean diameter of the particles in a colloidal solution is an important factor in colloid chemistry, and its accurate evaluation essential for correlation between experiment and theory. The presence of such a magnitude of small particles may mean that hitherto, where the electron microscope has been used for the evaluation of size, the mean value has been too high because the smaller particles have been unresolved. The theory of Verwey and Overbeek (4) predicts that small particles of diameter ca. 20 \AA should have a very low stability, since they would require very high electric potentials (Ψ_0), and have low absolute values of repulsive potential energy. The latter is directly proportional to particle radius. The fact that particles of this size have been shown to exist in such profusion in the present work does indicate, however, that the preparation of very small colloid particles in a stable form is by no means impossible.

REFERENCES

1. DE BRUYN, H. and TROILSTRA, S. A., *Kolloid-Z.* **84** 192, (1938).
2. HARMSEN, G. J., VAN SCHOOIJEN, J., and OVERBECK, J. TH. G., *J. Colloid Sci.* **8**, 64 (1953).
3. TRILLAT, J. J. and LALOEF, A., *J. Chim. Phys.* **46**, 168 (1949).
4. VERWEY, E. J. W. and OVERBECK, J. TH. G., *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, 1948, 170-178.

V

SPECIMEN PREPARATION TECHNIQUES
IN BIOLOGY AND MEDICINE

Problems of Osmium Fixation

G. F. BAHR, G. BLOOM and U. FRIBERG

*Institute for Cell Research and Genetics, and Department of Histology,
Karolinska Institutet, Stockholm*

DURING fixation and subsequent treatment in various fluids great changes in volume of tissue specimens may occur. To our knowledge no measurements have been reported on the changes of volume during osmium fixation and following embedding according to the general technique applied for electron microscopical specimens. We have therefore considered it justified to present the results of quantitative measurements on the changes in volume, weight, and specific weight during this procedure.

The experimental method was based on the principle of Archimedes. For the weighing arrangement an analytical balance with a sensitivity of 0.1 mg was used. Mostly small pieces of guinea pig's liver weighing 150–200 mg served as test objects. Other tissues were used for the sake of comparison. A measuring group was comprised of at least 5 specimens. Fixation, dehydration, and methacrylate infiltration were carried out at 0° or 24° C, whereas paraffin infiltration was performed at 58° C.

Fig. 1 shows the changes which occur during fixation in 1% osmium tetroxide in isotonic Tyrode's solution at pH 7.2 over a period of up to 24 hours. A marked and rapid swelling is seen which reaches a maximum of 30% after 4 hours. Half of the final value is reached after only 15 minutes in the fixative. The weight curve follows closely the volume curve and therefore only the volume curves will be referred to. The specific weight rises during fixation as an expression of the binding of osmium in the tissues.

Changes during the continued preparation are

disclosed in fig. 1. The swelling that takes place in the fixative is now transformed—during dehydration—into a shrinkage that almost brings the volume back to the original value. During paraffin infiltration further shrinkage is noted, especially in specimens that were fixed at 0° C. Methacrylate, on the other hand, causes only a small shrinkage during infiltration, and can in this respect be regarded as a more favourable medium. During polymerization, however, methacrylate reduces its volume by 20%—just as does paraffin during solidification—and it seems that this shrinkage is more or less completely transferred to the specimens, as far as we can judge from planimetric observations on embedded liver pieces. Fig. 1 also shows that for methacrylate treated specimens the fixation temperature is of little influence on volume.

The specific weight that rises during the fixation falls during dehydration and finally rises again during infiltration.

In another experiment a comparison was made between various tissues (fig. 2). Certain differences in intermediate and final values are to be noted. The principal pattern is, however, the same for all tissues.

The swelling seen during osmium fixation, is in no way unique for this fixative. In a series of formaldehyde concentrations, ranging from 0.5 to 16% there is a swelling in all solutions, the magnitude of which is related in inverse proportion to the concentration of the fixative. Maximal swelling is

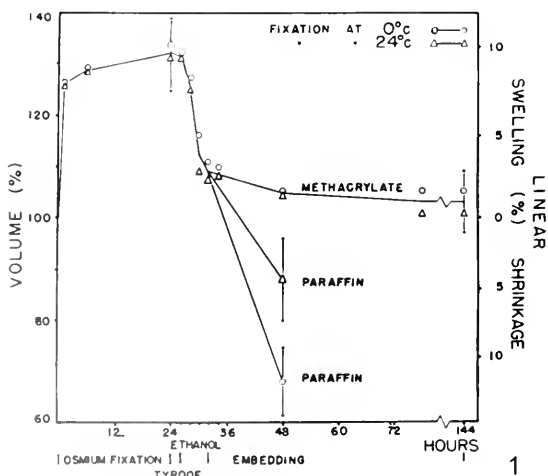


Fig. 1. Volume changes of pieces of tissues during osmium fixation and embedding.

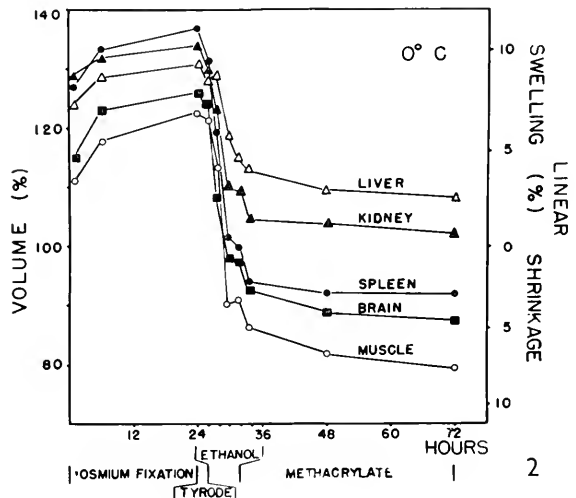


Fig. 2. Volume changes of pieces of various tissues during osmium fixation and embedding.

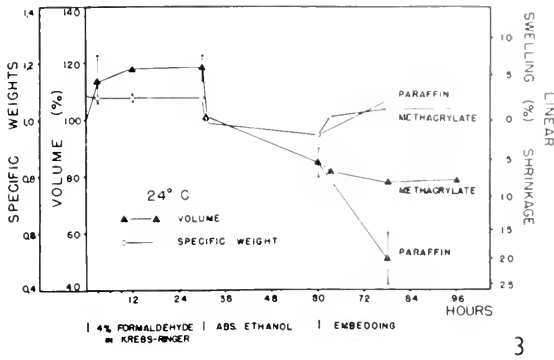


Fig. 3. Volume changes and variations in specific weight of pieces of tissues during formol fixation and embedding.

reached in 3 hours. Thereafter a shrinkage can be observed, the speed of which is not related to the concentration.

If formalin fixed specimens are followed further in the preparation procedures it is seen (fig. 3) that they react in a manner very similar to that described for osmium fixed material. Fixation in 4% formaldehyde gives an initial swelling of 18% after 12 hours. Dehydration and paraffin infiltration reduce the volume with 30% each. In methacrylate again, the shrinkage is small. The changes in specific weight are unimportant.

The results obtained indicate that the swelling in the fixatives is due not only to the fixing agents themselves but in a high degree to the aqueous media in which they are dissolved. Liver pieces were suspended in Tyrode's solution of various concentrations at 0°C. A swelling is noted in all, even those strongly hypertonic. As expected the swelling is most pronounced in the diluted solutions and in these, maximal swelling is also reached in shorter time.

Similar results are obtained with Krebs-Ringer media and also with sucrose solutions.

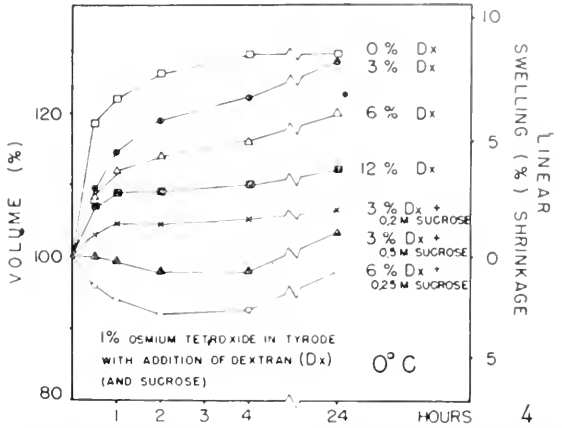


Fig. 4. Balancing of the volume changes of pieces of tissues during osmium fixation when adding dextran and sucrose to the osmium tetroxide solution.

The addition of small amounts of gelatin to physiological fluids has been recommended in order to reduce their toxic effects on cells. The addition of 0.25% gelatin to Tyrode's solution reduces the swelling significantly with about 20%.

Fig. 4 shows that a still more pronounced effect is noted with dextran. It is possible to use dextran in much higher concentrations than is possible with gelatin without increasing the viscosity to an impractical point. It is also seen that by combining dextran with sucrose it is possible to completely prevent the swelling.

The next question of great interest is if it is possible to reduce the shrinkage during dehydration to some extent. Dehydration in rising concentrations of ethanol brings about a more gradual shrinkage than absolute ethanol, but the end result is but little better.

In the literature various substitutes for ethanol as dehydrating agent have been proposed. From our results it is obvious that only methanol appears to give better results than those obtained with ethanol.

The Quantitative Assay of Lipids Extracted from Untreated and OsO₄-fixed Beef Brain

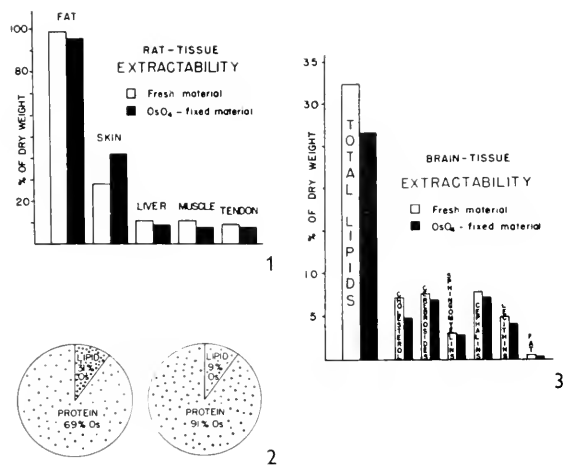
G. F. BAIER

Institute for Cell Research and Genetics, Karolinska Institutet, Stockholm

ALTHOUGH we know today where osmium *cannot* be expected to be found in a thin section, we really know little about the actual places of osmium reaction and deposition (1, 2). There has been much discussion about to what extent osmium is bound by the different constituents of a tissue. Now the main

interest is focussed on the question whether the lipids or the proteins are demonstrated by osmium deposits.

Our recent analyses show that osmium fixation renders a fraction of about 2% of the total dry weight unextractable in the form of lipids (fig. 1). Skin



obviously makes an exception in this series, because extractability is considerably increased. An explanation would be that here the fixation has opened up the tissue and rendered the lipids accessible for extraction.

The 2% lipids bound by the osmium fixation must consist of unsaturated compounds. In rats fed with a diet containing 5% fat, about 70% of the tissue fatty acids are unsaturated (3). Mammalian fat has as a rule an iodine number of 65 corresponding to a total capacity to bind 0.47 g Os per gram fat. With regards to the fact that only 70% of such fat is actually unsaturated, we calculate the osmium uptake by the unsaturated fat fraction to 0.63 g osmium per gram.

Ten per cent fat can ordinarily be extracted from tissues, which means that 100 g tissue dry weight has a maximal capacity to bind 4.7 g osmium by its lipids. Our analysis showed that maximal uptake values for liver tissue were about 15 g osmium per

100 g tissue dry weight. Thus the uptake exceeds the theoretical capacity of the tissue lipids by $\frac{2}{3}$. In other words, a considerable part of the osmium is bound by substances other than lipids.

Direct analysis shows that but little of the binding capacity of the lipids is actually used. Instead of theoretically possible 4.7 g only 1.3 g are taken up by the lipids in 100 g tissue dry weight. That is 8.4% of the total osmium uptake. (fig. 2.)

In consequence neither proteins nor lipids are significantly preferred by osmium.

Upon a question by Dr. Sjöstrand if there might possibly be a preference of certain compounds in the lipid fraction itself, an analysis of fixed and unfixed brain lipids was carried out. (fig. 3.) Technical details of the rather complicated analytical procedure cannot be discussed here and will be published elsewhere.

To demonstrate preferences of the osmium tetroxide fixation towards certain lipids an amount of osmium tetroxide was added corresponding to about 30% of the theoretical capacity of uptake. Six per cent lipids have been rendered unextractable but again no real significant preference for one type of lipid could be observed.

It may thus be said that osmium tetroxide fixation stains reactive compounds in tissues in even proportions, without giving significant preference to certain substances. Unfortunately more cannot be said from this study but that the well-known pattern of repeating dense and light bands in thin sections corresponds to accumulations of reacting and unreacting groups.

REFERENCES

1. BAHR, G. F., *Exptl. Cell Research* 7, 457 (1954).
2. — *ibid.* 9, 277 (1955).
3. DEUEL, H. J., *The Lipids*. N.Y. Interscience Publ. (1951).

The Fixation of Nuclei in Locust Testis

I. R. GIBBONS and J. R. G. BRADFIELD

Cavendish Laboratory, Cambridge

PREVIOUS studies on the problem of fixation, both with light and electron microscopes, have demonstrated the excellence of buffered osmium tetroxide in the preservation of cytoplasmic ultrastructure (4, 5). This work has been confirmed by the highly organized and highly reproducible ultrastructures observed with the electron microscope in the cytoplasm of cells after osmium fixation. However, with regard to the nucleus the situation is quite different. Little apparently organized ultrastructure has been observed in osmium-fixed nuclei either interkinetic or dividing. In view of this fact we have considered it desirable to re-examine the question of the fixation of nuclei.

The chromatin distribution within live nuclei of locust primary spermatocytes has been investigated by observing squashes of testis follicles in Belar solution with an ultra-violet microscope. Nuclei in meiotic prophase cells appear to have their chromatin arranged in intertwined strands, the thickness of these strands is variable and increases as the cell approaches diakinesis. When, however, osmium fixed nuclei of this material are examined in electron micrographs of thin sections they usually appear to have a rather homogeneous fine-grained appearance, and show little, if any, trace of the inhomogeneity of chromatin existing in live nuclei. In order to re-



Figs. 1-2. Electron micrograph (2) of a thin section of an osmium fixed nucleus in locust testis with an inset of an ultra-violet micrograph (1) of the same nucleus in an adjacent thicker section. Two clusters of mitochondria (*m*) are indicated. They possess considerable ultra-violet absorption.

solve this discrepancy, we have examined adjacent thick ($\frac{1}{2} \mu$) and thin (about 200 Å) sections of osmium fixed testis in ultra-violet and electron microscopes respectively. Low magnification micrographs permit the identification of identical nuclei in the two sections. A comparison between two sections of the same nucleus is shown in figs. 1-2. Fig. 1 is an ultra-violet micrograph of the thick section and shows

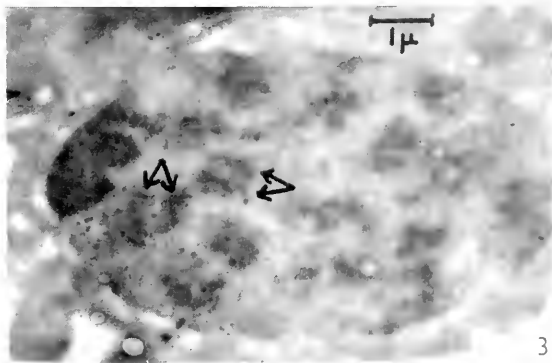


Fig. 3. Electron micrograph of locust testis fixed in 5% formaldehyde. Most of the field is occupied by a primary spermatocyte nucleus in which the pairing of the chromatids is indicated by the arrow.

that the inhomogeneous distribution of chromatin in the live nucleus is at least partly preserved by osmium fixation. Fig. 2 is an electron micrograph of the thin section of the same nucleus, it shows the homogeneous appearance typical of osmium fixed nuclei in this material and little trace of the inhomogeneities of chromatin existing in the section is discernible. This homogeneous appearance of nuclei in electron micrographs must, therefore, be ascribed not to the failure of osmium fixation to preserve chromatin distribution, but to its failure to produce appreciable contrast between chromatin and nuclear sap. We believe that this lack of contrast is evidence that osmium tetroxide does not react with desoxyribonucleic acid (2).

The general appearance of nuclei after osmium fixation is shown in fig. 2. The nucleus shows a rather homogeneous fine-grained structure with little trace of organisation. When examined at high magnification occasional traces of organised structure are seen appearing as groups.

The general appearance of nuclei after formaldehyde fixation is shown in fig. 3. The distribution of chromatin within the nucleus is easily visible because the relative contrast between chromatin and nuclear sap is higher than in osmium fixed nuclei. The pairing of the chromosomes during prophase is indicated but the chromosomes still show no apparently highly organised structure. As regards contracted chromosomes, the contrast between chromatin and cytoplasm is higher than in osmium fixed material but there is a similar apparent lack of organisation. The chromosomes may appear to possess a split down the centre but the significance of this is hard to interpret because of the difficulty of identifying the stage of meiosis from a thin section.

One of the classic fixatives used in light microscope studies of chromosomes is 45% acetic acid and we have considered it worth while to examine material fixed in this way in the electron microscope. In sections which are not too thin it is possible

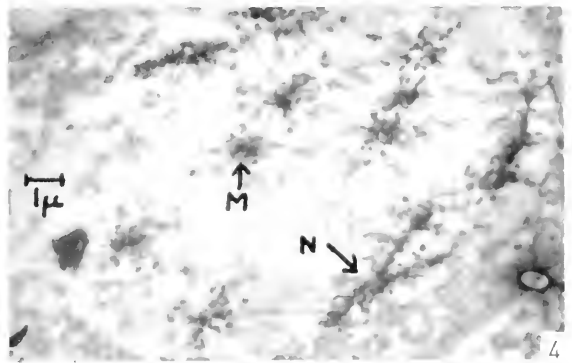


Fig. 4. Electron micrograph of locust testis fixed in 45% acetic acid. The pairing of the chromatids is indicated in transverse section (M) and longitudinal section (N).

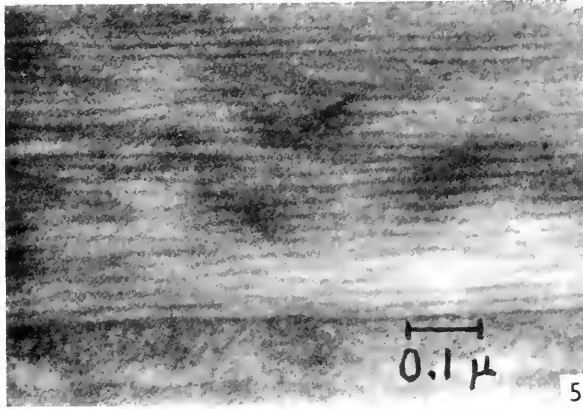


Fig. 5. Electron micrograph of a longitudinal section of a locust immature sperm head fixed in 1% osmium tetroxide.

to distinguish such gross characteristics as pairing of chromatids (fig. 4) both in transverse section (M) and longitudinal section (N). When thinner sections are used in order to obtain higher resolution the poor preservation makes interpretation almost impossible.

Sperm and spermatid heads of the locust have been shown by birefringence studies and ultra-violet dichroism studies (1) to contain nucleic acid molecules orientated along the axis of the head. It is, therefore, interesting to examine this material in the electron microscope after various fixatives in order to obtain some idea of the value of these fixatives in preserving chromatin fine structure. While we have not as yet been able to demonstrate structure in mature sperm heads, we have observed well defined and characteristic structure in the heads of spermatids. This structure in the most highly developed form we have been able to observe is shown in longitudinal section in fig. 5 where it appears as a large number of parallel lines of thickness about 70 Å which are orientated along the axis of the head. The corresponding transverse section—which is from the same cyst in the follicle and so must represent the same stage of development — is shown in fig. 6 to be a large number (about 270 in this case) of tightly packed polygons. We interpret these sections to mean that the head contains a large number of parallel tubes orientated along its axis (3). At this stage of development the head is shrinking rapidly and at later stages this structure seems to become too tightly packed to be easily visible and the head appears structureless. At earlier stages of development we have observed that material first seems to aggregate into sheets and that these sheets then appear to wrap around each other to form the tubed structure described above.

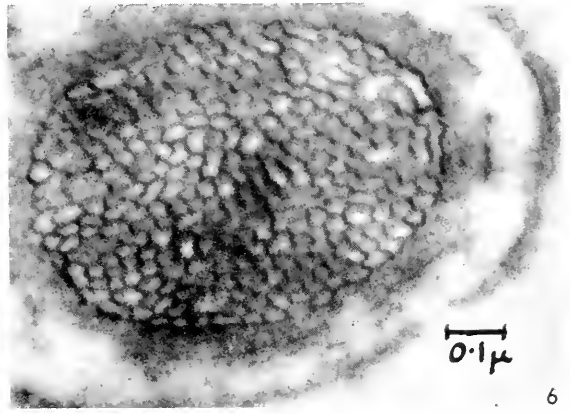


Fig. 6. Electron micrograph of a transverse section of a locust immature sperm head in the same cyst in the follicle as that shown in fig. 5 and hence at the same stage of development.

We have observed this structure after fixation in 1% buffered osmium tetroxide and after 5% buffered formaldehyde there being little obvious difference in the quality of preservation. We have also been able to observe the structure, though less well-preserved, after fixation in 45% acetic acid—a classic but brutal chromatin fixative.

It must be admitted that the results of the application of electron microscopy to the study of nuclei have been somewhat disappointing. In particular no further insight has been gained into the processes of mitosis and meiosis which at the level of the light microscope appear so mysterious and dramatic. It is not yet possible to say whether this is due to poor preservation by the existing fixatives, or to the presence of a type of organisation very hard to analyse in thin sections or to an actual lack of organisation within the region of size that can be observed with this technique. Our opinion is that a combination of the first two reasons given above is perhaps the most likely explanation. In this connection we feel it is pertinent to point out the possible use of high magnification stereo-photographs of fairly thin sections (from which removal of embedding material is not necessary) in elucidating the complex fine structure of chromatin.

REFERENCES

1. CASPERSON, T., *Chromosoma* **1**, 605 (1940).
2. GIBBONS, I. R. and BRADFIELD, J. R. G., *Biochim. et Biophys. Acta* (1957, in press).
3. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* (1957, in press).
4. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
5. PORTER, K. R. and KALLMANN, F., *Exptl. Cell Research* **4**, 127 (1953).

Ultra-thin Sections of Avian Tubercle Bacilli in a New Embedding Medium

A. M. GLAUERT¹ and E. M. BRILGER

Strangeways Research Laboratory and Papworth Hospital, Cambridge

THE reproduction of the tubercle bacillus presents a particularly interesting subject for study. The mycobacteria may be considered to occupy an intermediate position between the ordinary bacteria, which reproduce by binary fission, and the *Nocardia* and fungus-like organisms that undergo a more complicated life-cycle involving budding, branching and mycelial development.

We have previously studied the development of the avian tubercle bacillus in the phase contrast microscope (2) and were able to show that it can reproduce in more than one way. In some strains the rods of the original inoculum elongate and then divide directly by binary fission; these organisms behave like the ordinary bacteria and such strains have been described as "bacillary" strains. In other strains the original rods grow and branch, without immediate division, to form complex mycelial structures. These mycelia finally break down by a process of simultaneous multiple division to produce a mass of rods similar in appearance to those of the original inoculum.

These two types of development of avian tubercle bacilli have also been investigated in preparations of intact organisms in the electron microscope (1).

Only a limited amount of information can be obtained from such a study owing to the thickness of the bacilli, but it was obvious that a marked difference in internal structure underlay the differences in the reproductive processes. At the same time an unexpected development of round bodies or "intracellular units" was observed within the elongated rods of the bacillary strains. These bodies have since been examined more closely by the technique of ultra-thin sectioning and the accompanying cytoplasmic changes have been observed.

As other workers with bacteria have also observed, we found that the organisms were frequently distorted during the familiar preparative procedures for ultra-thin sectioning.

These observations led us to consider the possibility of using an alternative embedding medium. Maaloe and Birch-Andersen (5) have already had considerable success with a resin of the epoxy type and we have been experimenting with resins of the same series.² The ones we have been investigating are marketed under the trade name of Araldite.

A standard liquid epoxy resin is used and is made more plastic by the addition of dibutyl phthalate. On the addition of a suitable hardener the resin sets uniformly, without shrinkage, to form a clear, light-gold block. Originally we used an aliphatic polyamine as the hardener, this being the usual type of cold-setting hardener for these resins. Unfortunately, as was discovered by Maaloe and Birch-Andersen (5), a mixture of the resin with this hardener is difficult to handle and is not ideal for electron microscopy. The mixture is very viscous so that impregnation is difficult and also it is not readily soluble in absolute alcohol. On the advice of Dr. Glauert, of Aero Research Ltd., we have experimented with a different hardener with promising results. If the casting resin is mixed with equal quantities of this new hardener, which is a liquid anhydride, the resultant mixture is sufficiently fluid to be handled easily and is readily soluble in absolute alcohol. The hardening process takes a considerable time at normal incubation temperatures, but it can be speeded up as much as required by the addition of an amine accelerator.

After various trials we have found the following mixture to be suitable as an embedding medium:—

"Araldite" for ultra-thin sections

Casting resin M	10.0 ml
Hardener 964 B	10.0 ml
Dibutyl phthalate	1.0 ml
Accelerator 964 C	0.4 ml

Slight variations of this formula may be found convenient for different types of specimen.

For ease of handling the resin is mixed and the specimens are soaked at 48 C. The fixation of the specimens in buffered osmic acid and dehydration in graded alcohols is the same as for methacrylate embedding. From absolute alcohol the specimens are passed to a 50:50 mixture of alcohol and Araldite at 48 C for 1-2 hours, then to two changes of the Araldite mixture at 48 C for 2-3 hours and finally into gelatin capsules with fresh Araldite. The blocks harden in about 30 hours at 48 C. It has been found advisable to incubate the specimens at 48 C, because at other temperatures there is a tendency for soft specimens to rise in the capsule during the setting process.

The resultant blocks have a similar hardness to methacrylate and thin sections have been cut with ease. Parallel specimens were embedded in methacrylate so that a direct comparison could be made.

¹ Sir Halley Stewart Research Fellow.

² These resins were developed by Messrs. Ciba Ltd. of Basel and are made in England by Aero Research Ltd. of Duxford, Cambridge.

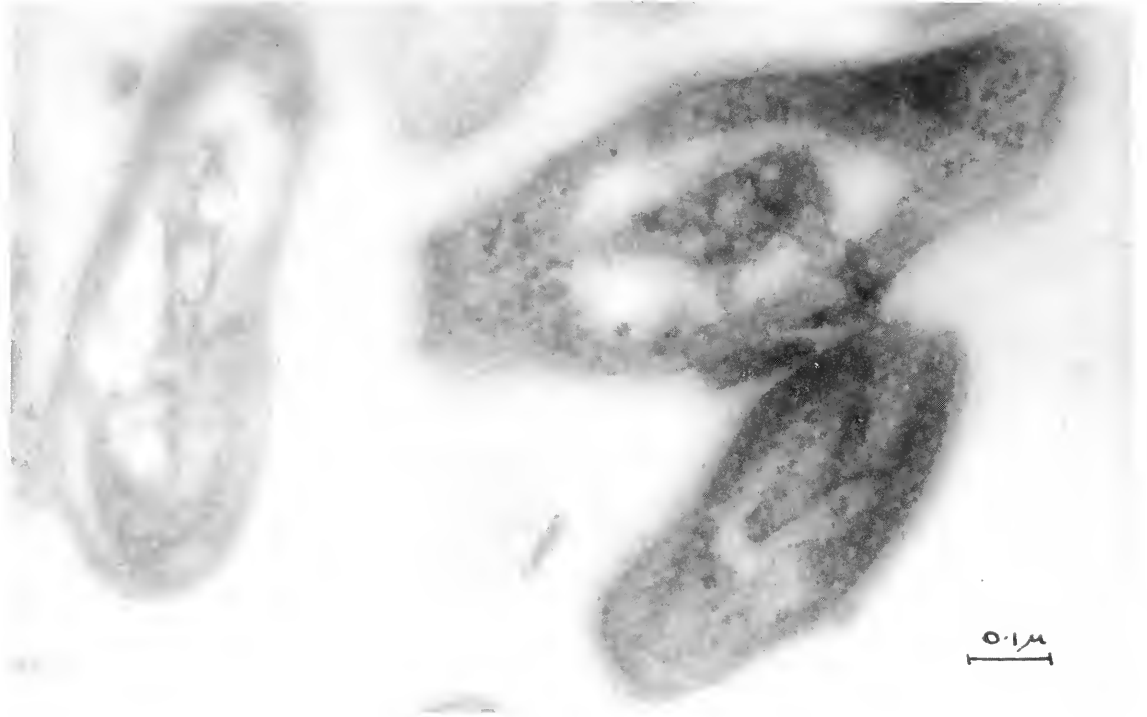


Fig. 1. Ultra-thin section of avian tubercle bacilli embedded in methacrylate. The organisms are distorted. Note the complex nuclear apparatus and large cytoplasmic granules. $\times 110,000$.

If the original inoculum is viewed directly, without sectioning, it is seen to consist mainly of short rods with electron-dense polar bodies and a transparent, structureless cytoplasm. After 24 hours' growth these rods elongate and round bodies are clearly visible within them. These bodies have distinct membranes and it was suggested that they might correspond to the segmentation spores of the *Nocardia*.

Methacrylate.—Sections of the small, transparent rods of the inoculum show that they have large central light areas containing threads and granules, the "nuclear apparatus". The cytoplasm, which occupies a narrow peripheral zone, has a granular structure, the granules ranging in size from 100 to 200 Å. There is some evidence of the presence of fine threads and membranes within the cytoplasm but the cells are not sufficiently well preserved for these to be accepted with any certainty. The cells are obviously swollen and distorted and nothing definite can be deduced concerning the nature of the nuclear material.

After 24 hours' incubation the rods of the inoculum have elongated, the dense threads and granules in the nuclear region have more complex configurations and the cytoplasm is denser (fig. 1). The cytoplasm still has a granular structure and in some organisms there is also a scattering of larger granules of 200 to 400 Å diameter. A few of the organisms are in process of dividing by binary fission to form two daughter cells, each with its own nuclear apparatus.

At later stages in the development of the bacilli a very different pattern of internal structure is seen. Rows of round bodies are observed forming inside the bacilli. These units have a finely granular structure of uniform density and are enclosed within a definite limiting membrane. Their formation is accompanied by an increase in the number and size of the larger cytoplasmic granules. The bodies do not appear to contain an organised nucleus and in the early stages of their development the nuclear apparatus of the bacillus is still visible outside them. We interpreted these bodies as spores (3), although the later stages of their reproduction will have to be followed before their nature can be clearly established. In structure and development they bear a remarkable similarity to the spores of the ordinary bacteria described by Chapman (4).

Araldite.—The study of similar organisms embedded in Araldite is only in its early stages but certain differences of structure have already been observed.

As was stated earlier, most of the bacilli appear to be far better preserved. The cell wall is no longer separated from the cytoplasm and there is clear evidence of a cytoplasmic membrane underlying the cell wall (fig. 2). This membrane has proved to be particularly elusive in studies of methacrylate sections. The fine limiting membranes of the developing spores are also clearly seen and appear to be double (fig. 3). There seems to be no doubt that these fine membranes are seriously distorted during methacrylate embedding.



Fig. 2. Ultra-thin section of avian tubercle bacillus embedded in Araldite. The organism appears smooth and there is a fine cytoplasmic membrane underlying the cell wall. 60,000.

Fig. 3. Ultra-thin section of avian tubercle bacillus embedded in Araldite. A spore is developing in the centre of the bacillus and is enclosed in a fine double membrane. 80,000.

The so-called vacuole is usually filled with a fine network and the central dense structure has a far more uniform appearance. Instead of the complex mass of threads and granules that are observed with methacrylate we find a smooth thread-like structure with associated dense granules.

These results with Araldite are only preliminary but seem to us to be promising. Some similar tests have been made with mammalian tissues and there are indications that Araldite will be useful in the preparation of hard tissues, such as adult hairs.

We would like to thank Dr. R. H. Glauert, of Aero Research Ltd., for his cooperation throughout the course of this work. Some of the electron micrographs were taken in the Cavendish Laboratory, Cambridge, and we would like to thank Dr. V. E. Cosslett and Mr. R. W. Horne for providing electron microscope facilities.

REFERENCES

1. BRIGER, E. M., COSSLETT, V. E., and GLAUERT, A. M., *J. Gen. Microbiol.* **10**, 294 (1954).
2. BRIGER, E. M. and GLAUERT, A. M., *J. Gen. Microbiol.* **7**, 287 (1952).
3. — *Nature*, **178**, 544 (1956).
4. CHAPMAN, G. B., *J. Bacteriol.* **71**, 348 (1956).
5. MAALOI, O. and BIRCH-ANDERSEN, A., VIIIth Symp. Soc. Gen. Microbiol. "Bacterial Anatomy", p. 261. (1956).

The Use of Gelatin for Embedding Biological Objects in Preparation of Ultrathin Sections for Electron Microscopy

V. P. GILĚV

Lab. of Electron Microscopy, Acad. of Sciences of the USSR, Moscow

THE majority of investigators working in the field of electron microscopic cytology and histology use the method of embedding biological objects in methacrylates (3).

It was proposed to embed biological objects in polyethylenglycols of high molecular weight which are soluble in water, (1, 2, 5). But due to the fact that preparation of ultrathin sections of the objects embedded in these substances was difficult, this method did not become wide-spread in electron microscopy.

The method we offer is based on the use of gelatin as embedding medium. It makes it possible to completely exclude treatment of objects with organic solvents and to obtain sections up to 0.03–0.04 μ thick and, perhaps, thinner.

A 10% water solution of food gelatin is boiled for several minutes together with beaten-up hen egg albumen and activated charcoal. Per 300 cm³ of gelatin solution we take the albumen of one hen egg and 3 g of activated charcoal. Then the solution, while it is warm, is filtered first through paper and then through an asbestos bacterial filter. One portion of solution is evaporated in a thermostat at a

temperature of 45 C until there remains half of its content, and the other one until there remain three thirds of the initial volume; in this way we obtain 20% and 40% solutions which are used for impregnation and embedding.

We may prepare 20% and 40% solutions of refined gelatin in Ringer solution.

The solutions should be absolutely transparent. To prevent from rotting some thymol is added.

The objects (striated muscle tissue of axolotl, *Amblystoma punctatum*) were fixed by osmium tetroxide (4) at pH 7.4–7.5 during 20 hours at a temperature of -1°C . After being washed in pipeline water or in Ringer solution (1–4 hours), the objects were placed for 4 hours into 20% solution of gelatin heated up to the temperature of 37 C and then for 15 hours into a 40% solution. During this period of time the pieces of muscle tissue to the size of 1–0.3–0.3 mm are well impregnated with gelatin. Then the 40% solution of gelatin with the objects enclosed in it is poured out on oil cloth and dried slowly at the temperature of 37 C to such a state in which gelatin is not brittle.

The plate of gelatin with the objects included in it is separated from the oil-cloth and cut for rectangular blocks. The blocks are glued up with 40 % solution of gelatin to the old methacrylic blocks sharpened in the form of a truncated pyramid and placed for several hours into a thermostat (37°C) for complete drying.

Immediately before cutting in a microtome the blocks are sharpened in such a way that the square of the section will not exceed 0.2 mm². The blocks are kept in cans with tight caps.

Cutting is effected with a glass knife (without fluid). In our work we used a microtome of Danon and Kellenberger. The long side of the block should be parallel to the sharp edge of the knife. The blocks just dried are cut worse when the weather is dry; in this case it is better to cut them not earlier than in 24 hours after they were exposed to the air. In the case of considerable humidity of the air and blocks, it is recommended to dry them some time before cutting. Position of the knife in cutting gelatin blocks is usually, to some extent, steeper than in cutting methacrylic blocks. The rate of cutting is approximately 1 section per 1 sec. It is not difficult to obtain sections 0.03–0.04 μ thick. Usually the sections are formed in the shape of enduring undissintegrating ribbons. These ribbons are sorted out and individual sections or groups of sections are transferred with the aid of a thin filament into drops of water (or better of 2 % solution of acetic acid) lying on a l.c. Parlodion film that floats on the surface of water (temperature of about 37–40°C) filling a Koch cup. But better results are obtained when the sections are placed into water of room temperature, which is subsequently heated up to 37–40°C.

Expanding, the sections in most cases lose their bonds with each other and, therefore, not always a series of sections may be obtained. Then the film under each drop is punctured with a thin needle and the sections sink to the undamaged part of the film. The copper grids are placed on the film in such a way that the centre of the grid is above the section. After that from above a microscope slide is placed. Having put it upside down, we withdraw the film with grids.¹ After drying the specimens are ready for examination (fig. 1).

For more complete removal of gelatin from the sections the ready grids with the specimens are placed for 2–4 hours into warm water (37–40°C) or into a weak solution of acetic acid.

The osmium tetroxide that remains in the object after fixation and washing (especially when it is done for a short period of time) interacts with gelatin, after which the latter becomes less transparent, hardly removable from the section and creates a rather strong background that makes some fine de-

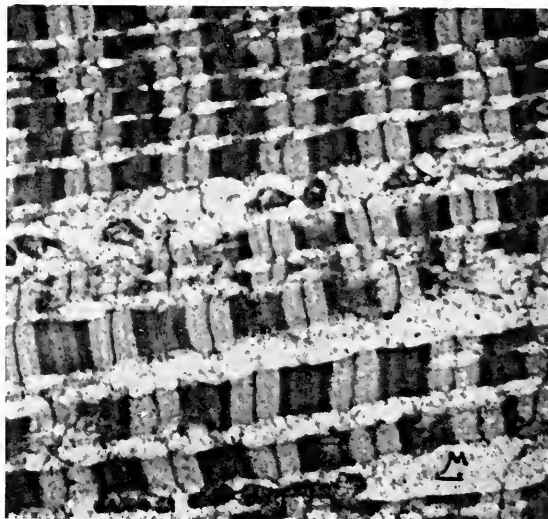


Fig. 1. Striated muscle tissue of the axolotl (*Amblystoma punctatum*). The section has been treated with 4 % acetic acid.

tails of the structure of the tissues less visible. Therefore, it is recommended that before enclosing the objects in gelatin, fixation should be shorter and washing longer. It can be supposed, however, that the presence of the background obliterating the boundaries of some structures, is connected with the presence of substances which are otherwise eliminated or precipitated, while the specimen is treated with alcohols and methacrylates.

In the case of thinner sections it is recommended to examine them without removal of embedding medium (gelatin). In this case the sections should be expanded in cold water (about +1 to +2°C).

The tissues, embedded in gelatin, can be easily cut with a glass knife for sections 1 μ thick for examination in the light microscope. In this case the blocks should not be too dry and, therefore, are kept in open vessels. The sections are glued up to microscope slides with albumen, to which some glycerine has been added. The gelatin is dissolved in warm water.

REFERENCES

1. BRANDES, C. H., *Mikrokosmos* **44**, N7, 167 (1955).
2. FIRMINER, H. J., *Stain Technol.* **25**, N3, 121 (1950).
3. NEWMAN, S. B., BORYSKO, E., and SWERDLOW, M., *J. Research Nat. Bur. Standards* **43**, 183 (1949).
4. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
5. RICHARDS, A. G., ANDERSON, T. F., and HANCE, R. T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **51**, N1, 148 (1942).

¹ This method of mounting sections was elaborated together with V. I. Birjuzova, one of the workers of our laboratory.

On the Preparation of Ultrathin Serial Sections by Means of a Watchmaker's Lathe

W. NIKLOWITZ

Institut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, der Akademie der Wissenschaften zu Berlin

ULTRATHIN sections suitable for studying biological objects in the electron microscope are prepared by means of conventional microtomes or by making use of new constructions of these instruments (for references, see 16, 20).

To-day's trend is to employ ultramicrotomes which have proved most satisfactory—such as the excellent ultramicrotome of Sjöstrand. However, since about one year we make use of a watchmaker's lathe in preparing ultrathin sections. This apparatus is characterized by great simplicity both in its construction and in its operation. I should like to try to give a short description of the instrument, and to report subsequently some results obtained.

The basic principle of this ultramicrotome is a commercial watchmaker's lathe, as it was used already by Giuntini and Edlinger (10). Technical details have already been reported elsewhere (16). This ultramicrotome is fitted with a thermal advance of the knife similar to that recently described (6). The difference is, that with our apparatus the cooling of the metal rod supporting the knife is utilized in forwarding the latter. According to the rotating principle, the object to be cut passes the glass knife (made of Jenaer Geräte-Glas 20) only once during one cutting cycle. This ultramicrotome provides series of ultrathin sections that are relatively uniform and have a mean thickness of about 300 Å. The thickness of the sections may be adjusted by means of the speed with which the sections are made. In the meantime several of these microtomes are put into operation, and we may now state that they have given the same satisfactory results.

In order to demonstrate the usefulness and efficiency of this microtome, some results of our investigations, partly still in course, partly already published, shall now be reported.

The first micrographs of ultrathin sections shown were given for comparison only. They represent sections of the kidney of the *white mouse*, an organ generally chosen as an object for tests, because of the variety of its submicroscopic cellular structure (16).

Regarding the problem of the origin of specific granules from the *mitochondria in Ehrlich's ascites carcinoma* of the white mouse, the microscopical (phase contrast) and histochemical investigations carried out in our institute by Kieser (12) shall be extended by means of ultrathin sections. The mitochondria of the tumor cells have the same specific substructure as already described for other tissues (21). The cristae, however, may be arranged both in

the longitudinal and the transverse direction of the mitochondria. Furthermore, there are to be seen single or several spherical granules, strongly osmiophilic, and enveloped by a common membrane. They are, in early stages of development, of the same magnitude as the mitochondria. These preliminary results, therefore, may suggest that the granules possibly may arise from mitochondria, as is the case in the cloudy swelling of the kidneys (8).

Recently it was shown on different objects that the plastids of the higher plants are formed of submicroscopic lamellae (summarizing literature see Frey-Wyssling, (7)). Systems of such lamellae are demonstrable also in the chromatophores of the green algae. This fact has been demonstrated by means of a micrograph of a chromatophore of a green algae, the mean thickness of the lamellae being 30 to 40 Å.

This observation led us to the investigation of the substructure of *cyanophyceae* (blue-green algae) during the past few years. In this group of organisms, too, we were able to state that the chromatoplasm — the region of the cell containing the assimilative pigments — consists of submicroscopic systems of lamellae (18, 19). Having already furnished proof in a previous paper that systems of lamellae are to be found in *Rhodospirillum rubrum*, an autotrophic bacterium (17), we are now able to state definitely that *in all organisms containing chlorophyll, the assimilatory pigments are probably attached to submicroscopic systems of lamellae*.

Furthermore, three types of granules may be differentiated in cyanophyceae: small, strongly osmiophilic granules, granules of inorganic phosphate, and, as a particular and characteristic group, granules exhibiting lamellar structure in ultrathin sections and having mitochondrial function, as was demonstrated in histochemical investigations. This latter group of granules was provisionally designed as "ferment active granules" (4, 5).

Among the representatives of the Nostocaceae there are further distinct elements in the region of the centropiasm, a detailed description of which will be published elsewhere (19).

For a number of years, we have also been concerned, to a certain extent, with the substructure of bacteria (13-15). The results of our recent investigations, comprising primarily the problem of the nucleus and of equivalents of the nucleus respectively, will be published elsewhere. According to our observations, the equivalents of the nucleus, both in bacteria and in cyanophyceae, as seen in electron micro-

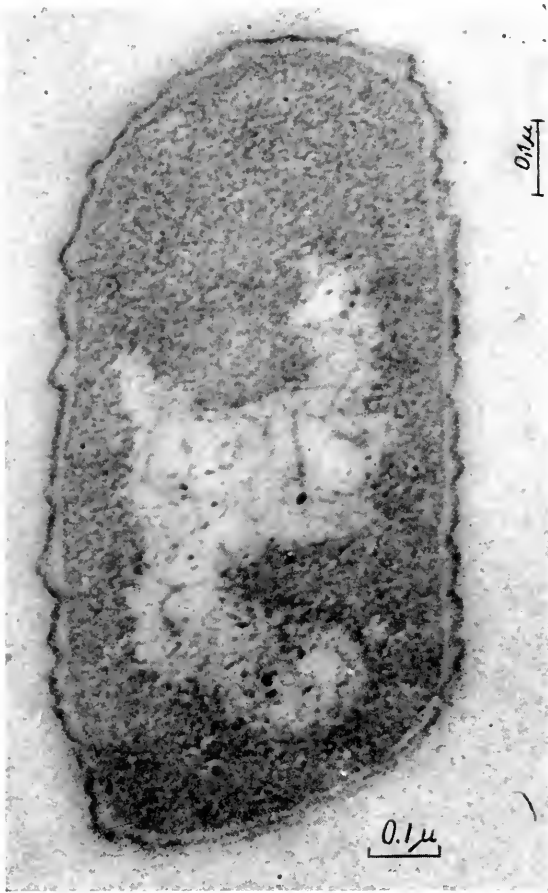


Fig. 1. Electron micrograph of an ultra-thin longitudinal section from *Escherichia coli* (three hours culture). Magnification 90,000.

scopic investigations, reveal a structure deviating from that of higher organisms. In our opinion the idea drawn from what was seen in ultrathin sections and light-microscopical investigations, i.e. that bacteria contain true nuclei with chromosomes, is premature, especially when taking into consideration that even the results concerning the fine structure of chromosomes in higher organisms are still rather incomplete. Moreover, comprehensive studies of fixed series of different stages of the development revealed that the image will largely depend upon the fixation. According to Geitler (9), emphasis should not rest on the alternative question nucleus or no nucleus, chromosomes or no chromosomes, but on exactly hitting upon the equivalents of the nucleus.

From our investigations the following procedure has proved most favourable for the fixation. The objects—whether prefixed (2, 11) or not—are fixed in a puffed solution of OsO_4 (pH 6.8; 7.1; 7.4),

added with 0.2 M saccharose for 10–15 min. at 4°C. This fixation is followed by a further one in formol (1:10) for 4–6 hours.

This procedure avoids an unfavourably long exposure to OsO_4 , as well as the addition of NaCl (3). As has earlier been stated (1), a prolonged fixation with OsO_4 causes a destruction of the tissues, and the addition or a washing with NaCl entails an enormous loss of substances (22).

Fig. 1 represents a section through *Escherichia coli*. The substructure of the cytoplasm is granular. In the central bright region filamentous elements with a mean thickness of 80 Å may be recognized.

From our investigations it became evident that the distribution and the diameter of these filaments will vary with different fixations.

This short report at this Conference was intended to demonstrate that our ultramicrotome renders possible to do routine sections which are suitable for carrying out submicroscopic studies, and I should like to conclude my arguments citing a sentence of the nestor in the field of investigation of submicroscopic structures, Frey-Wyssling, who states that just as classical physiology reached its present summit only following the perfection of histology, the progress in physiology of the cell will depend upon shedding more light on the submicroscopic morphology of the cell.

REFERENCES

1. BAHR, G. F., *Exptl. Cell Research* **9**, 277 (1955).
2. BIRCH-ANDERSEN, A., MAALOE, O., and SJÖSTRAND, F. S., *Biochim. et Biophys. Acta* **12**, 395 (1953).
3. CHAPMAN, C. B. and HILLIER, J., *J. Bacteriol.* **66**, 362 (1953).
4. DREWS, G. and NIKLOWITZ, W., *Arch. Mikrobiol.* **24**, 147 (1956).
5. — *ibid.* **25**, 333 (1956).
6. EKHOLOM, R. and ZELANDER, T., *Experientia* **12**, 195 (1956).
7. FREY-WYSSLING, A., *Protoplasmatologia* **2**, A/2 (1955).
8. GANSLER, H., Vortrag auf der 6. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Münster 1955.
9. GEITLER, L., *Fortschr. Bot.* **17**, 1 (1955).
10. GIUNTINI, J. and EDLINGER, E., *Ann. Inst. Pasteur* **86**, 671 (1954).
11. KELLENBERGER, E. and RYTER, A., *Schweiz. Z. Pathol. u. Bakteriologie* **18**, 1122 (1955).
12. KIESER, H., *Arch. Geschwulstforsch.* (1957, in press).
13. KNÖLL, H., *Zeitschr. Naturwissenschaften* **5**, 38 (1944).
14. KNÖLL, H. and ZAPF, K., *Zentr. Bakteriologie, Parasitenk., Abt. 1 Orig.* **157**, 389 (1951).
15. — *ibid.* **161**, 241 (1954).
16. NIKLOWITZ, W., *Mikroskopie*, Wien, **10**, 401 (1955).
17. NIKLOWITZ, W. and DREWS, G., *Arch. Mikrobiologie* **23**, 123 (1955).
18. — *ibid.* **24**, 134 (1956).
19. — *ibid.* (1957, in press).
20. SITTE, H., *Mikroskopie*, Wien, **10**, 365 (1955).
21. SJÖSTRAND, F. S. and RHODIN, J., *Exptl. Cell Research* **4**, 426 (1953).
22. SYLVÉN, B., *Acta Union Intern. contre le Cancer* **7**, 708 (1951).

How to Prepare Ultrathin Sections of Tissue Cultures

V. DOSTAL

Behring-Werke, Marburg a. d. Lahn, and the Department of Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

OWING to improvements in method, tissue cultures have in recent years become of growing importance for the culture of viruses, for the quantitative determination of infectivity, for carrying out neutralization tests, and for the morphological study of multiplication processes. In addition, they are being used for diagnoses and for the production of vaccines.

In recent years I have worked on the culture of viruses, especially the poliomyelitis virus and the vaccine virus. The basic materials used were monkey and calf kidneys which I prepared for the examination in the electron microscope. The tissues treated (1, 5) in culture bottles grow into a cell outgrowth predominantly in monolayers at the bottom of the container within a few days.

Various methods as to how to produce ultrathin sections are already known. D. C. Stuart (4) specified a method in which the embedding, i.e. the poly-

merization, takes place directly at the cell attached to the tube. C. G. Harford, A. Hamlin, and E. Parker (2) have the tissue grow on a formvar foil, afterwards embedding the latter. I chose to make a sediment of tissue cultures which I obtained from full-grown, normal, and infected cultures.

For preparing the sediment I used such tissues as are normally developed in producing poliomyelitis vaccine. The tissues were partly not infected, partly they displayed a certain state of virus multiplication within the cell. The tissue to be examined by electron microscopy is processed up to its being embedded in the culture bottle. It is fixed with a solution of 1% phosphate-buffered osmium tetroxide (according to Sjöstrand). In order to remove cell detritus, the cell surfaces were previously rinsed with Hanks' solution. The cells were dehydrated with alcohol. The change to methacrylate mixture was via various

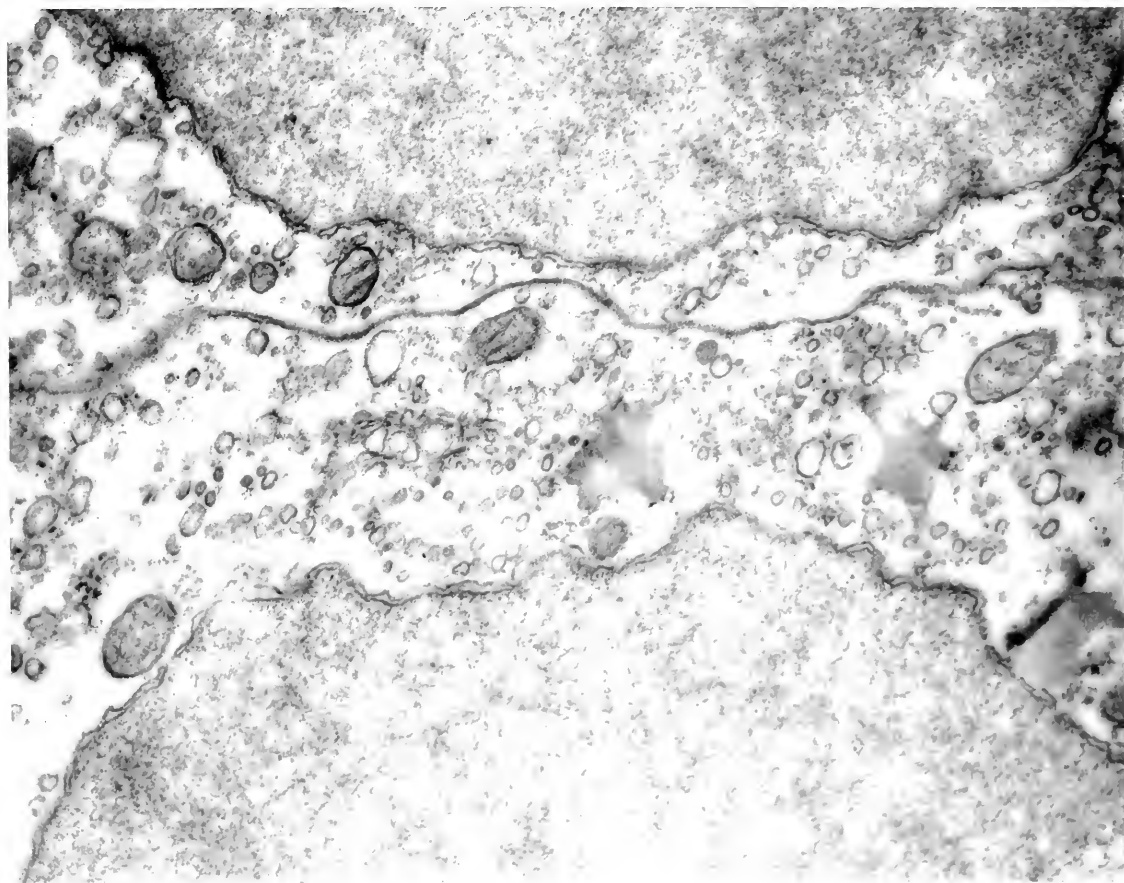


Fig. 1. An ultrathin section of a monkey kidney tissue culture which had been infected with vaccine-virus. The tissue was fixed 48 hrs. after infection. In the photograph the nuclei of two cells are to be seen which distinctly show the double membrane. Furthermore, the cell border is easily recognizable as a double membrane. In the protoplasm various mitochondria with their septa. All over the hyaloplasm there were lots of small, rotund forms; besides, there were some hyaline osmiophilic areas. Siemens Electron microscope UM 100 c, Magnification 28,000.

alcohol-methacrylate mixtures. Since the cell outgrowth is predominantly in monolayers, the respective periods during which the tissue has to stay in the various media from fixation to embedding may be comparatively short. Cells were damaged by staying too long in alcohol of a higher percentage, e.g. over night. No shrinkage of cells was noticed by light microscopic examination. The tissue was detached from the bottle in the non-polymerized methacrylate mixture, by means of a rubber-coated, bent glass rod. By centrifuging the cell suspension at about 300–500 rpm for five minutes one gets a compact sediment. When properly fixed, its color is a dirty brown.

Sedimentation was already effected in a butyl-methyl-methacrylate mixture (4:1) with 2% dichlorbenzoylperoxide (3). The methacrylate mixture was not polymerized preliminarily; however, the filled gelatine capsules were evacuated for five minutes before being deposited in the incubator in order to ensure removal of gas pockets, which are easily formed in sediments. Incubation was carried out at 48 C for about 30 hrs.

The ultrathin sections were prepared with an ultra-microtome (Fernandez-Moran) placed at my disposal by courtesy of Messrs. E. Leitz at Wetzlar. The knife used is a diamond built into a container to receive the sections. The container was filled with an alcoholic solution of 25%. The sections appeared in the shape of an uninterrupted band and spread out properly on the water surface within 15 minutes. By heating the water it was possible to speed up this

process without the quality of the sections deteriorating. The sections themselves showed grey-white interference colors. The bands of sections were received by mesh copper grids with a formvar film.

The sections (fig. 1) were observed and photographed were taken in a Siemens electron microscope ÜM 100 c with stigmator and an aperture of 30μ and an accelerating voltage of 60 kV.

The examinations carried out have proved that it is possible to obtain results which can easily be reproduced by a simple method of preparation, such as the preparation of sediments by trimming of the cells from the culture containers. It enables both infected and non-infected tissue cultures to be examined by electron microscopy.

These investigations were kindly supported by Drs. Grehn and Walter, Wetzlar. I also wish to extend my thanks to Miss M. Hahn of the Behring-Werke for her cooperation in preparing the sections and taking the electron micrographs.

REFERENCES

1. DULBECCO, R. and VOGT, M., *J. Exptl. Med.* **99**, 167 (1954).
2. HARFORD, C. G., HAMLIN, A., and PARKER, E., *J. Exptl. Med.* **101**, 6, 577 (1955).
3. NEWMANN, S. B., BORYSKO, E., and SWERDLOW, M., *J. Research Nat. Bur. Standards* **4**, 43, 183 (1949).
4. STUART, D. C., *Ann. Report* **26** (1954).
5. YOUNGNER, J. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **85**, 202 (1954).

Eine einfache Vorrichtung zum Anspitzen von plexiglaseingebetteten Objekten

A. MAAS

Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn

Das vor dem Schneiden auf dem Mikrotom notwendige Anspitzen plexiglaseingebetteter Objekte, das unter mikroskopischer Beobachtung von Hand mit einer Rasierklinge vorgenommen wird, ist bei kleiner Objektgröße sowie bei großer Härte des Plexiglasses mit Schwierigkeiten verbunden. Im folgenden soll über eine Vorrichtung berichtet werden, die es gestattet, plexiglaseingebettete Objekte bis zu einer Dimension von einigen μ in die Spitze einer Pyramide zu legen, deren Spitzen- und Flächenwinkel exakt definiert sind.

Das Objekt wird in üblicher Weise in das halbkugelförmige Ende eines zylindrischen Plexiglasblockes eingeschlossen. Der Plexiglasblock wird sodann in eine Haltevorrichtung (Blockhalter) eingespannt. Die sich beim Anspitzen des Plexiglasblockes

ergebende Form des angespitzten Objektes ist mitbestimmend für die Größe und Güte der späteren Ultra-Dünnschnitte. Durch die Größe des Spitzenwinkels wird die statische Festigkeit des Objektes beim Schneidevorgang festgelegt. Auf Grund der im Objekt beim Schneiden auftretenden Zug- und Druckspannungen wird somit die Güte des erhaltenen Ultra-Schnittes beeinflusst.

Mit Hilfe einer Rasierklinge wird der Plexiglasblock so angespitzt, daß sich das Objekt in der Spitze einer Pyramide befindet. Das *Prinzip der Anordnung* ist in Abb. 1 im schematischen Grundriss dargestellt. Der Plexiglasblock ist um eine Achse A_n um definierte Winkelbeträge drehbar und in der Längsrichtung der Achse verschiebbar angeordnet. Das eingebettete Objekt kann mittels eines später

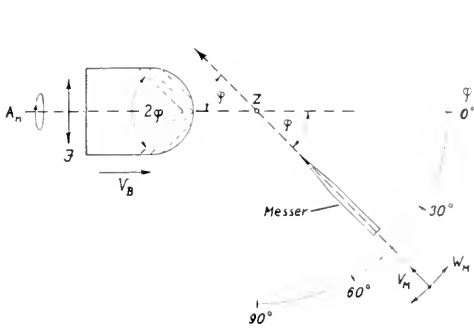


Abb. 1. Prinzip-Skizze.

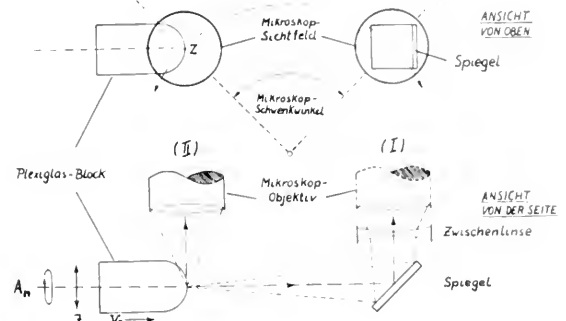


Abb. 2. Optik.

noch zu besprechenden vereinfachten Kreuztisches in die Drehachse A_n verlagert werden (Justierung J). Das zum Ansätzen des Blockes dienende Messer befindet sich zentral verschiebbar auf einem Schwenkarm (Verschiebungsrichtung $=V_M$), der in horizontaler Ebene um den in Verlängerung von A_n liegenden Punkt Z gedreht werden kann (Winkeleinstellung W_M). Der so veränderbare und jeweils fest einstellbare Winkel zwischen V_M und der Richtung der Drehachse A_n ergibt den als Winkel zwischen zwei gegenüberliegenden Flächen der angespitzten Pyramide definierten Spitzenwinkel 2φ . Der Winkel φ ist stufenlos von $0-90^\circ$, der Spitzenwinkel der angespitzten Pyramide somit von $0-180^\circ$ wählbar. Der Vorschub (V_B) des eingebetteten Objektes (gestrichelter Kreis im Plexiglasblock) in Richtung der Drehachse auf den Punkt Z zu erfolgt mittels einer Mikrometerspindel. Die Drehung des Plexiglasblockes um die Achse A_n geschieht um Winkel von $360^\circ/n$, die durch Raste definiert sind, wobei n die Anzahl der Pyramidenflächen ergibt.

Die Wirkungsweise der Anordnung ist nun folgende: Der Block wird mittels des Vorschubes V_B in den Schneidbereich des Messers vorgeschoben und nach jeweiliger Teildrehung durch Bewegung des Messerstößels auf der Führungsgeraden V_M in Richtung Z geschnitten. Nach Erreichen der Ausgangsstellung

hat sich bereits eine, allerdings noch stumpfe Pyramide gebildet. Das Objekt wird nun um einen kleinen Betrag weiter vorgeschoben und der beschriebene Vorgang wiederholt.

In der Zeichnung sind die Schnittspuren gestrichelt eingezeichnet. Die Pyramide entsteht also aus einem sich mehr und mehr zuspitzenden Pyramidenstumpf. Es ist hierdurch möglich, sich langsam an das im Block eingebettete Objekt heranzutasten, ohne unnötigerweise Objektmaterial wegzuschneiden. Die Spitze der Pyramide befindet sich bei dem fertig angespitzten Block in dem mit Z bezeichneten Schnittpunkt der Messerachse V_M mit der Drehachse A_n .

Die geforderte Lage des Objektes in der Spitze dieser Pyramide setzt voraus, daß es in der Drehachse des Plexiglasblockes liegt. Da dies praktisch nie der Fall ist, muß das Objekt durch zwei-dimensionale Verschiebung in die Drehachse des Blockes gebracht werden. Bei einem Durchmesser des Plexiglasblockes von 4 mm beträgt die maximal mögliche Abweichung der Objektlage von der Drehachse 2 mm. An Stelle eines sonst für eine derartige Zentrierung üblichen normalen Kreuztisches, dessen Herstellung wegen seiner Schlittenführungen kostspielig ist, konnte ein mechanisch vereinfachter Kreuztisch verwandt werden. Das Objekt wird hierbei nicht wie üblich auf

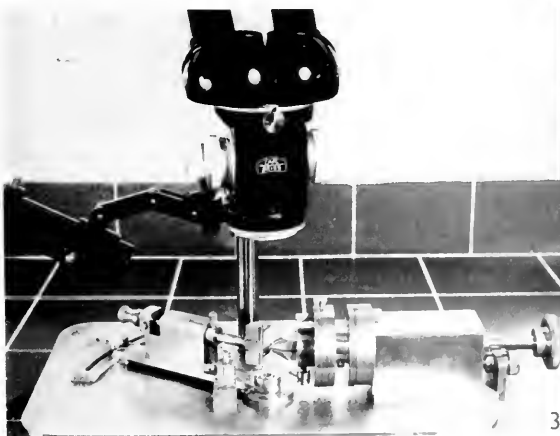
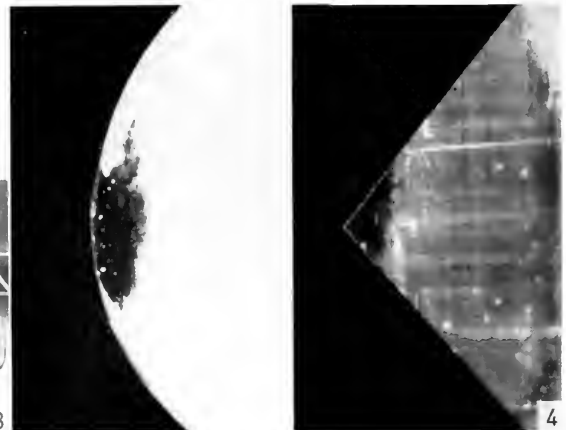


Abb. 3. Detailansicht. Abb. 4. Plexiglasblock mit eingebettetem Objekt vor und nach dem Ansätzen.



Geraden, sondern auf Kreisbogen bewegt, deren Mittelpunkte D_1 und D_2 auf der x - und y -Achse liegen und deren Radien r_1 und r_2 groß sind gegenüber der Objektverschiebung. Bezeichnet man den kleinsten Abstand des Objektes von der x -Achse mit x und den von der y -Achse mit y , so gilt für die durch Bewegung auf dem Kreisbogen erreichten Verschiebungsstrecken x_1 und y_1 wegen der großen Krümmungsradien $x_1 \approx x$ und $y_1 \approx y$. Die Zentrierung wird durch Einstellung des Objektes auf den Schnittpunkt eines Fadenkreuzes der nachfolgend beschriebenen Optik erleichtert.

Zentrierung und Anspitzen des Objektes werden unter *mikroskopischer Beobachtung* vorgenommen. Hierzu ist ein Binokularmikroskop (Zeiß) mit 40facher Vergrößerung schwenkbar um eine lotrecht stehende Achse angeordnet, so daß sich in das Sichtfeld des Mikroskopes nacheinander der Punkt Z und ein um 45° geneigter Spiegel bringen lassen (Abb. 2 oben).

In der mit (1) bezeichneten Stellung (Abb. 2 unten) befindet sich das Mikroskopobjektiv über dem Spie-

gel und erlaubt somit eine Beobachtung des Plexiglasblockes in Richtung seiner Drehachse und damit die Zentrierung des Objektes. In der Stellung (II) wird das Objekt während des Anspitzvorganges kontrolliert. Die Beleuchtung des Objektes geschieht von unten durch eine Bohrung im Drehpunkt Z des Schwenkarmes und außerdem von der Seite mittels einer schwenkbaren Lichtquelle.

Die Abb. 3 zeigt die technische Ausführung des Apparates. Die Grundplatte ist auf den Stativfuß eines Binokularmikroskopes der Fa. Zeiß aufgeschraubt. Von links nach rechts sind folgende Teile zu erkennen: Schwenkbare Lichtquelle, Schwenkarme des 45° -Spiegels, rechts davon Objekthalter und vereinfachter Kreuztisch. Von den beiden Drehknöpfen am rechten Ende der Apparatur dient der kleinere zur Vorschubeinstellung, der größere zur Drehung des Objektblockes. Abb. 4 zeigt einen Plexiglasblock mit eingebettetem Objekt vor und nach dem Anspitzen.

An Improved Method to Prepare Formvar Nets for Mounting Thin Sections for Electron Microscopy

F. S. SJÖSTRAND

Laboratory for Biological Ultrastructure Research, Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

THE mounting of microtome sections on formvar nets instead of films means a drastic gain in image contrast (1, 2). The method to prepare metallized formvar nets described in an earlier paper (2) is time-consuming due to the difficulties in obtaining reproducible results. The method to be described means a considerable improvement as it makes it possible to prepare formvar nets in a reproducible way.

The basic principle of the method to prepare formvar nets is to introduce minute water droplets into a thin layer of a formvar solution covering a glass surface. The water and the ethylen dichloride used as solvent for the formvar do not mix and, consequently, a great number of air bubbles will appear in the formvar layer when the ethylen dichloride and water have evaporated. These air bubbles may under certain conditions produce holes which perforate the formvar layer completely. However, if the right conditions are not fulfilled, the air bubbles will only produce thinner regions in the formvar film but no real holes.

If the layer of formvar solution is very thin the water droplets will produce holes in the formvar layer and real formvar nets with large open area are formed. A sufficiently thin layer of a formvar solution, from which a mechanically stable enough formvar

net is obtained, may be prepared in the following way. A microscope slide is dipped into a 2% formvar solution with ethylen dichloride as solvent and transferred to a small glass vessel, in which the air is saturated with ethylen dichloride (fig. 1). The saturation can be achieved by covering the bottom, the surfaces and the cover of the glass vessel with filter paper wetted with ethylen dichloride. The microscope slide is left in a vertical position in this glass vessel for twenty minutes. This long time for draining off the formvar solution is necessary in order to obtain a sufficient thin layer. The fairly high percentage of formvar secures a mechanically sufficiently stable net.

After twenty minutes, a stream of warm air saturated with water vapour is blown into the glass vessel and the microscope slide removed. A stream of damp air may be obtained by blowing air at a low pressure through warm water, the temperature of which may be 50–80 C. Air at a pressure of 1–2 kg is introduced at the bottom of a one liter or larger Erlenmeyer bottle which for convenience may be kept in a water bath at the desired temperature. The moistened air is transferred to the above-mentioned glass vessel by means of a short glass tubing.

The microscope slide is removed from the glass vessel, and after evaporation of ethylen chloride and

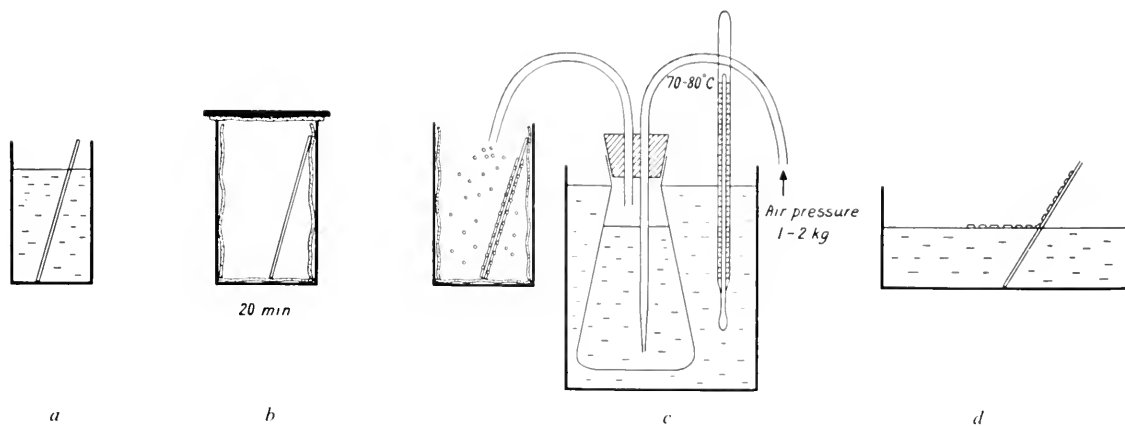


Fig. 1. The preparation of formvar nets as supporting material for ultrathin tissue sections. (a) Microscope slide in 2% formvar solution. (b) Microscope slide transferred to vessel in which air is saturated with vapour of solvent for the formvar (ethylendichloride). The slide is left there for 20 min. (c) Damp air is blown into this vessel. (d) Formvar net floated off onto water surface.

water the formvar net formed is floated off onto a water surface and transferred to specimen grids in the regular way. The upper two-thirds of the formvar net can be used.

With this method, it is possible to prepare formvar nets with a large percentage of open area and with a rather uniform and useful size of the holes of the nets. These formvar nets can be examined in the electron microscope and the useful grids selected. Before being used, the nets should be stabilized by coating them with a layer of metal or carbon in a metal shadow casting unit.

The gain in contrast when mounting the sections in nets is so considerable that thin sections can be examined without any objective aperture. This is of great advantage in high resolution electron microscopy, as it means an elimination of the most frequent source of astigmatism.

REFERENCES

1. SJÖSTRAND, F. S., *Science Tools* 2, 25 (1955).
2. — *Exptl. Cell Research* 10, 657 (1956).

Experiments on Staining Thin-Sections for Electron Microscopy

I. R. GIBBONS and J. R. G. BRADFIELD

Cavendish Laboratory, Cambridge

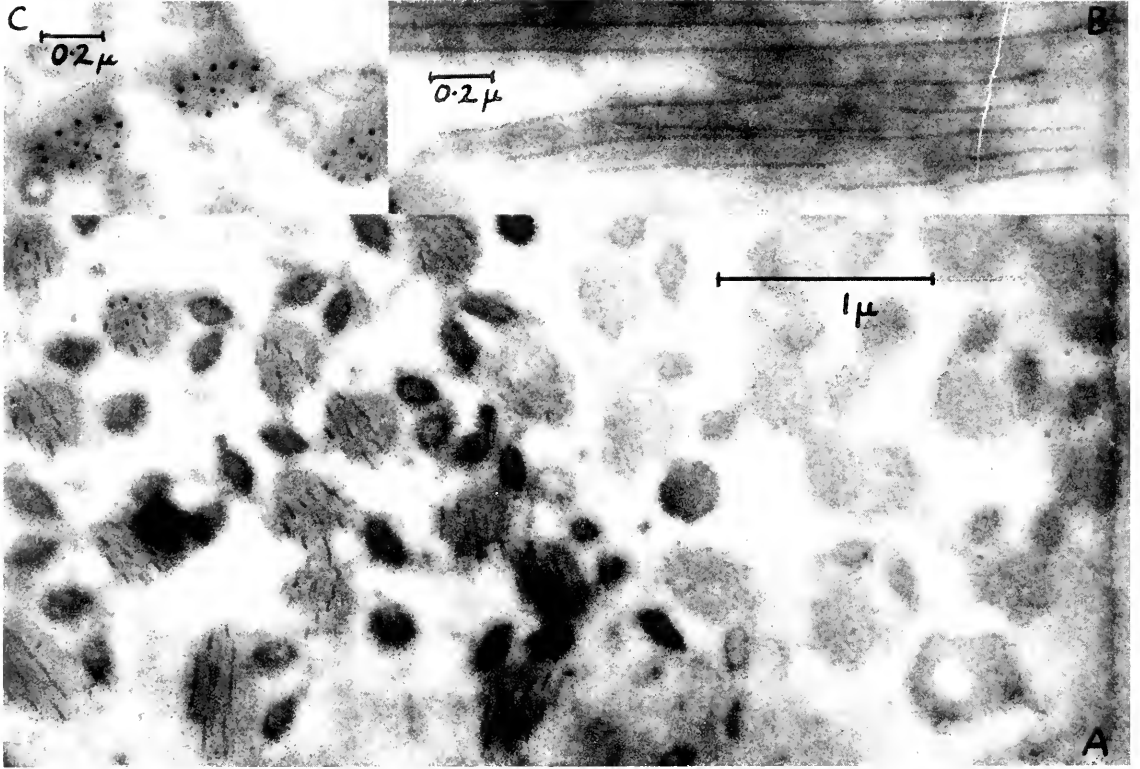
THE development of suitable staining techniques for electron microscopy is important because staining not only increases the observed contrast but also provides a possible means of obtaining cytochemical information about cell components.

Experimental.—The procedure for staining is simple. Cut a ribbon of sections and pick it up on a filmed electron microscope grid in the usual way. When the sections have dried down onto the film, float the grid section-side downward on the surface of the staining solution for about half an hour. Remove the grid carefully with forceps, rinse by brief immersion in two changes of glass-distilled water and allow to dry.

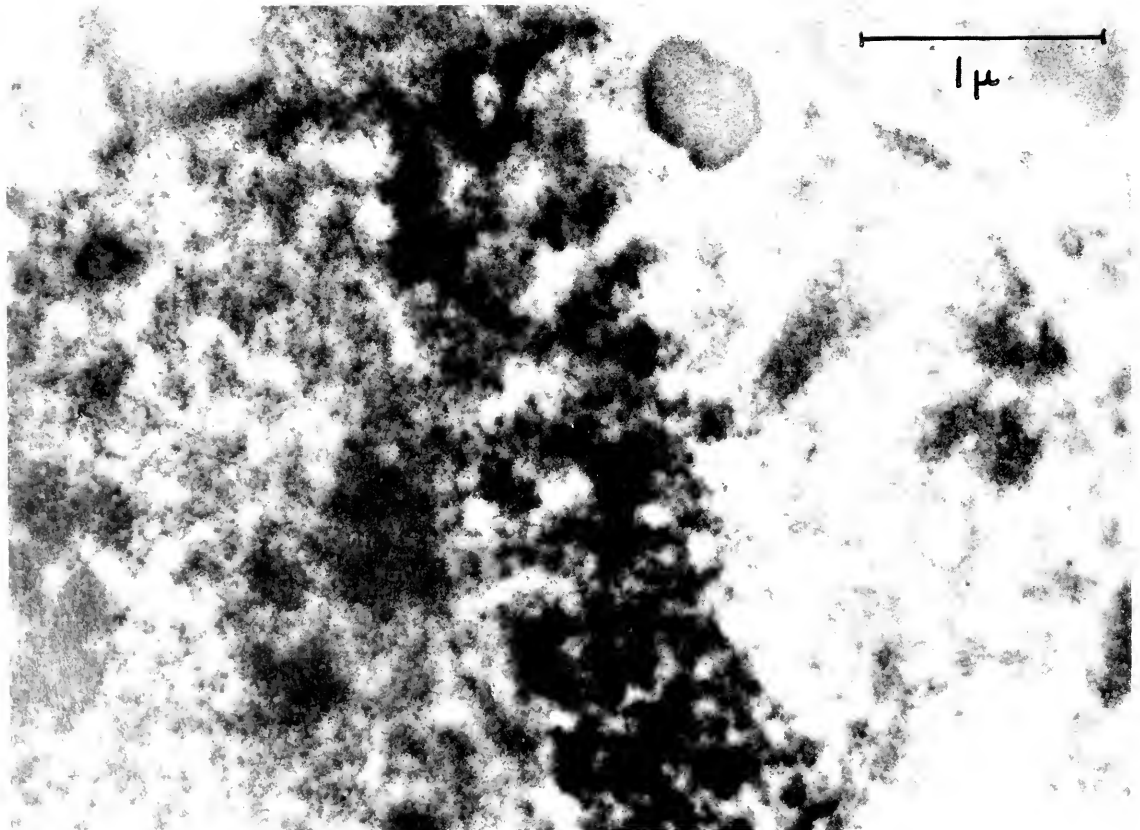
The time of staining used has generally been about half an hour, but it does not appear to be critical. Stereo-photographs of the fibres in locust sperm tails in a rather thick section (about 700 Å), which

had been stained in osmium tetroxide for half an hour, have shown the staining to be fairly uniform through the thickness of the section. This suggests that, even for a section as thick as this, penetration is almost complete in this time—in spite of the presence of the methacrylate.

A small modification of the above procedure enables an unstained "reference area" to be obtained. Before staining, the grid bearing the sections is placed in the electron microscope and some areas of the sections are given a brief irradiation with a fairly intense electron beam. When the grid is removed from the microscope and stained as before, those areas which were pre-irradiated appear to be unaffected by the staining procedure and hence serve as reference areas in the sections. Comparison with these unstained reference areas enables one to assess the intensity of staining in the rest of the section. A



1



2

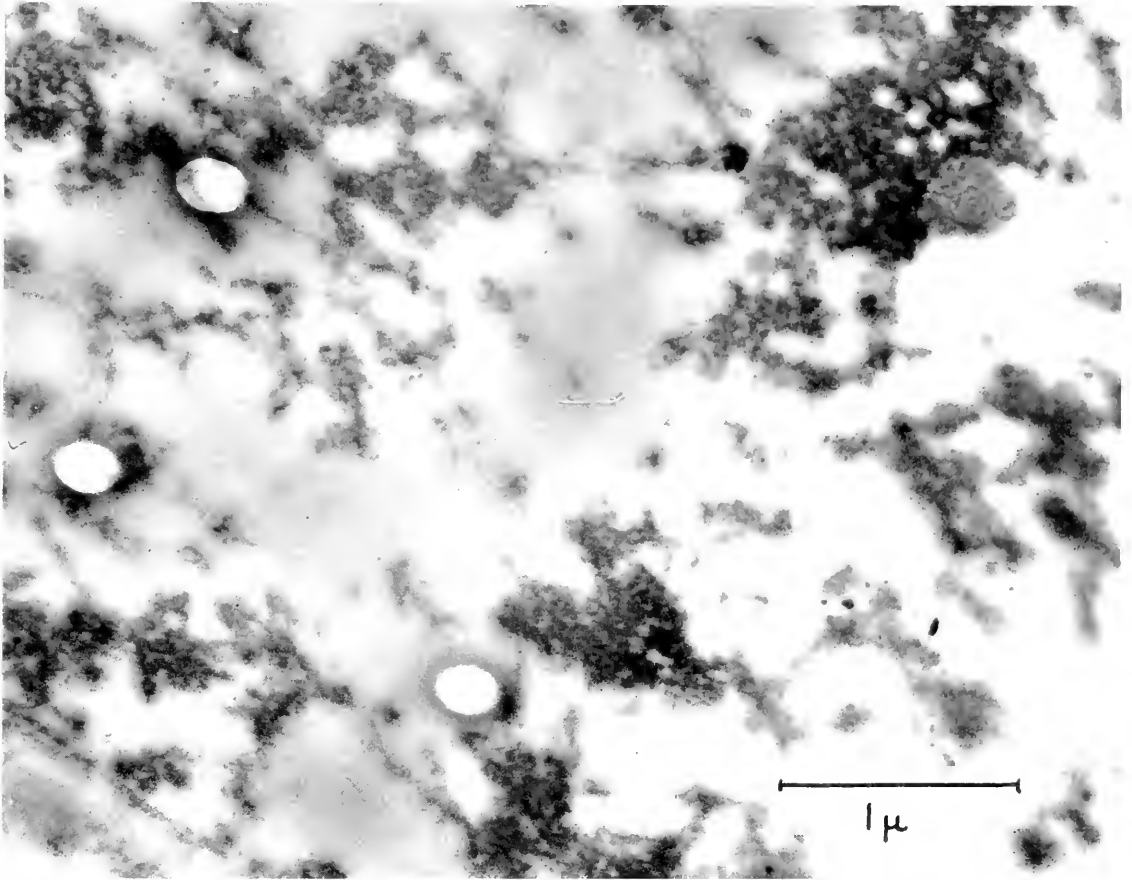


Fig. 3. Locust primary spermatocyte fixed in 45% isotonic acetic acid and section-stained in lanthanum nitrate. The chromatin masses in the unstained area on the right of the section appear only as diffuse blobs, while those in the rest of the section (which is stained) show a complicated form of structure.

comparison of this type has the great advantage of eliminating the effect of variations in section thickness, focussing, and photographic processing. Experience has shown, however, that it is necessary to clear the methacrylate in the stained areas of section at the same beam intensity as that used in the initial irradiation of the reference areas because the amount of clearing obtained is dependent on the beam intensity used. This method of obtaining unstained reference areas is best applied in an electron microscope with a double condenser lens system. With the second condenser focussed to give beam cross-over in the object plane, one irradiates only a fairly sharp spot about 5μ in diameter. It has been found most

convenient to move the section in such a way that this spot follows a zig-zag path across the section. In this way one obtains a reference area in all regions of the section.

Staining solutions so far tried have been 2% unbuffered osmium tetroxide and saturated phosphotungstic acid as general protein stains, and saturated ferric alum of 2%, lanthanum nitrate and of 2% thorium nitrate as stains for chromatin. In each case positive results have been obtained. By way of control a section has been floated on distilled water instead of stain.

This method of staining is particularly applicable to tissues fixed other than with osmium tetroxide,

Fig. 1. Locust testis fixed in 45% isotonic acetic acid and section-stained with osmium tetroxide. (a) Stained (left) and unstained (right) regions of a section in which the sperm tails are cut approximately transversely. Each sperm tail contains the $9 \cdot 2$ fibre bundle plus 2 mitochondrial strands. (b) Higher magnification micrograph of longitudinally cut sperm tails in a stained area of section. (c) High magnification micrograph of transversely cut sperm tail in a stained area of section.

Fig. 2. Locust primary spermatocyte fixed in 5% buffered formaldehyde and section-stained with osmium tetroxide. The light area on the right side was pre-irradiated and has not stained; the dark area on the left was not irradiated and has stained. At the junction of the stained and unstained areas is a narrow region, about 1μ wide, which is much darker and so, presumably, has stained more intensely than the rest of the stained area.

since with osmium fixed tissue any staining has to be extremely intense to show over the background of osmium staining produced during fixation. Attempts to remove the osmium from osmium fixed tissue without losing the quality of fixation have not as yet been successful.

Osmium staining after acetic acid fixation.— Fig. 1 shows a preparation of locust testis fixed in 45 % acetic acid made isotonic with 0.9 % sodium chloride; the section was stained in osmium tetroxide for half an hour. Fig. 1 a shows an area in which the sperm tails are cut in approximate transverse section. Comparison with the reference area shows that the 9 + 2 fibres in the tails stain much more strongly than the surrounding protoplasm. This is presumably due either to a higher concentration of dry mass in the fibres or else to some kind of specific affinity for osmium tetroxide possessed by the fibres after acetic acid fixation. Figs. 1 b and c show longitudinal sections of sperm tails.

Osmium staining after formaldehyde fixation.— Locust spermatocytes fixed in 5 % of buffered formaldehyde and section-stained with osmium tetroxide show a peculiar region of specially intense staining between the stained and unstained areas. This region was presumably subjected to a slight irradiation prior to staining; its significance is not yet understood (fig. 2).

Lanthanum staining after acetic acid fixation.— An example of the staining of chromatin appears in fig. 3, which shows part of a locust spermatocyte nucleus fixed in isotonic 45 % acetic acid and section-stained with lanthanum nitrate. The unstained chromatin shows no structure; the stained chromatin not only appears darker, but also shows a complicated form of organised structure.

One of us (I. R. G.) gratefully acknowledges receipt of a maintenance grant from the Department of Scientific and Industrial Research during the period of this work, and of a grant from King's College, Cambridge, to enable him to travel to the Conference.

Die Eignung und Anwendung von Phosphorwolframsäure und Thalliumnitrat als Kontrastmittel zur Darstellung cytoplasmatischer Strukturen

K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN

Zentral-Laboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn

OBWOHL bereits mehrere allgemeine und spezifische Kontrastmittel vorgeschlagen worden sind (1–4, 6), haben diese jedoch noch keinen Eingang in die allgemein gebräuchliche Präparationstechnik gefunden. Die Ursache kann darin vermutet werden, daß bisher nicht der Nachweis geführt wurde, daß die betreffenden Kontrastmittel ohne Einfluß auf die Güte der Strukturhaltung sind. Dieser Nachweis läßt sich nur durch vergleichende Untersuchungen bei hohen elektronenoptischen Abbildungsstufen erbringen.

Die allgemein übliche Normaltechnik ist heute eine Fixierung in gepufferter, isotonischer 1–2%iger Osmiumtetroxydlösung (5, 7). Es soll hier gezeigt werden, daß sich diese Normaltechnik durch routinemäßige Verwendung von Kontrastmitteln verbessern läßt.

Anläßlich von Schnittuntersuchungen an Protisten- und Säugerzellen wurden verschiedene Stoffe auf ihre Eignung zur besseren Darstellung von Zellstrukturen überprüft. Hierbei ergab sich eine vorteilhafte Anwendungsmöglichkeit von Thallium(I)nitrat ($TlNO_3$) und Phosphorwolframsäure ($P_2O_5 \cdot 24WO_3 + xH_2O$), im folgenden jeweils als T1 bzw. PWS bezeichnet. PWS ist bekanntlich ein vorzügliches Kontrastmittel für Fasereiweiße wie z. B. Kollagen

und Muskulatur. Es stellte sich heraus, daß PWS bei geeigneter Anwendung auch mit Erfolg bei cyto-logischen Untersuchungen benutzt werden kann.

Lösungen von PWS reagieren stark sauer und führen ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen zu Strukturveränderungen in der Zelle. Dieser Nachteil der PWS konnte vollständig vermieden werden, indem sie ebenso wie T1 zu 1 % in 70%igem Alkohol gelöst wurde. Läßt man eine solche Lösung während des Entwässerungsprozesses, eben auf der Stufe des 70%igen Alkohols in das Objekt eindringen, so wird der Kontrast der Objekte befriedigend gesteigert, während Strukturveränderungen im Objekt nicht auftreten, wie die Abb. 1–2 belegen. Die gute kontraststeigernde Wirkung der PWS wurde sowohl an Protozoen- als auch an Säugerzellen überprüft. T1 gelangte nur an Protozoen zur Erprobung. Die Abb. 1–2, die selbstverständlich unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen und phototechnisch verarbeitet wurden, zeigten deutlich in der Gegenüberstellung von Osmium-Fixation (Abb. 1) und Osmium-Fixation + Kontrastierung (Abb. 2) die Überlegenheit der Abbildung zusätzlich kontrastierter Objekte. Schnitte: Ultramikrotom nach Sjöstrand. Aufnahmen: Siemens-Übermikroskop Typ 100 d, 80 kV.

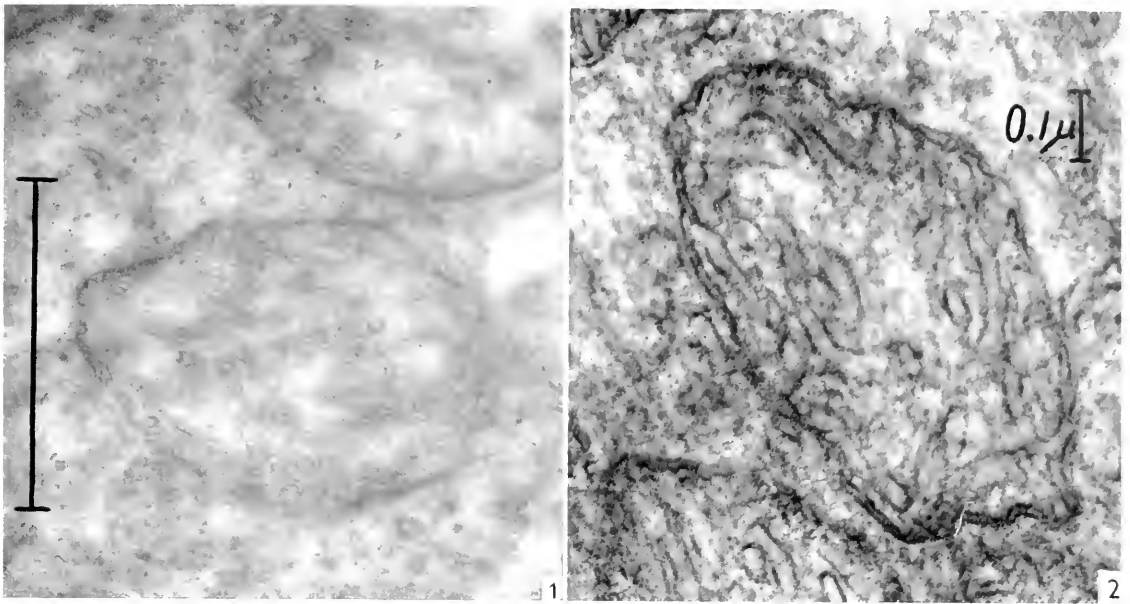


Abb. 1-2. Dünnschnitte durch Mitochondrien von *Paramecium caudatum*. Elektronenoptisch 11 300 bzw. 22 500 Endvergrößerung 49 000 bzw. 85 000

Die routinemäßige Anwendung der Kontrastierung hat sich bereits bei ausgedehnten cytologischen Untersuchungen an Protozoen (4, 9) und an Säugerzellen (8) gut bewährt. Bei der Präparation läßt sich eine Kontrastierung cytologischer Objekte mit PWS oder Tl leicht in die Normaltechnik einfügen:

- 4^h 2%ige isotonische gepufferte Osmiumtetroxydlösung (bei einem dem jeweiligen Objekt adäquaten pH-Wert)
- 1^h Tyrode-Lösung
- 14-16^h 70%iger Alkohol
- 1^h PWS oder Tl, zu 1% in 70%igem Alkohol gelöst
- 2^h 90%iger Alkohol
- 1^h 96%iger Alkohol
- 1^h absoluter Alkohol
- Einbettung

LITERATUR

1. BAHR, G. F., *Exptl. Cell Research* **5**, 551 (1953).
2. BAHR, G. F. und MOBERGER, G., *Exptl. Cell Research* **6**, 506 (1954).
3. HALL, C. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 1, 1 (1955).
4. LAMB, W. G. P., STUART-WEBB, J., BELL, I. G., DOVEY, R., und DANIELI, J. F., *Exptl. Cell Research* **4**, 159 (1953).
5. PALADI, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
6. RICHARDS, A. G., *J. Appl. Phys.* **23**, 1, 158 (1952).
7. SJÖSTRAND, F. S., *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 15 (1953).
8. WEISSNEELS, N., First European Regional Conf. on Electron Microscopy, Stockholm 1956.
9. WOHLFARTH-BOLLERMANN, K. L., *Z. Naturforsch.* (1957, im Druck).

The Use of the Electron Microscope to Control Preparation of Cellular Constituents

M. S. C. BIRBECK and E. H. MERCER

*Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research;
Royal Cancer Hospital, London, S.W. 3*

FOR a number of years biochemists have investigated cell fractions separated by centrifugation. The morphological identity of these fractions has sometimes been determined by light microscopy, although the fractions are usually characterised by their biochemical activity. By observing these fractions with the electron microscope, using the sectioning method, and by comparing them with the cell components in whole tissue, it is possible to have a

better control of the separation. It is also possible to improve the method of separation, and some of the general methods together with particular methods for nuclei and mitochondria which we have evolved in our laboratory, will be described.

General methods.—The conventional method of separating the cell fractions uses an angle-head centrifuge; with this method fractions must be washed several times by resuspension and resedi-

mentation in fresh medium. We have found that an improved separation may be obtained more quickly by using layering or gradient methods in a swing-out head centrifuge. When the medium contains high molecular weight components, which are required to improve the morphological appearance of the fractions, density gradients may be obtained without increasing the osmotic strength of the medium.

Fixation of cell fractions by the standard buffered osmium tetroxide solution (7) is satisfactory; no improvement has been found either by the addition of sucrose or high molecular weight components to the fixative, or by using a solution of osmium tetroxide in the suspending medium as a fixative. A small volume of a resuspended fraction is added to a larger volume of fixative; the fixed suspension is then spun to produce a pellet. The pellet, which should be less than 0.5 mm thick, is treated as a lump of tissue. It is dehydrated and embedded in methacrylate as in the conventional method. The pellet is oriented on the microtome so that a single section contains all the strata produced by sedimentation; in this way a proper estimate of the distribution of material in the pellet may be obtained.

A promising variant of these methods has been devised by us in which no attempt is made to isolate separate fractions. The tissue is homogenised in a medium, and the suspension is "layered" over a medium of higher density in a centrifuge tube. Using a swing-out head, the suspension is sedimented to form a pellet about 0.1 mm thick. This will contain "strata" of all components of the suspension separated according to their sedimentation rate. The whole pellet may then be fixed, sectioned and the composition of the various layers determined electron microscopically. As an example of its use, consider the problem of the uptake of a radio-active amino acid in a tissue. The compound is injected, after a certain time tissue is taken from the animal, homogenised and centrifuged by this method. The block is sectioned; a thin section is examined in the microscope and a radio autograph is made from a contiguous thick section. By comparing these, the particular cell fraction in which the radioactive isotope has been taken up may be found. The method may also be used for the intracellular localisation of other constituents which are still detectable by histochemical methods after fixation.

Methods for nuclei.—Nuclei, separated by many of various standard methods, have been examined (3). None of these methods gives nuclei of comparable appearance to those in sections of fixed tissue; many methods give nuclei, which appear clean in the light microscope, but are badly contaminated by cytoplasmic components when examined in the electron microscope. Nuclei prepared by the method of Philpot and Stanier (8) were found to be particularly interesting. This method, which only gives small yields, consists of centrifugation in a sucrose glycerol medium with the addition of glycerol

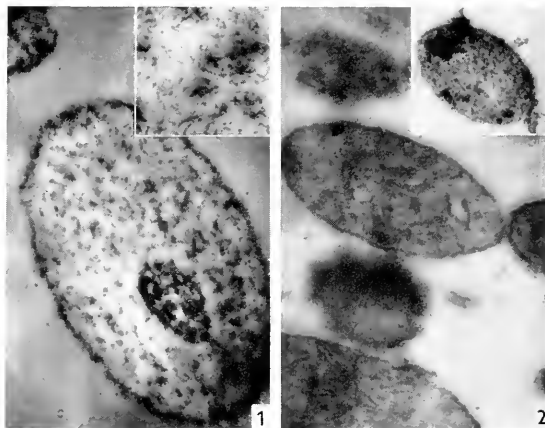


Fig. 1. Electron micrograph of a single nucleus in a fraction prepared by the method of Philpot and Stanier. The nucleolus may be seen, but the nuclear membrane is absent.

Inset. A high power micrograph of the nucleoplasm, showing filaments about 100 Å in diameter.

Fig. 2. Electron micrograph of a few mitochondria prepared in the dextran medium. The internal and external membranes may be seen.

Inset. A micrograph at the same magnification of a particle in a light mitochondrial fraction, which might be a lysosome.

phosphate. These nuclei (fig. 1) from rat liver are relatively clean of contaminating cytoplasm; this may be partially the result of the loss of the nuclear membrane, to which the cytoplasmic debris tends to adhere. There are, however, numerous small filaments (ca. 100 Å diam.) dispersed throughout the nuclei (fig. 1, inset). These filaments which significantly have the same diameter as nucleo-protein filaments, may be an artifact due to the method of separation; however, it is also possible that they also exist in sections of whole tissue, but are rendered invisible by an interstitial substance, which is lost during separation, possibly as a consequence of the removal of the nuclear membranes.

Methods for mitochondria.—The conventional method for the separation of mitochondria uses 0.25 M sucrose as a suspending medium (5). Mitochondria prepared by this method and by improved methods have been examined by several workers (1, 2, 6, 9). Mitochondria prepared in 0.25 M sucrose are swollen, empty and usually contaminated with microsomal debris. We have described an improved complex medium containing 0.25 M raffinose, 6% dextran and other additives. Mitochondria prepared in this medium (fig. 2) are not swollen and retain their internal double membranes and other contents. When the centrifugation conditions are carefully controlled it is possible to obtain cleaner mitochondria using this medium. This may be judged both by the lack of microsomal material in the electron micrographs and also biochemically by their low R.N.A. assay. Although the higher density and viscosity of this medium would appear to make high centrifugation speeds necessary, this is not so for mitochondria as the absence of

swelling and the retention of contents increases their sedimentation rate. The medium has no biochemical disadvantages; it does not significantly inhibit any enzymes.

Using this medium particles (fig. 2, inset) have been seen in light mitochondrial fractions which are similar to those described by Kuff *et al.* (6). They are smaller and denser than mitochondria; they have only a single external membrane and a rather granular interior. Duve (4), from the biochemical evidence of enzyme distributions in light mitochondria fractions, has postulated a new cytoplasmic particle, the lysosome in which certain hydrolytic enzymes would be contained.

Discussion.—These results demonstrate how electron microscopy can help the biochemist by giving him an improved method of controlling the purity of the cell fraction. Moreover they also demonstrate how the methods may be improved so that the fractions may be obtained not only in a greater state of purity, but also less damaged by the separation.

The method is of equal importance to the electron microscopist, for it is probably the only way in which he will be able to determine the chemical nature of the fine structures he sees. It is unlikely that histochemistry will ever be possible in electron microscopy, to the same extent as it is in light microscopy. The electron microscopist must there-

fore separate the structures he observes without damaging them, and then chemically analyse them. The techniques of separation by centrifugation are examples of such a general method.

This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the British Empire Cancer Campaign, Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, the Anna Fuller Fund, and the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

The authors are particularly grateful to Mr. K. G. Moreman for supplying the illustrations.

REFERENCES

1. BIRBECK, M. S. C. and REID, E., *Biochim. et Biophys. Acta* **20**, 419 (1956).
2. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* (1957, in press).
3. DAVISON, P. F. and MERCER, E. H., *Exptl. Cell Research* **11**, 237 (1956).
4. DUVE, C. DE, PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATHIAUX, R., and APPELMAN, F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
5. HOGEBOM, G. W., SCHNEIDER, W. C., and PALADE, G. E., *J. Biol. Chem.* **172**, 619 (1948).
6. KUFF, E. L., HOGEBOM, G. H., and DALTON, A. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 23 (1956).
7. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
8. PHILPOT, J. ST. L. and STANIER, J. E., *Biochem. J.* **63**, 214 (1956).
9. WETTER, R. F., WATSON, M. L., and COTONE, M. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 127 (1955).

A Micro-manipulation Method for the Preparation of Calibrated Microdroplets over the Range of 10^{-6} – 10^{-10} ml in Electron Microscopy

IRENE SUGÁR

Dept. for Electron Microscopy of the Institute for Measurement and Instrumentation of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

THE electron microscope is a research tool that can in principle make it possible to estimate the concentration of particles of colloidal dimensions in colloidal systems. A condition for this is to find a method to measure the volume which corresponds to a counted number of particles.

Riedel and Ruska (3) and Backus and Williams (1) gave different solutions of this problem, by applying internal standards in micro-droplets sprayed on to the specimen supporting film. The method of Backus and Williams, using uniformly sized polystyrene latex as a standard can be applied in a more general way than that of Riedel and Ruska using salt crystals for this purpose. In investigating molecules of small particle size, it was observed that uncertainties may arise from the fact that the droplets are so to say quantized for the standard but remain statistical for

the material and it is difficult to obtain good correlation between counts of particles and the number of latex spheres in various droplets.

In this paper we present a micromanipulation method for preparing measured micro-quantities. This requires considerably more technical work than the spraying method but does not rely on an internal standard. Depending on the magnifications used in the electron microscope, we can in a reproducible way choose the proper micro-volume between 10^{-6} – 10^{-10} ml.

The separation of the micro-volumes and their placing onto the specimen holder takes place with the use of micro-pipettes whose internal diameter is only a few microns, in the optimal case 2–3 microns. These pipettes are made with the microforge of de Fonbrune (2) but his original method has been

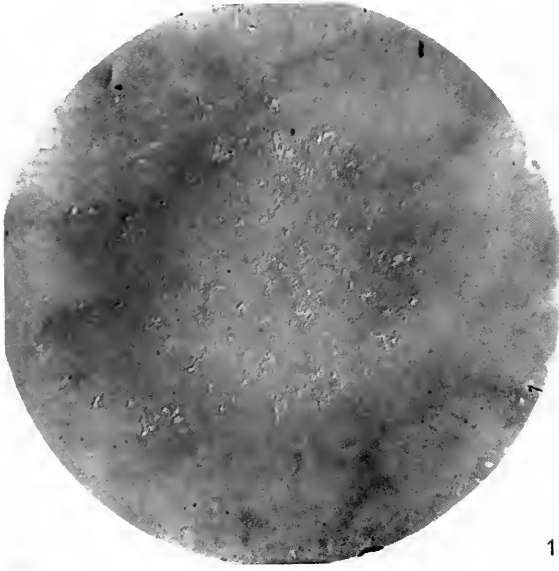


Fig. 1. Microdroplet from Paris PL 1/49 virus strain.

greatly simplified and pipettes of a perfectly cylindrical shape can be made. In the case of say 30 microns, a quantity of about $2 \cdot 10^{-10}$ ml can be separated and placed individually on the film.

The micro-pipettes are operated with mercury pistons. This requires a pressure of several atmospheres. For this purpose a special small hydraulic apparatus has been constructed. This hydraulic method of operating a micro-pipette is practically free of inertia so that in separating the micro-volume to be measured, the length of the column can be set at any desired position and read by means of the ocular micrometer. There is an air cushion between the liquid and the mercury. We do not count on a loss in material because these micro-pipettes can easily be silicized.

To preserve these minute quantities of liquid, micro-manipulation takes place in a moist chamber (4). The objective is protruding into the chamber. The specimen holder is placed on the base of the chamber. The objective lens is furnished with an anti-dim covering layer. The chamber can be kept at any useful temperature. The formvar covered grid is gently pressed against the surface of a small piece of moderately dried agar-plate. When the droplets are placed on the film, their moisture is absorbed by the agar-plate and the particles settle on the film.

All the manipulative tools are mounted on the Zeiss micromanipulator.

Fig. 1 shows a droplet taken from the Paris PL 1/49 virus strain. The number of counted particles in these pictures are 440. All counts fell between 417 and 490, and we could determine the absolute particle number.

As to the pipette calibrations, two types of measuring were tried. By means of x-ray microradiography silhouettes of mercury-filled pipettes were obtained. For very thin pipettes, however, satisfactory results have not yet been attained. So we made use of a thought of de Fonbrune (2) and calibrated micro-pipettes by pressing micro-droplets of water into paraffin oil, taking water columns which were identical with those applied in the original experiment. This type of calibration gave a constant error of 4–10 %, depending on the diameter of the pipette.

REFERENCES

1. BACKUS, R. C. and WILLIAMS, R. C. *J. Appl. Phys.* **21**, 11 (1950).
2. DE FONBRUNE, J., *Technique de Micromanipulation*. Masson et C^{ie}, Paris, 1949.
3. RIEDEL, and RUSKA, E., *Kolloid-Z.* **96**, 86 (1943).
4. SUGÁR, I., *Z. wiss. Mikroskop.* (in press).

Über die quantitative Spreitung von Zellen.

Eine Untersuchung dünnster Filme mit dem Elektronenmikroskop

A. KLEINSCHMIDT

Hygiene-Institut, Frankfurt am Main

NEBEN qualitativen Spreitungsversuchen an Zellen, wie sie zur elektronenmikroskopischen Darstellung cytologischer Objekte seit Hartman u. a. (8), von Senseney u. a. (16), Kleinschmidt (12, 13) und Herzberg u. a. (9) angewendet wurden, ist eine quantitative Analyse der Filme mit mikroskopischen Teilchen auf einer Wasseroberfläche, dem Substrat, angezeigt. Damit erhält man einen besseren Einblick in den komplexen Vorgang. Methodisch setzt sich die Untersuchung aus drei Teilen zusammen: 1. Die

Filmerzeugung und Filmeigenschaften; 2. die Übertragung auf feste Träger und 3. die licht- und elektronenmikroskopische Darstellung.

1. Jeder unlösliche Film auf einer Wasseroberfläche erzeugt in komprimiertem Zustand einen Schub, der in dyn/cm gemessen werden kann. Wir benützen einen Langmuir-Trog zur Filmerzeugung und messen den Schub mit einer Oberflächenwaage vom vertikalen Typ (4, 7, 18). Man erhält damit von aufgetragenen Proteinfilmen, wie von Rinder-

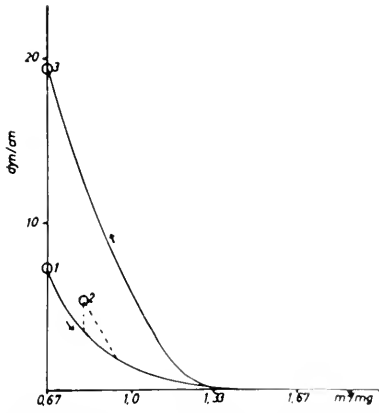


Abb. 1. F/A -Kurve von Rinderserum-Albumin mit Übertragung des Films. Ordinate: Schub in dyn/cm , Abszisse: Flächenbedarf in m^2/mg Protein; Kreise: Übertragung.

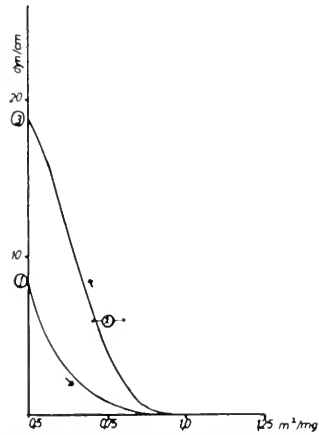


Abb. 3. F/A -Kurve einer Suspension von *E. coli* in Rinderserum-Albumin. Kurvenform wie Abb. 1. Kleinerer Flächenbedarf. Nur bei 1 u. 3 sichere Übertragung.

serumalbumin. Kraft Flächenkurven (Force Area = $F A$ -Kurven (Abb. 1)). Es ergeben sich für Proteine grundsätzlich zwei Kurvenformen: Nach Dervichian (5) und Joly (11) entwickelt sich der sog. A-Film aus einem völlig expandierten Film und erreicht höhere Schübe bei gleicher Fläche als der für diese Darstellung wichtigere B-Film. Dieser bildet sich auf kleiner Fläche aus und weist einen „Eigenschub“ auf. Der Film altert dabei, d. h. bei gleichbleibender Fläche steigt der Schub mit der Dauer der Spreitung an. Daraus abgeleitete Kraft Zeit ($F t$)-Kurven (Abb. 2) zeigen das Ende dieses Prozesses an, der für reine Proteine nach 15 Min. abgeschlossen sein sollte (3). Dies ist in der Regel am isoelektrischen Punkt des Proteins der Fall (6); man stellt also das Substrat darauf ein.

In einer 0,1%igen isotonischen Albuminlösung (I.E.P. pH 4,9) lassen sich Zellen, wie Erythrocyten oder Bakterien (*E. coli* und *Proteus*), suspendieren. Erzeugt man damit einen Albuminfilm, so werden diese mitgeführt. Es entsteht ein „Suspensionsfilm“. Für ihn lassen sich entsprechende $F A$ - und $F t$ -Kurven aufstellen. Sind sie identisch mit denen der reinen Proteinlösung, so beteiligt sich kein Zellmaterial an der Spreitung. Sind die $F A$ -Kurven nach

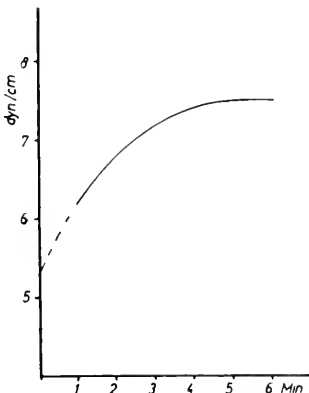


Abb. 2. Ft -Kurve von Rinderserum-Albumin. Im horizontalen Teil Beginn der Übertragung 1 (siehe Abb. 1).

links versetzt (Abb. 3), so ist Albumin an Zellbestandteile adsorbiert und trägt damit nicht mehr zur Spreitung bei, wie etwa bei Colibakterien. Ist dagegen die Kurve nach rechts verschoben und zeigt eine andere Form als der Albuminfilm, so ist spreitfähiges Material ausgetreten und befindet sich im Film, wie bei Erythrocyten (Abb. 4).

Daß diese Filme ausgesprochene Mischfilme sind, ergibt sich aus der $F A$ -Kurve. Eine oder mehrere stufenförmige Änderungen der Kurvenneigung weisen darauf hin. Neben der mechanischen Prüfung aller Filmbestandteile kann man einzelne Filmabschnitte für die morphologische Untersuchung heranziehen. Schon die lichtmikroskopische Untersuchung mit Phasenkontrast zeigt z. B. bei Erythrocyten (Abb. 5), daß diese nach Hämolyse im Substrat nahezu kugelig sind und durch einen B-Film von Albumin und Hämoglobin nur an einer Stelle ihrer Oberfläche im Film fixiert werden. Der weitere Kurvenverlauf und die Kontrolle der Erythrocytenhüllen im Substrat zeigt, daß diese zu zerfallen beginnen,

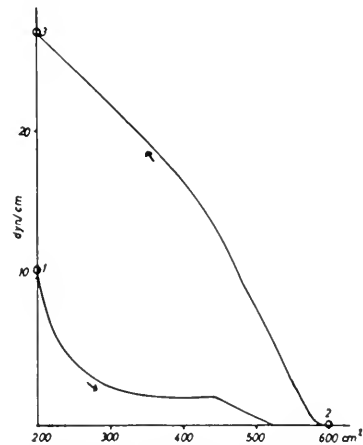


Abb. 4. F/A -Kurve eines Films von Hammelblk.-Suspension auf aqua dest. pH 4,9. B-Film mit deutlicher Stufe, A-Film nach rechts versetzt (langsam spreitendes Material). Übertragung bei 1 u. 3.

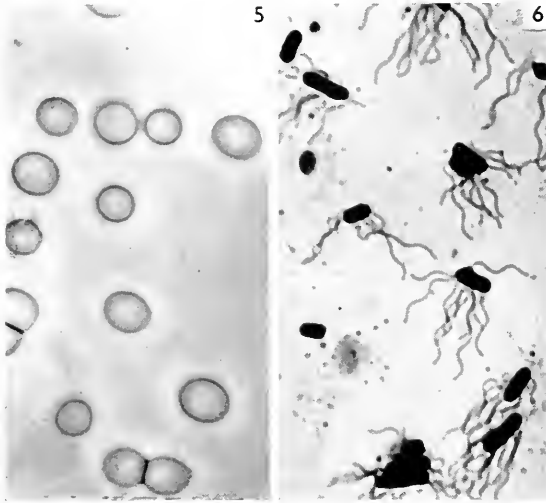


Abb. 5. Hammelerythrocyten, gespreitet. Deckglaspräparat, mit Substrat und im B-Film übertragen. Phasenkontrast. 1000

Abb. 6. *E. coli*, gespreitet. Geißelfärbung. Gerichtete Ausbreitung der Geißeln im Albuminfilme. 2000

sobald sie zwischen die Filmbestandteile in die Wasseroberfläche treten. Dies ist zwischen 5 und 2 dyn cm der Fall. Bei völliger Expansion sind alle vorher im Mikroskop sichtbaren Hüllen abgebaut und zu kleinsten Bruchstücken zerfallen. Bakterien haben solche Erscheinungen nicht, sicher infolge ihrer stabilen Zellwand.

2. Für die elektronenmikroskopische Darstellung ist die Übertragung des auf Wasser liegenden Films auf eine Formvarfolie wichtig. Die Methode schließt sich an die Untersuchungen von Langmuir u. Schaefer (14) an. Dabei läßt sich die Übertragung durch einen genügend hohen Schub des Films über 15 dyn cm erzielen, oder es genügt der anfängliche Schub des B-Films bei Beginn der Expansion. Bei vertikaler Stellung der freitragenden Formvarfolie zieht der Film beim Ein- und Aus-tauchen auf, bei horizontaler Stellung wird er von der Oberfläche abgehoben. Der Vorgang ist dann einwandfrei, wenn an der Folie keine Substratreste während des Aufziehens haften. Die Methode ähnelt in dieser Beziehung der Übertragung von Fremdschichten auf Stearatstufenschichten nach Blodgett u. Langmuir (2) und Sobotka (17), die ebenfalls zur Dickenbestimmung solcher Filme und Proteinschichten herangezogen wurden. Bei identischer Präparation der zellhaltigen Schicht auf die Formvarfolie und die Stearatstufenschichten ergaben sich Schichtdicken von 20 bis 40 Å. Sie stimmen mit den aus der Albuminkonzentration errechneten Film-dicken überein. Dabei stören Anteile von Zellen bei der Messung nicht, wenn nur keine zu hohe Konzentration der Partikel gewählt wurde und spreitfähiges Material aus den Zellen nicht austritt. Erforderlich für eine richtige Übertragung ist also im wesentlichen ein genügend hoher Schub.



Abb. 7. *E. coli*, gespreitet. Gruppe von flachen und erhabenen Zellformen, letztere mit freiliegendem Teil der Zellwand. Oben links stark überhöhte Geißelschatten, bedampft. 10000

3. Zur mikroskopischen Beobachtung trocknen die Objekte mit dem Film auf der Folie an. Die dabei auftretende starke Ablachung der zuvor walzenförmigen Bakterien ist der Oberflächenspannung des Wassers zuzuschreiben. Jedoch tritt keine wesentliche Umorientierung und lokale Störung im Film ein. Die Gleichartigkeit vom Film auf Wasser und der Schicht auf der Folie läßt sich auch einfach mit Polystyrol-Latexteilchen, die in bestimmter Konzentration im Albuminfilme gespreitet sind, überprüfen. Die elektronenmikroskopische Darstellung gibt für Bakterien und Erythrocyten einige besondere Erscheinungen.

Die gleichmäßige Verteilung der Partikel, wie bei Erythrocytenhüllen und Latex, trifft man bei Bakterien nicht in dem Maße an. Sie wandern gelegentlich vor der endgültigen Wasserabgabe kurze Strecken aufeinander zu und bilden so kleine Gruppen. Das ist davon abhängig, wie rasch der Film aus dem Wasser austaucht. Bei einzeln liegenden Bakterien zeigen die Geißeln über große Strecken eine Orientierung entsprechend dem Spreitungsvorgang (Abb. 6). Sowohl bei der Übersicht wie im Einzelbild ist die Ausbildung der Geißeln hervorzuheben. Sie müssen schon vorher in der Oberfläche in gleichmäßiger Form fixiert sein. Dann sind auch die Zelleiber nicht mehr fähig, um eine horizontale Achse zu rotieren. Nun treten bei *E. coli* je nach dem pH-Wert des Substrats, bei dem gespreitet wird, entweder Bakterienformen mit Retraktion des cytoplasmatischen Inhalts — bei saurem Substrat — auf, oder solche Formen, bei denen die Zellen von einem gleichmäßig dichten Material erfüllt sind — bei neutraler oder alkalischer Reaktion (Abb. 7). Solche Phänomene trifft man auch dann an, wenn saure

Fermentlösungen, wie etwa Pepsin in HCl, auch bei vorher fixierten Objekten einwirken. Dabei hinterlassen die enzymatisch abgebauten Geißeln am ursprünglichen Ort auf der Folie Abdrücke. Ebenso sind neben der Retraktion des Zellinnern Zellwandverschiebungen, wohl durch die salzsaure Lösung, erkennbar. Wie oben an den *F* λ -Kurven von Albuminfilmen mit Colibakterien gezeigt wurde, tritt kein spreitfähiges Material aus. Ebenso wenig spreiten die Geißeln selbst. Vollständige Expansion und Kompression eines solchen Films ergibt zwar eine räumliche Trennung der Geißeln vom Zelleib, jedoch bleiben sie in ihrer Gestalt erhalten. Die Keratinstruktur (1) läßt sich also, auch bei verschiedenem Substrat, nicht in eine Form spreitfähiger Proteine bringen. Das makromolekulare Gefüge bleibt unter dem Einfluß der Oberflächenspannung des Wassers erhalten. Über das Auftreten stark erhöht erscheinender Geißeln ergaben weitere Versuche, daß es sich um einen Effekt der Bedampfungsschicht mit Wolframoxyd handelt.

Die Filamente von *E. coli*, die mehrfach beschrieben wurden (8, 10, 19 u. a.), lassen sich dadurch erzeugen, daß man Suspensionen mit isotonischer Lösung wäscht und erst kurz vor dem Spreitungsversuch das Albumin zusetzt. Es scheint also ein Kunstprodukt der Oberflächenpräparation zu sein. Da es sich bei den Stämmen auch um *E. coli anindolica* handelte, brauchen die fermentativen Eigenschaften der Bakterien nicht die wesentliche Rolle bei der Ausbildung der Filamente zu spielen (15).

Die Präparation ergibt gleichmäßige Resultate. Das erlaubt einige Schlüsse. Schon die Trennung in spreitfähiges und nicht spreitendes Material gibt ei-

nen Anhalt, wie weit ein makromolekulares Gefüge stabiler oder instabiler Bauart vor allem an der Zelloberfläche vorliegt, wenn die Oberflächenspannung des Wassers darauf einwirkt. Tritt ein Zerfall auf, wie bei Erythrocyten, ist auch die Form der Bruchstücke für den Bauplan solcher biologischer Grenzflächen heranzuziehen, sofern es sich um morphologisch nachweisbare Aggregate handelt.

LITERATUR

1. ASIBERY, W. T. und WEIBULL, C., *Nature* **163**, 280 (1949).
2. BLODGETT, K. B. und LANGMUIR, I., *Phys. Rev.* **51**, 964 (1937).
3. BULL, H. B., *Advances in Protein Chem.* **3**, 95 (1947).
4. DERVICHIAN, D. G., *J. Phys. Radium* (7) **6**, 221 (1935).
5. — *Compt. rend. acad. sci.* **209**, 16 (1939).
6. GORTER, E., *Ann. Rev. Biochem.* **10**, 619 (1941).
7. HARKINS, W. D. und ANDERSON, T. F., *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 2189 (1937).
8. HARTMAN, R. E., GRIEN, T. D., BATEMAN, J. B., SENSENEY C. A., und HESS, G. E., *J. Appl. Phys.* **24**, 90 (1953).
9. HERZBERG, K., KLEINSCHMIDT, A., REQUARDT, K., und VOGELL, W., *Arch. Virusforsch.* **6**, 283 (1955).
10. HOUWINK, A. L. und VAN IJERSON, W., *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 10 (1950).
11. JOLY, M., *Compt. rend. acad. sci.* **208**, 975 (1939).
12. KLEINSCHMIDT, A., *Kolloid-Z.* **142**, 74 (1955).
13. — *Acta Haematol.* **13**, 337 (1955).
14. LANGMUIR, I. und SCHAEFER, V. J., *Chem. Rev.* **24**, 181 (1939).
15. MACCAGARO, G. A. und ANGELOTTI, A., *Giorn. Microbiol.* **1**, 85 (1955).
16. SENSENEY, C. A., KAHN, R. P., und DESJARDINS, P. R., *Science* **130**, 456 (1954).
17. SOBOJKA, H., *Medical Physics* II, 550, Chicago, 1950.
18. WILHELMY, L., *Ann. Physik* **119**, 177 (1863).
19. WYCKOFF, R. W. G., *Electron Microscopy*, New York-London, 1949.

The Effect of Acridine Type Dyes on the Submicroscopical Structure of Large Molecules

F. GUBA, G. HAJÓSSI-KEREK and G. ROMHÁNYI

Electron Microscope Laboratory of the Hungarian Academy of Science, Budapest, and Pathological Institute of the University of Pécs

It is generally known that some of the compounds of acridine type show considerable pharmacological effects or even may act as cancerogens. According to recent experiments (1), dyes of the acridine type in vitro precipitate polysulphates and polyphosphates (2). They also influence the polyelectrolytes in the tissues *in situ* in such a way that they show negative birefringence.

We have examined the effect of several acridine compounds on some biological macromolecular substances. We began our experiments with the reaction of pure substances: 5-aminoacridine,

tryptaflavin, acridine orange, atebtrin and rivanol on myosin, DNA, chondroitine sulphuric acid, hyaluronic acid and heparin. The dyes used differ mainly in their amino groups. The submicroscopical morphological changes caused by the acridine dyes were studied by means of electron microscopy and polarization optical analysis.

Fig. 1 shows chondroitin sulphuric acid in a control sample and fig. 2 when treated with tryptaflavin. Except for myosin, all our components are globular.

As demonstrated in fig. 2, the structure changes

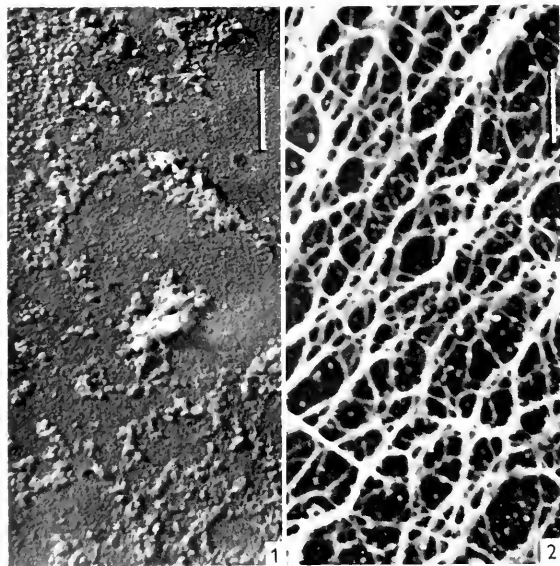


Fig. 1. Chondroitin sulphuric acid. Control sample.

Fig. 2. Chondroitin sulphuric acid-tryptaflavin complex. The reticular structure characteristic of tryptaflavin complexes can be seen very well.

when mixed with the dye. The dyes always brought about precipitation. The consistency of the precipitates was different with every compound; the most compact precipitate was obtained with rivanol.

The results show that the change in structure is, in principle, characteristic for the dye, but in addition the chemical composition of the substrate is of importance. These conclusions were supported by our polarized light analysis.

We think that the structure which develops is due to a coupling of the macromolecules through the dye molecules. This is supported by the following observation: we solved the newly developed structure by the known diffusion method with NaOH and ethyl alcohol respectively. On the elimination of either of the components the newly developed structure breaks up.

The coupling depends on the steric behaviour both of the polyelectrolyte and the dye molecule. It is obvious that the development of this structure depends on the side groups of the acridine, chiefly of its NH_2 groups.

REFERENCES

1. DOGSON, K. S., ROSE, F. A., and SPENCER, B., *Biochem. J.* **60**, 346 (1955).
2. ROMHÁNYI, G., *Congress of the Hungarian Pathological Soc.*, Debrecen, 1955.

VI

CELL ULTRASTRUCTURE, GENERAL

Elektronenmikroskopische Studien an Leberschnitten von Thyroxin-behandelten Ratten

H. SCHULZ¹, H. LÖW, L. ERNSTER und F. S. SJÖSTRAND

*Aus dem Anatomischen Institut des Karolinska Institutes und dem
Wenner-Grens Institut der Universität Stockholm*

DIE Schilddrüsenhormone bewirken eine Labilisierung der zellulären Multienzymsysteme, wie biochemische Ergebnisse von Aebi und Abelin (1), Tapley, Cooper und Lehninger (13) und von Klemperer (6, 7) gezeigt haben. Martius und Hess (8, 9) fanden bei steigenden Thyroxinkonzentrationen eine fortschreitende Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in der Atmungskette, die bis zu einer vollständigen Entkopplung führt. Eigene Studien an isolierten Mitochondrien von thyreotoxischen Rattenlebern ergaben, daß die Wirkung des Thyroxins wahrscheinlich eher verbunden ist mit strukturellen Veränderungen der Multienzymsysteme als mit einer spezifischen Hemmung einzelner Enzyme (2, 3).

Wir haben unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt, um Befunde der Morphologie biochemischen Ergebnissen gegenüber zu stellen.

Eine zusammenfassende Beschreibung der submikroskopischen Struktur der normalen Rattenleber wurde bereits von Fawcett (4) durchgeführt. Palade und Siekevitz (11) berücksichtigten vorwiegend die Lebermikrosomen. Das Verhalten der Lebermitochondrien unter pathologischen Bedingungen wie Hunger und akute Hypoxie untersuchten Gansler und Roullier (5), sowie Mölbert und Guerritore (10).

Erwachsene Ratten erhielten intraperitoneal eine tägliche Dosis von 0,4 mg DL-Thyroxin (Hoffmann-La Roche) über 5 Tage; am sechsten Tag wurden die Tiere getötet und Leberstückchen von 0,5–1 mm Kantenlänge lebensfrisch nach Sjöstrand (pH 7,2) fixiert. Postmortale Veränderungen versuchten wir auszuschließen, indem wir zu jedem Versuch ein Normaltier unter denselben Bedingungen präparierten, sowie nur Schnitte aus der Oberfläche der Gewebstückchen verwandten. Die Schnitte fertigten wir an mit dem Ultramikrotom nach Sjöstrand. Für die Aufnahmen benutzten wir das RCA EMU 2c Elektronenmikroskop. Die in den Tabellen und im Text angegebenen Maße sind das statistische Ergebnis von Messungen an verschiedenen Leberzellen von den untersuchten sechs Ratten: über 100 Messungen liegen den jeweiligen Zahlen zugrunde.

Zum lichtmikroskopischen Nachweis des Glykogens mit dem Färbefahren nach Best wurden einige kleine lebensfrische Leberstückchen von den Versuchs- und Kontrolltieren zur Vermeidung der „Glykogenflucht“ fünf Minuten mit einer $m/3$ NaOH-Lösung behandelt (12), danach in absolutem Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet.

In unseren elektronenmikroskopischen Studien untersuchten wir besonders die Veränderungen an den Lebermitochondrien. Nach Behandlung mit Thyroxin zeigen die Mitochondrien eine deutliche Schwellung und eine Aufhellung der Matrix. Die Aufhellung der Matrix beginnt immer in der Mitte eines Mitochondriums und nimmt allmählich zur Peripherie zu. In Normalfällen besteht die Matrix aus einer über das ganze Mitochondrium gleichmäßig verteilten, feingranulierten Grundsubstanz von mäßiger Osmiophilie (Abb. 1). Bei einer Schwellung ist sie zusammengesetzt aus unregelmäßigen Flecken mit unterschiedlichem, weniger dichtem Kontrast

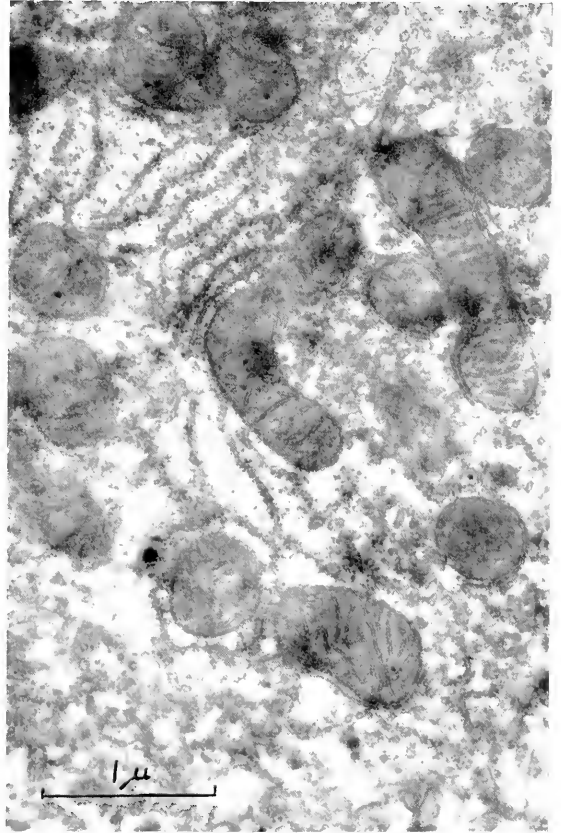


Abb. 1: Ausschnitt aus einer normalen Leberzelle der Ratte. Zahlreiche längs- und querschnittene Mitochondrien. Im Cytoplasma außerdem α -Cytochromen sowie doppelkonturierte Membranen, die die Mitochondrien zirkulär umgeben. Elektronenoptisch 8600 \times , Abb. 24000 \times .

¹ Wissenschaftlicher Assistent am Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf; Stipendiat der Stadt Düsseldorf.

TABELLE 1. Länge und Breite der Mitochondrien.

	Geringste Breite, μ	Größte Breite, μ	Durch- schnittl. Breite, μ	Geringste Länge, μ	Größte Länge, μ	Durch- schnittl. Länge, μ	Verhältnis Breite zu Länge
Normale Lebermitochon- drien der Ratte	0,136	0,506	0,302	0,578	1,73	1,03	3 : 10
Nach Behandlung mit Thyroxin	0,528	0,566	0,939	0,801	2,187	1,376	6,6 : 10

TABELLE 2. Anzahl und Länge der Innenmembranen in einem Mitochondrien-Längsschnitt.

	Höchste Anzahl der Innen- membranen	Kleinste Anzahl der Innen- membranen	Durchschn. Anzahl der Innen- membranen	Größte Länge einer Innen- membran m μ	Geringste Länge einer Innen- membran m μ	Durchschn. Länge der Innen- membranen m μ
Normale Lebermitochon- drien der Ratte	34	8	19	380	48	128
Nach Behandlung mit Thyroxin	25	3	10	189	16	86

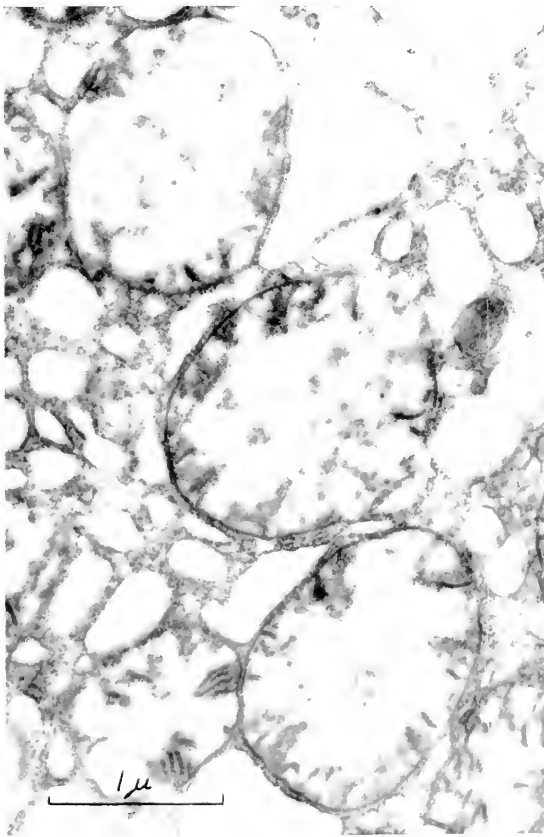


Abb. 2: Ausschnitt aus einer Leberzelle der Ratte nach Behandlung mit Thyroxin. Geschwollene Mitochondrien und Vakuolisierung des Cytoplasmas. Elektronenoptisch 8600 \times , Abb. 24000

und darin liegenden feinen fädigen Strukturen (Abb. 2). Es ist möglich, daß dieses durch eine strukturelle Veränderung der Eiweißmoleküle bedingt ist. Andere geschwollene Mitochondrien haben eine unveränderte Matrix. Die morphologischen Unterschiede dürften biochemisch verschiedenen Labilitätsstufen der Multienzysysteme entsprechen.

Das wesentlichste Kriterium für eine Mitochondrienschwellung im elektronenmikroskopischen Bild ist eine Breitenzunahme des Mitochondrienkörpers. Das Größenverhältnis von Breite zu Länge beträgt in Normalfällen 3:10, nach Thyroxinwirkung 6,6:10 (Tabelle 1).

Die statistische Auswertung der elektronenoptischen Befunde ergibt weiterhin, daß die Gesamtoberfläche der „cristae mitochondriales“ nach Behandlung mit Thyroxin sich gegenüber normalen Lebermitochondrien um maximal 30 % vermindern kann. Auf Schnittbildern ist die durchschnittliche Anzahl der Innenmembranen pro Mitochondrium von 18 auf 10 reduziert; die durchschnittliche Länge einer Innenmembran ist um $\frac{1}{3}$ verkürzt (Tabelle 2). Oft erkennt man auf den Bildern nur noch 15 m μ kleine Reste von Innenmembranen. Geschwollene Mitochondrien sind stets umgeben von intakten Außenmembranen. Durch die Volumenzunahme ist die Gesamtoberfläche der Mitochondrienaußenmembranen um das 3–4 fache vergrößert worden. Da die Außenmembranen nicht dünner geworden sind, muß eine Neubildung von Membranzusammenhang erfolgt sein. Es ist möglich, daß die dafür notwendigen Baubestandteile von den Innenmembranen herrühren. Faßt man die analytischen Messungen der Membransysteme zusammen (Tabelle 3), so sind nach Behandlung mit

TABELLE 3. Übersicht der Messungen an den Mitochondrien-Innen- und Außenmembranen.

	Außenmembranen in Å						Innenmembranen in Å					
	Gesamtbreite		Osmiophile Schichten		Osmiophobes Intervall		Gesamtbreite		Osmiophile Schichten		Osmiophobes Intervall	
	Mittel	σ	Mittel	σ	Mittel	σ	Mittel	σ	Mittel	σ	Mittel	σ
<i>Normale Lebermitochondrien der Ratte</i>												
Tier I	168 ± 3	16	42 ± 4	19	84 ± 2	20	118 ± 8	25	53 ± 5	34	48 ± 4	9
Tier II	128 ± 6	21	50 ± 12	8	38 ± 5	7	147 ± 7	32	38 ± 6	18	42 ± 4	16
Tier III	147 ± 2	12	46 ± 8	15	55 ± 3	13	189 ± 4	19	63 ± 3	21	63 ± 7	27
Wert:	150 Å		45 Å		60 Å		150 Å		50 Å		50 Å	
<i>Nach Behandlung mit Thyroxin</i>												
Tier I	174 ± 8	9	44 ± 3	12	78 ± 4	10	183 ± 8	18	57 ± 3	6	69 ± 4	8
Tier II	162 ± 5	13	42 ± 4	6	87 ± 4	10	172 ± 6	12	61 ± 4	8	76 ± 6	20
Tier III	170 ± 3	4	48 ± 3	8	71 ± 5	5	189 ± 3	21	48 ± 6	12	65 ± 5	16
Wert:	170 Å		45 Å		80 Å		180 Å		55 Å		70 Å	

Thyroxin die osmiophoben Schichten der Außen- und Innenmembranen um 20 Å verbreitert, was wahrscheinlich auf eine Schwellung zurückzuführen ist. Die osmiophilen Schichten der Membransysteme bleiben unverändert.

Thyroxin bewirkt außerdem Veränderungen am Cytoplasma der Leberzellen. Man findet zahlreiche verschieden große, über die ganze Leberzelle gleichmäßig verteilte Vakuolen, deren Inhalt elektronenoptisch leer ist. Die Membran der Vakuolen ist 40–65 Å dick und von außen mit homogenen Partikeln

bedeckt. Der seitliche Partikelabstand beträgt 100–210 Å, die Partikelbreite 120 Å. Wir nehmen an, daß die Vakuolen aus den α -Cytomembranen entstanden sind. Diese Veränderung ist so ausgeprägt, daß man von einer weitgehenden Veränderung des Ergastoplasmas sprechen kann (Abb. 2). Auf Grund vergleichender lichtmikroskopischer Untersuchungen ist in den Vakuolen wahrscheinlich kein Glykogen enthalten.

Die festgestellten Veränderungen (Abb. 3) an den

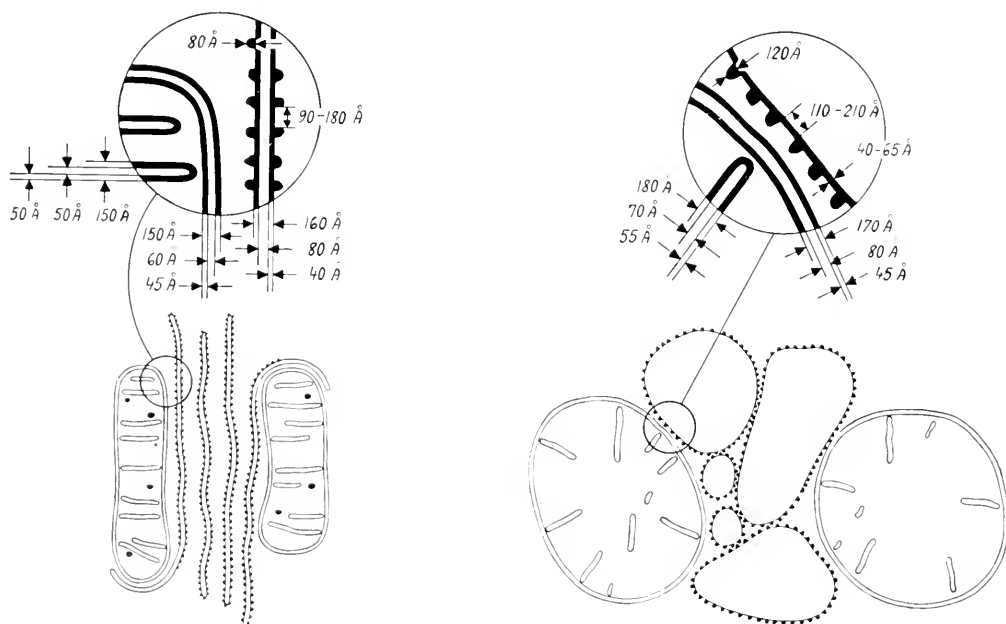


Abb. 3. Schematische Darstellung der Modifikationen an den Mitochondrien und den α -Cytomembranen der Rattenleber nach Behandlung mit Thyroxin. Links sind die normalen Verhältnisse dargestellt.

Mitochondrien und am Ergastoplasma beruhen auf Schwellungsvorgängen, die verursacht sind durch eine Insuffizienz der osmotischen Regulation. Die Schwellung der Mitochondrien, die „in vitro“ auf Grund zahlreicher biochemischer Studien nachgewiesen wurde, ist auch aus unseren elektronenoptischen Aufnahmen ersichtlich. Ob die Insuffizienz der osmotischen Regulation z. B. bedingt ist durch einen ATP-Mangel oder durch Ionenverschiebungen, kann aus den elektronenoptischen Ergebnissen nicht beantwortet werden.

Die Fragen der Membranverminderung und Membranvermehrung sind möglicherweise verbunden mit Änderungen in der Atmungsintensität des Mitochondriums. Aus bisherigen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Schilddrüsenhormone ist bekannt, daß bei der Hyperthyreose, trotz reichlichem O_2 -Angebot, eine verminderte Fähigkeit besteht, O_2 aufzunehmen. Die eigentliche Ursache der Mitochondrienschwellung besteht jedoch in einer Labilisierung der enzymatischen Aktivität, wie eigene biochemische Untersuchungen bestätigt haben. Die Unterschiede in der Morphologie der Mitochondrien entsprechen hierbei verschiedenen Labilitätsstufen der Multienzymsysteme. Es bleibt die Frage zu erörtern, ob mit den elektronenoptischen Befunden bewiesen werden kann, daß die Modifikationen am Chondriom und an den α -Cytomembranen dem „in vivo“-Zustand entsprechen. Über die abschließende Prüfung der morphologischen Veränderungen in Beziehung zu den biochemischen Ergebnissen wird ausführlich an anderer Stelle berichtet.

LITERATUR

1. AEBI, H. und ABITIN, I., Elektrolyt- und Fermenthaushalt der hyperthyreotischen Leber. *Biochem. Z.* **324**, 364–384 (1953).
2. BAYER, R. E., LÖW, H., und ERNST, L., The effect of thyroxine on mitochondrial stability. *Proc. Norwegian Biochem. Soc.*, Oslo, **2-3** (1956).
3. — *Acta Chem. Scand.* (1957, in press).
4. FAWCETT, W., Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **15**, 1475–1502 (1955).
5. GANSLER, H. und ROULLIER, CIL., Modifications physiologiques et pathologiques du chondriome. (Etude au microscope électronique.) *Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriologie*, **19**, 217–243 (1956).
6. KLIMPERT, H. G., The uncoupling of oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria by thyroxine, triiodothyronine and related substances. *Biochem. J.* **60**, 122–128 (1955).
7. — The uptake of thyroxine and triiodothyronine by rat-liver mitochondria. *ibid.* **60**, 128–135 (1955).
8. MARTIUS, C. und HESS, B., The mode of action of thyroxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 486–487 (1951).
9. — Über den Wirkungsmechanismus des Schilddrüsenhormons. *Biochem. Z.* **326**, 191–203 (1955).
10. MÖLBERT und GUILTRITTORE, zitiert nach BÜCHNER, F., Hemmung der Oxydationen als pathogenetisches Prinzip. *Klin. Wochschr.* **34**, 777–781 (1956).
11. PALADE, G. E. und SIEKEVITZ, P., Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 171–201 (1956).
12. TAKAHASHI, K. und IWASE, S., On artifacts appearing in the histochemical fixation of glycogen. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 391–399 (1955).
13. TAPLEY, D. F., COOPER, C., und LEHNINGER, A. L., The action of thyroxin on mitochondria and oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 597–598 (1955).

Die Entstehung, die Vermehrung und die Abscheidung geformter Sekrete der Mitochondrien von *Paramecium*

K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN

Zentral-Laboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn

ÜBER den Organellcharakter und die wichtigen Funktionen der Mitochondrien im Zellstoffwechsel besteht heute kein Zweifel mehr: Biochemische Untersuchungen haben die stoffliche Zusammensetzung und die enzymatische Aktivität dieser Zellorganellen aufgezeigt (5). Das Elektronenmikroskop konnte in den letzten Jahren erweisen, daß der hochgeordneten enzymatischen Funktion eine ebenso hohe strukturelle Ordnung zu Grunde liegt (6–10, 14, 15).

Dagegen fehlen uns bis heute eindeutige Aufschlüsse über die Entstehung und die Vermehrung der Mitochondrien, was für die Beurteilung einer Kontinuität des Chondrioms von Bedeutung ist. Es geht um die Frage, ob wir die Mitochondrien als Autoduplikanten zu betrachten haben oder ob sie etwa aus anderen cytoplasmatischen Strukturen entstehen können (1, 4). Bekanntlich wird versucht,

gewisse Phänomene der plasmatischen Vererbung durch eine Autonomie des Chondrioms zu deuten.

Als Untersuchungsmaterial diente ein Klon von *Paramecium caudatum*, der in Heudekokt kultiviert wurde. Nach Fixation mit Osmiumtetroxyd, Formalin oder mit dem Gemisch nach Regaud, Champy und Maximow wurden die Zellen in einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert und in Plexiglas eingebettet. Dünnschnitte von 200–300 Å Dicke gelangten ohne Herauslösen des Einbettungsmediums im Elektronenmikroskop zur Untersuchung. (Ultra-Mikrotom nach Sjöstrand, Siemens-Übermikroskop Typ 100 d, 80 kV.) Als bestes Fixierungsmittel erwies sich eine 1%ige Lösung von Osmiumtetroxyd bzw. eine 10%ige Formalinlösung, beide mit dem Acetatveronalpuffer nach Michaelis auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,2 eingestellt.

Als Kontrastmittel haben sich Phosphorwolframsäure ($PWS = P_2O_5 \cdot 24WO_3 + xH_2O$) und Thalliumnitrat ($Tl = TlNO_3$) bewährt, beide jeweils zu 1% in 70%igem Alkohol gelöst (15).

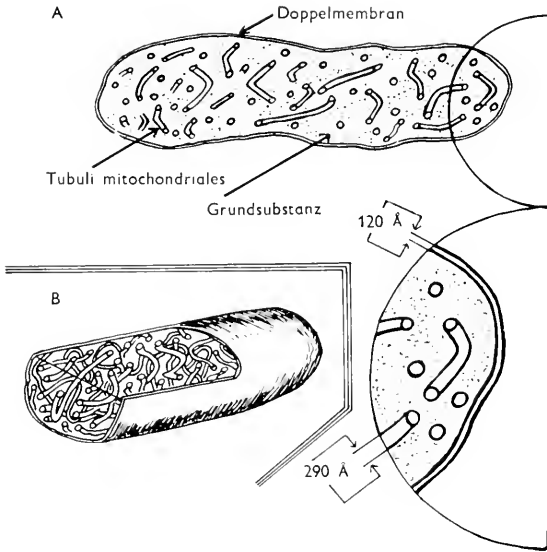


Fig. 1. Schematische Darstellung der Feinstruktur der Mitochondrien von *Paramecium caudatum*. A, schematischer Dünnschnitt; B, räumliche Rekonstruktion.

Es zeigte sich, daß die Mitochondrien von *Paramecium* einen anderen Bauplan besitzen als die Mitochondrien aus Säugergeweben. Im Inneren der Mitochondrien finden sich als wesentliche Strukturelemente Röhren bzw. Kanäle.

Über den Inhalt der Tubuli mitochondriales lassen sich vorerst nur Vermutungen anstellen. Es erscheint möglich, daß sie eine Flüssigkeit enthalten, die im elektronenoptischen Bild bislang nicht zur Darstellung gebracht wurde. Zweifelsohne bewirken aber diese Röhrenstrukturen eine beträchtliche Vergrößerung der reaktionsfähigen Oberfläche innerhalb der Mitochondrien.

Wir kommen für den Aufbau der Mitochondrien von *Paramecium* zu einem Schema wie nach Fig. 1, das gleichzeitig die Unterschiede im Aufbau von *Paramecium*-Mitochondrien einerseits und dem bislang bekanntgewordenen Strukturprinzip von Säuger-Mitochondrien (6, 8, 11) andererseits deutlich macht.

Da man bei *Paramecium* unter optimalen Kulturbedingungen bis zu 4 Zellteilungen pro Tag erzeugen kann, wurden nun Tiere mit hoher Teilungsrate überprüft in der Hoffnung, Aufschlüsse über die Entstehung oder Vermehrung der Mitochondrien zu gewinnen. Es ließ sich eine ziemlich geschlossene Entwicklungsreihe von Mitochondrien nachweisen. Aus kleinen cytoplasmatischen Bläschen entstehen größere Gebilde, die wir als „Promitochondrien“ bezeichnen können.

Diese Promitochondrien entwickeln Mikrotubuli, die durch weiteres Wachstum in normal große Tubuli mitochondriales übergehen, wobei gleichzeitig das Mitochondrium selbst heranwächst. Diese Entwicklungsstadien finden sich nur im Endoplasma. Über die Natur der cytoplasmatischen Bläschen kann

noch keine sichere Aussage gemacht werden. Mit Sicherheit sind die cytoplasmatischen Bläschen nicht mit „Mikrosomen“ oder „Biosomen“ zu identifizieren (nach Eichenberger (3) sollen die Mitochondrien durch Umwandlung von Mikrosomen entstehen).

Unsere heutigen Forschungsmittel erlauben noch nicht, die etwa 700 Å großen „cytoplasmatischen Bläschen“, aus denen die Mitochondrien entstehen, näher zu charakterisieren. Die Frage nach der Kontinuität und Autonomie des Chondrioms kann noch nicht endgültig beantwortet werden.

Die Untersuchung von Zellen mit hoher Teilungsrate erbrachte auch weitere Befunde über den Vermehrungsmodus der Mitochondrien. In den lichtmikroskopischen Untersuchungen hatten Danneel und Güttes (2) sowie Steiner (13) bereits eine Teilungsfähigkeit der Mitochondrien verschiedener Zellen wahrscheinlich gemacht. Wir finden bei *Paramecium* Stadien, die sich sowohl als Querteilungen als auch eine Art Knospung interpretieren lassen. Von einer gleichmäßigen Verteilung der Substanz des Mitochondriums kann bei solchen Durchschnürungen keine Rede sein. Vielmehr lassen sich alle Zwischenformen zwischen Teilung und Abschnürung verfolgen.

Von besonderem Interesse ist eine Erscheinung, die sich wiederum an Zellen mit hoher Teilungsrate besonders deutlich zeigt. Man kann an zahlreichen Mitochondrien verfolgen, daß sich die begrenzende Doppelmembran öffnet und Tubuli ins Cytoplasma entläßt. Dieser Befund dürfte von Bedeutung für den Funktionsmechanismus der Mitochondrien sein, wenn sich zeigen ließe, daß es sich hier wirklich um eine Art sekretorischer Tätigkeit der Mitochondrien handelt.

Die Deutung mußte mit besonderer Vorsicht geschehen, da uns ja das Elektronenmikroskop immer nur einzelne Zustandsbilder, nicht aber den kontinuierlichen Ablauf eines Vorganges in der Zelle zu beobachten gestattet.

An Hand eines großen Untersuchungsmaterials ließ sich erhärten, daß man wirklich von einer Abscheidung geformter Sekrete bei den Mitochondrien sprechen kann. Die Richtigkeit dieser Auffassung wird durch folgende Befunde bestätigt:

- 1) Der Äquivalenzgrad der elektronenoptischen Bilder zum lebenden Zustand kann aus der Erfahrung zahlreicher Reihenversuche mit verschiedenen Fixierern, pH-Werten und Kontrastierungen als gut bezeichnet werden.
- 2) Im Cytoplasma lassen sich auch in der näheren Umgebung von Mitochondrien Strukturen nachweisen, die den Tubuli mitochondriales außerordentlich ähnlich sind.
- 3) Eine Sekretion von Tubuli konnte nur selten an Zellen mit geringer Teilungsrate beobachtet werden, sie tritt gehäuft bei Zellen mit hoher Teilungsrate auf, bei denen der Stoffwechsel erhöht ist.
- 4) Und letztlich läßt sich an entleerten Mitochon-

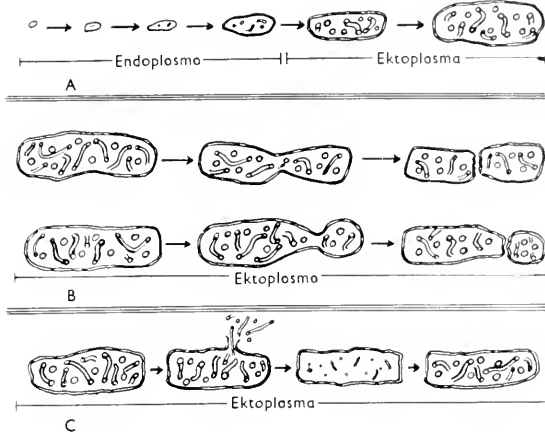


Fig. 2. Schematische Darstellung der Entstehung (A), der Vermehrung (B) und der Abscheidung (C) geformter Sekrete der Mitochondrien von *Paramecium caudatum*.

drien eine Regeneration der Tubuli verfolgen, und zwar bilden sich in diesen entleerten Mitochondrien zunächst wie in den Promitochondrien Mikrotubuli, die wieder zu normalen Tubuli mitochondriales heranwachsen.

Wir haben hier also eine echte Regeneration einzelner Mitochondrien vor uns.

Die Ergebnisse über Entstehung, Vermehrung und einen Funktionsmechanismus der Mitochondrien lassen sich schematisch wie in Fig. 2 zusammenfassen. Ein Abdruck der Belegaufnahmen war im Rahmen dieses Tagungsberichtes nicht möglich. Ihre Veröffentlichung erfolgt an anderer Stelle.

Die Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht. Frh. Chr. Brodt danke ich wiederum für wertvolle technische Assistentz.

LITERATUR

1. ALTMANN, H. W. u. a., Das Cytoplasma. In Handbuch der Allgemeinen Pathologie, II, 1. Berlin (Göttingen)-Heidelberg, 1955.
2. DANFEL, R. und GÜTTES, E., *Naturwissenschaften* **38**, 5, 117 (1951).
3. EICHENBERGER, M., *Exptl. Cell Research* **4**, 275 (1953).
4. FREY-WYSSLING, A., *Protoplasmatologia* II, A2. Wien, 1955.
5. LINDBERG, O. und ERNSTER, L., *Protoplasmatologia* III, A4. Wien, 1954.
6. PALADE, G. E., *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 188 (1953).
7. POWERS, E. L., EHRET, C. F., und ROTH, L. E., *Biol. Bull.* **108**, 2, 182 (1955).
8. RHODIN, J., Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney. Karolinska Institutet, Stockholm, 1954.
9. SEDAR, A. W. und PORTER, K. R., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 583 (1955).
10. SJÖSTRAND, F. S., *Nature* **171**, 30 (1953).
11. — International Union of Biological Sciences, Series B 21. Groningen, 1954.
12. SJÖSTRAND, F. S. and RHODIN, J., *Exptl. Cell Research* **4**, 426 (1953).
13. STEINER, M., *Naturwissenschaften* **41**, H. 8, 191 (1954).
14. WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., *Z. Naturforsch.* (1957, im Druck).
15. — Diese Proceedings, S. 124.

Changes in the Ultrastructure of the Ciliary Epithelium during Inhibition of the Secretion of Aqueous Humour

Å. HOLMBERG

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

It has been shown by many investigators (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11) that the epithelium of the ciliary body plays an important role in the formation of aqueous humour, partly as a barrier between blood and aqueous humour, and partly as an actively secreting epithelium. This investigation comprises only the innermost, non-pigmented layer of the ciliary epithelium.

Rabbits were used as experimental animals. The tissue has been fixed *in vivo* by injection of 1% osmic acid in veronal-acetate buffer into the posterior chamber of the eye. The animals were kept under general anesthesia (nembotal). After 15–20 minutes part of the ciliary body was removed and the fixation continued *in vitro* for further 3½–4 hours. The animals, treated with Diamox, were partly nephrectomized, partly not. The nephrectomized animals were given 10 mg Diamox per kg body weight intravenously, the others 100 mg Diamox per kg

body weight. As control animals, besides the normal ones, animals were used which instead of Diamox were given Diazil in equal amounts. The fixation was carried out after different intervals after the injection.

The normal structure.—In this report brief mention will be made of some of the cell components which seem to undergo changes after inhibition of the secretion.

Most characteristic for the non-pigmented epithelium of the ciliary body are the β -cytomembranes. (fig. 1). They stand out as triple-layered membranes with two osmiophilic components, each about 40 Å thick, and one central osmiophobic layer about 70 Å thick. At the cell surface one can clearly see how the membranes are continuous with the cell membrane. Thus the β -cytomembranes may be interpreted as folds of the cell membrane, but it seems probable

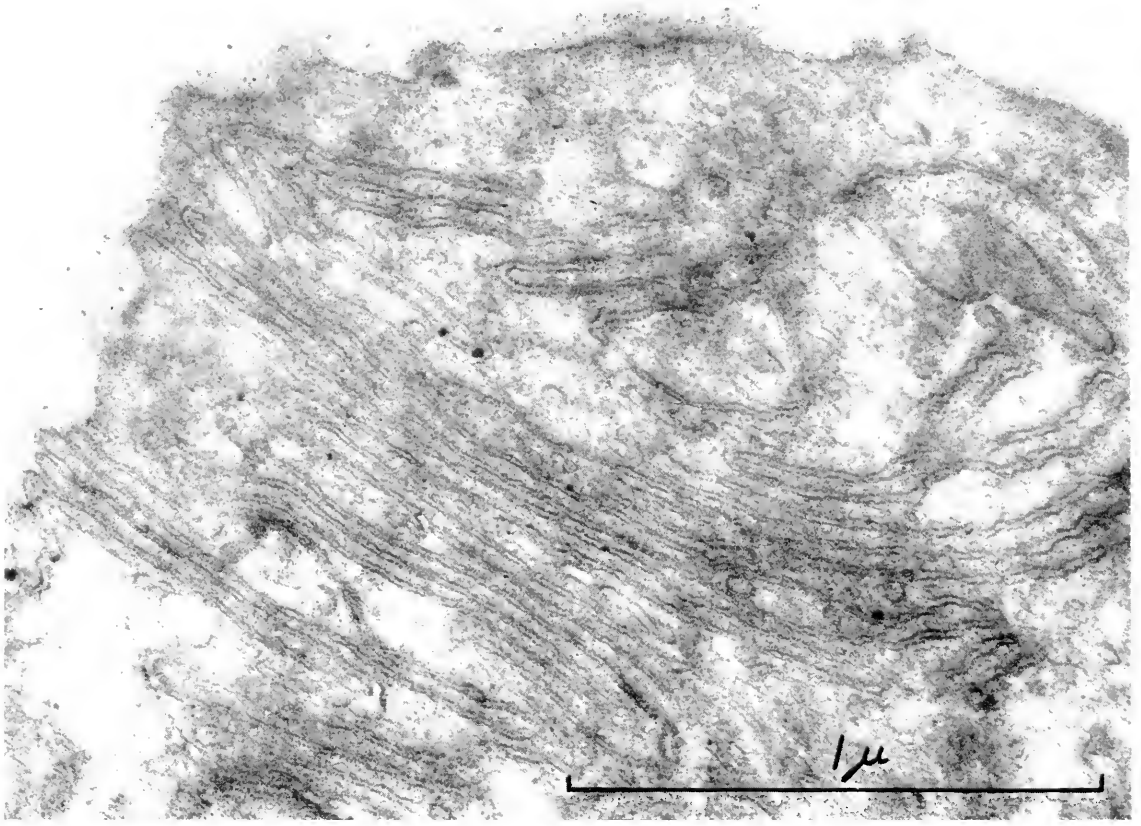


Fig. 1. β -cytomembranes in the non-pigmented epithelium of the ciliary body. Magnification 70,000.

that the central, osmiophobic layer, because of its regular thickness, is not a simple extracellular tissue space. The membranes are localized only to the apical parts of the cell, and do not extend deeper into the cell than to the apical part of the nucleus. Outside the cell membrane a basement membrane is observed 250–350 Å thick, separated from the cell membrane by an interspace 400–700 Å wide.

The mitochondria are relatively small with a mean width of only 0.18μ . Most of them are built up in the common way, with the inner double membranes oriented mainly perpendicularly to the outer double membrane. In some cases, however, the inner membranes extend parallel to the long axis of the mitochondrion and along its whole length. In none of these cases have any connections between the inner and outer membranes been seen.

The Golgi apparatus (fig. 2) is without exception encountered in the basal part of the cells. In each cell one can observe 1–3 Golgi units, each consisting of the well-known components: 2–3 rows of double membranes, γ -cytomembranes, a few larger vacuoles, and several small vesicles. Each single osmiophilic component of the double membranes is about 50 Å thick. Both the vacuoles and the vesicles are bounded by a single membrane, about 50 Å thick.

Changes in the ultrastructure after injection of

Diamox.—Diamox produces changes in the non-pigmented epithelium in at least three of its components: the cytoplasm, the mitochondria and the Golgi apparatus.

The most marked changes in the cytoplasm is seen within 30 minutes after injection of Diamox. The cells are filled with small vesicles, in the deeper layers mostly very regularly spread, but close to the surface often congregated in large groups. It is striking how the vesicles in these groups are arranged in rows or concentric circles, resembling the arrangement of the β -cytomembranes.

After more than 30 minutes after injection of Diamox the amount of vesicles decreases and at intervals longer than 60 minutes they seem to be practically absent from the cytoplasm.

Under the influence of Diamox there is a pronounced increase in the width of the mitochondria from the normal 0.18μ to about 0.25μ . This increase is due to a real increase of the volume of the ground substance of the mitochondria and not to such a swelling as is characteristic for the post-mortem changes. The alteration of the mitochondria appears very soon; it is seen already within 15 minutes after injection of Diamox and persists for a long time. Thus 2 hours after injection the width of the mitochondria is still about 0.25μ . As far as can be seen

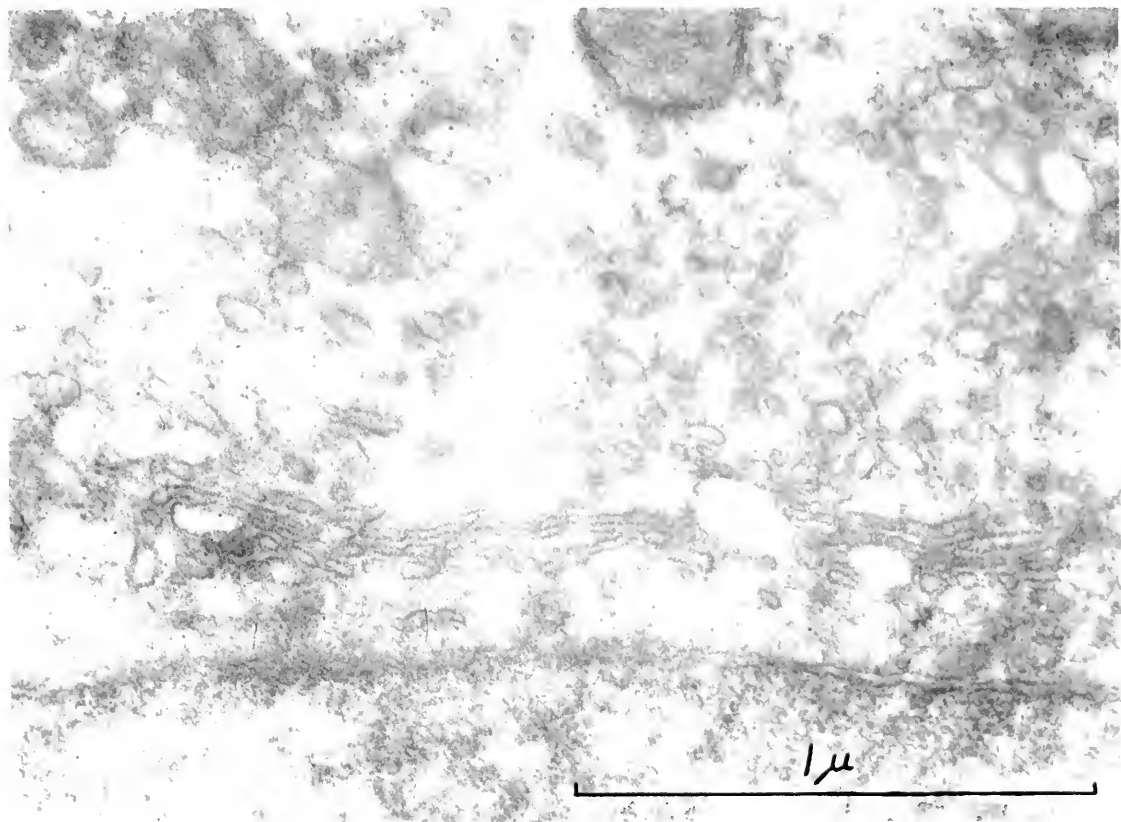


Fig. 2. Golgi apparatus from a normal animal. One Golgi unit with several membranes, a few large vacuoles and some small vesicles. Magnification 53,000.

TABLE 1. *The vacuolization of the Golgi apparatus after Diamox.*

Experiment	Number of animals	Number of Golgi regions observed per cell	Number of vacuoles per Golgi region per section
Normal animals; no nephrectomy	12	31	78 ± 10
Control animals after nephrectomy (Diazil)	3	7	79 ± 11
		4	86 ± 18
		7	93 ± 12
30 min. after 10 mg Diamox per kg body weight; nephrectomy	3	13	193 ± 12
		11	173 ± 11
		4	228 ± 40
60 min. after 10 mg Diamox per kg body weight; nephrectomy	3	6	184 ± 13
		4	142 ± 7
		5	155 ± 15
120 min. after 10 mg Diamox per kg body weight	3	6	79 ± 10
		6	116 ± 15
		9	118 ± 7
30 min. after 100 mg Diamox per kg body weight; no nephrectomy	3	6	195 ± 23
		6	174 ± 16
		4	198 ± 25

now, there are no other changes in the mitochondria, but the analysis is not yet finished.

In the *Golgi apparatus* there is a great increase in the amount of the small vesicles (fig. 3). A quantitative analysis has been performed by counting all vesicles seen in the *Golgi apparatus* on one section through a cell. The result is presented in Table 1. This informs of the fact that the changes in the *Golgi apparatus* appear very soon and that the number of vesicles decreases in animals killed at longer intervals after the injection of Diamox. Thus, after two hours the amount of vesicles is about the same as in the control animals.

Another change in the *Golgi apparatus* concerns the *Golgi membranes*, which normally lie in 2-3 rows with 4-5 membrane pairs in each, sometimes split up into several units with only 1-3 membrane pairs (fig. 3).

Finally it must be pointed out that in the control animals no such variations have been observed in the cytoplasm, the mitochondria or in the *Golgi apparatus*.

Discussion. Concerning the cell structure under normal conditions it should only be emphasized that the organisation of the apical parts of the cells, with the β -cytomembranes and the basement mem-

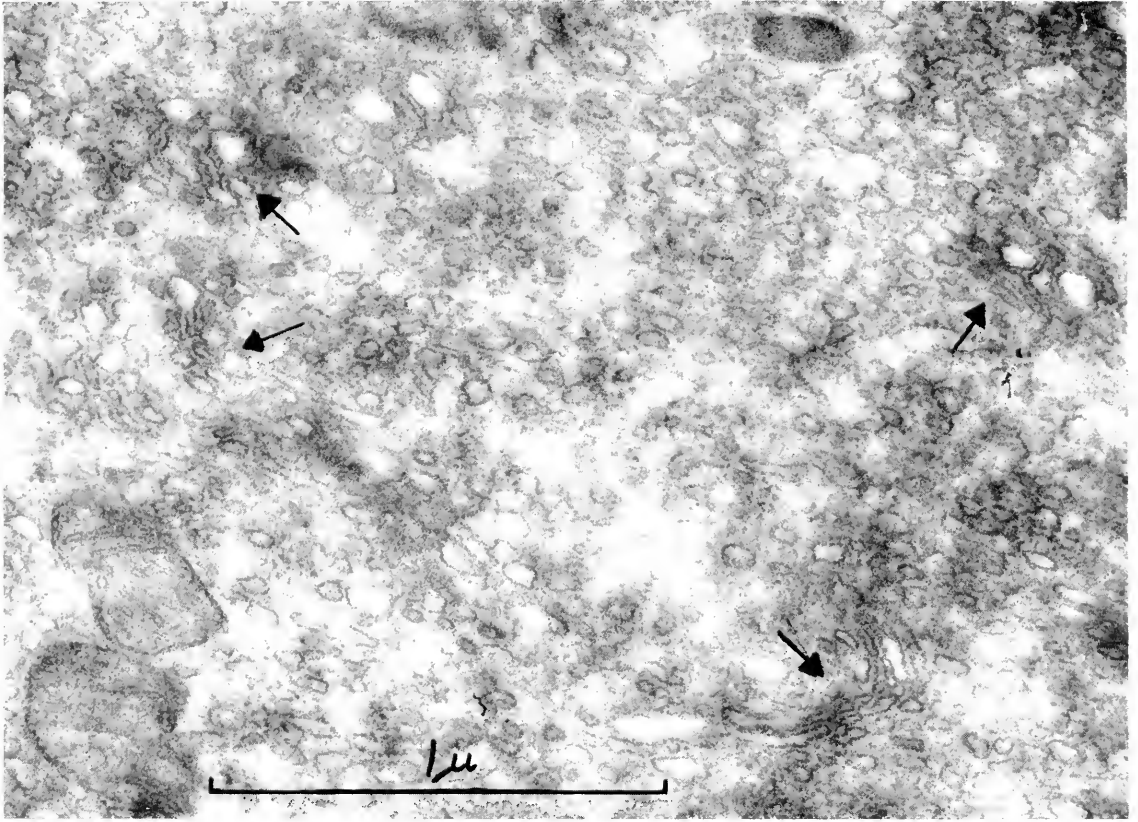


Fig. 3. Golgi apparatus from an animal fixed 15 minutes after injection of 10 mg Diamox per kg body weight. Several Golgi units (arrows) with numerous small vesicles. Magnification 50 000.

brane outside the cell surface membrane, is also a characteristic of the epithelium of the proximal convoluted tubule of the kidney (12, 15). Comparing these epithelia from a functional point of view one finds that they are similar to a certain extent.

The mode of action of Diamox has not yet been fully elucidated, but it is reasonable to assume that its inhibition of carbonic anhydrase will interfere with the formation of aqueous humour. Tonographic studies (3) have also shown that the inflow of aqueous humour into the eye is inhibited with about 60 %.

Are the changes seen in the ciliary epithelium in fact due to the effect of Diamox and are these changes responsible for the inhibition of the secretion? After nephrectomy the diuretic effect of Diamox is absent. The use of a control substance (Diazil), which is physically and chemically similar to Diamox but is lacking any effect on the intraocular tension, other secondary effects can be excluded. Therefore it seems highly probable that the changes seen actually are due to the inhibitory effect of Diamox on the secretion.

As far as I know, no functional changes in the Golgi apparatus have been observed earlier by means of electron microscopy. It is beyond all doubt that there is a marked alteration in the Golgi apparatus

of the ciliary epithelium concerning both the amount of vesicles and the arrangement of the membranes. The interpretation of these changes is somewhat difficult at this stage of the investigation, but they may indicate that the Golgi apparatus really takes part in the secretion according to the hypothesis presented in light microscopic investigations.

The fact that in the earlier stages of Diamox inhibition a high amount of small vesicles accumulates in the cytoplasm of the cells can be explained by a sudden blockage of the outflow of aqueous humor from the cell surface to the posterior chamber and its accumulation in vesicles. From these arguments it follows that the changes in the cytoplasm seen after Diamox injection may be secondary to the inhibition of the secretion.

REFERENCES

1. BĀRĀNY, E., *Acta Phys. Scand.* **13**, 55 (1947).
2. — *ibid.* **13**, 81 (1947).
3. BECKER, B., *Amer. J. Ophth.* **27**, 599 (1955).
4. DAVSON *et al.*, *J. Physiol.* **108**, 203 (1949).
5. DUKE-ELDER, S. and DAVSON, H., *B. J. Ophth.* **33**, 452 (1949).
6. FRIEDENSWALD, J., *Arch. of Ophth.* **210**, 761 (1938).
7. — *B. J. Ophth.* **28**, 503 (1944).

8. — *Amer. J. Opth.* **32**, 9 (1949).
 9. — *ibid.* **39**, 59 (1955).
 10. KINSEY, V. E. and BÁRÁNY, E., *Amer. J. Opth.* **32**, 189 (1949).
 11. PALM, E., *Acta Opth.* **24**, 189 (1946).
 12. RHODIN, J., Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney. Stockholm, 1954.
 13. ROSS, E., *J. Phys.* **114**, 229 (1951).
 14. SJÖSTRAND, F. S. and HANZON, V., *Exptl. Cell Research* **7**, 415 (1954).
 15. SJÖSTRAND, F. S. and RHODIN, J., *Exptl. Cell Research* **4**, 426 (1953).

L'appareil de Golgi des Protozoaires et son ultra-structure comparée à celle des Métazoaires

P.-P. GRASSÉ

Laboratoire de Microscopie Electronique appliquée à la Biologie,
 105 Boulevard Raspail, Paris

L'APPAREIL de Golgi des Protozoaires a été l'objet de recherches approfondies mais des incertitudes quant à sa structure et à ses homologues, ont persisté jusqu'à l'époque, toute récente, où le microscope électronique a permis de reconnaître la constance structurale de cet organite.

Dès 1925, Duboscq et Grassé ont affirmé que l'appareil parabasal des Flagellés (organite découvert par Janicki en 1911) est l'homologue de l'idiozome des éléments germinaux mâles des Métazoaires. Dans diverses publications, cette interprétation fut soumise au contrôle des faits (2, 3, 4). C'est au dictyosome, constituant normal de l'appareil de Golgi que Duboscq et Grassé ont finalement assimilé l'appareil parabasal des Flagellés (Zooflagellés, Choanoflagellés, Euglènes, Cryptomonadines, etc.) et les corps osmiroréducteurs de certains Rhizopodes (*Entamoeba*) et Sporozoaires (Grégarines et Coccidies).

Dans une note récente (5), j'ai eu l'occasion de montrer par la microscopie électronique la quasi-identité structurale de l'appareil de Golgi des Zoo-flagellés et des Métazoaires. L'objet de la présente communication est de préciser cette identité et d'en montrer la constance.

Quelle que soit l'espèce de Zooflagellés à laquelle on s'adresse, les résultats sont les mêmes : l'appareil parabasal qu'il soit simple (*Trinitus*, *Foaina*) ou complexe (*Joenia*) ou multiple (*Trichonympha*, *Spirotrichonympha*) a la même structure fondamentale. Il se compose d'un nombre, variable selon les espèces, de *sacculus* très aplatis, empilés les uns sur les autres (14 chez *Trinitus*, une trentaine chez *Joenia annectens*). Les saccules ont une paroi fortement osmiophile et un contenu qui l'est très peu. Leurs bords sont généralement gonflés. Tout autour de la pile de saccules s'observe un essaim de vésicules de taille régulière (100 m μ env.) à paroi osmio-

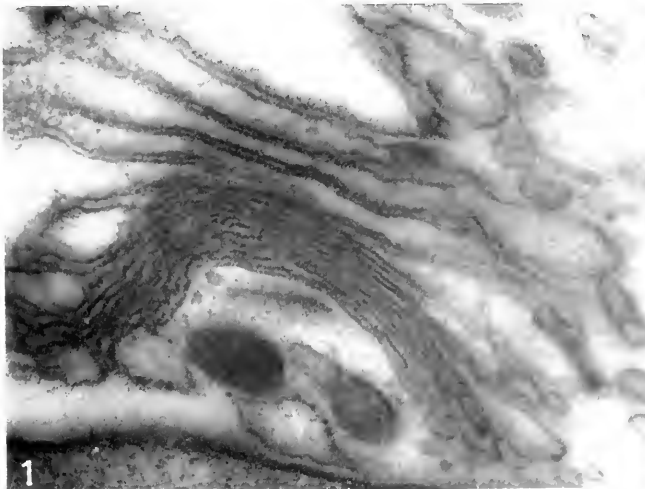


Fig. 1. *Foaina grassii*, parabasal dont certains saccules ont les bords fortement gonflés. Grandissement direct 20.000; photographique 42.000.

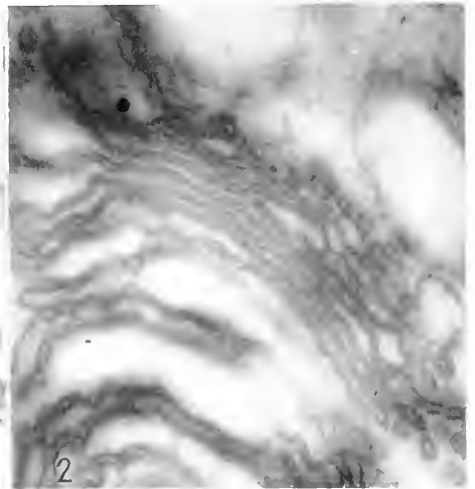


Fig. 2. Dictyosome d'un ovocyte d'*Helix pomatia* montrant l'analogie de structure avec le parabasal de *Foaina*. Grandissement direct 17.300; photographique 37.000.

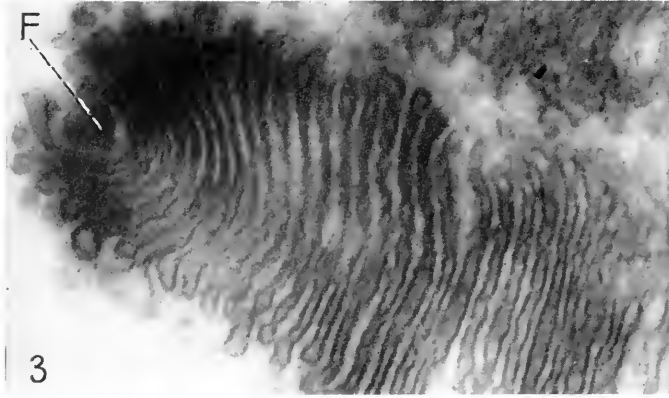


Fig. 3. « Parabasale » de *Joenia annectens*; Remarquer la coupe transversale (noire et compacte) du filament parabasale F. Grandissement direct 20.000; photographique 54.000.

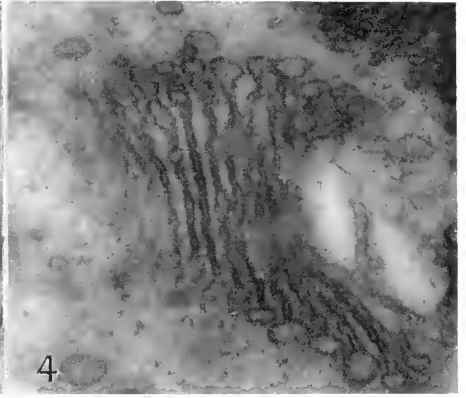


Fig. 4. Dictyosome ou parabasale de *Trichonympha agilis* (symbiote de *Reticulitermes lucifugus*), montrant la production par perlage latéral, des vésicules osmiophiles, et de la substance chromophobe par « vésiculation » totale des saccules distaux. Grandissement direct 20.000; photographique 43.000. Microscope électronique RCA EMU 3A.

phile (moins que celle des saccules) et à contenu grisâtre, ce sont les *vésicules osmiophiles* (fig. 1–2).

Dans les espèces où un filament particulier (filament parabasale lequel est engendré par le centrosome) relie l'organite au centrosome, les saccules s'orientent par rapport à celui-ci de telle sorte que le filament s'appuie sur le saccule supérieur de la pile, lequel saccule est plus ou moins creusé en une gouttière qui reçoit le filament (fig. 4). Aucune autre liaison n'a été observée entre les saccules et le filament.

De toute évidence, les saccules forment la substance chromophile de l'appareil parabasale; nous ne pensons pas que les vésicules osmiophiles étant donné leur petitesse soient visibles en microscopie optique, sauf lorsqu'elles sont extrêmement abondantes, ce qui arrive.

Quant à la substance chromophobe, si nette chez les Protozoaires, il n'est pas possible de la reconnaître dans tous les cas; nous croyons pouvoir affirmer qu'elle n'est pas un constituant constant et fondamental de l'appareil de Golgi. L'examen d'un nombre élevé de préparations conduit à l'interprétation que voici : Les saccules osmiophiles les plus distaux, c'est à dire ceux qui, conventionnellement sont le plus éloignés du filament parabasale, se gonflent, tandis que leurs contours perdent toute netteté; ils deviennent une grande vésicule claire (fig. 3), laquelle nous paraît exactement correspondre au liseré ou à la gouttelette chromophobe montré, sous le microscope optique, par le dictyosome, après son imprégnation osmique. Cette « sécrétion » ne nous a pas paru être constante, ce qui explique l'absence de substance chromophobe dans certains dictyosomes vus au microscope optique.

Dans quelques préparations, concernant surtout des *Foaina*, on observe des vésicules non distales, mais à position intercalaire, dont la région marginale est extrêmement gonflée en bulle claire qui, libérée se confond, peut-être, avec de la substance chromophobe (fig. 1).

L'identité de structure de l'appareil parabasale et des dictyosomes de Métazoaires, paraît totale : mêmes lamelles osmiophiles plates et empilées les unes sur les autres, même mode de production de vésicules osmiophiles.

Les différences tiennent 1° au rapport de contiguïté de certains parabasaux avec un dérivé centrosomien, le filament parabasale, mais les dictyosomes eux-mêmes, sont très souvent attirés par le centrosome; 2° à la production de substance chromophobe, surtout par la vésiculation totale des saccules distaux, laquelle n'a pu être vue en toute certitude dans les dictyosomes¹.

La ressemblance va si loin que, dans un lot de photographies où parabasaux et dictyosomes sont mélangés, le biologiste non prévenu n'évite pas les confusions.

L'appareil de Golgi, qu'il appartienne à un Protozoaire ou à un Métazoaire, présente les mêmes caractéristiques, à savoir :

- 1° une pile de saccules osmiophiles.
- 2° un nuage de vésicules osmiophiles, incontestablement issues des saccules.

La substance chromophobe de tous dérive probablement de la vésiculation totale de certains saccules, mais nous n'en avons la preuve que pour les Protozoaires.

Au total, l'appareil de Golgi—aussi bien chez les Métazoaires que chez les Protozoaires—est un constituant cytoplasmique caractérisé par sa structure et par son activité sécrétoire (vésicules osmiophiles,

¹ Sur un appareil de Golgi aussi puissamment sécréteur que celui des glandes multifides de l'*Helix pomatia*, il ne nous a pas été possible de suivre la transformation des saccules en produit de sécrétion (substance chromophobe), lequel se voit fort bien après imprégnation osmique sous le microscope optique.

substance chromophobe), tout à fait distinct du chondriome et du « vacuome ».

La question reste posée de savoir si l'appareil de Golgi, organite constant de la cellule des Métazoaires, existe chez tous les Protozoaires. Nous inclinons à penser qu'il n'est pas présent chez tous; nous n'avons pu le découvrir chez des Flagellés tels que les Oxymonadidae. Mais l'emploi systématique du microscope électronique le révélera peut-être dans des organismes où il avait échappé au microscope optique, tel est le cas des Infusoires ciliés, où une de nos élèves, Madame Noirot, vient de le découvrir

chez un *Entodinium* (Infusoire Ophryoscolecidae) (observation inédite), avec la même structure qu'un parabasal, mais relativement plus petit.

BIBLIOGRAPHIE

1. DUBOSCO, O. et GRASSI, P.-P., *Compt. rend. acad. sci.*, Paris, **180**, 477 (1925).
2. — *Arch. zool. exptl. et gén.* **73**, 381 (1933).
3. GRASSI, P.-P., *Compt. rend. soc. biol.*, Paris **93**, 1097 (1925).
4. — *Arch. zool. exptl. et gén.* **65**, 345 (1926).
5. — *Compt. rend. acad. sci.*, Paris, **242**, 858 (1955).
6. GRASSI, P.-P. et CARASSO, N., *Nature* **179**, 31 (1956).
7. JANICKI, C., *Biol. Zentr.* **31**, 321 (1911).

The Morphology of the Golgi Apparatus in Neurones and Epithelial Cells of the Common Limpet *Patella vulgata*

D. LACY

Department of Zoology and Comparative Anatomy, St. Bartholomew's Medical College, London

WIDELY different views are held about the morphology of the Golgi apparatus in cells of molluscs (2, 11, 8). The following is a summary of work carried out to determine the morphology of the Golgi apparatus in neurones and epithelial cells of the common limpet, *Patella vulgata*. The neurones studied were from the pedal, pleural and visceral ganglia. The epithelial tissue lies adjacent to the ganglia.

As revealed by Kolatchev's method (5) the Golgi apparatus in neurones of the limpet consists basically of a system of black filaments. In most cells the filaments anastomose to form *networks* of various complexity (fig. 1). In relatively few cells they remain discrete. Associated with some of the networks and some of the discrete filaments is a weakly osmiophilic substance. In small cells (about 5μ in diameter) the networks are confined to a small region

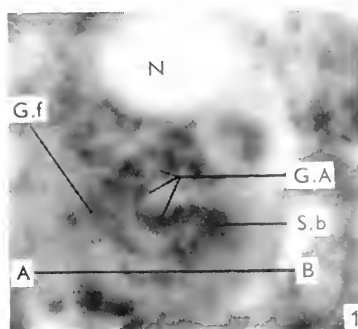


Fig. 1. Photomicrograph of a neurone treated according to Kolatchev's technique. Magnification 1700.

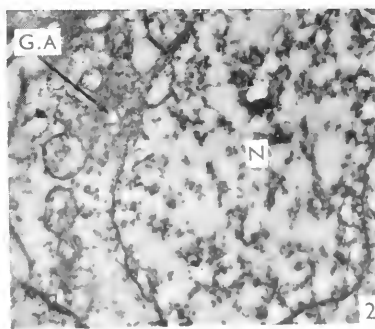


Fig. 2. Electron micrograph of a very small and possibly young neurone about 5μ in diameter. The Golgi apparatus is a small compact inclusion lying next to the nucleus. This may be a primitive or embryonic condition. Magnification 11,000.

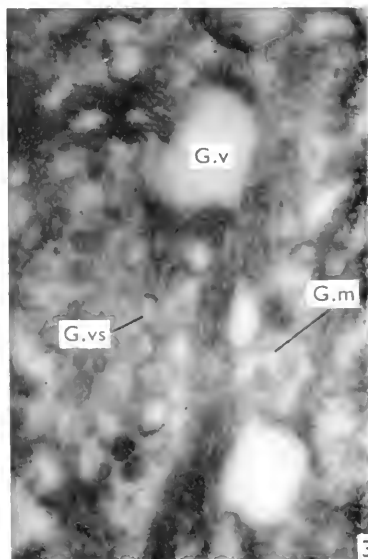


Fig. 3. Electron micrograph showing the fine structure of a Golgi filament in a neurone. Magnification 45,000.

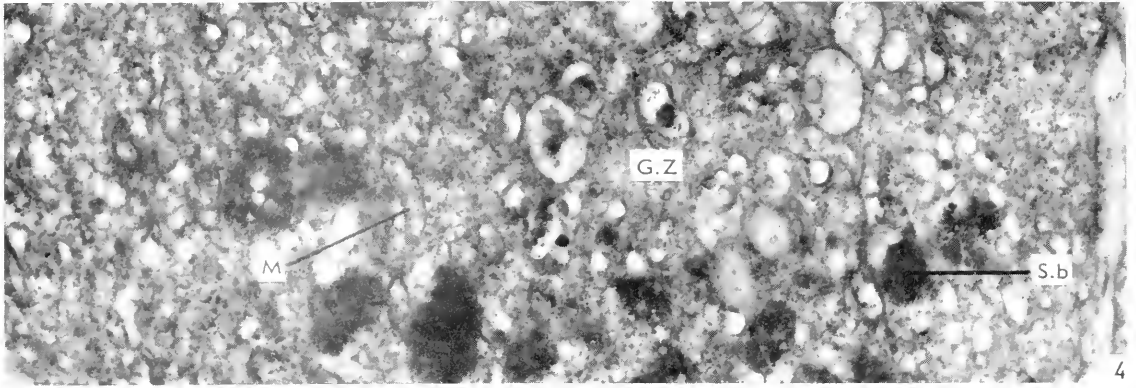


Fig. 4. Electron micrograph of a small part of the highly differentiated Golgi zone of a neurone. The line A-B in fig. 1 passes through a similar region. Magnification 21,000.

of the cell body lying next to the nucleus. In larger neurones they extend from the nucleus (which is excentrically placed) into much of the cell body.

Additional details of the structure of the Golgi filaments are revealed when cells are treated by Kolatchev's method and examined by electron microscopy. The Golgi apparatus is found to consist of chromophilic and chromophobic components as in vertebrate cells (3, 6).

Examination of neurones fixed in buffered osmic acid (7) shows that the Golgi filaments are located in a highly differentiated zone of the cell body (fig. 4). The filaments consist of paired anastomosing membranes which enclose two substances; a dense material lying within narrow folds of the membranes, and an osmiophobic substance lying within small dilations of the membranes (fig. 3). Lying next to the filaments and scattered about much of the differentiated zone are numerous small (Golgi) vesicles. Some discrete Golgi vacuoles are also present.

Comparison of material treated by Kolatchev's method with that fixed in buffered osmic acid shows that the chromophilic component of the Golgi apparatus corresponds to the membranes together with the dense substance they enclose. The chromophobic component of the Golgi apparatus corresponds to the osmiophobic substance lying within dilations of the membrane. Finally the weakly osmiophilic substance (seen in Kolatchev's preparations examined by light microscopy) arises from the impregnation of the Golgi vesicles. The weakly osmiophilic substance is probably the "archoplasm" of previous workers (2).

Filaments are not seen in very small neurones fixed in buffered osmic acid. However, these cells contain a compact organelle, lying close to the nucleus, with an ultra-structure similar to that described for the filaments (fig. 2).

Kolatchev's method also reveals certain spheroidal bodies. These are light to dark brown in colour and

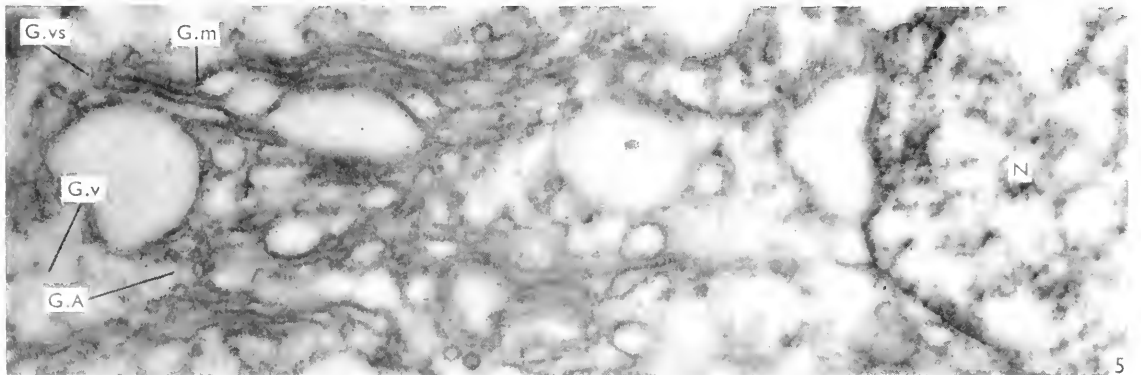


Fig. 5. Electron micrograph showing the Golgi apparatus in an epithelial cell. The apparatus is more compact than in neurones but has the same basic ultra-structure (compare with fig. 3). Magnification 41,000.

Figs. 2-5 are micrographs of tissue fixed in buffered osmic acid, pH 7.4.

G.A.	Golgi apparatus	G.v.s	Golgi vesicles
G.F.	Golgi filament	G.Z	Golgi zone
G.m.	Golgi membrane	M	Mitochondrion
G.v.	Golgi "vacuole" (osmiophobic substance lying within a dilation of the folded Golgi membrane)	N	Nucleus
		S.b	Spheroidal body ("lipochondrion")

are located around the Golgi zone. They are revealed by Baker's Sudan black method (1) and correspond to the "lipochondria" of some workers (8).

Epithelial cells contain an organelle, lying to one side of the nucleus, with an ultra-structure similar to that described for neurones (fig. 5). This organelle is identified as the Golgi apparatus.

When the above results are considered alongside previous work (4, 3, 6, 9, 10) it would appear that the Golgi apparatus is a distinct type of organelle, morphologically well defined, which exists in the cells of animals belonging to such diverse classes as mammals and gastropods. In all probability, therefore, it is a universal constituent of animal cells.

I am greatly indebted to Dr. V. E. Cosslett for the use of the Siemens Elmiskop I at the Cavendish Laboratory, Cambridge, and to Mr. R. Horne of that Laboratory for his most skillful assistance in the examination of specimens.

Basophilic Structures in the Cytoplasm of the Sea Urchin Egg

B. A. AFZELIUS

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, and the Wenner-Gren Institute for Experimental Biology, Stockholm

THE sea urchin egg is an ideal subject for a study of the microscopic and submicroscopic organization of the nucleic acids. The nucleic acid content in the egg is high, giving the cytoplasm an intense basophilia, especially in the young oocyte (4). The viscosity of the egg cytoplasm is low, permitting a rather complete stratifying of the cell components within the intact egg by centrifugal methods (9, 10), and thus furnishing a means of comparing the submicroscopic appearance of cytoplasmic fractions with their light microscopic staining properties.

This paper is a preliminary report of an electron microscopical study of some of the nucleic-acid-containing structures in the sea urchin egg. Eggs of the species *Echinus esculentus*, *Psannechinus miliaris*, and *Strongylocentrotus droebachiensis* were used.

The microscopically detectable basophilic elements were investigated in fixed material by the Feulgen technique, methyl green-pyronin staining controlled by ribonuclease-treated sections (5), galloyanin-chromalun staining (7) and other techniques considered to be less specific for nucleic acids. The fixation fluid used for most of the experiments was Carnoy's fluid, as no loss of the nucleic acids occurs following this fixation (17). However, since cytoplasmic fixation in Carnoy's fluid was rather poor, comparison tests were performed on material fixed in osmium tetroxide, formaldehyde, Regaud's fluid, or Bouin's fluid. Also eggs that were vitally stained with toluidine blue were studied in the living condition and in sectioned material fixed according to the method of Izquierdo (14). The electron microscopical part of the work was performed with the sectioning technique

REFERENCES

1. BAKER, J. R., *Quart. J. Microscop. Sci.* **85**, 1 (1949).
2. BRAMBILLI, F. W. R. and GATENBY, J. B., *Proc. Roy. Soc. Dublin* **17**, 275 (1923).
3. DALTON, A. J. and FELIX, M. D., *Am. J. Anat.* **94**, 171 (1954).
4. GATENBY, J. B., *J. Roy. Microscop. Soc.* **74**, 134 (1954).
5. GATENBY, J. B. and BEAMS, H. W., *The Microtomists' Vade Mecum*, Churchill, London, 1950.
6. LACY, D. and CHALLICE, C. E., *In Mitochondria and other Cell Inclusions*, S.E.B. Symposium, Oxford, 1955.
7. PALADI, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
8. ROQUI, A. L., *J. Roy. Microscop. Soc.* **74**, 188 (1954).
9. SJÖSTRAND, F. S. and HANZON, V., *Exptl. Cell Research* **7**, 415 (1954).
10. ———, *Experientia*, **10**, 367 (1954).
11. THOMAS, O. L., *Quart. J. Microscop. Sci.* **88**, 445 (1947).

according to Sjöstrand (19) after fixation in 1 per cent osmium tetroxide in sea water (2). An RCA EMU 2c electron microscope was used.

Light microscopical observations.—Feulgen staining gave a negative result with regard to both the pronucleus of the egg and the different strata of the centrifuged egg. Similarly, there were no detectable methyl green staining of sea urchin eggs with the methyl green-pyronin technique.

Staining methods for ribonucleic acid (RNA) localization on the other hand indicated the presence of appreciable amounts of RNA in the egg cytoplasm. When centrifuged eggs were studied, the cortex (which is not affected by centrifugation) and the layers of clear cytoplasm and mitochondria were found to contain the bulk of the ribonucleic acids. Also, in the bottom of the mitochondrial zone, which in the eggs examined was the heaviest one, there were particles with a size ranging from 0.8 to 3 μ , which stained readily with the RNA-specific stains. Other particles of similar size and staining characteristics did not move to the centrifugal pole of the eggs but remained apparently attached to the outer surface of the nuclear membrane. Similar results were obtained by vital staining with toluidine blue. The clear layer, the layer of heavy bodies at the bottom of the egg and the bodies attached to the nuclear membrane all stained intensely, the two layers being sharply delimited. However, the mito-

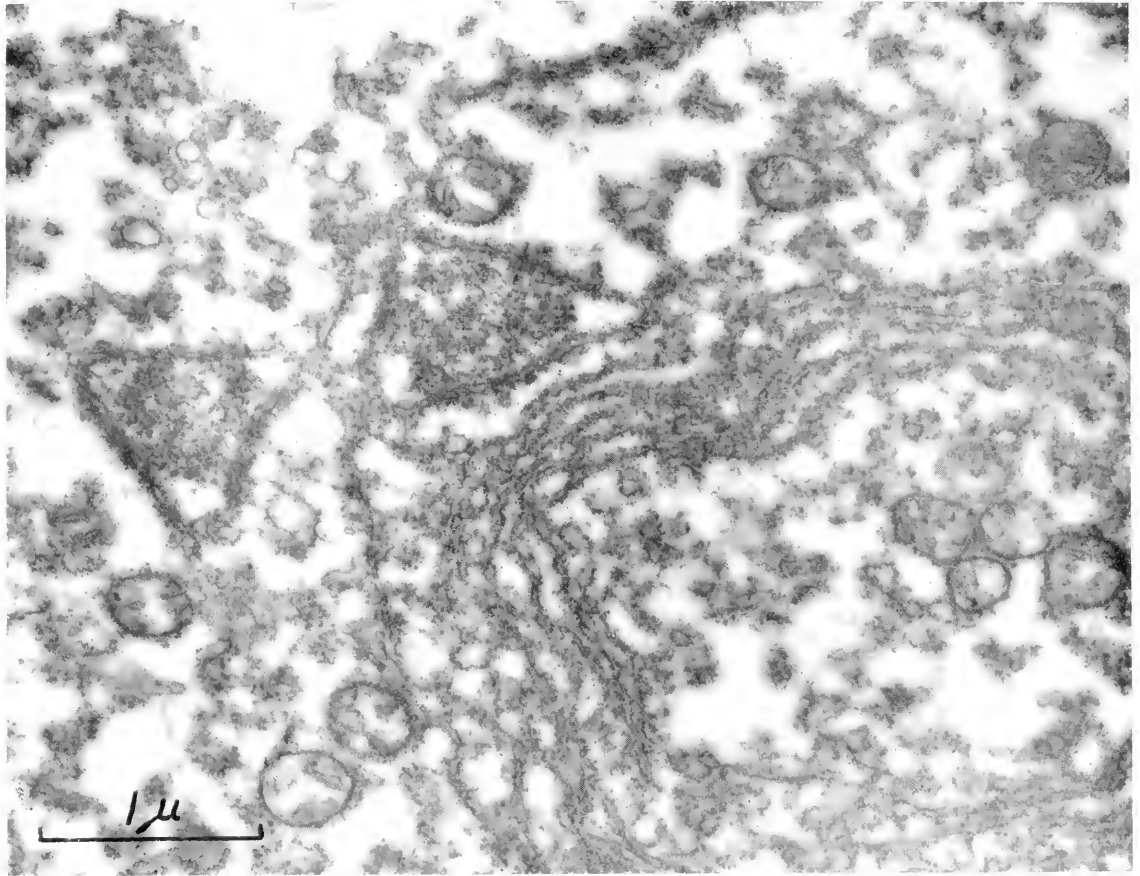


Fig. 1. The two RNA-containing bodies of microscopic dimensions in the egg cytoplasm can be compared in this picture. A portion of a "yolk nucleus" with α -cyotomembranes enclosing a few mitochondria is seen at the right and two triangular heavy bodies to the left of this inclusion. The picture is from the sea urchin species *Strongylocentrotus droebachiensis*. Magnification 30,000.

chondria were not or very faintly stained by this technique.

Another cell component that stained with the RNA-specific stains was found occasionally in some oocytes of Swedish sea urchins and regularly in the oocytes of the species *Strongylocentrotus droebachiensis*. This particle can be described as an elliptical body consisting of concentric membranes which often enclose a particle resembling a yolk granule or a few mitochondria. The total diameter is 5μ or less. When centrifuged, these bodies go to the clear layer. They are sometimes called "yolk nuclei", which is not a particularly happy name as this term has been used for different structures in different oocyte types and as they have probably nothing to do with yolk synthesis.

Electron microscopical observations.—Two of the RNA-containing structures described above were recognized with certainty in the electron microscope on ultra-thin sections; the "yolk nuclei" of the oocytes and the heavy bodies of the mature egg.

In the "yolk nucleus", whose membranous structure is vaguely discernible with the light microscope, the individual membranes were seen to have a

thickness of 60 \AA and to be associated with granules approximately 150 \AA in diameter. The membranes, like those of the exocrine pancreatic cells (20) were apparently arranged in pairs, with the granules located on their outer surfaces. The yolk granules and mitochondria that were typically enclosed by these membranes exhibited no peculiarities in their fine structure.

Turning to the mature egg the heavy bodies were examined in sections from the centrifugal pole of a stratified egg. Each heavy body was seen to be a dense aggregation of tiny granules (approximately 150 \AA) surrounded by a membrane of exactly the same appearance as the nuclear membrane. The shape of the heavy bodies as seen in sections was variable; the type most often observed possessed a regularly triangular outline, but bodies of a lentiform outline were also common, and some, especially the larger ones, appeared polygonal or rounded. The membranes did not seem to enclose the granular mass completely, but left small gaps at the angles. Occasionally particles of the same appearance have been found on the nucleocytoplasmic border in mature eggs or in oocytes. They were enclosed by a

nuclear membrane on both sides or were situated within outpouchings of the nuclear membrane.

The RNA-containing clear cytoplasm contained so many different structures that it was impossible to ascertain exactly what structure or structures were responsible for the basophilic staining. There seemed to be no particular structure that was confined to this layer upon centrifugation. Many cell components, however, were concentrated to this zone, among them the small dense granules with an approximate diameter of 150 Å (which normally were more or less uniformly dispersed throughout the cytoplasm of the egg), and vesicles and membranous systems, some of which were dotted with small granules on their outer surfaces.

Discussion.—Quantitative biochemistry has provided data concerning the nucleic acid content of the sea urchin eggs. Perhaps the most remarkable result from such studies is the demonstration that the DNA-content in the egg is approximately 25 times higher than that of the spermatozoon (8, 13). This is interpreted to mean that there may exist a cytoplasmic DNA-store in the egg cell (13, 21; see, however, 8). The RNA content of the egg is approximately 30 times as great as that of the DNA (3, 18).

Cytochemical localization of the two nucleic acids has been performed on living eggs by ultra-violet absorption at the wavelength 2537 Å by Harvey and Lavin (11, 12). There is good agreement between these absorption pictures and pictures obtained by cytochemical staining for nucleic acids. The centrifugal pole could not be investigated by the method of Harvey and Lavin because the *Arbacia* egg contains pigment that moves to the centrifugal pole and absorbs ultra-violet light as well as visible and infra-red. The nucleus of the mature egg is Feulgen-negative (see (15), and for a differing opinion (6)), and showed no detectable absorption in ultra-violet light.

In the present investigation the RNA has been localized not only in the clear zone of the stratified egg but also in particles in the centrifugal pole. There are some reasons indicating that these heavy particles are derived from the nucleus. They are occasionally seen within bleb-like outpouchings of the nuclear membrane, and in the cytoplasm they are surrounded by a membrane that very closely resembles the nuclear membrane. Like the nucleolus they exhibit very great density on centrifugation. It is suggested that either fragments from the nucleolus or else other RNA-containing entities within the nucleus are expelled through the nuclear membrane together with portions of the membrane that act as envelopes. It has been shown in an earlier paper that fragments of the nuclear membrane may exist

free in the egg cytoplasm (1); they are then often arranged in groups of three to ten membranes approximately parallel to each other.

Three important basophilic entities have been recognized in the cytoplasm of the sea urchin egg; heavy bodies, "yolk nuclei", and the RNA-containing component of the clear cytoplasmic layer of the stratified egg. It is a notable feature that all three entities contain a large number of granules about 150 Å in diameter. There is thus nothing that speaks against the assumption that the 150 Å granules are responsible for the basophilic staining. Palade (16) demonstrated a good correlation between cytoplasmic basophilia and "a small particulate component of the cytoplasm" consisting of dense granules of a diameter ranging between 80 and 300 Å (normally 100 to 150 Å). In the sea urchin egg most of the dense particles appear free in the cytoplasm, and only in the "yolk nuclei" are they arranged on membranes in a way characteristic of many vertebrate tissue cells, to form α -cytomembranes according to the terminology of Sjöstrand (19).

The author wishes to thank Dr. G. Gustafson, Kristineberg Zoological Station, and Bestyrer D. Rustad, Trondheims Biological Station, for help and supply of material; Dr. F. Sjöstrand, Associate Professor of the Department of Anatomy, for placing the resources of his laboratory at the author's disposal; and Professor J. Runnström, the Wenner-Gren Institute, for his unflinching support and interest. Financial support from the Swedish Natural Science Research Council is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. AFZELIUS, B. A., *Exptl. Cell Research* **8**, 147 (1955).
2. — *ibid.* **10**, 257 (1956).
3. AGRELL, L., *Compt. rend. soc. biol.* **144**, 1322 (1955).
4. BRACHET, J., *Embryologie chimique*, Paris, 1947.
5. — *Quart. J. Microscop. Sci.* **94**, 1 (1953).
6. BURGOS, M. H., *Exptl. Cell Research* **9**, 360 (1955).
7. EINARSON, L., *Exptl. Cell Research* **1**, 359 (1949).
8. ELSON, D. and CHARGAFF, F., *Experientia* **8**, 143 (1952).
9. HARVEY, E. B., *Biol. Bull.* **81**, 114 (1941).
10. — *The American Arbacia and other Sea Urchins*, Princeton, 1956.
11. HARVEY, E. B. and LAVIN, G. I., *Biol. Bull.* **86**, 163 (1944).
12. — *Exptl. Cell Research* **2**, 393 (1951).
13. HOFF-JØRGENSEN, E., in KITCHING, Recent Development in Cell Physiology. London, 1954.
14. IZQUIERDO, L., *Compt. rend. soc. biol.* **148**, 1504 (1954).
15. MARSHAK, A. and MARSHAK, C., *Exptl. Cell Research* **5**, 288 (1953).
16. PALADE, G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59 (1955).
17. SANDRITTER, W. and HARTLEIB, J., *Experientia* **11**, 313 (1955).
18. SCHMIDT, G., HECHT, L., and THANNHAUSER, S. J., *J. Gen. Physiol.* **31**, 203 (1948).
19. SJÖSTRAND, F. S., in OSTR and POLLISTER, Physical Techniques in Biological Research. New York, 1956.
20. SJÖSTRAND, F. S. and HANZON, V., *Exptl. Cell Research* **7**, 393 (1954).
21. ZEUTHEN, S., *Publ. Staz. Zool. Napoli* **23** Suppl., 47 (1951).

Functional Changes of the Free Cell Surface Membrane of the Intestinal Absorbing Cell

F. S. SJÖSTRAND and H. ZETTERQVIST

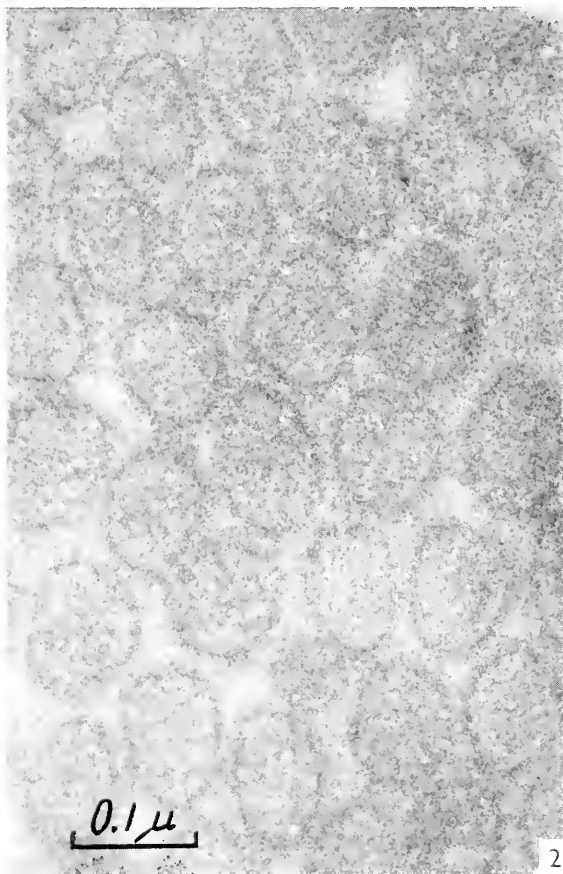
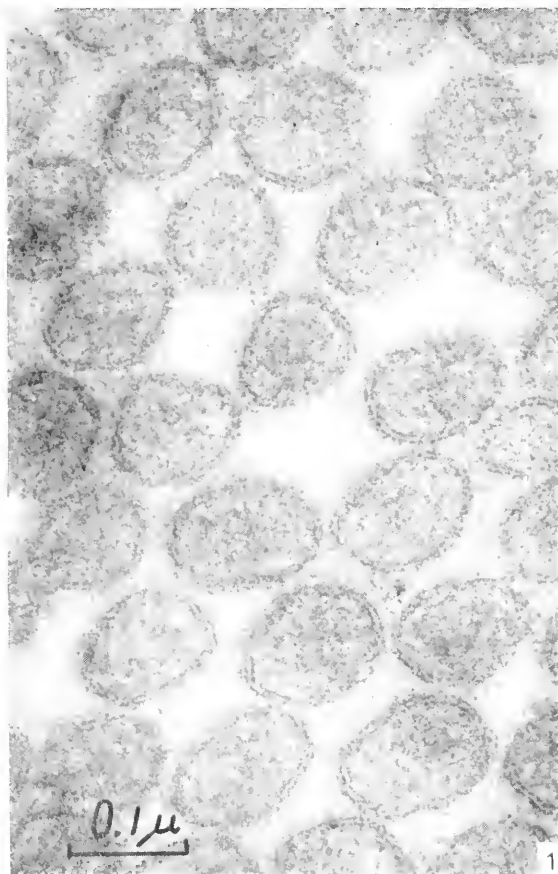
The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

EVER since it was observed, one hundred years ago, that the free border of the intestinal absorbing cell was cross-striated, the question of how absorption takes place has been eagerly discussed. Many authors have considered that the cross-striation is caused by a system of small canals through which particles with a diameter of less than 0.5 micron can pass, while others advanced the opinion that the striation depends upon rodlets or fibres extending from the cytoplasm in order to increase the absorption area of the cell. In the latter case the absorption of fat, for instance, should occur in an aqueous solution after hydrolysis.

With the development of electron microscopical techniques and methods of thin sectioning it has been shown in osmium-fixed material that the free border of the cell is built up of small finger-like extensions

of the cytoplasm (1, 2, 3, 4). At high resolution it is observed that these extensions are covered by a continuous plasma membrane without pores or interruptions either between the bases of the extensions or at their tops (4). The membrane is visualized as two opaque lines separated by a less opaque space, the total thickness of the membrane being about 100 Å (4).

The structure of this plasma membrane (fig. 1) has now been investigated at absorption of different food stuffs. The experimental animals—adult white mice weighing between 20 and 30 grams—were fed after at least 12 hours starving and 4 hours without water. In this preliminary investigation the following kinds of food were used: as carbohydrate food, crumbs of white bread; as protein, native hen egg-white; and as fat, heavy cream. The animals ate the



Figs. 1–2. Cross sections through the brush border of intestinal epithelium of mouse. *Fig. 1.* Starving animal. Magnification 150,000. *Fig. 2.* Animal fed with egg white, one hour before killing. Magnification 160,000.

carbohydrate food spontaneously while the protein and the fat was given by stomach tube. After different lengths of time, usually 1 or 2 hours, the animals are decapitated and specimens from the proximal jejunum are taken for fixation in the usual way. The results obtained are based on studies of specimens from 9 animals, 3 for each kind of foodstuff.

That absorption actually takes place can be observed on survey pictures of fat absorption where the cells are crowded with fat droplets.

In studying the plasma membrane the earlier known distinct, double-contoured structure can no longer be observed. In most places the membrane now appears as a single opaque layer with diffuse outlines the thickness of which seems to vary with the substance being absorbed. Thus, at carbohydrate absorption the membrane appears thinner than at fat absorption, while the comparatively thickest

structure is obtained at protein absorption (fig. 2), the total thickness in the last case being about 100 Å, i.e. the same as in starving animals. No more exact measurements are performed because of the diffuse outlines of the membrane.

The results obtained show that absorption from the intestinal lumen occurs through a cell membrane which appears to be able to change its structural organization under different functional states.

REFERENCES

1. DALTON, A. J., KAHLER, H., STRIEBICH, M. J., and LLOYD, B., *J. Natl. Cancer Inst.* **11**, 439 (1950).
2. GRANGER, B. and BAKER, R. F., *Anat. Record* **103**, 459 (1949).
3. — *ibid.* **107**, 423 (1950).
4. ZETTERQVIST, H., *The Ultrastructural Organization of the Columnar Absorbing Cells of the Mouse Jejunum*. Thesis. Karolinska Institutet, Stockholm, 1956.

The Hepatic Sinusoidal Endothelial Cell and Its Histological Relationships¹

H. F. PARKS

*Department of Anatomy, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, New York,
and the Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy,
Karolinska Institutet, Stockholm*

EVER since Hoffman and v. Recklinghausen (4) observed the phagocytic character of the endothelium of the hepatic sinusoid and v. Kupffer (6) identified his "Sternzellen" as potent phagocytes, this endothelium has been a subject of considerable attention. Failure of silver precipitation methods to demonstrate cell outlines has suggested that the endothelium is either syncytial or discontinuous (2). Finally, the existence of a perisinusoidal space is still being claimed (1) and denied (3) in contemporary writings. These several points of interest emphasize the need for continued electron-microscopic study of sinusoidal endothelium and its histological relations.

This report deals with the external shape of sinusoidal endothelial cells, their relation to one another and to hepatic cells, and to the physiological implications of these relationships.

The observations herein recorded were made as a companion study to an investigation of phagocytosis also reported in this volume (5). Details of tissue preparation may be found in that paper.

The endothelial lining of the sinusoid appeared in places as a single sheet of cytoplasm of variable thickness (fig. 1), the thinnest places being less than 200 Å thick. In other places it was bilaminar, pre-

sumably because of extensive overlapping of the cytoplasm of two neighbouring cells (fig. 2). A few sections were seen in which it was tri-laminar and appeared to consist of numerous overlapping sheet-like processes of cytoplasm (described below).

Shape of cells.—Hepatic sinusoidal endothelial cells of the mouse are very complicated in shape. It will be easily appreciated that no exact description of cell shape can be given because of the limitations of interpretation imposed by the thinness of sections suitable for electron microscopic study; however, certain morphological characteristics have been noted. Sinusoidal endothelial cells, at least many of them, are not typical squamous cells like those lining ordinary blood capillaries. Irregularity of shape and long cytoplasmic processes are discernible with the light microscope in ordinary histological sections. Finer cytoplasmic extensions have also been seen in this study; sheet-like and trabecular processes.

The expression "sheet-like" is intended to describe narrower extensions (1 to 3 μ wide and $\frac{1}{30}$ to $\frac{1}{4}$ μ thick) of the usual thin sheet of cytoplasm surrounding the nucleus of an endothelial cell. (It is of course possible that they are really tangential sections of the periphery of more or less rounded cells.) Such structures were seen apparently hanging free in the lumen, or beneath the main stratum of endothelial cell cytoplasm lining the sinusoid, or actually constituting the endothelial lining in places.

¹ Partially supported by a grant from the National Science Foundation, Washington, D.C., U.S.A.

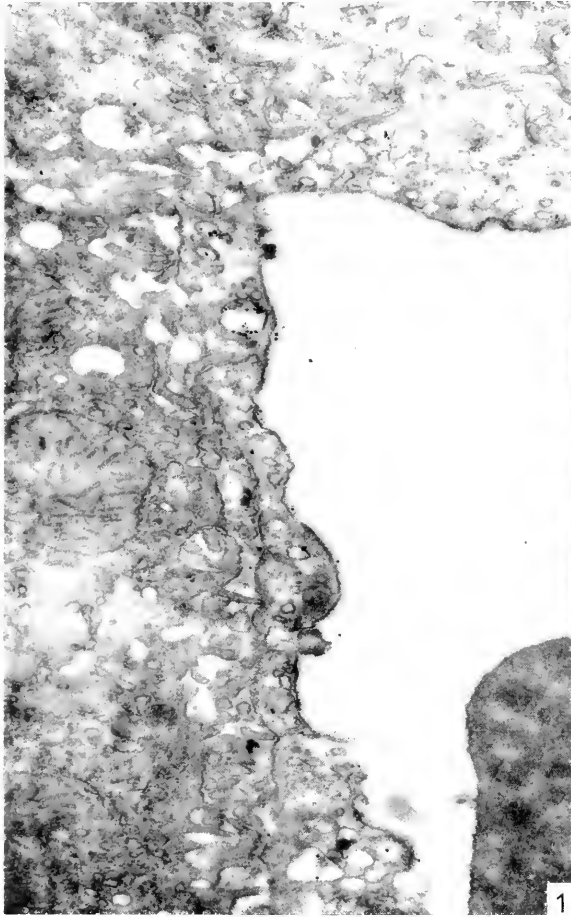


Fig. 1. Section through portion of hepatic sinusoid. Erythrocyte at bottom right. Hepatic cells at left and top. Lumen is lined by a single sheet of cytoplasm resting on hepatic-cell villi extending through perisinusoidal space. Phagocytosed gold particles are seen in membrane-enclosed vacuoles. Magnification 26,000.



Fig. 2. Section through wall of hepatic sinusoid. Erythrocyte at right. Hepatic cell on left. Endothelium is in two layers. Pseudopod-like processes seen in lumen and between endothelial laminae. Magnification 48,000.

Trabecular cytoplasmic processes were recognizable only in transverse section where they appeared irregularly round, oval, triangular, etc. Some trabeculae were situated between sheets of cytoplasm forming a bilaminar endothelial lining; others projected into the lumen as pseudopods, where some of them lay close to the sinusoidal lining, as though bent downstream by the moving blood (fig. 2). Among the trabeculae located in the lumen, some were lying in correspondingly-shaped grooves in larger masses of endothelial cell cytoplasm so that they did not bulge into the lumen, but presented one surface to it. In some instances the surface depression that lodged a trabecula was more than a groove; the lips of the "groove" were not fused together, but came into contact with one another above the trabecula, thus forming a tunnel through which the trabecula passed. Finally, many sections were seen in which a trabecula was fitted into a canal surrounded by a continuous wall of cytoplasm, the intercellular space appearing as a closed circular cleft. It will be appreciated from

this "piston-in-a-cylinder" arrangement that endothelial cells not only have elongate projections but also form internal channels into which such projections can be fitted.

Relation of endothelial cell to endothelial cell.—This relationship is easily described for those areas lined by thin sheets of cytoplasm. One process merely overlapped another, and the intercellular space apparently allowed blood plasma free access to the perisinusoidal space, as was evident from the fact that colloid particles passed between overlapping cells with ease (5).

In the vicinity of the main cell body the relationship was sometimes more complicated, and is not yet fully understood. In many cases the body of one cell merely overlapped the attenuated cytoplasmic extension of another or a thin cytoplasmic process of one cell was fitted into an appropriately shaped recess in another. In some places, however, two closely apposed (parallel) cell membranes ran a complicated, sharply-curving course strongly

suggesting the appearance of intimate interdigitation of two neighbouring cells. It is not known whether, or to what extent, this relationship exists, because it was occasionally possible to follow a cell membrane far enough to get the impression that the whole formation represented a complicated infolding of the membrane of a single cell.

One other type of intercellular relationship has been described above; that of a trabecula from one cell fitting into a tunnel in another cell.

Relation of endothelial cell to subjacent structures.

—The surface of the hepatic cell was characterized by a large number of simple and branched villous extensions (2) of variable length (usually about 0.15–0.5 μ) and about 0.025 μ in diameter. In some sections a number of villi were cut longitudinally and seen to extend all the way from the main body of the hepatic cell below to the endothelial cell above, while the spaces between villi contained numerous transversely-sectioned cytoplasmic processes (fig. 1). Most of these latter processes were considered to be hepatic-cell villi or their branches. Endothelial cells rested directly on this bed of villi: no basement membrane was seen between endothelial cell and hepatic cell.

The mechanical attachment of endothelial cell to hepatic cell appears to be effected, at least in part, by an intermingling of villus-like processes of one cell with similar processes from the other. This relationship appeared not to be important in sections through cytoplasmic extensions some distance from the endothelial cell nucleus; in fact only a few cytoplasmic villi other than those of hepatic cells were seen. However, in the vicinity of the endothelial cell nucleus, branched villi projecting into the perisinusoidal space from the endothelial cell often appeared to be very numerous. Von Kupffer (6) described and illustrated endothelial cell processes passing between two hepatic cells toward the bile canal; a single similar observation has been made in this study, and it appears that this may be an important anchoring mechanism. A special relationship between the reticular (collagenous) fibers in the perisinusoidal space and endothelial cells has not yet been observed.

An incidental observation on the surface of the hepatic cell next to the perisinusoidal space seems worthy of mention here. Small membrane-enclosed vacuoles have been seen in hepatic cells containing one or more rounded bodies about 350 Å in diameter and somewhat denser than the ground cytoplasm. In some instances these vacuoles were seen opening into the perisinusoidal space and apparently discharging their content of rounded bodies.

Cell membranes.—The plasma membranes of both the endothelial cell and hepatic cell villus have been seen to be double in places, and apparently single in others. The double-membraned condition is not restricted to the luminal surface of the endothelial cell; it has been seen on the basal side also.

This study has shown that hepatic sinusoidal endothelial cells of the mouse are most unusual in shape. Nothing has been seen that is inconsistent with the bizarre pictures published by v. Kupffer (6). The facts that there is extensive overlapping of cytoplasmic processes and in some cases trabecular processes of one cell pass through tunnels in other cells tend to reconcile the idea of continuity of endothelial lining with the irregularities of cell shape.

In the absence of a basement membrane and intercellular cement, endothelial cells appear to be anchored in place by complicated relationships of their cytoplasmic processes with other endothelial cells and with subjacent hepatic cells.

The following considerations argue that the perisinusoidal space is an anatomical entity of physiological significance: There is no basement membrane between endothelial lining and hepatic cell. There is no intercellular cement, as manifested by the fact that colloidal particles (and therefore presumably blood plasma) pass from the blood stream between endothelial cells into the space. The hepatic cell surface area is enlarged by villi even in places where the under surfaces of endothelial cytoplasmic sheets appear completely flat (the hepatic cell surface is thus apparently designed to carry on exchange of materials at a much greater rate than that of the cell interposed between it and the blood stream). Small rounded bodies are secreted by the hepatic cell into the fluid filling the perisinusoidal space.

If, as it appears from the above, blood plasma actually comes into direct contact with the hepatic cell, then the question of continuity or discontinuity of endothelial lining decreases in importance.

It is a pleasure to express thanks to Dr. F. S. Sjöstrand for the use of his laboratory facilities.

REFERENCES

1. EPPINGER, H., *Die Permeabilitäts-Pathologie als die Lehre vom Krankheitsbeginn*, p. 569. Wien, 1949.
2. FAWCETT, D., *J. Natl. Cancer Inst.* **15** (Supplement), 1475–1502 (1955).
3. FELLINGER, K., BRAUNSHNER, H., and PAKSCH, F., *Wien. Klin. Wochschr.* **65**, 738–740 (1953).
4. HOFMAN, F. and von RECKLINGHAUSEN, F., *Zentr. med. Wiss.* **5**, 481–482 (1867).
5. PARKS, H. and CHIROUIN, A. *These Proceedings*, p. 155.
6. VON KUPFFER, C., *Arch. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsmech.* **54**, 254–284 (1899).

Observations on Early Stages of Phagocytosis of Colloidal Particles by Hepatic Phagocytes of the Mouse^{1, 2}

H. F. PARKS and A. D. CHIQUOINE

Department of Anatomy, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, N.Y., and the Laboratory for Biological Ultrastructure Research Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, and Department of Biology, Princeton University, Princeton, N.J.

WHEN colloidal suspensions of gold or mercury chloride are injected intravenously in the mouse, microscopically visible inclusions of the colloidal particles very rapidly become visible in hepatic phagocytes. Optically homogeneous aggregates from $\frac{1}{2} \mu$ in diameter down to the limits of microscopic visibility are seen in animals killed as early as 15 seconds after injection. Larger spherical inclusions about 1 micron in diameter appear after about 2 minutes and are very numerous by 10 minutes following injection (1). They have been observed previously with the electron microscope and seen to be membrane-enclosed structures (3). The question of how inclusions of phagocytized colloidal particles are formed is presently being investigated, and morphological observations on hepatic phagocytes of animals killed during the first 2.5 minutes following injection are reported here.

Hepatic tissue was taken from 50 white mice weighing 15 to 20 grams. Twenty-five were killed at intervals of 15 seconds to 2.5 minutes following intravenous injection of colloidal gold or mercury chloride. The others received no experimental treatment. Small strips of liver were removed in a cold room and placed in buffered (pH 7.2) isotonic 1% osmium tetroxide solution, where they were cut into blocks one mm or less in thickness with a stainless steel razor blade. After 15 minutes to 4 hours (usually one hour) in fixative, the tissue was rinsed 10 minutes to 1 hour in Tyrode's solution, dehydrated in a graded series of alcohols, and embedded in methacrylate (10 or 20 parts methyl to 90 or 80 parts butyl). The polymerization was catalyzed by 0.4% powdered benzoyl peroxide. A considerable part of this material was discarded because of improper polymerization of methacrylate in the center of the blocks of tissue. The sections were cut on a Sjöstrand ultramicrotome and analyzed in an RCA EMU 2c electron microscope.

(1) *At 15 seconds following injection* colloidal particles were seen in several relationships to endothelial phagocytes:

Particles attached to cell surface. Some cells apparently have a "sticky" membrane that immobilizes particles coming in contact with it. These cells were seen with their surface largely covered with particles while neighboring cells showed few or no attached particles (fig. 1). Their surfaces were sometimes very irregular, characterized by numerous small pseudopod-like processes that were also covered with

particles. Adherence to a cell membrane is of course a necessary condition to phagocytosis, and the relationship here described is considered an early stage of the phagocytosis process.

Particles located in depressions of the cell membrane. Some sections were seen in which the whole luminal surface of a cell did not show an affinity for particles, but particles were found associated with semicircular (in profile) depressions of the cell membrane. The fact that particles were in relation to the depressed portion but not to other parts of the cell membrane suggests that the depression represents an invagination formed in response to the presence of particles on the membrane. A depression appearing semicircular in profile could be either a groove or a spherical invagination. The latter possibility seems likely in this case because circular profiles of membrane-enclosed groups of particles were usually seen in the cytoplasm in the vicinity of the turned-in portion of membrane; these were sections of spherical inclusions or cross-sections of spherical (or cylindrical) invaginations from the surface. This general picture suggests that some phagocytosis takes place by a localized spherical or cylindrical invagination of cell membrane that pinches off the surface membrane to form a spherical inclusion. A miniature example of this type of relationship is seen in fig. 1, B.

Particles in intracellular clefts. In some sections shallow to deep infoldings of cell membrane were seen enclosing narrow cleft-like intracellular spaces (cf. fig. 2). Some contained a large number of particles; others only a few. It cannot be stated whether such clefts pre-existed or were formed by invagination of the cell membrane in response to adherent colloidal particles.

Particles in intercellular (?) spaces. In many sections a cleft-like space between separate masses of cytoplasm was seen communicating both with the lumen of the sinusoid and the perisinusoidal space. Whether such a cleft was intra- or intercellular in a given instance could not be ascertained from a single section; it might be a cleft between two cytoplasmic processes of the same cell or between two separate cells. At any rate, particles were seen both in these clefts and in the perisinusoidal space.

(2) *At later stages of the phagocytosis process* up to 2.5 minutes, few changes of a qualitative nature were seen. Phagocytes were more conspicuous be-

¹ Partially supported by the National Science Foundation, Washington, D.C., and the Whitehall Fund.

² An earlier stage of this work was reported in an abstract in the *Anatomical Record*, V, 124 (1956 Meetings of the American Association of Anatomists).

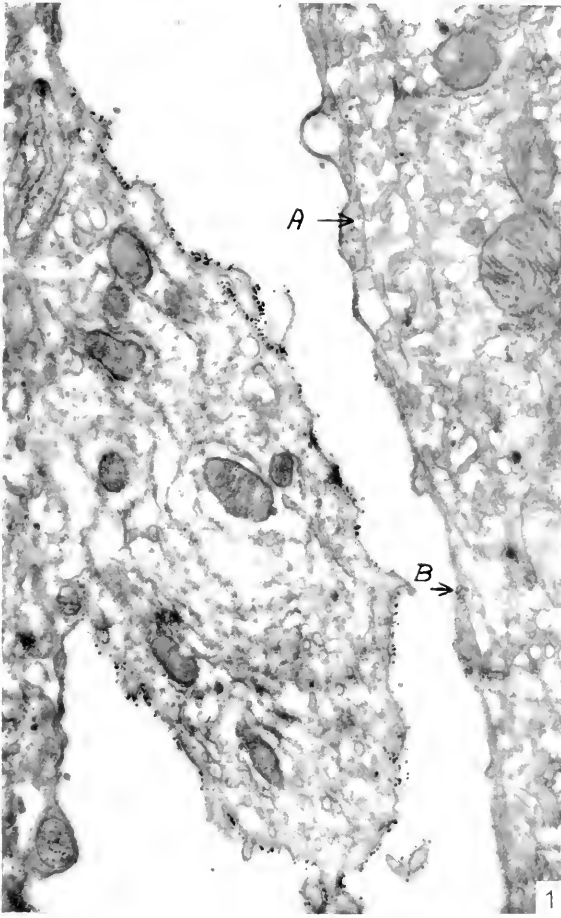


Fig. 1. Endothelial phagocyte projecting into lumen of sinusoid. Numerous gold particles are adhering to its surface 15 seconds after intravenous injection. Two pseudopods are seen in section at lower right. The endothelium on the opposite side of the lumen is not entirely devoid of phagocytic capacity: at A a particle has evidently been phagocytized, and at B two particles are apparently in process of being engulfed. Magnification 24,000.

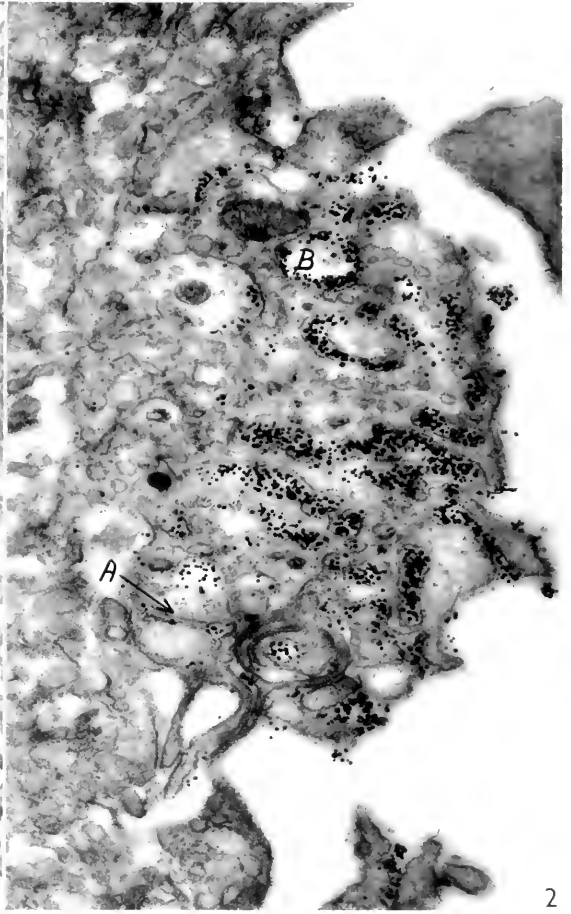


Fig. 2. Unusually potent phagocyte 2 minutes after injection of colloidal gold. Lumen on right; perisinusoidal space on left. One large branched cleft filled with gold particles is seen communicating with lumen. At A a gold-containing cleft communicates with the perisinusoidal space. At B a rounded profile probably represents a spherical, membrane-enclosed inclusion. Magnification 32,000.

cause of their greater content of particles, many of which were contained in spherical or spheroidal membrane-enclosed inclusions of various sizes. In some instances the membrane of an inclusion was seen to be double. The most remarkable observation made on this material was on certain particle-containing cleft-like spaces (these may or may not have been present in cells at 15 seconds following injection, but were not seen). These spaces ran a highly irregular, sometimes branching, sometimes exaggeratedly serpentine course, suggesting that the section was passing through an area of complicated interdigitation of two neighboring cells. However, in a few instances a strong impression was gained that the whole formation was intracellular; i.e., that the cleft represented an extremely complicated infolding of the surface membrane of a single cell. Some clefts that were obviously intracellular were seen apparently breaking up into small spheroidal inclusions,

some of which contained particles. Again, it was impossible to decide whether such clefts, if intracellular, pre-existed or formed in response to the presence of foreign particles. The small amount of particulate material (often in widely separated groups) in some clefts suggested that the clefts had not been formed in response to the presence of the particles.

It was further noted that a certain amount of phagocytosis of material in the clefts passing from lumen to perisinusoidal space had taken place, as evidenced by spheroidal inclusions of particles in the vicinity of these clefts. Also, some particles were seen in clefts on the basal side of phagocytes, suggesting that phagocytosis of material from the perisinusoidal space was taking place (fig. 2).

In a morphological description of sinusoidal endothelial cells (2) an intercellular relationship characterized by a trabecular process of one cell passing through a tunnel in another cell is described. The

narrow intercellular cleft between these two masses of cytoplasm, which appears circular or ovoid in cross section, very often contained numerous colloidal particles within 2 minutes following injection.

Since the discovery that very dilute colloidal vital dyes are segregated in highly concentrated spherical inclusions by phagocytes, there has been much speculation concerning the manner in which these inclusions are formed. It is now possible with the electron microscope to follow the progress of colloidal particles as they enter the phagocyte, and thus gain a clearer idea of the mechanism involved. Though the present study is far from complete, it indicates that particles enter the phagocyte in spheroidal and in

cleft-like depressions of the cell membrane that secondarily pinch off from the cell surface to form intracellular inclusions. The clefts, whether they pre-exist or form by invagination in response to the presence of particles, appear to represent the more important form of phagocytosis mechanism (fig. 2).

REFERENCES

1. PARKS, H., *Anat. Rec.* **125**, 1-16 (1956).
2. — These Proceedings, p. 152.
3. PARKS, H., PEACHEY, L., and CHIQUOINE, A., *Anat. Rec.* **124** (1956) (Abstracts of meetings of American Association of Anatomists).

The Role of Cell Membranes in Morphogenesis

M. S. C. BIRBECK and E. H. MERCER

Chester Beatty Research Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital, London S.W. 3

THE study of morphogenesis by electron microscopy is likely to prove a formidable undertaking. However, the labour can be lessened by the choice of an appropriate system in which there are present not only various examples of differentiated cells but, at the same time, cells in different stages of development. It is a further advantage to have the different stages distributed in the tissue in an easily recognised manner.

Systems of cells satisfying these demands are not common. One, which is admirable for the purpose, is the follicle of the growing hair of the mammalian skin. Here we find at the end of a small tube, the outer root sheath, dipping down into the skin, a germinal matrix producing a steady stream of cells which, passing along the tube, differentiates into the six concentric cylinders of cells which form the hair and its enveloping sheaths. In the distance of a few 100 μ of the tube we find cells in the following stages: dividing cells, undifferentiated cells, cells in early differentiation and differentiated cells engaged in synthesis of their characteristic products. It is thus possible in a single electron microscopic section to find examples of cells in all stages of their development arranged in a linear sequence.

Taking advantage of this situation, we have examined in hair follicles—fixed, embedded and sectioned by the now standard procedures—the events associated with early differentiation, which occur in the mid and upper regions of the bulb (see figure 1). By comparing the cells of the undifferentiated matrix with those, a few cell diameters further along the follicle which show definite signs of differentiation, we have been led to suspect that the contacts between the surfaces of the cells play a leading role in morphogenesis. (See also reviews (5) and (6).)

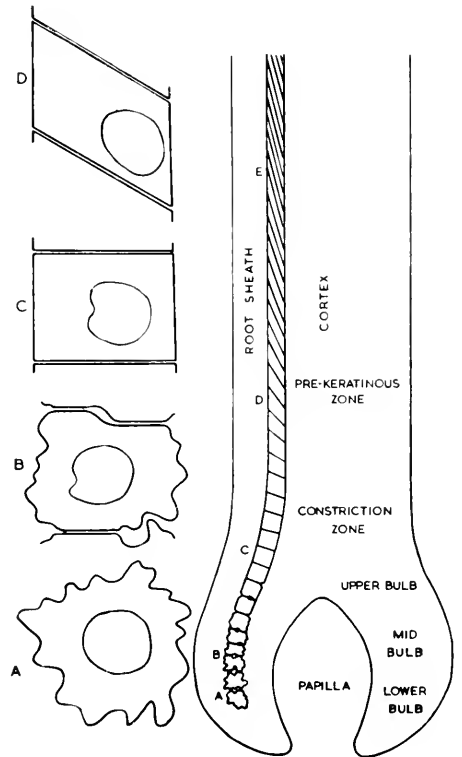


Fig. 1. Diagrammatic representation of the behaviour of cell membranes and morphogenetic developments in the hair follicle with reference to the hair cuticle. In the outline of the follicle, shown in the centre, the changes in the cuticular formation and the several zones of the follicle are indicated. On the L.H.S. is shown a series of cells (A to D) in which cell contacts are shown developing, spreading and deforming the cells.

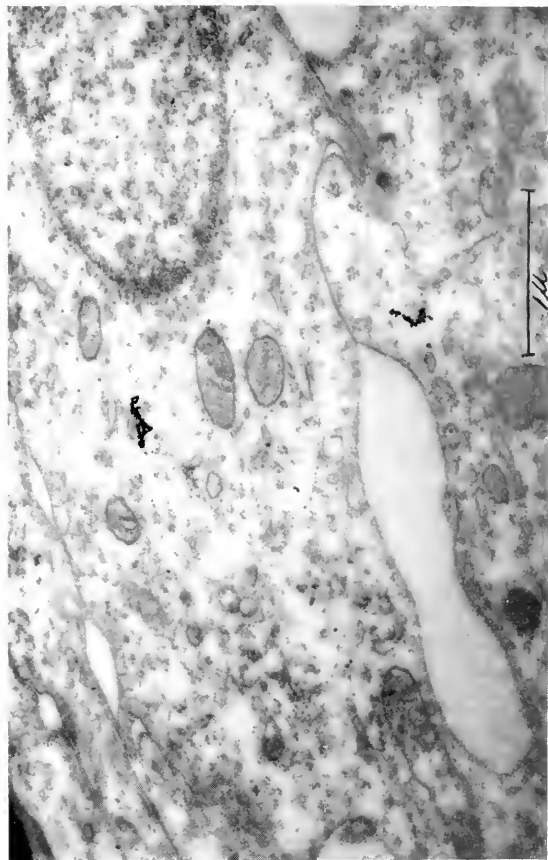


Fig. 2. Electron micrograph of the mid-bulb region of the follicle showing early cell contacts and (probably) contact spread.

The cells of the matrix contain many mitochondria, many agranular vesicles and large numbers of the dense particles thought to contain ribonucleic acid (3). There are none of the specialised intracellular inclusions which appear later at higher levels in the follicle. The surfaces of the cells are very convoluted and intercellular gaps are common. Numerous small finger shaped pseudopods project from the surfaces and often penetrate deeply into neighbouring cells. Close contact between the cells is limited to a few small areas where the two plasma membranes are parallel and separated by a distance of about 120–150 Å. We conclude therefore that the surface membranes of the undifferentiated cells are flexible and in active motion. Their adhesion is small and contact is both temporary and limited in area. The space between the membranes at these "adhesive contacts" is not by any means empty. A material of rather poor electron scattering power is observed both between the closely opposed surfaces and also spread out over the immediately adjacent surfaces. We suppose that this material is the cement responsible for the adhesion of the surfaces. Very little can be deduced concerning its chemical nature. The very slight reaction with the osmium fixative suggests that it is not protein or lipid in nature, but that it

might be polysaccharide. In view of the important role we shall assign to it in morphogenesis, it is most regrettable that more is not known.

When the cells further along the follicle are examined the importance of cell contacts becomes apparent (figure 2). The areas of contact spread and, in a zipper-like fashion, draw the cells together with the result that intercellular gaps are closed and the surface convolutions are smoothed out (figure 1). This development does not take place uniformly throughout the cell population. Contact spread occurs first in the cylinder of cells, which will become the cuticle of the hair, and follows rapidly in those cells, between the cuticle and the outer sheath, which form the three layers of the inner sheath. However, in the cortex, the central cylinder of cells, contact spread does not occur until much later; the cells remain united only locally and intercellular gaps are common.

Contact spread appears to have important morphogenetic consequences, some of which can be deduced from the appearance of the cells of the various layers in the mid and upper bulb. The cells of the cuticle assume an important place in all subsequent developments because between them adhesive contacts appear early, spread more extensively and seem to be stronger. The cuticle stands out from the surrounding cells partly because of the density of its membranes and also because of the cuboidal shape of the cells in longitudinal section. It appears that the surface adhesion between these cells is great enough to actually modify their shape. By drawing the membranes of contiguous cells together in zipper fashion (4) the mass of previously rounded cells is converted progressively into a columnar layer (figure 1), which divides the advancing stream of cells into two domains whose subsequent developments are in striking contrast. Inside the cuticular "barrier" is the cortex where the characteristic product of cell synthesis is fibrous keratin; outside we find the inner root sheath where amorphous trichohyaline is the typical product.

In the cortex contacts are localised and surface activity persists at least as high as the follicular constriction. The melanocytes, which form the pigment of the hair, are situated largely near the tip of the papilla, and appear able to take advantage of the weak adhesion between the cortical cells to extend their long pigmented processes throughout the cortical space. The absence of gaps between the cuticle cells prevents the processes penetrating the cuticle and the inner root sheath beyond. The actual incorporation of the pigment granules into the cortical cells appears to be a consequence of the continued surface activity of these cells for we can see small pseudopods enveloping the ends of the pigmented processes in a manner suggestive of phagocytosis. Occasionally bundles of granules still enclosed in membranes have been found in cortical cells (1).

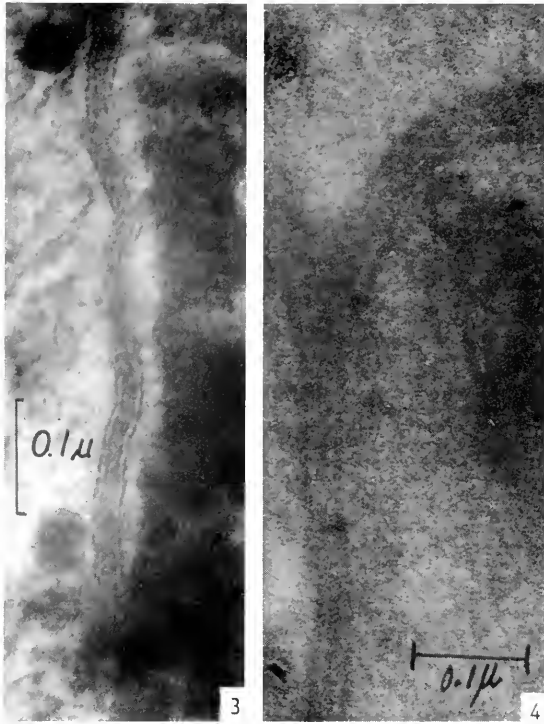


Fig. 3. Complex intercellular membranes between the cuticle cells.

Fig. 4. Complex intercellular membranes between the Henle cells (inner root sheath).

The dense, closely adhering membranes of the cuticular cylinder not only appear to form a barrier separating the domain of keratin formation (cortex) from the domain of trichohyaline formation (inner sheath), but appear also to prevent the cuticle itself from acquiring sufficient raw materials. For although synthesis is rapid in the cortex and the inner root sheath, in the cuticle itself, synthesis is delayed until above the constriction of the follicle when a form of amorphous keratin with a high cystine content appears.

A discussion of the structure of keratin and trichohyaline will be found elsewhere in this volume (2). These two proteins are responsible for the hardened and fibrous texture of the cells of the hair and sheath which develops rapidly above the follicular constriction. Simultaneously with the development of these intracellular products the intercellular structures also undergo a remarkable development. Until this level the adhesive contacts have consisted simply of the two plasma membranes and the intervening cement layer of 120–150 Å thick. As the cells of the cuticle and sheath fill with protein, the plasma membranes suddenly dilate to a distance of 300–400 Å and a series of complex layers form between them (figs. 3 and 4). The nature and function of these intercellular layers are obscure; possibly they serve to hold together the hardened cells. The dense layers (one in the sheath cells and two or three in the cuticle) may be deposits of an electron dense tanning agent in a pervading less dense cement of the type described below. In the cortex the membranes also dilate and finally become cemented together but we have not found a layered structure.

This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the British Empire Cancer Campaign, Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, the Anna Fuller Fund, and the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

The authors are particularly grateful to Mr. K. G. Moreman for supplying the illustrations.

REFERENCES

1. BIRBECK, M. S. C. and MERCER, E. H., *Exptl. Cell Research* **10**, 505 (1956).
2. — These Proceedings, p. 159.
3. PALADE, G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 567 (1955).
4. SCHMITT, F. O., *Growth* **5**, 1 (1940).
5. WADDINGTON, C. H., *Principles of Embryology*. Allen & Unwin, London, 1956.
6. WEISS, P., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **1**, 182 (1943).

Electron Microscopic, X-Ray and Birefringence Studies on the Proteins of the Hair Follicle

M. S. C. BIRBECK and E. H. MERCER

*Chester Beatty Research Institute, Institute of Cancer Research:
Royal Cancer Hospital, London, S.W. 3*

CELLS derived from the mammalian epidermis are able to synthesise a variety of materials some of which are fibrous. In the hair follicle (fig. 1), for example, two very different fibrous products appear, trichohyaline and keratin. The formation of these

substances can be followed in the polarisation and electron microscopes and to a limited extent by means of x-ray diffraction. The hair follicle therefore provides an excellent opportunity for correlating the results of the three techniques.

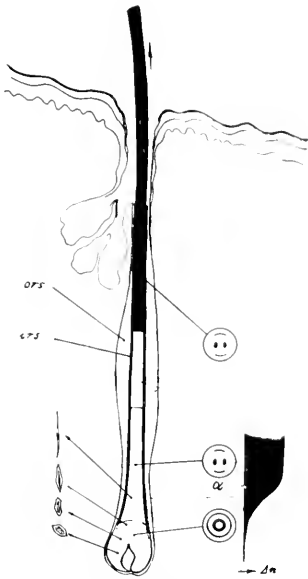


Fig. 1. Diagram of the hair follicle showing the development of the fibrous structure of the cortex. On the right-hand side is shown the rise in birefringence (Δn); in the centre the x-ray diffraction patterns at several levels are indicated in circles; on the left-hand side the changes in cell shape.

The two birefringent systems are well defined when the follicle is viewed between crossed polaroids and measurements (3) show in the cortex a continuous rise in birefringence at the level of the follicular constriction. In the Henle layer of the sheath the change from the isotropic to the birefringent state occurs in a single sudden step, suggesting a rapid transformation of the cell contents. A slower rise occurs in the Huxley layer and the sheath cuticle. The comparison of precisely the same fields in the polarising microscope and the electron microscope

has enabled the birefringence to be correlated with structure.

The inner root sheath.—This correlation is most complete in the Henle layer of the inner root sheath. By examining in the electron microscope the area in which birefringence first appears, we can see in some detail the formation of the fibrous form. The rounded, structureless, dense bodies, which appear lower down in the cytoplasm of the sheath cells and rapidly aggregate to form the large droplets recognisable in the light microscope as trichohyaline, are seen transforming into fibrils. The details of the actual transformation are shown in fig. 2. Fine filaments (about 100 Å diameter) can be seen extending in both axial directions from the lenticular shaped droplets of the amorphous form. The transformation occurs entirely intracellularly and differs from anything previously described, although the formation of fibrils from solutions of corpuscular molecules is well known. It would seem that the filaments "crystallise" out on the surface of the solid droplets and are pushed away from the surface by their continued growth. The nearest physical analogue would be the growth of single crystals from the molten state. Little is known of the chemical composition of trichohyaline to assist our speculations and the amounts present in the hair are too small to make it possible to examine it by x-ray diffraction.

In the other layers of the sheath (Huxley and sheath cuticle) a similar transformation occurs. However, it takes place more slowly and the amorphous and fibrous forms can be seen together, in the same cells, for a distance of several hundred microns above the constriction.

The cortex.—A very different course of events occurs in the cortex. Here the fibrous form appears directly in the form of fine filaments (60–80 Å in width)



Fig. 2. Electron micrograph of a portion of a Henle cell of the inner root sheath at the point of transformation of the elongated trichohyaline droplets into filaments. (Longitudinal section.) Magnification 73,000.

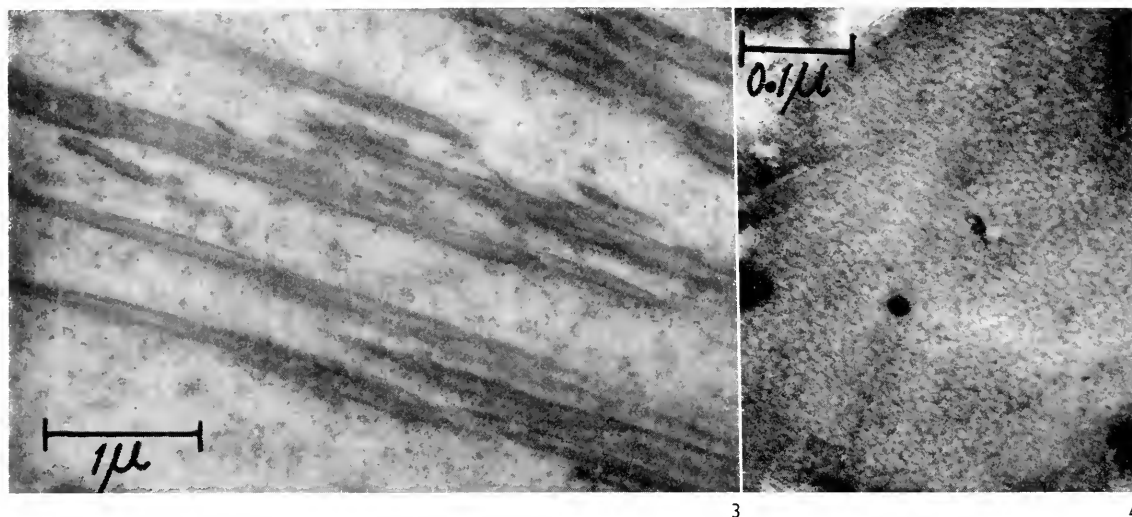


Fig. 3. Electron micrograph showing fibrils of keratin appearing in a cortical cell in the upper bulb region (longitudinal section). Magnification 20,000. Fig. 4. A cross-section at high magnification of a fibril showing the component keratin filaments (light) on a dark ground—the cystine-rich matrix. Magnification 150,000.

without any evidence of a non-fibrous precursor. Filaments can be detected electron microscopically in the bulb cells at a level below which the birefringence is strong enough to be demonstrated. Such filaments are oriented parallel to the fibre from their first appearance. These observations clearly show that the keratin is not synthesised as an amorphous precursor which is converted into a fibrous form by its passage through the narrow neck of the follicle.

In the upper bulb, where the rise in birefringence takes place, the cells rapidly fill with filaments (fig. 3) and condense to form the rather definite structures recognisable in the light microscope as fibrils (0.1 – 0.2μ in diameter). At this level there is sufficient material present to enable an x-ray diffraction photograph to be made and a typical α -type pattern results (fig. 1). There is therefore little doubt that the long fine filaments are the structures responsible for this x-ray pattern which is of such interest to crystallographers (2).

Cross-sections of the condensed fibrils (fig. 4), show that the filaments are embedded in a material which, after osmium fixation, has a greater electron scattering power than the filaments themselves, i.e. the filament sections appear light on a dark ground. The most probable interpretation is that the osmium is here acting as a specific stain for cystine (cysteine) and that the S sites are concentrated in the interfilamentous regions. Since chemical analysis of dissolved hair (1) shows the presence of a fibrous component (α) with a low S content and an amorphous component (γ) with a higher S content, we suggest that the α -component be identified with the fine filaments and the γ with the interfilamentous cement. Fibrous keratin is thus seen to be a complex

of "filaments plus matrix" rather than a single entity.

An unsolved question is the contribution to the observed birefringence of intrinsic and form factors. Attempts to determine these contributions by the standard method of immersing the hair in a series of liquids is not possible, since these invariably fail to penetrate. Liquids, which do penetrate the hair, either react with it chemically or swell the entire structure. In either case the double refraction falls, usually irreversibly, to a low value. The structure of fine filaments embedded in a highly cross-linked matrix suggested by electron microscopy may explain these results. The hair is certainly a Wiener body, i.e. a system of oriented rodlets embedded in a matrix, probably with different optical constants, and there is likely to be a form contribution. But, since the matrix is by far the more cross-linked component, suitable imbibition liquids penetrating the matrix alone probably do not exist.

This investigation has been supported by grants to the Chester Beatty Research Institute (Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital) from the British Empire Cancer Campaign, Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, the Anna Fuller Fund, and the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

The authors are particularly grateful to Mr. K. G. Moreman for supplying the illustrations.

REFERENCES

1. ALEXANDER, P. and HUDSON, R. F., *Wool, Its Chemistry and Physics*. Chapman and Hall, London, 1954.
2. ASTBURY, W. T., *Proc. Roy. Soc. B* **134**, 303 (1947). Review.
3. MERCER, E. H., *Biochim. et Biophys. Acta* **3**, 161 (1949).

The Mechanism of Hemolysis Caused by Ultrasonic Irradiation. I

W. ROMANOWSKI, A. FELTYNOWSKI, and J. LITWIN

*Human Physiology Department of the Academy of Medicine, Warsaw,
and State Institute of Hygiene, Warsaw*

THE authors investigated the mechanism of hemolysis caused by the ultrasonic irradiation in several experiments under special conditions, and they have obtained some interesting results.

The blood of the dog treated with heparine and next diluted three times by Tyrode's liquid was irradiated for $1\frac{1}{2}$ min. from a generator of the power of 3 W/cm^2 and at the frequency of 800 Kc. Then the specimen was formed from the erythrocytes irradiated and from the controls. The specimens were shadowcast with chromium and were observed under the Siegbahn-Schoenander electron microscope.

All the blood cells from the irradiated specimen were much smaller than the controls and attained $\frac{1}{4}$ of their previous size. The blood cells had no characteristic "delta" form in the centre, and their shadows were longer than those of the controls. This indicated that the erythrocytes transformed into a spherical form.

We find that some results of Sibuya (2) and those of Lindemann (1) though contrary to their interpretation, give evidence that the spherical form is

one of the forms in which the erythrocytes change when subjected to ultrasonic treatment, and this change may precede the hemolysis. It is now difficult to decide whether it is caused by the denaturation by the ultrasonic radiation of a characteristic protein in the erythrocyte membrane which gives shape of a "biscuit", or by the change in pH or temperature, or by other factors.

When irradiating with a smaller dose, changes similar to those described by Lindemann were observed, i.e. convex and concave deformations on the surface of the blood cell. The appearance of these forms can be explained by a non-uniform denaturation of the protein over the whole surface.

REFERENCES

1. LINDEMANN, B., *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.* **209**, 44 (1950).
2. SIBUYA, after BERGMANN, *Der Ultraschall*, p. 41. VDI-Verlag, Berlin, 1939.

The Mechanism of Hemolysis Caused by Ultrasonic Irradiation. II

W. ROMANOWSKI and A. FELTYNOWSKI

*Human Physiology Department of the Academy of Medicine, Warsaw,
and State Institute of Hygiene, Warsaw*

By means of an ultrasonic 3 W/cm^2 generator at the frequency of 800 Kc the authors irradiated mice in a special vessel submerged into another one filled with oil (cooled with ice and water). The blood specimens were taken from the tail and then investigated under the electron microscope. The irradiation times were 9-13 min. (mortal dosage) and 5 min.

After irradiating with a mortal dosage nearly all the erythrocytes were greatly changed. Their sizes were much smaller than those of the control ones, and their shapes were also changed. Some

smaller or greater convex and concave deformations were observed. After five minutes' irradiation such changes have also been observed, but not on all blood cells.

These deformations are thought to be caused by a non-uniform denaturation of the protein on the surface, which gives a "biscuit" form to the erythrocytes.

Similar changes in size and shape of the erythrocytes were obtained in *in vitro* experiments (preceding communication).

L'ultrastructure de la membrane nucléaire des ovocytes de l'Araignée (*Tegenaria domestica* Clerk)

J. ANDRE et CH. ROUILLER

*Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences, Clermont-Ferrand, et
Institut de Recherches sur le Cancer Gustave Roussy, Villejuif*

Dès les premières recherches sur l'ultrastructure de la membrane nucléaire, par Callan et Tomlin (4), les ovocytes se sont révélées être un matériel de choix pour cette étude. Depuis, on a étendu à un assez grand nombre de types cellulaires, en les précisant et modifiant, les notions alors acquises, et l'on se représente à l'heure actuelle la limite entre noyau et cytoplasme comme une enveloppe à double paroi percée de nombreux pores qui la feraient ressembler à une écumoire sphérique (voir la bibliographie parue jusqu'à ce jour dans Zetterqvist (16)).

Toutefois, dans les dernières publications, qui sont presque simultanées (1, 6, 16), il subsiste encore des différences d'interprétation des images observées, et il nous a paru utile de confronter les points de vue de ces auteurs avec les résultats obtenus sur un matériel favorable et nouveau, les ovocytes de l'Araignée des maisons *Tegenaria domestica* Clerk.

Des Araignées fraîchement capturées sont rapidement disséquées et des fragments d'ovaire sont fixés dans le liquide de Palade au pH 7,5. Après lavage et déshydratation, ils sont inclus dans du méthacrylate de butyle et coupés à l'ultra-microtome Servall-Porter. L'observation est faite aux microscopes électroniques Trüb-Täuber KM4 de la Faculté des Sciences de Clermont-Ferrand, et RCA EMU 2E de l'Institut Gustave Roussy de Villejuif.

Les formations lamellaires de la membrane. Sur les coupes normales à la surface du noyau, les deux feuillettes de la membrane se présentent comme deux lignes parallèles, épaisses de 50 Å et distantes de 140 Å (fig. 1). Ils paraissent identiques en épaisseur et opacité, contrairement à ce qui a été souvent noté (6, 9). Les clichés de très bonne résolution permettent de penser que chacun d'eux, considéré jusqu'ici comme simple, est en réalité double, composé de deux lames osmiophiles séparées par un espace plus clair (fig. 1).

Les pores. A intervalles relativement rapprochés, les deux feuillettes se rejoignent et laissent libre un pore. A ces endroits, ils s'écartent d'abord un peu l'un de l'autre en s'épaississant nettement, et se raccordent (fig. 1). Au voisinage des « *soudures* » ainsi formées se trouvent des petits grains foncés, de sorte que ces régions possèdent une forte densité électronique. Le pore ayant un diamètre de 350 Å et étant partiellement obstrué, la probabilité pour qu'une coupe d'épaisseur minimum 250 Å passe par l'espace libre est très faible. C'est pourquoi la plupart semblent fermés par un bouchon (6), une fine membrane (1), un diaphragme diffus (15) (fig. 1). Ces barrières ne sont probablement que des portions

de la soudure annulaire plus ou moins entamée par la coupe. Un examen attentif permet de trouver quelques pores dans lesquels aucune membrane transversale n'est visible. La lumière apparaît alors très étroite (fig. 1).

Le nuage. S'il ne possède pas de fermeture, le pore est toutefois occupé par un « *nuage* » d'une substance diffuse qui s'étend des deux côtés de la membrane nucléaire. Il est plus foncé que la matrix cytoplasmique, et c'est sa présence qu'ont décelé les tracés

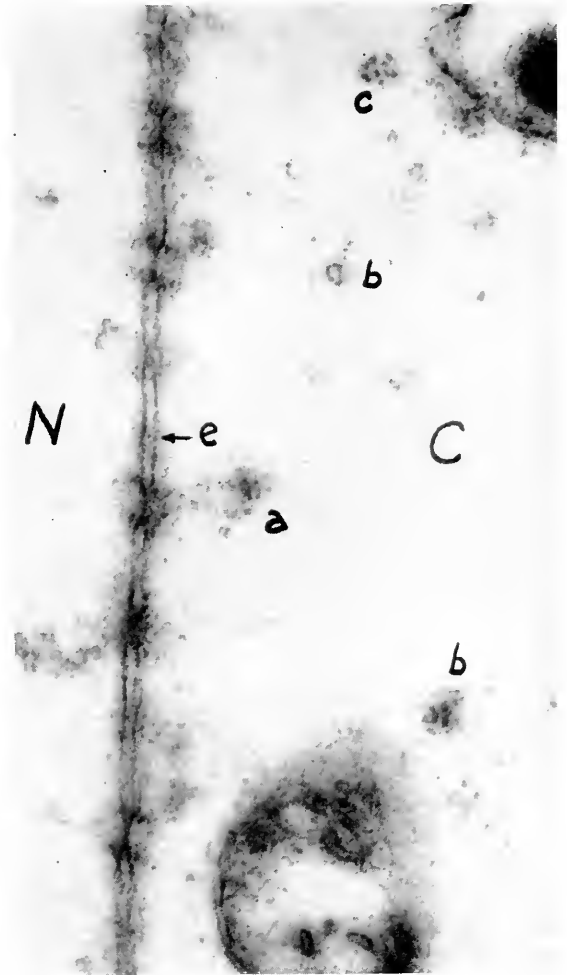


Fig. 1. Coupe normale à la surface du noyau, N = Nucléoplasme, C = Cytoplasme. Les amas granulaires sont: (a) au voisinage de la membrane nucléaire et en relation avec le nuage; (b) libres dans le cytoplasme; (c) à proximité des lamelles ergastoplasmiques; en (e) une particule dans l'espace périnucléaire.

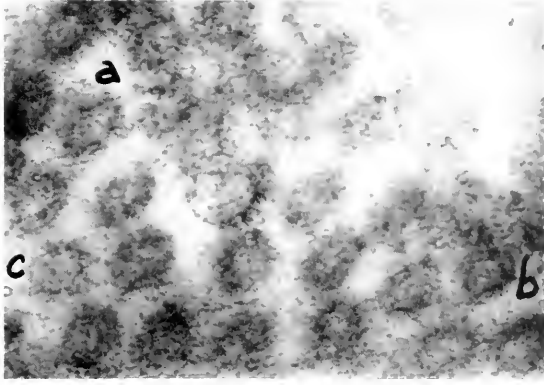


Fig. 2. Coupe presque tangentielle. Remarquer l'apparence de certains anneaux en roue dentée (a), deux cercles concentriques (b), cercles de particules (c).

densitométriques de Kautz et de Marsch (8). Sa morphologie est extrêmement variable. Il est le plus souvent vaguement hémisphérique ou cônica d'un côté comme de l'autre de la membrane. Dans le nucléoplasme, il s'effiloche parfois jusqu'à 1500 Å. Généralement, il est plus opaque dans une région située à la verticale de la soudure. C'est elle qu'Azelius a schématisée sous la forme de margelles de puits bordant le pore, mais ses limites sont extrêmement diffuses. Toute l'aire nuageuse, surtout dans sa portion plus foncée, et aux abords de la soudure, est semée de très fines particules de taille comprise entre 50 et 100 Å.

Du côté du cytoplasme, le nuage, après s'être rétréci, se dilate à nouveau en une sphère richement pourvue en particules identiques dont certaines toutefois semblent confluer. Plus loin dans le cytoplasme, de tels *amas granulaires* sont encore visibles, et leurs grains, plus gros, dessinent parfois les rosettes, cercles, spirales connus dans l'ergastoplasme (9) (fig. 1).

Les anneaux. Ces figures ne sont visibles que sur des coupes tangentielles, malheureusement très rares : pour les ovocytes âgés dont la vésicule germinative est devenue énorme, il n'y en a pas plus de 1 sur 500. Cette rareté explique qu'elles soient longtemps restées inaperçues ou que leur interprétation ait été erronée.

Dans l'ovocyte de Tégénaire, les anneaux sont remarquablement nombreux puisqu'ils atteignent une densité de 80 au micron carré, compte tenu de la compression due au rasoir. Ils sont disposés, uniformément sur tout le noyau, en rangées assez régulières, alternant généralement d'une rangée à l'autre (fig. 2). Leur diamètre externe étant de 850 Å, ils couvrent presque la moitié de la surface du noyau. La distance moyenne entre deux centres voisins est de 1100 Å. Ils comprennent une couronne foncée large de 250 Å entourant un centre clair de 350 Å.

La couronne possède une structure complexe, dont l'image varie selon le niveau, ainsi qu'on peut le voir sur une coupe très légèrement oblique, quand on observe les rangs qui se succèdent depuis le

nucléoplasme jusqu'au cytoplasme. Dans les cas favorables, on peut même distinguer que deux cercles concentriques la limitent (fig. 2). Quoiqu'il en soit, des particules de 50 à 100 Å parsèment ces différentes images, donnant le plus souvent des figures en cercles pointillés ou en roues dentées. Les plus grosses d'entre elles ont souvent l'aspect de vésicules creuses, ainsi que Rebhun (11) l'a déjà noté, et il est remarquable que ces vésicules s'associent fréquemment par couples donnant des figures en paires de lunettes.

Le centre de l'anneau est en général homogène, plus ou moins grisé, mais on peut y trouver également quelques grains.

L'espace périnucléaire. Alors qu'on le pense généralement homogène (10), nous y avons trouvé des granulations d'environ 50 Å. Certaines d'entre elles sont contournées par les deux feuillettes de la membrane du noyau, et ce fait porte à penser qu'il ne s'agit pas d'un artefact (fig. 1).

La correspondance entre les pores et les anneaux. Cette question est interprétée de façon différente par les divers auteurs. Pour Watson et pour Haguenaou et Bernhard, l'anneau est la vue en plan de la *soudure*, tandis que c'est celle du *mage* foncé pour Alzelius, et Zetterqvist. Or, il convient de remarquer que l'opacité du nuage est plus faible que celle de l'anneau, tandis que la soudure, région épaissie de la membrane, est au contraire très diffusante aux électrons. De plus, la morphologie du nuage est moins uniforme que celle des anneaux, et notamment, l'existence occasionnelle d'un contour net à ces derniers (deux cercles concentriques) montre

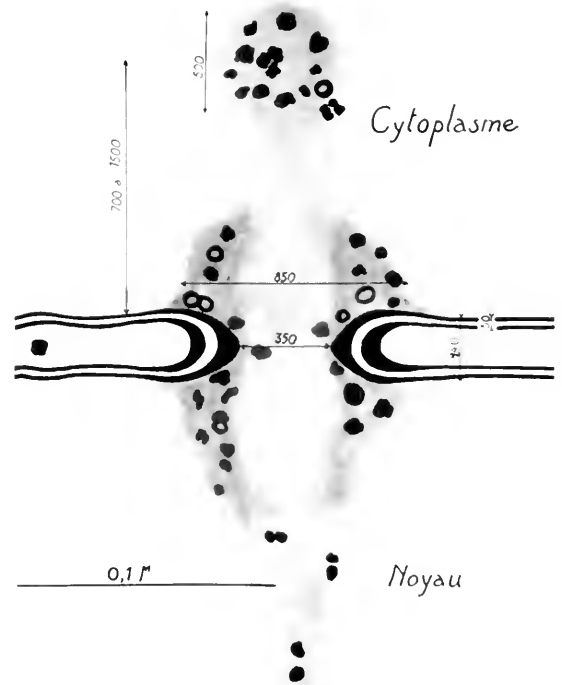


Fig. 3. Schéma d'un pore de la membrane nucléaire.

qu'ils possèdent une paroi franche. Cette dernière ne peut être que la soudure car jamais le nuage ne se montre nettement limité. Il semble donc plus raisonnable d'assimiler l'anneau aux parois du pore proprement dit, et si le nuage peut se surajouter effectivement à elles dans l'image définitive, il ne saurait la former à lui seul. Cette interprétation est pleinement confirmée par l'examen des coupes obliques qui ne peuvent s'expliquer que si la structure annulaire est intermembraneuse.

La duplicité des feuillettes de la membrane nucléaire. La constatation que nous avons faite à ce sujet rejoint celle de Rhodin (13) sur les membranes des mitochondries et celle de Zetterqvist (16) sur les membranes cellulaires. Toutefois, lorsque le feuillet apparaît double dans nos micrographies, il est comme dilaté et moins contrasté (fig. 1). C'est peut-être un artefact de fixation. C'est peut-être encore l'amorce d'un processus de délamination (11). Cette observation demande à être généralisée avant de pouvoir en connaître l'exacte signification.

La généralité des pores. Les pores ont déjà été rencontrés dans les noyaux interphasiques de nombreux types cellulaires chez les Vertébrés (6). Chez les Invertébrés, ils ont été rencontrés chez un Insecte (2), des Echinodermes (1) et des Protistes (3, 7, 15). Enfin, leur découverte toute récente dans les gamètes d'un Champignon (14) nous laisse à penser que ces structures sont peut-être un trait morphologique de toute cellule vivante.

Le noyau de l'ovocyte âgé de Tégénaire en possède environ 1,5 million. La surface de la lumière de ces pores représente presque le $\frac{1}{10}$ de la surface du noyau.

Il semble naturel de rechercher leur rôle après de Robertis (19) et Watson (15), dans les échanges nucléo-cytoplasmiques.

Si cette hypothèse était vérifiée, nous aurions dans le *nuage* entourant le pore et dans l'*amas granulaire* qui le termine, l'image du transfert de substance démontré par voie spectrophotométrique par Caspersson (5) et son école.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFZELIUS, B. A., *Exptl. Cell Research* **8**, 147 (1955).
2. BAHR, G. F. et BEERMAN, W., *Exptl. Cell Research* **6**, 519 (1954).
3. BAIRATI, A. et LEHMANN, F., *Experientia* **8**, 60 (1952).
4. CALLAN, H. G. et TOMLIN, S. G., *Proc. Roy. Soc. B* **137**, 367 (1950).
5. CASPERSSON, T. O., *Cell Growth and Cell function. A Cytochemical Study*. New York, 1950.
6. HAGUENAU, F. et BERNHARD, W., *Bull. Cancer* **42**, 537 (1955).
7. HARRIS, P. et JAMES, T., *Experientia* **8**, 384 (1952).
8. KAUTZ et DE MARSCH, *Exptl. Cell Research* **8**, 394 (1955).
9. PALADE, G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59 (1955).
10. POLICARD, A. et BESSIS, M., *Compt. rend. acad. sci.* **242**, 2496 (1956).
11. REBHUN, L. I., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 93 (1956).
12. DE ROBERTIS, E., *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 341 (1954).
13. RHODIN, J., *Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney*. Stockholm, 1954.
14. TURIAN, G. et KELLENBERGER, E., *Exptl. Cell Research* (sous presse).
15. WATSON, M. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 257 (1955).
16. ZETTERQVIST, H., *The Ultrastructural Organisation of the Columnar Absorbing Cells of the Mouse Jejunum*. Stockholm, 1956.

Electron Microscopy on Grasshopper Spermatids

F. S. SJÖSTRAND and B. A. AFZELIUS

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

SPERMATOGENESIS in the grasshopper takes place within the ducts of the testis. The consecutive stages follow each other in a regular order with the immature spermatocytes at the bottom and the mature spermatozoa at the mouth of a duct. Because of this neat order and because the chromosomes are few and large, spermatogenesis in the grasshopper has been thoroughly studied with the light microscope. A comprehensive bibliography on this subject is found in Schröder's *Handbuch der Entomologie* (3).

In the present study the Swedish grasshopper *Chorthippus (Stauroderus)* sp. was used. This species belongs to the grasshopper family *Truxalidae* which usually has a haploid chromosome number of approximately 10 (3). The shape of the late spermatid is similar to that of the spermatozoon of *Tettigonia*

(*Locusta viridissima*) (as described by e.g. Retzius, (7)), the harpoon-like acrosome being the most striking characteristic. The nucleus of the spermatid in the stages examined is spade-shaped, the anterior region flattened and bordered by the acrosomal "harpoon barbs", while the posterior part has a triangular cross-section. The slender middle piece forms a smooth continuation of the head consisting of two mitochondrial filaments parallel to the tail filaments. In the short tail-end the tail filaments, but not the mitochondrial filaments, continue. This tail-end is thus analogous to the sperm tail of other animal groups.

In this study with the electron microscope of ultra-thin sections attention was concentrated on the nuclear contents and the mitochondria. The

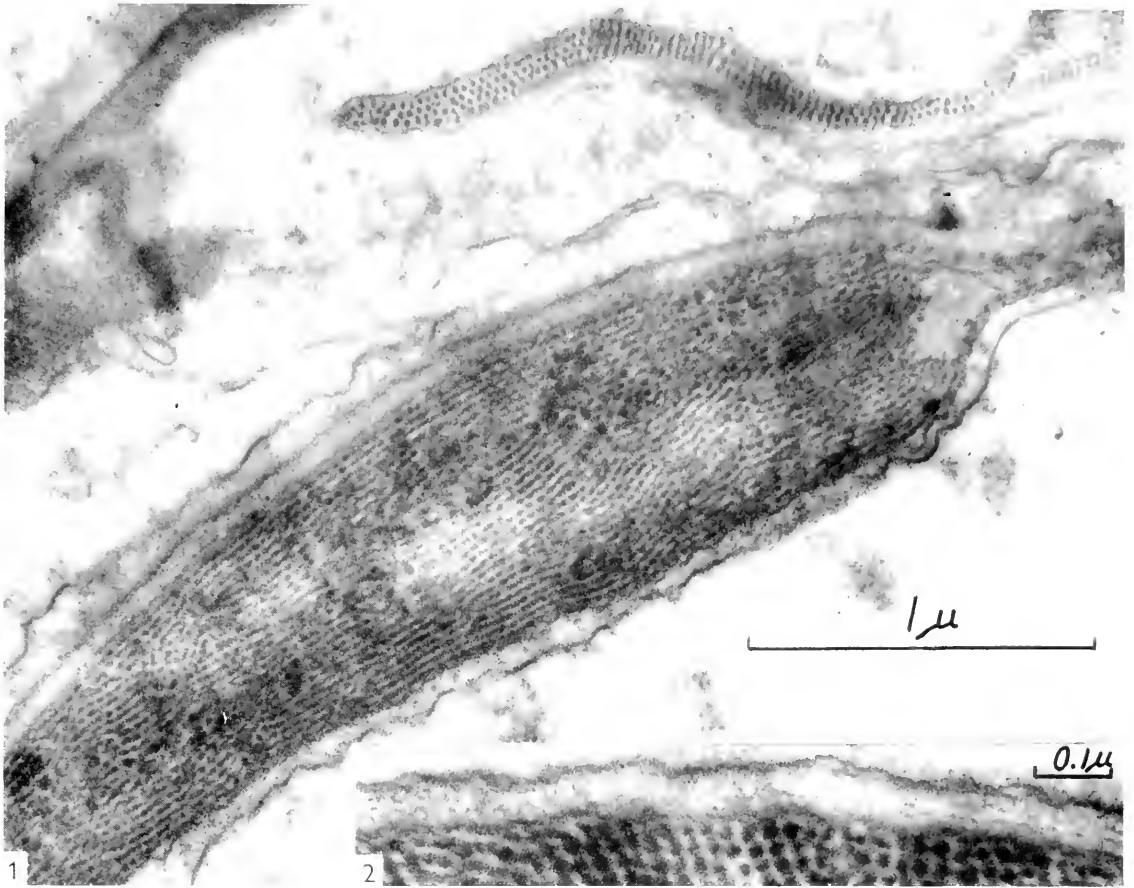


Fig. 1. Survey picture of two spermatids of the grasshopper *Chorthippus*. Cross-section through the anterior part of their heads. Magnification 46,000.

Fig. 2. Detail of a head with part of the "caudal sheath" and the nuclear material. Magnification 103,000.

acrosomal region consists of at least four different parts, the mutual relations of which are not entirely clear in this material. The acrosomal barbs have a homogeneous texture.

The nucleus, as seen in fig. 1., has a strikingly regular ultrastructure. There are many uniformly thick opaque filaments in a parallel arrangement oriented along the long axis of the nucleus. In a transverse section at the broadest part of the nucleus approximately 3000 filaments, about 200 Å in diameter, have been counted. The filaments are within restricted regions equally spaced in a hexagonal array giving a crystal-like appearance to that region of the nucleus. In longitudinal sections these filaments could be followed for a distance of several microns. There is no clear evidence that two adjacent filaments join at their ends. Towards the basal portion of the nucleus there is a general coarsening of the structure. Instead of the filaments dense conglomerates of irregularly sized opaque regions are observed near the centriole. The nuclear membrane shows a varying appearance in different regions. Partially it seems to consist of a single layer and partially a triple layered structure is evident.

In the neck region and alongside the convex surface of the head of the spermatid a caudal sheath is found, resembling very closely the caudal sheath described in the cat spermatid by Burgos and Fawcett (2), or that in the spermatozoon of the edible snail (6). This sheath is thus seen to consist of a cylindrical aggregation of apparently tubular filaments. Possibly the function of the caudal sheath is a supporting one as it covers the neck region, where the mechanical strains are at their greatest. The centriole exhibits no peculiarities and is not found in a nuclear indentation as is the centriole of the sea urchin spermatozoon (1).

The relationship of the two mitochondrial filaments and the tail proper was studied on transverse sections of the middle piece. The space enclosed by the cell membrane is divided into two approximately equal half-cylinders, each having its individual membrane. One part consists of the eleven tail filaments in the traditional arrangement (4), two additional free filaments and a non-dense surrounding matrix material; the other part consists of the two mitochondrial filaments embedded in a moderately dense matrix material. The non-dense tail part invariably



Fig. 3. Length-section through one of the two mitochondria in the middle piece with the mitochondrial membranes as folds from a homogeneous part. Magnification 94,000.

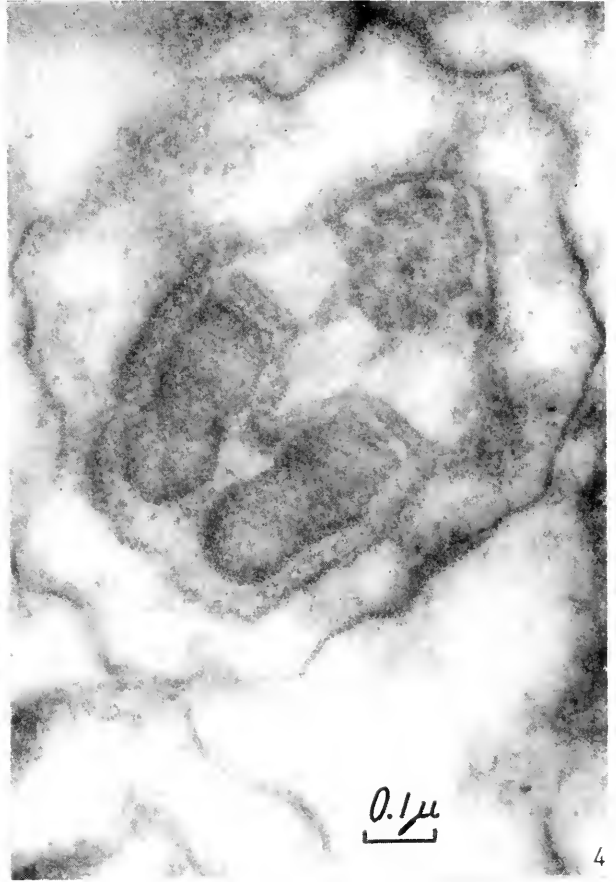


Fig. 4. Cross-section through the middle piece of the spermatid showing the characteristic arrangement of the two mitochondria and the tail filaments. Note also the "caudal sheath" like tubuli near the mitochondria. Magnification 112,000.

bulges into the mitochondrial half along the central axis. The two central filaments are always in a plane, which would pass between the two mitochondrial filaments. As these latter are known to pass without twisting around each other or around the tail proper (7), it can be concluded that the central filaments also follow a straight course.

Three equally thick filaments are visible in the light microscope in the grasshopper spermatozoon. Since two are obviously mitochondria, only one of the three is therefore responsible for the flagellar movements. The mitochondria, however, are not complete mitochondria as are those described by Sjöstrand (8) and others. As seen in longitudinally sectioned middle pieces each of the two mitochondrial filaments consists of one part in which the opaque material is homogeneous, and a second part, which shows a regular cross striated appearance. The cross striations are due to a stack of double membranes. These membranes are arranged with very regular spacing and are all of equal size, approximately 230 Å thick. The membranes appear as folds of a thin continuous membrane. Alongside

the mitochondrial threads and within the matrix are tubular formations similar to those of the caudal sheath.

The high degree of order thus revealed in the grasshopper spermatid makes this material especially suitable for studies in which the ultrastructure as seen in the electron microscope is compared with x-ray analysis. So far, the technical problems encountered in getting a clean preparation of oriented grasshopper sperm nuclei for x-ray diffraction have not been overcome (10). Birefringence and ultraviolet dichroism measurements performed on living locust spermatozoa, however, have shown that the physical properties of the head closely resemble those of microcrystalline fibers of pure sodium desoxyribonucleate (9). This study also suggests a crystalline or paracrystalline organization of the nucleoproteins within the grasshopper sperm head. It is not known how this organization may be correlated with the idea of the continuity of the chromosomes in the interphase nucleus. Grassé, Carasso and Favard (5, 6) in a study of the spermatozoon of the edible snail described a similar longitudi-

dinal orientation of filaments in the nucleus and made the suggestion that these filaments represented the unwound and elongated chromatids. As the number of filaments is a few thousand and the number of chromatids in the grasshopper approximately 20, a large number of turnings of the filaments at their ends should be found if their interpretation is correct. As we have not seen these connections, the idea of the chromosomes existing as extremely long folded threads is not supported by the present material. Another plausible explanation is that each chromosome splits into a great number of subfilaments.

REFERENCES

1. AFZELIUS, B. A., *Z. Zellforsch.* **42**, 134 (1955).
2. BURGOS, M. H. and FAWCETT, D. W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 287 (1955).
3. DIPDOLIA, P., in SCHRÖDER, Handbuch der Entomologie, Jena, 1928.
4. FAWCETT, D. W., *Laryngoscope* **64**, 557 (1954).
5. GRASSI, P.-P., CARASSO, N., and LAVARD, P., *Compt. rend. acad. sci.* **242**, 1395 (1956).
6. ———, *Annales Sci. Nat. Zool.* **18**, 339 (1956).
7. REIZIUS, G., *Biol. Unters., N. F.*, **14**, 55 (1909).
8. SJÖSTRAND, F. S., *Nature* **171**, 30 (1953).
9. WILKINS, M. H. F., *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **23**, 104 (1951).
10. ———, personal communication, 1956.

The Acrosomal Reaction of the Sea Urchin Spermatozoon

B. A. AFZELIUS

The Wenner-Gren Institute for Experimental Biology and the Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

THE acrosomal globule, which in some mammalian spermatozoa flattens to form a "galea capitis" covering the anterior part of the nucleus (6), remains in the primitive or spherical condition in sea urchin spermatozoa. The acrosomal region of this spermatozoon contains, in addition to the acrosomal globule, a mass of structureless or sometimes fibrous material situated within an apical indentation of the nucleus (1). This paper deals with the changes the acrosomal region undergoes while the sperm approaches the egg surface or, in most but not all spermatozoa, when treated with egg water. "Egg water" is the term for sea water containing dissolved substances from the jelly coat surrounding the eggs.

Figure 1 represents a *Psammechinus miliaris* spermatozoon fixed two minutes after addition of egg water. This spermatozoon has undergone an acrosomal transformation. The most notable feature of this reaction is the position of the acrosomal globule on the outer surface of the cell membrane. The mechanism for this transfer is unknown, since the cell membrane appears not to be ruptured at any point.

Other changes have been noted in egg-water-treated spermatozoa: (a) The cell membrane is more blackened following fixation in osmium tetroxide than that of untreated spermatozoa, and is often separated from the enclosed structures by an empty space. As a rule the cell membrane is not ruptured. (b) The middle piece, which appears to be a single huge mitochondrion, may have moved to a position alongside the nucleus and some of its internal double membranes may have swollen to form vesicles. (c) A portion of a tail may also have moved to a position at the side of the nucleus but inside the cell membrane that ordinarily closely invests the nucleus.

To a much smaller extent this phenomenon has also been observed in untreated spermatozoa (as in fig. 3, ref. 1). The possibility is recognized that some of these changes may represent abnormalities.

In other experiments spermatozoa have been added to sea urchin eggs that showed a somewhat slow fertilization rate but were otherwise normal. After 2-4 minutes the eggs were fixed, dehydrated and embedded following the routine scheme (10). In sections of cortex and jelly coat of the eggs, spermatozoa were found in contact with the egg surface (first stage of fertilization). They were often found in a position perpendicular to the egg surface, in which cases the chance of getting a longitudinally sectioned spermatozoa was rather favourable. These spermatozoa had all undergone an acrosomal reaction; i.e., the acrosomal globule was always outside the cell membrane of the spermatozoon. Figure 2 is an example of an *Echinus esculentus* spermatozoon in the immediate vicinity of an egg. The apical indentation in the nucleus has the same dimensions as in spermatozoa that have not reacted. A fine filament, presumably formed from material originally situated in the apical nuclear indentation, is seen within the cell membrane in the most anterior part of the acrosomal region. This filament, which consists of a rather short rod of longitudinally oriented fibrils, has apparently pushed the cell membrane before it, resulting in the formation of a pointed apex. The acrosomal globule outside the cell membrane is recognized by its homogeneity and density following osmium tetroxide fixation. It has become ring-shaped, and surrounds the pointed apex mentioned above.

At a later stage in the acrosomal reaction the cell membrane has ruptured, allowing the ring-shaped

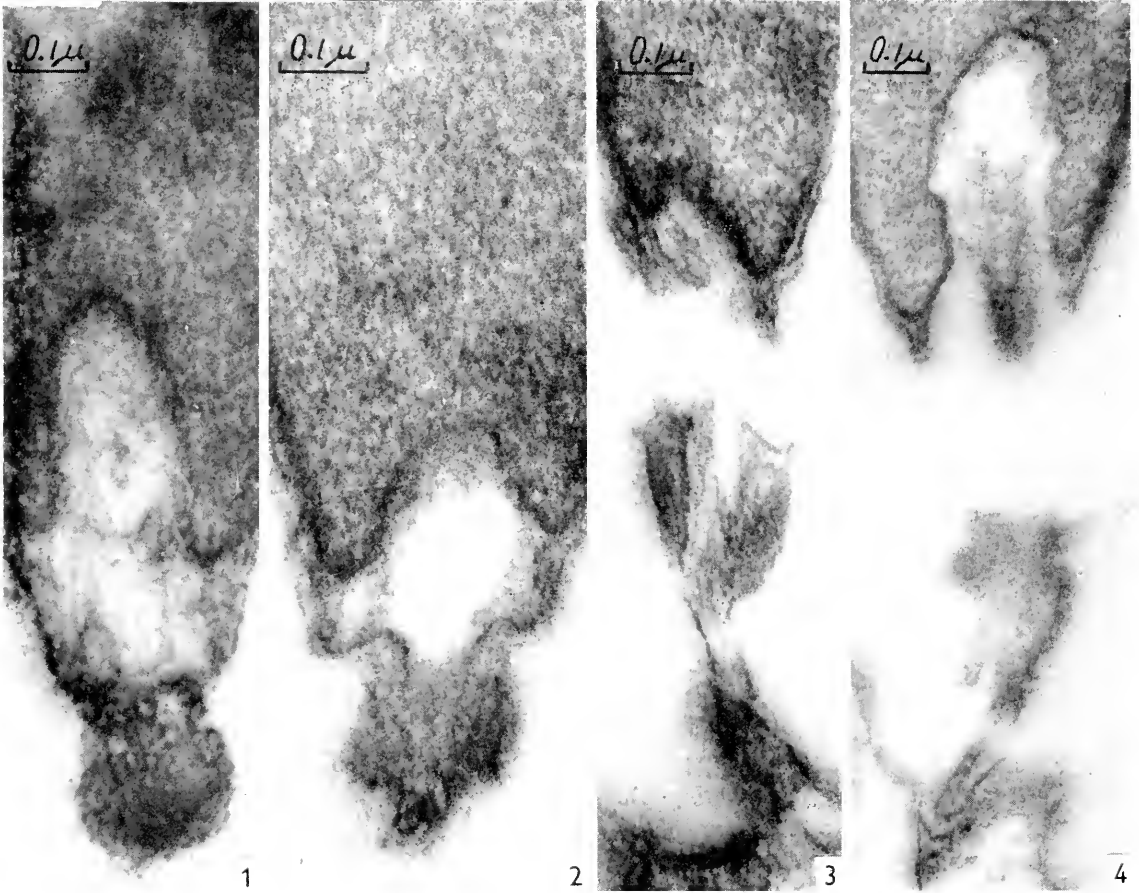


Fig. 1. The acrosomal region of a *Psammechinus miliaris* spermatozoon that has undergone the acrosomal reaction through treatment with egg water. Magnification 100,000.

Fig. 2. The acrosomal region of an *Echinus esculentus* spermatozoon that has undergone the acrosomal reaction in the immediate vicinity of an egg. Magnification 116,000.

Fig. 3. The acrosomal region of a *Strongylocentrotus droebachiensis* spermatozoon that has undergone the acrosomal reaction with the acrosomal filament projecting from the sperm nucleus to a process on the egg surface. The nuclear indentation is obliquely cut. Magnification 96,000.

Fig. 4. The acrosomal region of a *Strongylocentrotus droebachiensis* spermatozoon that has undergone the acrosomal reaction and projects an acrosomal filament from the sperm nucleus to the egg surface at the bottom of the picture. The filament is broken into three fragments. Magnification 84,000.

acrosomal globule and its attached segment of cell membrane to separate from the sperm head. However, the filament, which in many cases observed had elongated to a length exceeding 0.5μ , has retained its connection with both the sperm nucleus and the separated acrosomal region. Figures 3 and 4 illustrate this stage of the acrosomal reaction in *Strongylocentrotus droebachiensis* spermatozoa. In figure 3 the filament and acrosomal ring are shown to advantage while the nucleus is not sectioned in such a way as to show its apical indentation. Figure 4 illustrates the nuclear indentation. In both pictures the acrosomal filament is fractured. It is not known whether this is due to imperfect fixation or to mechanical damage in subsequent treatment.

Conclusions.—The two parts of the acrosomal region found in sea urchin spermatozoa, viz., the

acrosomal globule and the material within the indentation in the nucleus, behave differently when the spermatozoon comes in contact with the egg or is treated with egg water. The acrosomal globule is expelled from the cell but evidently does not dissolve within the first 3 minutes at the temperature used during the experiments (4–10 C.). The material within the nuclear indentation, on the other hand, remains on the inner side of the cell membrane and elongates to form the acrosomal filament which coexists with the expelled acrosomal globule.

The phenomenon of the acrosomal reaction was first described by J. C. Dan (2) in sea urchin spermatozoa and later her studies were extended to a variety of other animal classes and to different circumstances evoking the reaction (3, 4, 5, 11). The possibility to perform ultra-thin sectioning (accord-

ing to the technique of Sjöstrand (9, 10)) made it possible to differentiate the two parts of the acrosomal region and to follow the fate of these two parts and of the cell membrane during the acrosomal reaction. It also made possible the examination of spermatozoa in contact with the egg surface. It has been found that *all spermatozoa in contact with eggs exhibit the acrosomal reaction*. The probable importance of this phenomenon in fertilization is therefore emphasized. Spermatozoa treated with egg water, on the other hand, do not show a full percentage of acrosomal reaction.

Regarding the functions of the two parts of the acrosome in the process of fertilization nothing in the present observations is contrary to the belief of Wada, Collier and Dan (11) that the acrosome contains the lysin that dissolves the egg membrane, although stages in this process could not be studied. More likely the acrosomal globule is the one which consists of and contains the egg membrane lysin. The impression gained by Rothschild and Tyler (8) from the electron microscopic study of whole mounts (unsectioned material) that the acrosomal globule forms the acrosomal filament seems to be erroneous.

The author wishes to thank Dr. G. Gustafson, the Kristineberg Zoological Station, and Bestyrer D. Rustad, Trondheim Biological Station, for the help and supply of material; Dr. F. Sjöstrand, Associate Professor of the Department of Anatomy, for placing the resources of his laboratory at the author's disposal; Professor J. Runnström, the Wenner-Gren Institute, for his unflinching support and interest. Financial support from the Swedish Natural Science Research Council is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. ALZHIUS, B. A., *Z. Zellforsch.* **42**, 134 (1955).
2. DAN, J. C., *Biol. Bull.* **103**, 54 (1952).
3. — *ibid.* **107**, 203 (1954).
4. — *ibid.* **107**, 335 (1954).
5. DAN, J. C. and WADA, S. K., *Biol. Bull.* **109**, 40 (1955).
6. FAWCETT, D. W. and BURGOS, M. H., Ciba Foundation, *Colloquia on Ageing* **2**, 86. London, 1956.
7. RHODIN, J., Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney. Stockholm, 1954.
8. ROTHSCHILD, LORD and TYLER, A., *Exptl. Cell Research, Suppl.* **3**, 304 (1955).
9. SJÖSTRAND, F. S., *Nature*, **168**, 646 (1951).
10. — in OSIFER and POLLISIER, *Physical Techniques in Biological Research*, III, 241. New York, 1956.
11. WADA, S. K., COLLIER, J. R., and DAN, J. C., *Exptl. Cell Research*, **10**, 168 (1956).

The Structure of Galea Capitis in Human Sperm

J. SCHULTZ-LARSEN and R. HAMMEN

The University Institute of Human Genetics, the Department of Gynecology and Obstetrics at the University Hospital, Copenhagen, and the University Institute of Biophysics, Copenhagen

As galea capitis, at least as far as animals are concerned, has shown itself to be important for sperm fertility, we have undertaken an investigation of this structure and its relationship to the acrosome as part of our systematic electron microscopic research on the normal morphology of the human sperm. In the course of this work, we have found a formation in the foremost part of the head of the sperm which to our knowledge has not been described previously in human sperm.

Lively sperm from young men whose ejaculates had been subjected to thorough analysis and found to be normal were used. The ejaculates were diluted 10–15 times with Tyrode's solution, and fixed with 1% osmium tetroxide with a pH of 7.4 in isotonic ion concentration. Dehydration in alcohol and embedding in butylmetacrylate. Our experiments have demonstrated that impurities, which are present in large amounts in normal human sperm, are largely the cause of irregular polymerisation. When using chemical accelerators (benzoylperoxide, 2:4-dichlorobenzoylperoxide, lauroylperoxide) it has thus been necessary to remove impurities from the ejaculates prior to fixation by means of repeated centrifugation and suspension in pure Tyrode solution. These procedures have, however, proved to reduce the number of motile sperm considerably, and the membrane mentioned above is damaged. Polymerisation with ultra-violet light without chemical accelerators makes it possible to work with less

pure preparations and yet achieve satisfactory preservation. The sections have been cut with a Sjöstrand ultramicrotome with razor blades. In preparing sections with the latter microtome, the method suggested by Sjöstrand (11) has been closely followed.

In the preparations made by merely spreading a suspension of sperm heads which had been subjected to the normal cleansing and fixation procedures, one usually cannot see the galea, and in no way gains any impression of the structure to be described below.

Fig. 1 shows that the galea is a hood-like structure which reaches down over the forepart of the head. The hood is in this preparation torn off the head. The galea capitis consists of two layers: the inner one, nearest to the head, and the outer layer, each of which is about 50 Å thick. The two layers are separated by a space approximately 400 Å wide. The galea stretches from the foremost point of the head down to the head's equator, where the inner and outer layer form a cul de sac. Galea capitis is bounded on its outer side by a thin membrane which continues past the equator of the head to cover the basal part. This outer membrane is only 50 Å thick, and its continuation forms the membrane that covers the middle-piece, the tail and the tail tip.

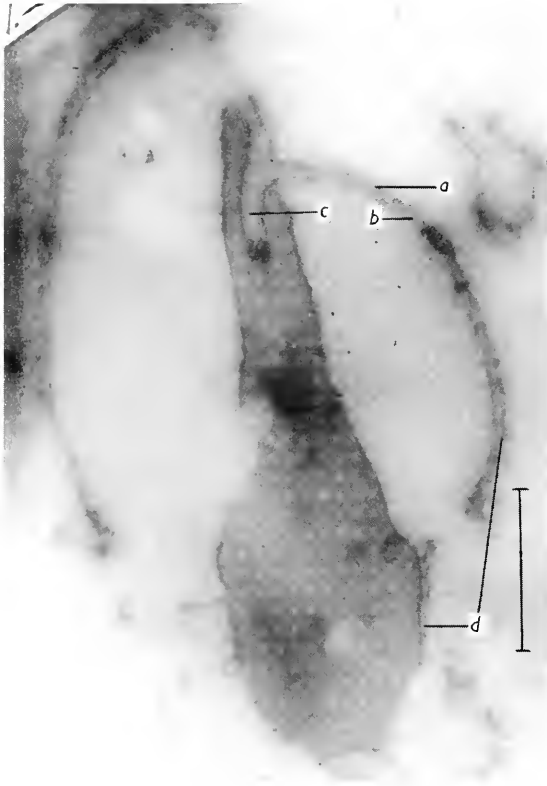


Fig. 1. Longitudinal section of the head. Galea capitis consists of an outer membrane (a) and an inner one (b), which continues down and lines a cavity in the tip of the head (c). Galea capitis has been forced off the head. On the surface of galea capitis there is an outer membrane approximating 50 Å which continues down to the basal part of the head (d). Magnification = 22,000.

The inner membrane of the galea capitis forms a pocket lining an acrosomal cavity. At the bottom of this acrosomal cavity is seen a denser structure. The cavity is otherwise filled by a structureless mass that continues into the mass filling up the space between the two galea capitis membranes, and which gives less contrast than the other parts of the head.

We have sectioned several somewhat shorter heads in a sagittal or oblique plane and have found similar structures, but with acrosomal cavities larger and oval in shape.

Discussion.—Galea capitis in human sperm is exceptionally delicate and fine in structure—so delicate, in fact, that up to now there has been doubt as to whether such a structure was present in mature

sperm (cf. 5, 6, 12). Electron microscopists, too, have denied its existence in humans (e.g. ref. 8).

On a few of Retzius (9) pictures of mature human sperm one nevertheless discerns a contour just in front of the equator of the head, which would correspond to the rearmost boundary of a hood. Some irregularly shaped heads likewise suggest the presence of a galea in human sperm (cf. 3, plate I, figure 5), which may be hypertrophied relative to the head. Furthermore, Williams (13) is of the opinion that he has observed a loose galea in a single case.

Phylogenetically the presence of galea in human sperm is a reasonable assumption. It has been possible to prove the existence of a hood in a large number of animals from varying phylogenetic levels, though these hoods have been of diverse shapes and extent, and often occur together with a so-called perforatorium. The presence of a galea in human sperm is also strongly supported by the investigations of Gatenby *et al.* (2) of spermiogenesis.

As yet it is impossible to decide upon the function of galea capitis and the acrosomal part of the sperm head. As galea capitis always forms part of the spermatozoa of various types of animals, it might be supposed that, together with the acrosomal part of the head, it has an important part to play with regard to the possibility for the sperm to reach the egg-cell.

REFERENCES

1. AFZELIUS, BJÖRN A., *Z. Zellforsch.* **42**, 134 (1955).
2. GATENBY, J., BRONTÉ, J., and BEAMS, H. W., *Quart. J. Microscop. Sci.* **78**, 1 (1936).
3. HAMMEN, RICH., *Studies on Impaired Fertility in Man*. Copenhagen and London, 1944.
4. HAMMEN, RICH., SCHULTZ-LARSEN, JORGEN, and CARLSEN, F. E., *Fertil. Steril.* **5**, 411 (1954).
5. HELD, H., *Ber. Verhandl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-phys. Kl.* **68**, 205 (1916).
6. MARCUS, H., *Arch. Zellforsch.* **15**, 445 (1921).
7. PAPANICOLAOU, GEORGE N. and STOCKARD, CHARLES R., *J. Anat.* **24**, 37 (1918).
8. REED, C. J. and REED, B. P., *Anat. Rec.* **100**, 1, 1948.
9. RETZIUS, GUSTAVE, *Biologische Untersuchungen*. XV, 57 ff., 1910.
10. SCHULTZ-LARSEN, JORGEN, HAMMEN, RICH., and CARLSEN, F. E., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **35**, 45 (1954).
11. SJÖSTRAND, F. S., *Experientia* **9**, 14 (1953).
12. STIEVE, H., *Harn- und Geschlechtsapparat*. II. Teil. In W. v. MÖLLENDORFF, *Handb. der mikr. Anat. d. Menschen* **7**, 103 (1930).
13. WILLIAMS, W. W., *Fertil. Steril.* **1**, 199 (1950).

The Ultrastructure of the Thyroid Gland of the Mouse

R. EKHOLOM and F. S. SJÖSTRAND

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, and the Department of Anatomy, University of Gothenburg

THIS paper presents the results obtained mainly by studying the thyroid gland of mice kept in normal laboratory conditions. These results will be the basis of a further analysis of the structural changes in the thyroid in connection with the stimulating and inactivating of the gland.

The thyroid has earlier been studied with aid of the electron microscope by several investigators (1, 2, 4). The observations made by these authors are in general accord. Thus, they all give an account of the existence of microvilli on the follicular surface of the thyroid cells and a "lamellar" or "canalicular" structure in the cytoplasm. However, as regards the structure of the capillaries, opinions are at variance. Monroe suggests that, in places, the endothelium lining of the capillaries is discontinuous but Dempsey and Peterson are of the opinion that close examination always reveals a continuous capillary wall.

Material and methods.—The thyroid gland of 40 adult white mice were examined. The fixation of the tissue

specimens was performed in a blood isoton 1 per cent osmium tetroxide solution, buffered at pH 7.2 with veronal acetate, a modification of the osmium solution of Palade (6). The specimens were embedded in a mixture of *n*-butyl and *n*-methyl methacrylate mainly according to Newman *et al.* The ultrathin sectioning was performed partly with the microtome designed by Sjöstrand (7), partly with an instrument described by Ekholm & Zelandér (3). The sections were examined partly in an RCA EMU 2b, partly in an RCA EMU 3b microscope.

Results. The thyroid cells are organized according to a very regular pattern as revealed by a survey picture (fig. 1). The cells are bordered by a plasma membrane which at the top surface, facing the follicle, protrudes in a greater or lesser number of microvilli of varying size and shape. At the base the cell membrane, associated with a basement membrane, is usually seen to run in close vicinity to a capillary. The cell nucleus is situated in the centre of the cell. A large number of mitochondria are evenly distributed throughout the cells. The apical zone of the

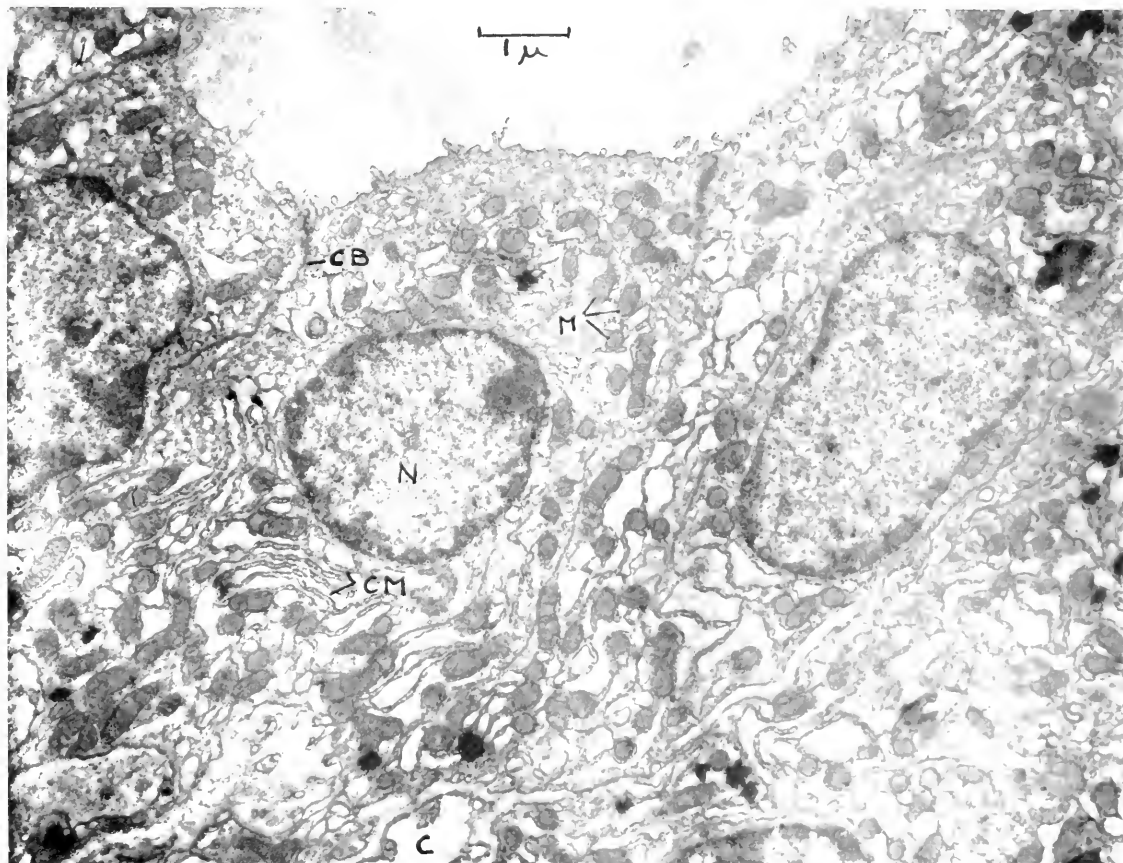


Fig. 1. Survey picture of mouse thyroid cells with the follicle (uppermost), cell boundary (CB), mitochondria (M), intracellular cytoplasmic membranes (CM), nuclei (N) and capillary (C). Magnification $\times 12,000$.

cells contains small granules. Predominantly in the middle and basal parts of the cells more or less regular systems of membranes are seen.

The *plasma membrane* bounding the cytoplasm of the thyroid cell is in its major course observed as a single membrane having a mean thickness of about 80 Å (79 ± 3 Å). The membranes of two adjacent cells run regularly in close relationship, the mean distance between the lines being about 145 Å (146 ± 7 Å). The part of the plasma membrane that bounds the villi is thinner, about 60 Å (58 ± 5 Å). Here the membrane, at least in some places, is observed as a double-edged one composed of two dark lines with a less opaque space in between. The maximum length of the microvilli is about 0.4μ and the maximum diameter about 0.08μ .

The *mitochondria*, usually rod-shaped, are scattered all over the cells apparently at random. The length of the mitochondria varies considerably in the sections but the width was found to be fairly constant with a mean value of $0.25 \pm 0.016 \mu$.

The mitochondria are bordered by an outer double-edged membrane composed of two dark lines separated by a less opaque space. The mean distance between the centers of two dense lines is 110 ± 3 Å and the total thickness of the membrane measured between the outer limits of the dark lines is 165 ± 4 Å. The calculated thickness of the individual dark lines is consequently about 55 Å and the width of the space between the lines about 55 Å.

Inside the mitochondria a system of inner membranes is observed. These membranes, mainly oriented perpendicularly to the long axis of the mitochondrion, also appear double-edged. Usually the inner membranes are in contact with the outer membrane at both ends but sometimes only one end of the inner membrane touches the outer, the other end being free. At the point of contact the central space of the inner membrane continues, in isolated cases, in the corresponding space of the surface membrane, but usually the two spaces are separated by a dark line.

The measured total thickness of the internal mitochondria membranes is 180 ± 3 Å and the distance between the centers of the two dark components 125 ± 4 Å. Consequently, the calculated thickness of the individual dense lines is about 55 Å and the width of the space between the lines about 70 Å.

The *intracellular cytoplasmic membranes*, by Sjöstrand (8) also named α -cytomembranes, appear as a thin basic membrane to which at one side small dark particles are attached. These particles are irregularly shaped but are usually fairly regularly interspaced (150–350 Å) along the basic membrane. However, within shorter distances the membranes are completely free from particles. The mean diameter of the particles is 145 ± 9 Å and the mean thickness of the basic membranes is 55 ± 3 Å.

The general organization of the α -cytomembranes varies. In restricted areas they show a rather regular,

parallel arrangement. In such areas the membranes seem to be arranged in pairs in such a way that two adjacent membranes face each other with the particle-covered side, the distance between the two components of each pair being rather constant (about 0.05μ). The smooth surfaces of the membranes are in these areas separated from each other by a wider and more irregular space. If the membranes are followed for a certain distance it is seen that the two nearest membranes from two adjacent pairs join and so close the space which is bounded by the smooth sides of the membranes.

In other areas this regular arrangement is not obvious because the spaces between the smooth sides of the membranes are irregular in shape and vary very much in size.

Granules. In the cytoplasm of glands from animals which have lived in normal laboratory conditions only few and small granules are found. But if the gland is slightly stimulated (by low room temperature) the granules increase in number and size and it is possible to distinguish at least two types of granules. One type has a content of irregular aggregates of a dense fine granular material. Another type has a denser packed, evenly distributed fine granular content. Both kinds of granules are bounded by a single, about 50 Å thick membrane.

The *Golgi apparatus* is usually found in close relation to the nucleus. It is made up of short membranes arranged in pairs, vacuoles and small vesicles.

The *cell nucleus* has a content of osmium-impregnated particles, irregularly arranged but densely accumulated at the nuclear membrane and in some areas in the interior of the nucleus. The nuclear envelope appears in sections cut perpendicularly to the nuclear surface as a double-edged membrane, consisting of two dense layers which are separated from each other by a less opaque space. The dense layers are about 50 Å thick and the space in between varies from about 80 to 250 Å. The double edging of the membrane is, however, lost at intervals and within these areas the nuclear membrane is rather indistinct. The dimension of these areas is approximately 400 Å.

The *capillaries*. The basal part of the thyroid cell usually borders on a capillary. Here the plasma membrane runs irregularly and is separated from the capillary endothelium by a space containing two basement membranes, one belonging to the thyroid cell and the other to the endothelium. The thickness of each of these membranes is 300–500 Å.

The thickness of the endothelial wall differs very much from place to place but the major part of the wall is very thin, 0.03 – 0.05μ . Within these parts a constant feature is the appearance of discontinuities of the endothelial lining (fig. 2). These discontinuities are located at varying distances from each other but never coincide with the boundary between two adjacent endothelial cells. They are, however, no true interruptions for they are always bridged by a

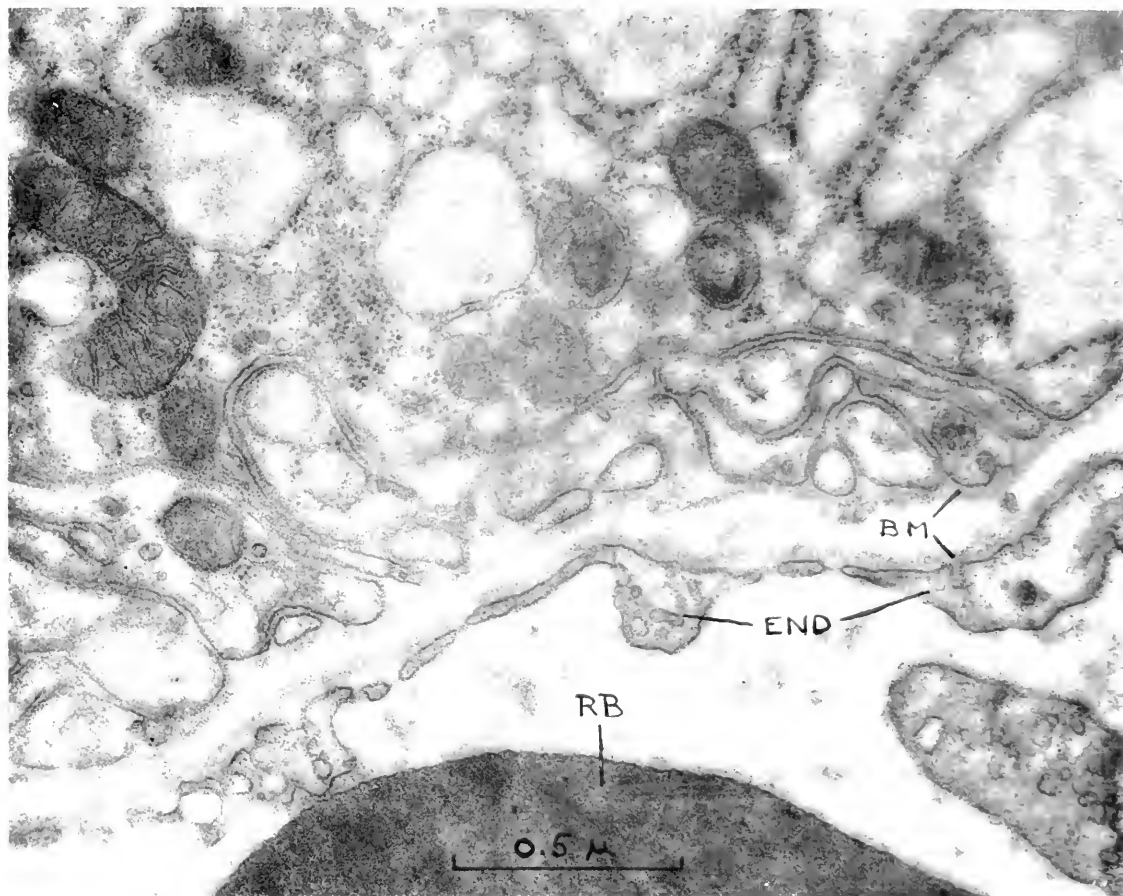


Fig. 2. Section through the basal part of a thyroid cell and a capillary showing endothelial discontinuities. BM = basement membrane; END = endothelium; RB = red blood corpuscle. Magnification = 62,000.

more or less distinct fairly dense membrane and the endothelial basement membrane continues uninterrupted over these areas. The width of the discontinuities is about 300 Å.

REFERENCES

1. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K., and PAKISCH, F., *Endocrinology* **53**, 123 (1953).
2. DEMPSEY, E. W. and PETERSON, R. R., *Endocrinology* **36**, 46 (1955).
3. EKHOLM, R. and ZILANDER, T., *Experientia* **12**, 195 (1956).
4. MONROE, B. G., *Anat. Rec.* **116**, 345 (1953).
5. NEWMAN, S. B., BORYSKO, I., and SWERDLOW, M., *J. Research Natl. Bur. Standards* **43**, 183 (1949).
6. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
7. SJÖSTRAND, F. S., *Experientia* **9**, 114 (1953).
8. — in POLLISTER, A. W., *Physical techniques in biological research*, Vol. III. New York, 1956.

Electron Microscopy of Chick Embryo Thyroid

R. STOLL, P. BLANQUET, A. P. LACHAPELE, R. MARAUD, and A. MAGIMEL

Fondation Bergonié and Faculté de Médecine, Bordeaux

ACCORDING to a previous investigation the differentiation of the chick embryo thyroid shows two successive periods (18). In the first one, before 12 days, the thyroid anlage concentrates very low quantities of radioiodine and is practically devoid of follicles. During the second one, the uptake of radioiodine raises suddenly and strongly together with the differentiation of the follicular structure. Differ-

ence between the two periods is closely associated with colloid synthesis.

The present investigation was undertaken to determine to what extent this phenomenon could be related to the development of the cytoplasmic canalicular structures which were described in the thyroid of adult mammals (4, 14, 15, 23, 24).

Normal thyroid glands were obtained from 36 embryos

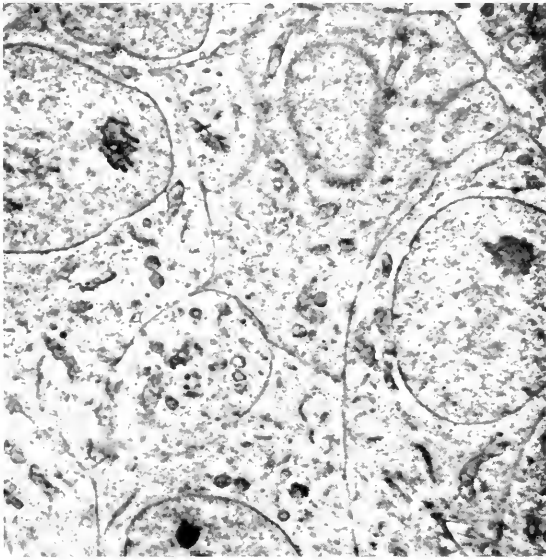


Fig. 1. Thyroid from a 9 days old embryo. The gland is of a cordal type and cells are practically devoid of canalicular structures and colloid. Mitochondria and small vacuoles are visible. Magnification 5000.

and chicks from 8 days of incubation to 13 days after hatching (Light Sussex). Thyroids were also removed from 18 embryos of 9 and 16 days previously treated at 3 days with thyroxine (0.001 mg) or tetramethylthiourea (1.5 mg). Choice and dosage of the drugs were established from our previous investigations. The glands were fixed in osmic acid, buffered according to Palade (1952) and embedded in *n*-butyl methacrylate. Sections 0.05 μ in thickness were cut with a Porter-Blum microtome and examined in a Philips electron microscope (Mod. 1951).

In the differentiation of the thyroid, electron microscope shows two periods identical to those previously described. In the first one, before 12 days of incubation, the canalicular structures and the colloid are very poor (fig. 1).

At 8 days, the gland consists of cellular cords which form spherules progressively later. Cellular nuclei contain a nucleolus and are ovoid, sometimes bean-shaped. The cytoplasm possesses a clearly discernible chondriome and numerous vacuoles variable in size and containing a pale substance. The canalicular structures, very scarce and small, lie generally at the periphery of the cell and show a clear lengthened center surrounded by a thin osmophilic wall. Between 2 or 3 epithelial cells, some small colloid droplets appear, containing filamentous protrusions, or microvilli inserted on the cellular membrane.

The second period is characterized by the differentiation of follicular colloid associated with sudden and general distribution of the canalicular structure. Its beginning is already discernible in the thyroid of 12 days old embryo. Sometimes the cell, very poor in canaliculi, presents the aspect of the preceding period; sometimes the cell, apparently devoid of vacuoles, appears clear and possesses numerous canaliculi which are short and fine (fig. 2); sometimes intermediary aspects are present. Generally speaking,

the small follicles are poor in canaliculi while the greatest are rich in such formations. The epithelial cords still persisting at this time, keep their initial structures. In the 13 days old embryo, the follicles increase in number and size while short canaliculi exist now in all the cells. Some osmiophilic projections, issued from granules of the apical part of the surrounding cells, are seen in the colloid.

Afterwards, the follicular structure is generalized in the thyroids removed from the 16, 17, 19 days old embryos. The long and twisted canaliculi fill then almost all the cytoplasm where they lie, following its larger amount. According to the disposition of the canaliculi, three states can be distinguished in the cells of the same follicle. Few cells are narrow and dark, because their canaliculi have almost joint walls and poor, lightly osmiophilic contents. The other cells are cuboidal in shape with a relatively clear appearance. This is caused by the canaliculi which are well developed and moderately filled with a pale ground substance. Among these elements, some cells show apical vacuoles which seem to be related to sectioning of highly dilated canaliculi, in the apical part of the cells. Between these vacuoles, osmiophilic granules, variable in size, are scattered. In all the cells, mitochondria are always covered with a canalicular sheet.

After hatching, the thyroid shows its well known follicular structure. Around the colloid, with its various osmophilic filaments, the three varieties of previously described cells form the follicular wall where a last cellular state is well recognizable (fig. 3). In this case, the canaliculi are so much filled with the pale ground substance that the cell shows an aspect of colloid degeneration. On the other hand, according to the observations of Monroe (14) on

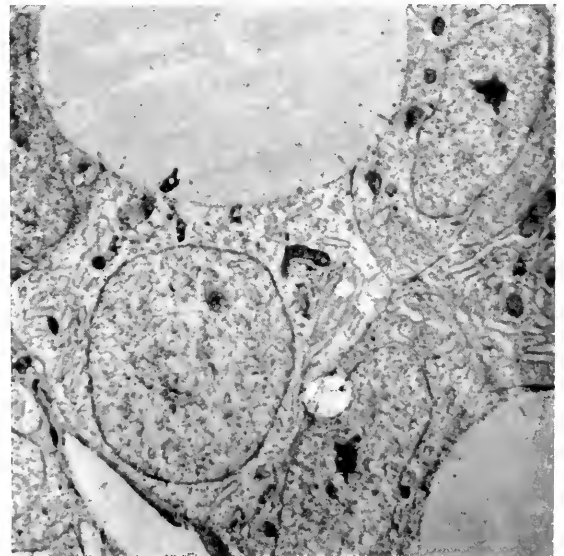


Fig. 2. Thyroid from a 12 days old embryo. The cells surrounding the follicular colloid present numerous fine canalicular structures. Magnification 5000.



Fig. 3. Thyroid from a just-hatched chick. The canalicular structures are well developed. In the apical part of some cells, osmiophilic granules and vacuoles, developed from canaliculi, are scattered. Note a sinusoidal capillary with endothelial cells. Magnification 2000.

the thyroid of the rat, the capillaries which surround the follicles of chick thyroid are of a sinusoidal type.

During the first period, thyroxine and tetramethylthiourea have no evident action on the thyroid. On the other hand, they produce specific changes in the second phase of the differentiation. Following treatment with thyroxine, a few cells appear normal, but the other present a washed-out appearance and are practically devoid of canalicular structures. The canaliculi which differentiate are very small and, according to Vidal (22), the formation of follicular colloid is very reduced. After administration of tetramethylthiourea, the follicles present columnar cells surrounding a reduced follicular cavity, as described by Adams and Bull (1). The cytoplasm is clear and filled by canaliculi which are strongly twisted by an abundant pale substance.

During the differentiation of the chick thyroid, the apparition of canalicular structures, permit to separate two periods which correspond to those previously observed after the use of radioiodine (16, 18).

In the first period, before 12 days, the colloid, the canaliculi and the uptake of radioiodine are very poor. In this case, the extracellular colloid droplets seen by electron microscope, correspond to the chromophobic colloid (21) and probably to the P.A.S. positive droplets of the classic microscopy (5, 19, 26). The role of the vacuoles and osmiophilic filaments in the colloid remain unknown.

In the second period, from 12 days, the physiological and histological differentiation of the thyroid advances rapidly. Radioiodine storage and hormonal synthesis increase strongly (2, 16, 20, 26). Simul-

taneously follicles differentiate and colloid develops (17, 21).

Interrelationships exist between these two groups of phenomena (18). Indeed, previous works on the thyroid of adult mammals have shown that the radioiodine is included in the follicular colloid, after a short passage through the glandular cells (11, 12). The radioiodine is also stored in the colloid of the chick embryo thyroid (10).

The iodine metabolism of the thyroid is therefore related to the colloid whose synthesis follows the apparition of the canalicular structures. Their sudden extension, between 12 and 13 days, explains the rapid increase of colloid development and radioiodine uptake.

The factors governing the formation of the canaliculi are an interesting subject for research. The most important point seems to be the embryonic hypophysis as shown by the use of thyroxine and tetramethylthiourea.

Indeed, following treatment with thyroxine, the formation of canaliculi and, consequently, the colloid elaboration are strongly inhibited. This hormone is known to act by the way of the hypophysis whose thyrotrophic function is reduced by a high level of thyroxine. On the other hand, the antithyroid compound produces an excessive canalicular development. This is due to the increase of the T.S.H. whose high level is demonstrated by the hypertrophy of the chick embryo thyroid (1, 8).

In conclusion, the development of the canalicular structures depends on the hypophysis which so controls the histophysiological differentiation of the thyroid, after 12 days. This explains the modifications of the embryonic thyroid when the hypophyso-thyroidal axis is affected by hypophysectomy (6, 7, 13), antithyroid drugs (1, 8), or in vitro culture (19).

Therefore, other factors, as iodide, can influence the canaliculi and colloid (unpublished data). Such a fact could explain the absence of thyroidal modifications sometimes observed after embryonic hypophysectomy (25).

REFERENCES

- ADAMS, A. E. and BULL, A. L., *Anat. Rec.* **104**, 421-438 (1949).
- BLANQUET, P., STOLL, R., MARAUD, R., and CAPOI, L., *Compt. rend. soc. biol.* **147**, 676-678 (1953).
- BERNHARD, W., HAGUNAU, F., GAUTHIER, A., and OBRING, C., *Z. Zellforsch.* **37**, 281 (1952).
- BRAUNSTEINER, H., FETTINGER, K., and PAKISCH, F., *Endocrinology* **53**, 123-133 (1953).
- CARPENTER, E., BLAHEY, J., and CHAMBERS, R. D., *J. Exptl. Zool.* **127**, 249-269 (1954).
- FUGO, N. W., *J. Exptl. Zool.* **85**, 271-297 (1940).
- FUGO, N. W. and WIESCH, E., *Acta biologica latvica* **8** (1938).
- GROSSOWICZ, N., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **32**, 51 (1946).
- HAGUNAU, F. and BERNHARD, W., *Arch. Anat. Micr. et Morphol. Exp.* **44**, 27-55 (1955).
- HANSBOROUGH, L. A. and MUSTAPHA KHAN, *J. Exptl. Zool.* **116**, 447-452 (1951).

11. LEBLOND, C. P., *J. Anat.* **77**, 149–152 (1943).
12. LEBLOND, C. P. and GROSS, J., *Endocrinology* **43**, 306–324 (1948).
13. MARTINDALE, F. M., *Anat. Rec.* **79**, 373–393 (1941).
14. MONROE, B. G., *Anat. Rec.* **116**, 345–362 (1953).
15. NÓSEDA, J., *Z. mikroskop.anat. Forsch.* **60**, 192–204 (1954).
16. STOLL, R. and BLANQUET, P., *Ann. Endocrinol.* **13**, 569–577 (1952).
17. STOLL, R., BLANQUET, P., MARAUD, R., and CAPOT, L., *C.R. Ass. Anat. XL^e réunion*, 785 (1953).
18. STOLL, R., MARAUD, R., BLANQUET, P., MOUNIER, J., and MEYNIÉL, G., *Ann. Endocrinol.* **17**, 15–32 (1956).
19. TIXIER-VIDAL, A., *Compt. rend. soc. biol.* **149**, 1377–1379 (1955).
20. TRUNNEL, J. B. and WADE, F. T., *J. Clin. Endocr. Metab.* **15**, 107–117 (1955).
21. VENZKE, W. G., *Am. J. Vet. Research* **10**, 272–281 (1949).
22. VIDAL, A., *Ann. Endocrinol.* **14**, 444–449 (1953).
23. WALTHARD, B., *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* (1955).
24. WEBER, G., ZAMPI, G., and IGNESTI, V., *Arch. de Vecchi* **22**, 297–308. (1954).
25. WOLFF, E. and STOLL, R., *Compt. rend. soc. biol.* **126**, 1215–1217 (1937).
26. WOLLMANN, S. H. and ZWILLING, E., *Endocrinology* **52**, 526–535 (1953).

Preliminary Studies on the Development and Differentiation of Cells and Structures of the Renal Corpuscle

B. V. HALL and L. E. ROTH

Department of Zoology, University of Illinois, Urbana, and Division of Biology and Medicine, Argonne National Laboratories, Lemont, Ill.

SOON after Bowman published his classical description of the Malpighian corpuscle, Gerlach (1) described the glomerular capillaries as lying between an invaginated double layer of cells extending from the inner wall of the capsule, as the intestine lies within the double layered peritoneum extending from the abdominal wall. Zimmermann (11) relied heavily on Gerlach's concept in developing his much disputed hypothesis of a glomerular "mesangium". More recently others have employed Gerlach's idea as a basis for a modified mesangial theory. In the modified theory (7), it is supposed that a special limited space, termed in a specific sense "intercapillary space", lies between the limbs of hypothetical capillary loops. Both mesangial cells and intercapillary space are imagined to be separated from capsular space by invaginated, two layered extensions of the basement membrane and cells of Bowman's capsule.

Hall (3) has obtained many convincing photographs which afford no evidence that the glomerulus is formed of simple capillary loops, as Vimtrup (10) thought. If glomerular capillaries are not arranged as simple loops, then the whole theory that the Malpighian body is formed by invagination of capillary loops into a blind, terminal vesicle of a renal tubule must be held questionable. In this respect, it is important to note that the able embryologist Huber (6) stated nearly fifty years ago, "the renal corpuscle consists of a double-walled capsule, the glomerular capsule, usually spoken of as the invaginated end of the renal tubule, though it is not developed by invagination". Huber (5) agreed fully with Herring's (4) earlier conclusion that glomerular differentiation takes place largely by "proliferation" and "readjustments" of its cells.

To obtain a clearer understanding of the nature

of the cells and structures of the mature glomerulus and of the embryonic processes involved in their formation, we began some time ago to investigate developmental stages of the Malpighian body by examination of thin sections under the electron microscope.

Immediately after decapitating 1–5-day-old rats, small blocks of tissue, about 1 mm on edge, containing immature glomeruli were removed from cortical regions of their kidneys. The blocks were fixed in 1% buffered OsO₄ solution, as described by Palade (8). Washed and alcohol-dehydrated tissues were embedded in a 19:1 butyl-methyl methacrylate mixture. The sections were cut with glass knives on a modified Minot International microtome at $\frac{1}{20}$ and $\frac{1}{40}$ μ . Before viewing them in a RCA-EMU-2 electron microscope, the sections were mounted on grids with formvar membranes and immersed in toluene for several minutes to remove the plastic in order to increase image contrast.

The earliest stages were recognizable chiefly by the total pattern of all constituent cells, since individual cells showed few or no specializations. The cells were arranged in solid masses with two outer layers arranged somewhat concentrically around a central group of cells showing no discernible organization. In these earliest stages, cell membranes were difficult to detect, especially between cells of the inner cell mass. However, the external surfaces of the cells of the inner mass (prospective endothelial cells) and of the inner concentric layer of cells (Bowman's visceral layer, or prospective podocytes (2, 3)), where they were opposed to each other, appeared to develop prominent surface membranes very early. No definitive capillary basement membrane, or lamina densa (2, 3) was observed in these early stages. Only the prominent, opposed surface membranes of the pro-

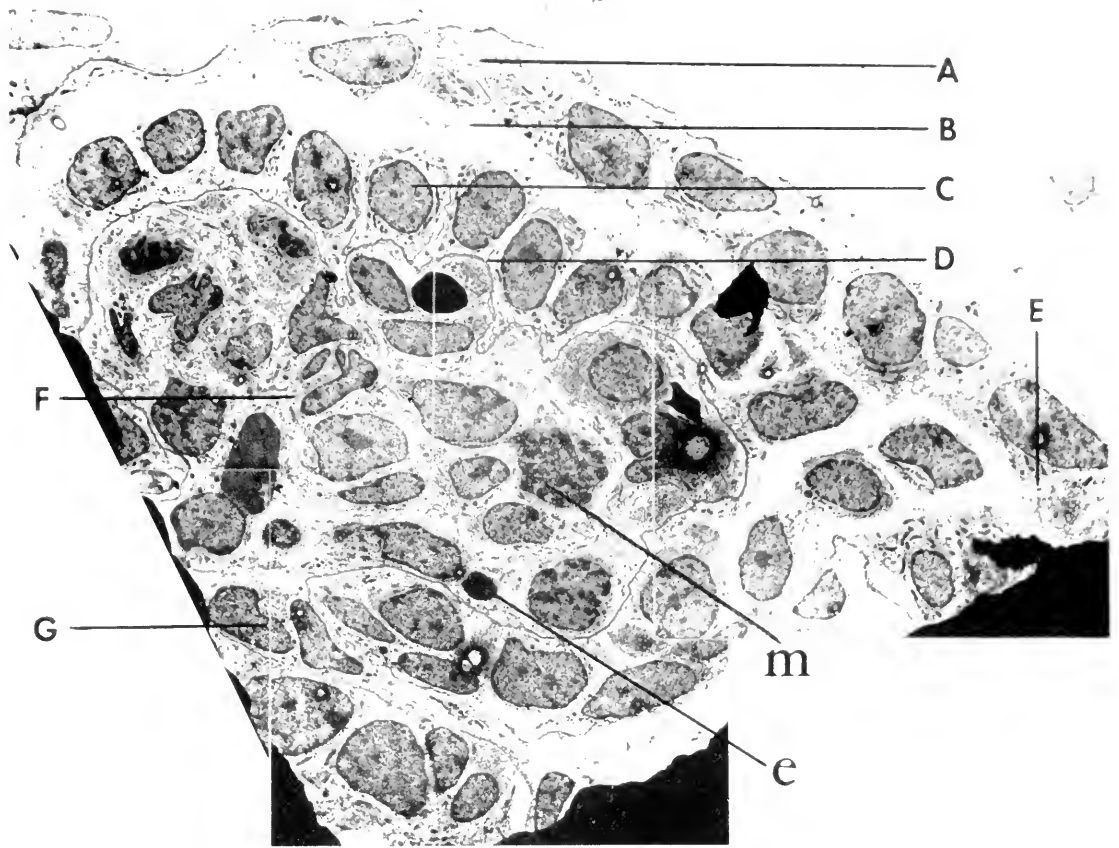


Fig. 1. Photomontage of electron micrographs of an early stage of a developing, rat renal glomerulus, with prospective endothelial cells but without capillaries, or capillary structures. (A) Bowman's capsular epithelium, and thin capsular basement membrane characteristic of these early stages. (B) Initial capsular space, seemingly developed by separation of the two epithelial layers. (C) Prospective podocytes, or Bowman's visceral epithelial layer. (D) Prominent cell surface membranes between the outermost prospective endothelial cells and the prospective podocytes. Especially noteworthy are the absence of a capillary basement membrane, and the short, broad extensions of podocytic cytoplasm between the prospective endothelial cells. (E) These extensions may play an important role in the organizing of prospective endothelial cells into the capillary system characteristic of the glomerulus. (F) Two cells of an immature arteriole. (G) Capsular connection with tubule. Note within the mass of prospective endothelial cells, the mitotic figure, *m*, and the precocious erythrocytes, as *e*, and the complete absence of formed capillaries. Osmium fixed. Magnification = 2065.

prospective endothelial and podocytic cells were seen bounding the narrow space which in a later stage would be occupied by lamina densa.

During these early stages of development, the basement membrane of Bowman's capsule appeared very tenuous. It had much the appearance of a fused, thickened membrane on the external surface of the prospective parietal epithelium. Flattening of the outermost concentric layer of cells and the concomitant initial definite appearance of a limited capsular space was the next recognizable advance in the differentiation of the Malpighian corpuscle. Pronounced mitotic activity of the prospective endothelial cells characterized this stage (fig. 1). The flattening of the prospective parietal cells, and the enlargement, perhaps even the initiation, of Bowman's capsular space may depend upon the elaboration and accumulation of fluid between the parietal and visceral

layers of Bowman's capsule. Capsular space appears to arise from separation of the parietal and visceral epithelial layers. It then enlarges. If invagination played a major role in glomerular development capsular space should decrease. These facts support the concept that in the rat the renal corpuscle is not developed by invagination.

Differentiating podocytes, after developing prominent surface membranes, usually appeared partially separated from each other. It appears that membrane formation was important to the separation process. Increase in surface area of the inner cell mass, afforded by mitotic division and growth of the prospective endothelial cells, may be an added important, mechanical factor tending to induce separation of the developing podocytes.

The next observed advance in glomerular development was initiation of formation of complex folds

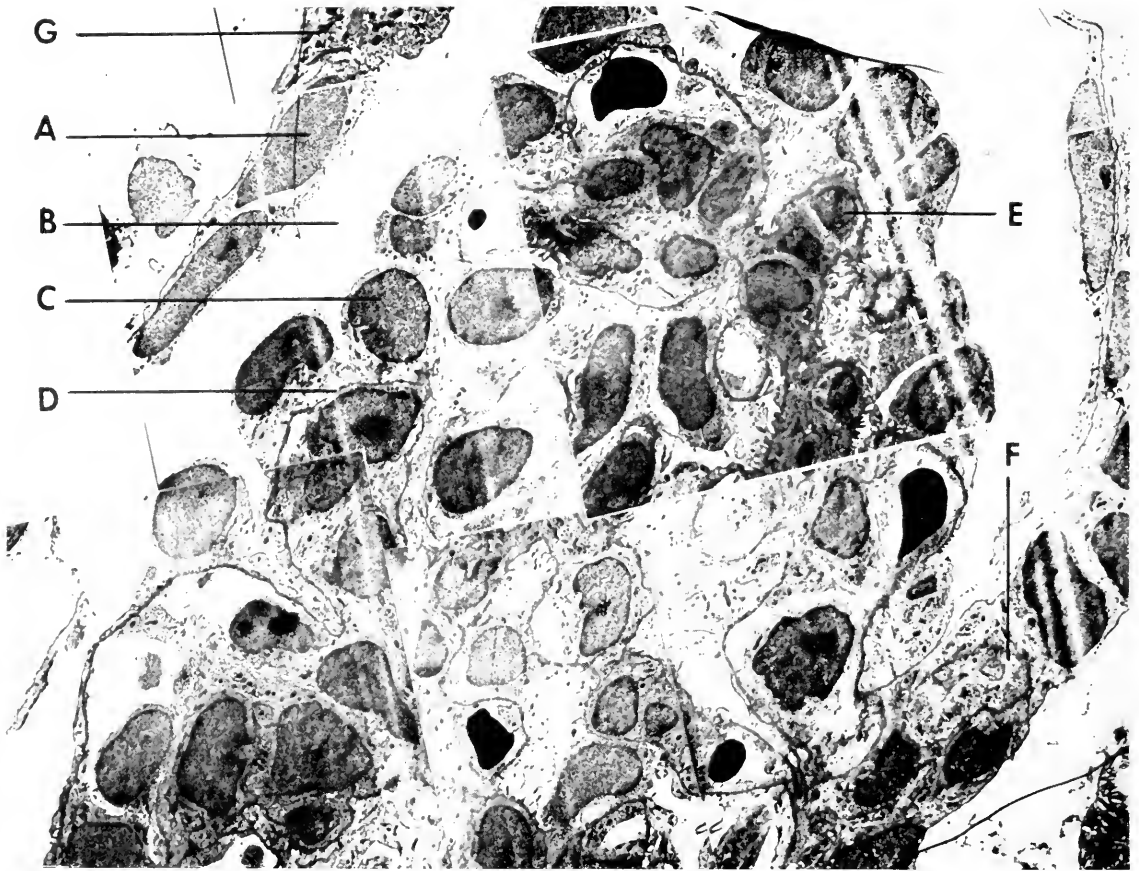


Fig. 2. Photomontage of electron micrographs of a later stage in the development of the rat renal glomerulus, demonstrating the early formation of the lobular organization, and initial stages of capillary formation. These incompletely differentiated capillaries are characterized by a very limited and apparently discontinuous capillary lumen, and by large, connecting masses of still undifferentiated endothelial cells, and by the presence of few differentiated endothelial cells. The capillary spaces appear to develop by the expansion and subsequent fusion of intra-cytoplasmic spaces which develop within the differentiating endothelial cells. (A) Capsular epithelium, and basement membrane, still characteristically thin. (B) Much enlarged capsular space. (If invagination played an important role in glomerular formation, this space should be reduced, not enlarged.) (C) Maturing podocytes, developing discrete processes, pedicels and trabeculae, and greatly increasing in size. (D) The cell surface membrane of the podocyte, which folds to form the numerous pedicels and trabeculae, while the definitive capillary basement membrane forms in intimate relationship with the surface membrane of the endothelial cells. (E) Prospective and differentiated endothelial cells. (F) Maturing arteriole. (G) Connection with tubule. Magnification $\times 2025$.

and processes in prospective podocytes. The mature podocyte (2, 3) is characterized by an extensive and complex system of relatively large processes, the trabeculae, and numerous, minute, interdigitating, terminal processes, the pedicels (foot-processes) which arise bilaterally from more or less parallel trabeculae radiating from the central mass of each podocyte. Differentiating podocytes acquired first, short, relatively broad processes, like those in fig. 1, which appear to fit into irregular spaces between the peripheral prospective endothelial cells. In later stages, it appears that these apparent processes have developed into ridges, or processes (the trabeculae), which are 30–40 μ long in some instances. They seem to penetrate into the compact inner mass of prospective endothelium and to separate prospective endothelial cells into connecting groups of primordial capillaries that differentiate later into definitive capil-

laries (fig. 2). The first, short, crude podocytic processes seemed to have few or to lack completely discrete pedicels. The elongated processes, however, showed numerous, typical, bilaterally arranged pedicels. Podocytic processes appeared to develop by folding of the cell surface, and by extension of discrete, cytoplasmic processes. The entire elaborate system of large and small processes forms only from the surface of a podocyte opposed to the surface membrane of the differentiating endothelium. Although the present study does not establish with certainty that growth of podocytic processes into the unorganized mass of prospective endothelium plays an active role in organizing the primordial capillaries and lobules, the evidence of the electron micrographs is in full accord with such a view.

Capillary lumina or enlarged cytoplasmic vesicles were not found in prospective endothelial cells in

the earliest stages of development, but in slightly later stages an occasional erythrocyte was present in the central mass of prospective endothelial cells. Lumina appeared to develop later in the solid primordial capillaries. Lumina appeared to begin development with the appearance of large cytoplasmic vesicles within individual endothelial cells. Later as the vesicles appeared enlarged, the endothelial cytoplasm, except around nuclei, appeared attenuated. The impression was gained that the continuous capillary lumina of mature capillaries is formed by the subsequent fusion of enlarged, individual cytoplasmic vesicles. In figs. 1 and 2, it is to be noted that some vesicles appear filled by a fully differentiated erythrocyte. This may be interpreted to mean either that erythrocytes differentiate *in situ*, or that the vesicles are apparent only and exist merely as tangential sections of lateral outpouchings of continuous, patent capillary lumen filled with plasma and erythrocytes. The validity of either possibility can be determined with certainty only by means of a large series of serial sections not available now. Yet, the presently available sections, including some serial ones, through about ten immature glomeruli have produced no support for the second interpretation. From a statistical point of view, it is very unlikely that all sections through many immature capillaries and several arterioles were cut tangentially so that all failed fortuitously to show evidence of a continuous, patent capillary lumen in any of the earliest stages of glomerular formation.

The impression is readily gained from close scrutiny of the electron micrographs that the lamina densa (definitive glomerular capillary basement membrane) forms only in close, intimate relationship with the smooth, continuous, endothelial cell surface membrane. It has not been found extending into or following the numerous folds of the podocytic cell surface membrane. Yet, it appeared rather frequently to extend or form to some degree between two endothelial cell surfaces within the walls of the primordial capillaries. These observations, along with the frequently observed close relationship of the lamina densa to endothelial cell nuclei, afford support to the view that lamina densa formation is dependent upon the presence or activity of external surface membranes of the endothelial cells. The proximal surface membranes of the podocytic cells may form, or play a role in the formation of the lamina densa, but they often appeared much less intimately associated with the developing lamina densa, than did the endothelial surface membranes.

It is of interest to note that soon after its earliest appearance, the lamina densa had attained a width

characteristic of the adult glomerulus. The basement membrane of Bowman's capsule in these same glomeruli (fig. 2) often appeared thinner than the lamina densa. In adult kidneys the basement membrane of Bowman's capsule usually appears much thicker than the lamina densa, often several times as thick. The continued increase in thickness of the capsular basement membrane, and its lamination and fibrous nature in fully matured Malpighian bodies appear to completely distinguish capsular basement membrane from lamina densa.

The electron micrographs do not support the old belief that capillaries invaginate the blind end of a nephron, but they do show clearly that glomerular capillaries differentiate *in situ* from an unorganized mass of prospective endothelial cells, such as Herring (4) and Reinhoff (9) had found. Previously, Hall (2, 3) has shown clearly that the lamina densa (definitive glomerular basement membrane) is the only basement membrane in the capillary wall, and in this study it is demonstrated that lamina densa forms only in direct and intimate contact with the surface membranes of prospective endothelial cells. It clearly follows that there can be no embryological basis for the old belief that a two-layered fold of Bowman's capsule extends from capillary to capillary, enclosing a mesangium and/or a limited intercapillary space between limbs of imaginary capillary loops. If the preliminary data and interpretations reported here are fully substantiated by future studies, then Gerlach's old idea of a glomerular peritoneum, and its modern counterparts, Zimmermann's "mesangium" and "intercapillary space" in the special sense of McManus and others, must be replaced by concepts of glomerular structure which are in accordance with the known embryological and anatomical facts.

REFERENCES

1. GERLACH, J., *Arch. Anat. Physiol. u. wiss. Med.*, p. 378 (1845).
2. HALL, B. V., Proc. Vth Ann. Conf. on the Nephrotic Syndrome, p. 1. Natl. Nephrosis Foundation, New York, 1953.
3. — Proc. VIIth Ann. Conf. on the Nephrotic Syndrome, p. 1. Natl. Nephrosis Foundation, New York, 1955.
4. HERRING, P. T., *J. Pathol. Bacteriol.* 6, 459 (1900).
5. HUBER, G. C., *Am. J. Anat.* 4, Suppl., 1 (1905).
6. — The Harvey Lectures, p. 100 (1909-10).
7. McMANUS, J. F. A., *Am. J. Pathol.* 24, 1259 (1948).
8. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* 95, 285 (1952).
9. REINHOLF, W. F., *Johns Hopkins Hosp. Bull.* 33, 392 (1922).
10. VIMRUP, B., *Am. J. Anat.* 41, 123 (1928).
11. ZIMMERMANN, K. W., *Z. mikroskop. anat. Forsch.* 32, 176 (1933).

Further Studies on the Nephron Ultrastructure in Mouse: Terminal Part of Proximal Convolution

J. RHODIN

*The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy,
Karolinska Institutet, Stockholm*

LIGHT and fluorescent microscopic studies (4) proved structural differences between different parts of the proximal convoluted tubule of the mouse nephron. Analyses of the nephron by means of electron microscopy (3, 7) dealt with the first part of the proximal convolution. The present report gives some data concerning the terminal part of the proximal convolution, and demonstrates characteristic features of its tubular cells, proving differences also at an ultrastructural level.

White female mice were decapitated and within 2 minutes small pieces of kidney tissue were immersed in 1 per cent isotonic osmium tetroxide buffered at pH 7.2 (1, 3, 5). The duration of the fixation was 60 minutes. After dehydration in alcohols and embedding in methacrylate, a Sjöstrand Ultra Microtome was used for sectioning and an RCA EMU 2c electron microscope for examination of the sections.

The tubular cells of the terminal part of the proximal convolution have a height of 5–8 μ , the value decreasing towards the first straight part of Henle's loop. In most cases, a free lumen is present which tallies with light microscopic findings after fixation with freeze-drying method. The luminal part of the cell is fitted with brush border extensions, all free from each other. This general arrangement of brush border extensions was described and illustrated with micrographs for the first part of the proximal convolution (3). With the tubule dilated this arrangement is easier to interpret in the terminal part. The extensions are covered with a 60 Å thick cell membrane. Between the bases of the brush border extensions are tubular invaginations of the surface membrane. However, they are less abundant than in the first part of the proximal convolution. The invaginations reach 0.1–0.2 μ into the cell. The bottom of the invaginations is usually slightly extended. The basal part of the cell faces the basement membrane with a 50 Å thick plasma membrane. This membrane shows but few of the infoldings, β -cytomembranes (6), so characteristic of the first part of the nephron. It has been noticed that there is a tendency for these folds to decrease both in number and height from the neck of the nephron towards the first straight part of Henle's loop. The scarcity of infoldings is a typical feature of the terminal part of the proximal convolution and facilitates the recognition of its tubular cells.

The basement membrane is a homogeneous, 800 Å thick, structureless layer. It is separated from the adjacent plasma membrane by a 180 Å wide space. The mitochondria are few and of oval shape with a

diameter some times exceeding 0.5 μ . Their ultrastructure is identical with what has earlier been described in tubular cells (3, 7). Microbodies with a diameter of 0.1–0.3 μ are present with a single outer membrane, the thickness of which is 50 Å. They lack inner membranes and thus can easily be distinguished from mitochondria. A small Golgi apparatus can be found with pairs of membranes as the main component. Large opaque granules and large vacuoles are present to the same extent as in the first part of the nephron. Their size is usually larger than 0.5 micron. Both large granules and the vacuoles are surrounded by a single membrane with a thickness of 50 Å. No connections have been traced between large vacuoles and tubular invaginations. Thus, it

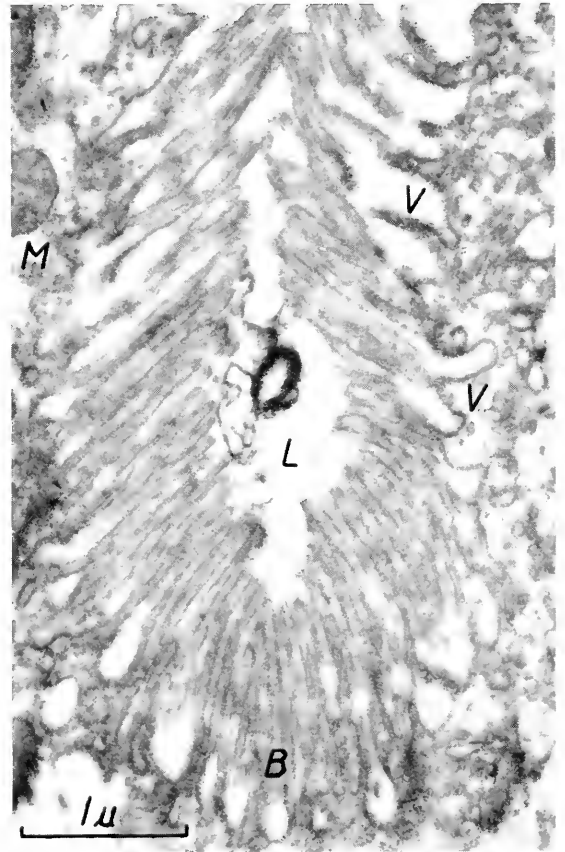


Fig. 1. Brush border zone with a free lumen (L). At the bases of the brush border extensions (B) are widened tubular invaginations (V). In close connection a mitochondrion (M). Magnification $\times 20,000$.

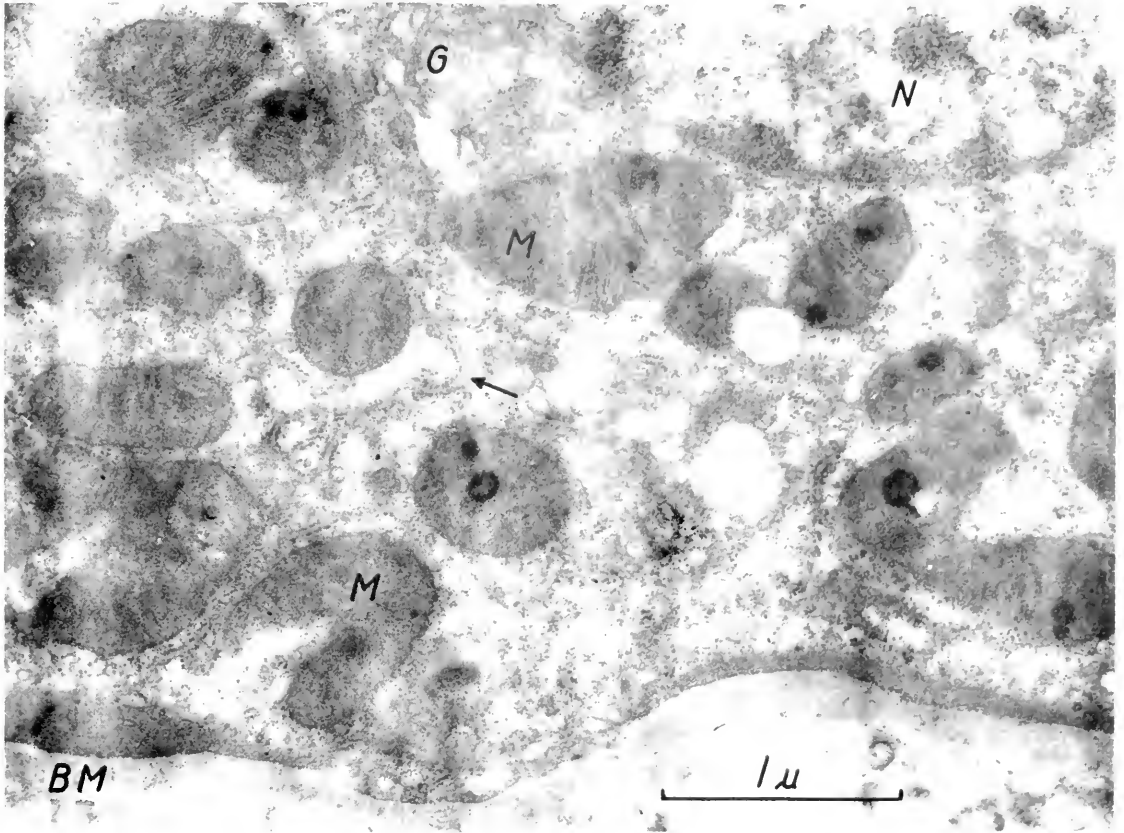


Fig. 2. Basal part of a cell from the terminal part of proximal convoluted tubule. Towards the basement membrane (BM) is seen the plasma membrane without infoldings, in places with a high density of the adjacent cytoplasm. Mitochondria (M) of round or oval shape. Some α -cytoplasmic membranes (arrow) with attached 160 Å thick granules. Parts of Golgi apparatus (G) and nucleus (N) are seen. Magnification = 30,000.

does not seem probable that the tubular invaginations develop into vacuoles, which makes the suggestion by Pease (2) seem doubtful.

The cytoplasm of the cells from the terminal part contains 160 Å large granules arranged either singly, or in aggregations of 4–6. The granules are more scarce than in the first part of the proximal convoluted tubule, which gives the cytoplasm of the terminal part a less dense appearance. The granules have not been found in the brush border extensions, as claimed by Pease (2). There may be a difference between mouse and rat. Several high resolution electron micrographs of brush border extensions from the first part of the proximal convoluted tubule have been published (3), where no granules are to be seen. These findings indicate that the cytoplasm of the brush border differs markedly from that of the rest of the cell. This structural difference may be related to functional differentiation of the cells. In very rare cases short α -cytoplasmic membranes (6) with the typical attached 160 Å granules occur in the cytoplasm. Occasionally, these may also be encountered in the cells of the first part of the proximal convoluted tubule of the mouse kidney.

This study of the mouse nephron has made it

possible to correlate light and electron microscopic findings as far as the lumen of the terminal part of the proximal convoluted tubule is concerned. In both cases a wide lumen has been demonstrated, although two different methods of fixation were used. The question of a free lumen in the first part of the proximal convoluted tubule is not yet settled by the statement of Pease (2) that a variation in cellular water content is responsible for the presence or absence of a free lumen. Of course, the present author does not deny that a free lumen exists *in vivo*, but after fixation with both osmium tetroxide by immersion and by freeze-drying the lumina of the proximal convoluted tubule are always found to be closed. In contradistinction to this, using the same fixation methods, the lumina of the terminal part of the proximal convoluted tubule are found to be open.

According to Pease (2), a "hydration" of the tubule cells is responsible for the closing of the lumen when the common fixation technique of immersion is used. He believes that the cells "pick up" water and that they then should be regarded as "swollen" cells. However, if this be true, it seems likely that the density of the cytoplasm of a swollen cell should be less than that of a non swollen cell. Still, in our

cases, the cytoplasm of the cells of the first part of the proximal convolution looks denser than that of the terminal part.

A free lumen throughout both the first and terminal parts of the proximal convolution has been proved to exist after intravenous injection of phlorizin as well as diodrast (Rhodin, unpublished observations). Either injection caused a heavy diuresis. In these cases, the kidney was fixed according to the standard procedure described previously (3). The cells of the first part of the proximal convolution fixed after induction of diuresis show isolated brush border extensions, as well as "dome" cells of normal appearance without brush border extensions. At the same time there is a clear-cut difference between cells of the first and terminal part of the proximal convolution as far as the density of the cytoplasm is concerned. In these diuretic kidneys, no "hydration" (2) was found to close the lumen. The explanation is no doubt that the injected diuretics cause such heavy accumulation of water in the lumen that it expands the whole tubule. The importance of the technique used by Pease (2) is not to be questioned here. On the other hand, many facts prove that the common technique of immersing the tissue is also reliable, at least when a thorough knowledge of the

normal light microscopic picture is employed as the basis for extended analyses with the electron microscope.

What has to be stressed is the fact that not only a free lumen of the present investigated part is in most cases demonstrable but also characteristic cellular features like few, rounded mitochondria, poor density of the cytoplasm, and few or almost absent infoldings of the plasma membrane.

This study has been supported through a grant from Stiftelsen Gustaf och Tyra Svenssons minne.

REFERENCES

1. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
2. PEASE, D. C., *Anat. Record* **121**, 723 (1955).
3. RHODIN, J., Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convoluted Tubule Cells of the Mouse Kidney. Karolinska Institutet, Stockholm, 1954.
4. SJÖSTRAND, F. S., *Acta Anat., Suppl.* **1**, (1944).
5. — *J. Cellular Comp. Physiol.* **42**, 15 (1953).
6. — in *Physical Techniques in Biological Research* (OSTER and POLLISTER, eds.), Vol. III, p. 241. Academic Press, New York, 1956.
7. SJÖSTRAND, F. S. and RHODIN, J., *Exptl. Cell Research* **4**, 426 (1953).

The Fine Structure of Brown Adipose Tissue in the Rat: with Observations on the Cytological Changes Following Starvation and Adrenalectomy

J. D. LEVER

Department of Anatomy, Cambridge University, Cambridge

THE main body of current opinion is that brown fat is merely a form of adipose tissue and not an endocrine gland as Cramer (1) believed. The works of Wertheimer and Shapiro (14) and Fawcett (3, 4, 5) suggest the active synthesis of glycogen and lipid within adipose tissue. In brown fat cells fuchsinophile "secretion-like" granules have been described by Rasmussen (12) while Sheldon (13) believed in a direct transformation of mitochondria into lipid droplets.

This paper presents a short light and electron microscopic study of brown fat in the normal, starved and adrenalectomised rat. Tissue for electron microscopy was fixed in Dalton's (2) dichromate-osmic solution for 45 mins., methacrylate-embedded and sectioned at approximately 150 Å.

Normal brown fat—Light microscopy: The multi-molecular lipid distribution in brown fat is well seen after Sudan black staining, the lipid droplets ranging in diameter from 0.5–7 μ within any cell. It is con-

sidered likely that fuchsinophile bodies, demonstrated by methyl green acid fuchsin staining, are mitochondria in oval or rounded shapes (0.5–1 μ d.) grouped between and around the fat droplets. In size and position these fuchsinophile bodies exactly correspond to phospholipid-positive granules demonstrated by the Baker acid haematein stain.

Normal brown fat—Electron microscopy: Apart from short invaginations into the cell, the plasma membrane is uncomplicated and is covered throughout its extent by a basement membrane. The endoplasmic reticulum (10, 11) in brown fat is inconspicuous and consists of a small saccular component, and a granular component (150 Å d.) which is aligned along the outer walls of the saccular component or occurs independently in the cytoplasm. The nuclear membrane is bilaminar: there are no special features of the nucleoplasm. Throughout this study the Golgi apparatus was not convincingly demonstrated.

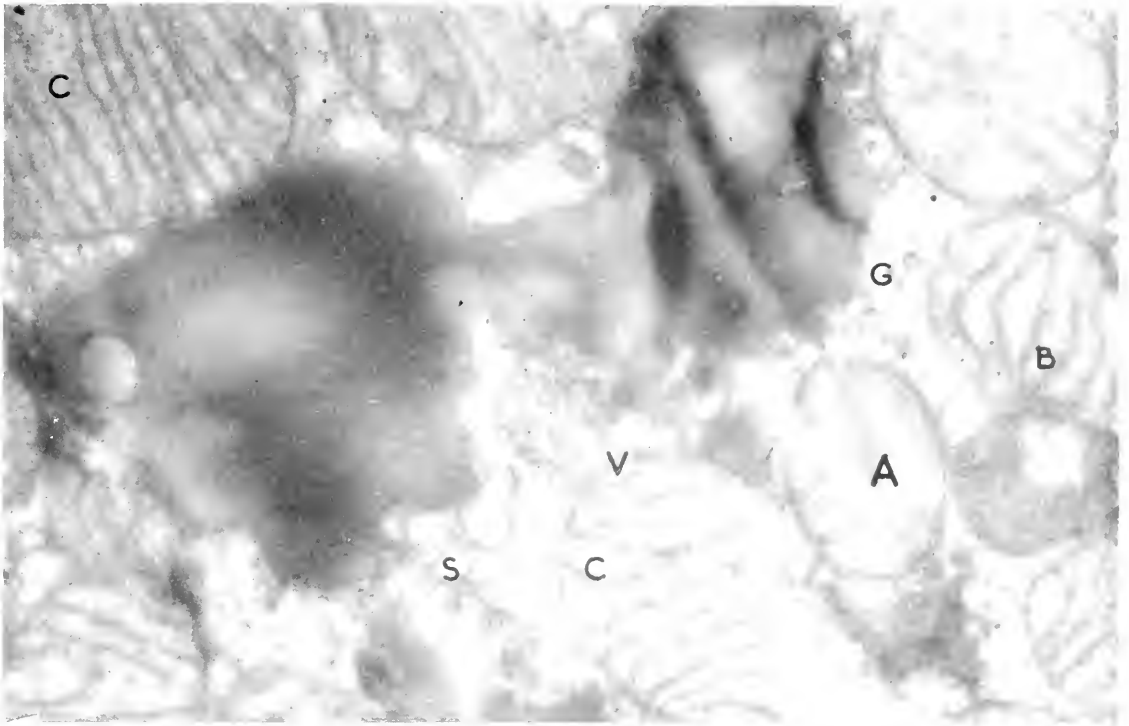


Fig. 1. Part of a normal brown fat cell. Mitochondria mostly have regular cristae some of which are beaded (B). Inter-cristal sections account for the appearance of such bodies as (A). Some mitochondria have vesicular internal membranes at one pole (V) and tiny vesicles are sometimes seen between the cristae (C). Lipid droplets lie freely in the cytoplasm and often interconnect. Endoplasmic reticular elements include a saccular component (S); the granular component (G) occurs independently, and in association with the saccular component. Magnification = 61,000.

The mitochondria are not markedly pleomorphic; although found anywhere in the cytoplasm they are commonly clustered around lipid droplets. From direct measurements their average cross-sectional diameter was calculated as 0.86μ . In some parts of its extent the mitochondrial enclosing membrane may be deficient, and often at points of contact with lipid droplets (fig. 3); osmiophile material may extend between droplet and mitochondrion at such a breach. Mitochondrial internal membranes consist for the most part of double membranes arranged in

parallel cristae of varying length (fig. 1) but vesicular components (figs. 1 and 2) may be admixed with the cristae or concentrated towards one pole as observed in the parathyroid mitochondria (9). The inter-cristal distance may range from 250 to 850 Å throughout the tissue, with a narrower variation within individual mitochondria. The thickness of the cristae (double membrane plus contained space) shows a similar individual and general variation between 150–350 Å. The broadest cristae are usually most widely separated and are frequently beaded

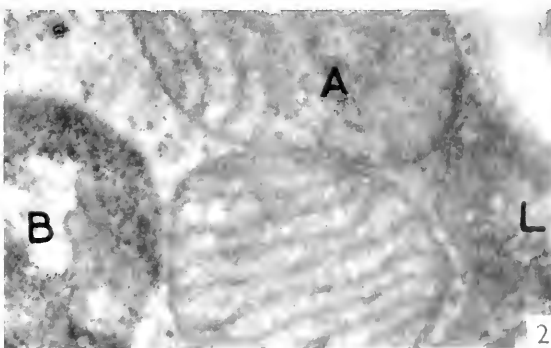


Fig. 2. The mitochondrion (A) contains both cristae and vesicles. The body (B) contains intensely osmiophile vesicles and is intermediate in appearance between the mitochondrion (A) and the lipid droplet (L). Note vesicular components in lipid droplet (see fig. 4). Magnification = 47,000.

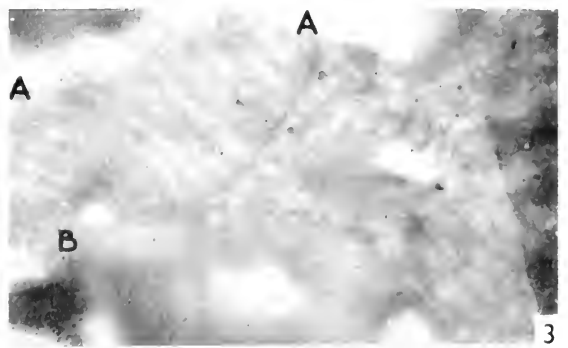


Fig. 3. The mitochondrion shown is freely open to lipid drops along the line A-A and at B. Magnification = 47,000.

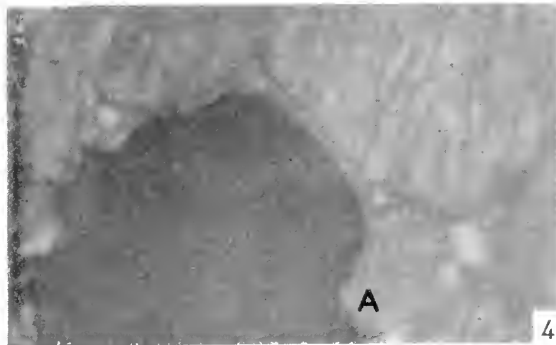
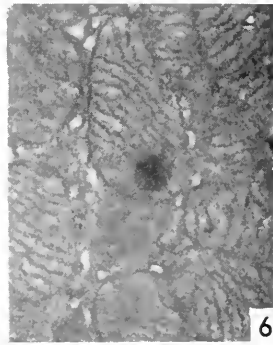
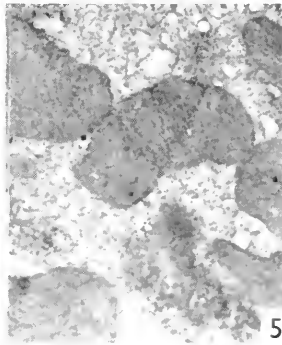


Fig. 4. In this field a vesicular component can be seen at (A) and is partially masked by the osmiophile material in the lipid droplet. Magnification = 47,000.



Figs. 5-6. Fig. 5 is a small representative field of a normal brown fat (control) cell while fig. 6 is a comparable field from the same animal after 7 days starvation. There is a marked increase in the number of mitochondria per unit area during starvation (see text). Both figs. 5 and 6, magnification = 24,000.

(figs. 1 and 2). Between the internal membranes is a semiopaque matrix material and should the plane of section be intercrystal the entire mitochondrial outline is then occupied by this matrix.

In addition to obvious lipid droplets and mitochondria, other bodies of an intermediate appearance are frequently found in proximity to the lipid droplets. There is evidence of an enclosing membrane to some but not all of these bodies, which resemble mitochondria in size and shape and contain intensely osmiophile internal vesicles (fig. 2). Fat droplets are unconfined by a membrane and lie freely within the cytoplasm (fig. 1). They are often seen to contain vesicular elements (fig. 4) resembling those already described within the "intermediate" bodies.

Changes in starvation and after adrenalectomy: The reaction of brown fat is similar in both these circumstances but the observed changes are more profound and of more rapid onset in starvation. These changes are: (a) A reduction in total lipid within the tissue and a concurrent diminution in droplet size as judged by light and electron microscopy. After 7 days starvation and in 21-28 days after adrenalectomy, there is: (b) a reduction in cell volume (estimated with the light microscope by direct measurements of cross-sectional cell diameters) of from 25-50 %, and (c) a two-fold (approximately) increase over normal in the number of mitochondria per unit area of fat cell (figs. 5 and 6). This last estimate was based on direct counts in electron micrographs of similar magnification.

Discussion.—It is of considerable significance that the size range, as measured by the light microscope, of $\frac{1}{2}$ -1 μ for the phospholipid-positive bodies and fuchsinophile bodies (mitochondria) and the smallest sudanophile droplets, should be comparable to mitochondrial average size (0.86 μ d.) as estimated from electron micrographs.

It is conceivable that the beading (figs. 1 and 2) of mitochondrial cristae in brown fat cells may precede their fragmentation into filaments or vesicles. This

would account for the mixture of these two types of internal membranes in many mitochondria. It has been suggested that lipid appears within the mitochondria of the adrenal cortex (6), the corpus luteum (7) and possibly the parathyroid (9). From the evidence of the present investigation it is considered probable that mitochondrial internal membranes in the brown fat cell become modified from a predominantly crystal to a vesicular form. The appearance of lipid within the mitochondria is concurrent with this modification.

As already stated the lipid droplets within brown adipose tissue lie freely within the cytoplasm. Therefore if, in fact, lipid does appear within the mitochondria then these bodies either discharge it freely into the cytoplasm through breaches in their limiting membranes or these membranes disintegrate around a contained droplet. Deficiencies in mitochondrial enclosing membranes have previously been reported (8) in the rat and hamster adrenal cortices. The series of events within mitochondria that has been described results in considerable alteration of their fine structure and, in all probability, in their complete destruction. An expendibility of mitochondria such as is postulated has already been described in the adrenal cortex (8). The observed increase in the number of mitochondria during starvation and following adrenalectomy must be viewed in the light of a concurrent cell shrinkage. In ordinary white adipose cells the cytoplasm and nucleus are displaced peripherally by the mass of fat and the crescentic shape of the nucleus suggests some degree of compression. In brown adipose tissue, if it be assumed that owing to the presence of intercellular fat droplets the other cell constituents are displaced or "compressed"; then, if most of this fat material is released from the cell, as occurs for example during starvation, the other cell constituents will become less "compressed". The explanation does not take into account the elasticity of the plasma membrane nor does it allow for any other change of state within

the cell which might accompany lipid release. Arguing thus, and making these assumptions, it would be expected that if the cytoplasm is less "compressed" in the brown fat cell of starvation, then the population density of mitochondria would decline. In fact there are many more mitochondria per unit area than in the normal controls and from what has been said it is reasonable to postulate an actual increased production of these bodies during starvation and following adrenalectomy.

I am indebted to Professor J. D. Boyd for his interest and criticism and to Dr. V. E. Cosslett for electron microscope facilities at the Cavendish Laboratory, Cambridge.

REFERENCES

1. CRAMER, W., *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **1**, 184-195 (1920).
2. DALTON, A. J., *Anat. Rec.*, **121**, 281 (1955) (abstract).
3. FAWCETT, D. W., *Science*, **105**, 123 (1947).
4. *Anat. Rec.*, **103**, 450 (1949) (proc.).
5. *J. Morphol.*, **90**, 363-406 (1952).
6. FEYER, J. D., *Amer. J. Anat.*, **97**, 409-430 (1955).
7. *Anat. Rec.*, **124**, 111-126 (1956).
8. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, Suppl., 313-318 (1956).
9. *J. Anat.*, **91**, 73-81 (1957).
10. PALADE, G. E., and PORTER, K. R., *J. Exptl. Med.*, **100**, 641-655 (1954).
11. PORTER, K. R., *J. Exptl. Med.*, **97**, 727-749 (1953).
12. RASMUSSEN, A. T., *J. Morphol.*, **38**, 147-193 (1923).
13. SHILDON, F. F., *Anat. Rec.*, **28**, 331-343 (1924).
14. WERTHEIMER, F., and SHAPIRO, B., *Physiol. Rev.*, **28**, 451-464 (1948).

VII

NERVE CELLS AND RECEPTORS

Neurofilaments et neurofibrilles dans les fibres nerveuses de la Sangsue

R. COUTEAUX

*Laboratoire de Biologie animale (P.C.B.), Faculté des Sciences, Paris, et
Laboratoire de Microscopie électronique appliquée à la Biologie (C.N.R.S.)*

BIEN avant l'introduction du microscope électronique en Cytologie nerveuse, le problème de la nature des neurofibrilles avait déjà fait l'objet de nombreux débats, mais la mise en évidence au cours de ces dernières années, à l'aide de ce nouvel instrument, de neurofilaments submicroscopiques a nettement fait prévaloir l'opinion que les neurofibrilles se forment au cours de la fixation par l'agglutination en faisceaux de ces neurofilaments. Cette interprétation, quoique très probable, a encore besoin d'être étayée par des observations positives. Les neurofibrilles des cellules nerveuses de la Sangsue que les recherches d'Apathy, Cajal et Nageotte ont rendues depuis longtemps classiques nous ont paru pour aborder ce problème un matériel particulièrement favorable et nous exposerons ci-dessous, très sommairement, les premières observations que nous avons pu faire sur la chaîne nerveuse ventrale de cet animal.

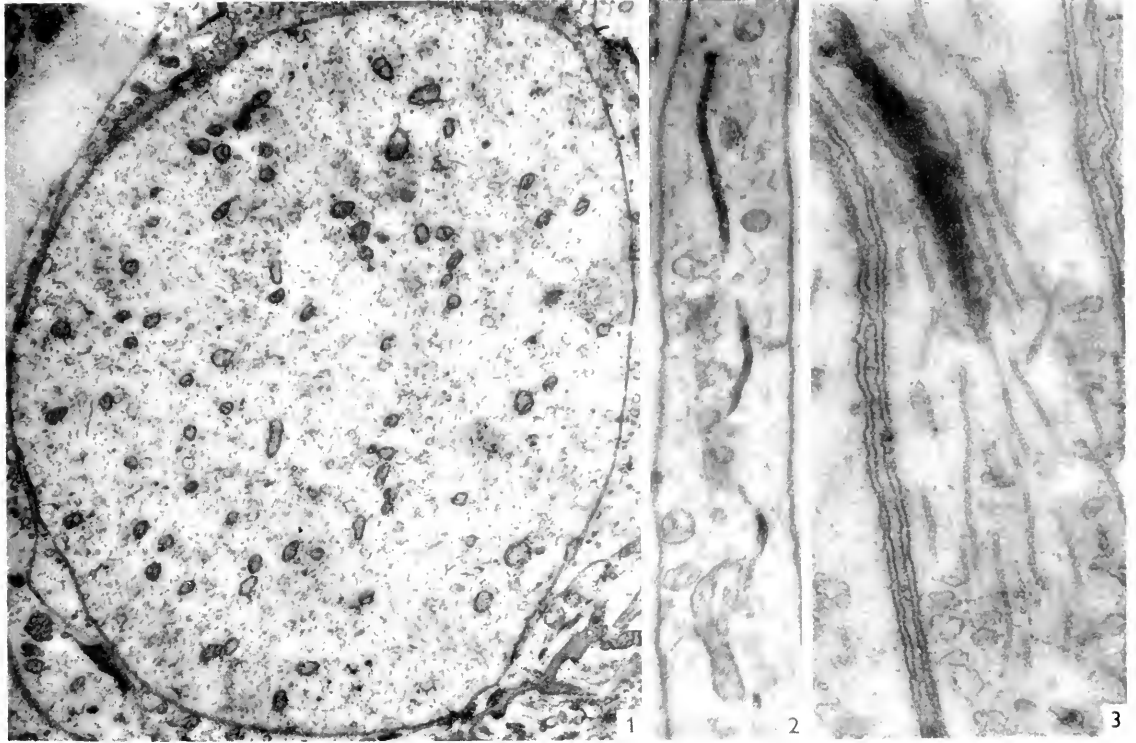
Matériel et technique.—C'est principalement sur les fibres nerveuses, amyéliniques, de la Sangsue (*Hirudo medicinalis*) qu'ont porté nos observations, les neurofibrilles présentant à ce niveau une orientation particulièrement simple qui facilite beaucoup l'interprétation des coupes ultraminesces. Ces fibres ont été étudiées à la fois au niveau des ganglions et des connectifs, sur coupes transversales et longitudinales. La fixation a été effectuée par une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 %, tamponnée au pH 7,3-7,5 selon Palade (1). Une fois mise à découvert par une dissection préalable, sur des animaux maintenus en extension, la chaîne ventrale a été d'abord fixée *in situ*, puis une portion de cette chaîne, détachée de l'animal, a été placée secondairement dans le fixateur pour une durée de 2 à 3 heures en général, mais aussi dans quelques cas pour des durées plus longues, atteignant jusqu'à 24 heures. Les pièces ont été enrobées au méthacrylate et coupées à l'ultramicrotome Porter-Blum. La plupart des observations ont été faites sur un microscope RCA du type EMU 3A et certaines d'entre elles sur un microscope RCA du type EMU 3B. En vue de permettre une comparaison directe des aspects neurofibrillaires observés au microscope ordinaire et de ceux que fournit le microscope électronique, des imprégnations métalliques ont été exécutées sur les animaux des mêmes lots en recourant aux méthodes à l'argent réduit utilisées par Cajal sur le même matériel.

Observations.—Sur une chaîne ventrale les aspects que présente l'axoplasme des fibres nerveuses peuvent être d'une fixation à l'autre ou même d'un point à l'autre de la même pièce très sensiblement différents. Nous n'envisagerons ici que les deux plus tranchés d'entre eux. Il est fréquent de n'observer dans ces fibres, qu'elles soient de grand ou de petit diamètre, aucune formation filamenteuse disposée longitudinalement et vraiment significative. Dans ce cas, en dehors des chondriosomes, généralement assez abon-

dants, parfois très allongés et orientés longitudinalement, et de corpuscules arrondis de taille et de densité variables, d'une interprétation actuellement difficile, on ne trouve dans l'axoplasme qu'un réseau grêle et très irrégulier. Notons que De Robertis et Bennett (2, 3) usant du même fixateur sur la chaîne ventrale d'un autre annélide (*Helodrilus caliginosa*) a souligné la particulière pauvreté des cellules nerveuses de cet animal en « neurofilaments ».

L'autre aspect de l'axoplasme se rencontre beaucoup plus rarement que le précédent dans les pièces fixées normalement. Aux constituants de l'axoplasme mentionnés dans le premier s'en ajoutent ici d'autres. Il s'agit de nombreux filaments nettement orientés longitudinalement, d'une longueur indéfinie (il a été possible de les suivre individuellement sur des distances supérieures à 2 μ dans le cas de fibres fixées en forte extension, où les filaments deviennent absolument rectilignes), d'un calibre uniforme d'environ 200 Å. Ces filaments, de forme cylindrique, se montrent en général plus denses à leur périphérie que dans leur région axiale, mais il paraît difficile sur ce type de préparations de décider si cette différence de densité traduit réellement une particularité de leur constitution. Une coupe transversale pratiquée dans une fibre nerveuse contenant ces filaments montre qu'ils peuvent être distribués de manière assez uniforme dans toute l'étendue de l'axoplasme. Cette distribution se trouve au contraire complètement bouleversée dans d'autres fibres par l'apparition d'une ou plusieurs formations allongées, relativement volumineuses, très fortement osmiroréductrices, disposées parallèlement à l'axe des fibres et auxquelles les filaments voisins paraissent s'agréger. Le calibre de ces formations varie de l'une à l'autre, mais reste en général de l'ordre du dixième de micron. Elles rappellent en tous points les neurofibrilles, telles que les révèlent chez la Sangsue les méthodes argentiques de Cajal, très souvent réduites à une seule dans le cas des petites fibres.

Les filaments submicroscopiques disséminés dans l'axoplasme que nous venons de décrire se rencontrent assez rarement dans les pièces de chaîne ventrale de Sangsue fixées normalement. Leur apparition s'accompagnant en général d'altérations plus ou moins importantes d'autres structures, notamment du chondriome, nous avons été amené à y voir une anomalie de la fixation et à varier systématiquement les conditions de la fixation en vue de déceler la cause de cette anomalie. Le fait qui nous paraît pour l'instant le plus propre à élucider ce problème, c'est



qu'en faisant précéder, par exemple de 5 minutes, l'action du tétr oxyde d'osmium tamponné sur la chaîne ventrale par celle de la solution ioniquement non balancée qui sert de tampon (tampon de Michaelis à l'acétate-véronal), on peut mettre en évidence de façon très aisée ces filaments submicroscopiques, mais naturellement au prix d'altérations plus ou moins graves des autres structures (fig. 1-5). Les images obtenues dans ces conditions permettent néanmoins d'analyser avec plus de précision le processus d'agglutination par lequel se constituent, au niveau de nombreuses fibres et selon un déterminisme qui reste à élucider, des formations longitudinales du

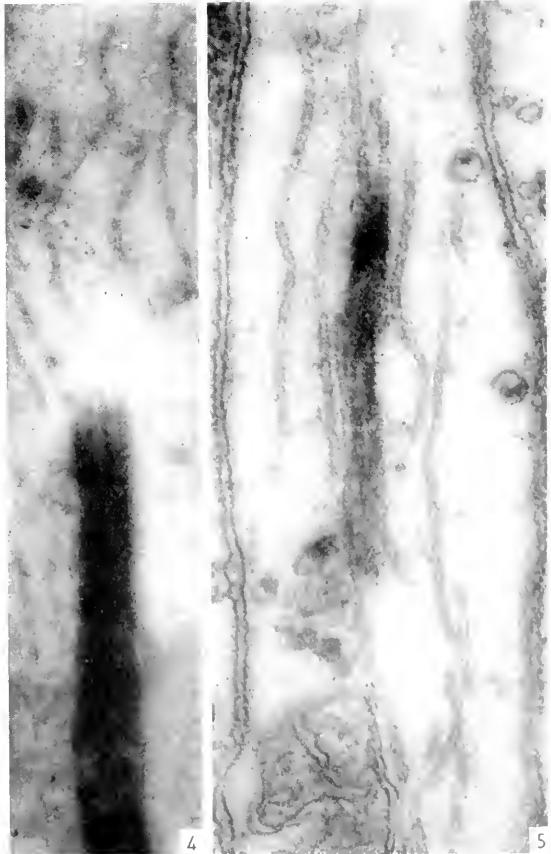


Fig. 1-5. Coupes de fibres nerveuses au niveau de la chaîne ventrale de la Sangsue. Fixation précédée d'un traitement de 5 min. par le tampon de Michaelis au véronal-acétate au même pH (concentration 0,028 M).

Fig. 1. Coupe transversale d'une grosse fibre nerveuse à un niveau très proche du péricaryon dont elle est issue, ne présentant que des altérations relativement discrètes: chondriome et « neurofilaments » apparaissent distribués de manière à peu près uniforme. (14.000 \times)

Fig. 2. Coupe longitudinale d'une petite fibre intéressant en quatre points de son trajet une neurofibrille sinuée. (18.000 \times)

Fig. 3-5. Coupes longitudinales de petites fibres montrant le processus d'agglutination des neurofilaments et la constitution de neurofibrilles fortement osmioréductrices. (Fig. 3, 43.000 \times ; fig. 4, 46.000 \times ; fig. 5, 57.000 \times .)

type neurofibrille. Si l'on substitue au traitement préalable par le tampon de Michaelis un traitement par l'eau distillée, on obtient en dehors d'un gonflement plus marqué du chondriome une accentuation du phénomène d'agglutination et sa généralisation à toutes les fibres.

BIBLIOGRAPHIE

1. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 295 (1952).
2. DE ROBERTIS, E. D. P. et BENNETT, H. STANLEY, in *The Structure of Cells* (Symposium Leiden 1954), p. 261. Noordhoff Publ., Groningen, 1955.
3. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 47 (1955).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Grenzstrangganglien von menschlichem Operationsmaterial

HEDI GANSLER

Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf

VON Patienten, bei denen wegen peripherer Durchblutungsstörungen eine Sympathectomie vorgenommen wurde, entnahmen wir während der Operation Ganglienmaterial, das 1 Stunde in 1%iger Osmiumsäure nach Palade fixiert und in der üblichen Weise eingebettet wurde.

Wir gingen aus von den Ergebnissen der klassischen Histologie, wonach die präganglionären Fasern in Form von sog. Endkolben oder Endknöpfen in direkten Kontakt treten sollen mit der Nervenzellmembran der postganglionären Fasern. In dem von uns untersuchten Material konnten wir nun weder auf dickeren Schnitten im Phasenkontrastmikroskop noch auf Dünnschnitten im Elektronenmikroskop solche Kontaktstellen zwischen Zellmembranen und Nervenfasern beobachten. Das Cytoplasma der Nervenzellen ist stark vakuolisiert, d. h. das endoplasmatische Retikulum zeigt sackförmige Ausweitungen. Die Mitochondrien sind meist hell geschwollen und lassen eine Innenstruktur weitgehend vermissen. Da in Gliazellen und in einigen Nervenfasern normale kleine Mitochondrien zu sehen sind, möchten wir annehmen, daß es sich bei den beschriebenen Nervenzellformen um intravital entstandene Veränderungen handelt. Im Cytoplasma ungeordnet verteilt sind kleine Fibrillen von etwa 40–50 Å zu sehen, wie sie auch in Nervenfasern, nur viel dichter und immer zur Längsachse der Faser orientiert, vorkommen. Außerdem liegen im Cytoplasma noch Anhäufungen von kleinen kreisförmigen Membranen mit einem Durchmesser von etwa 400 Å. Jede Nervenzelle ist von Gliazellen umgeben, die im allgemeinen ein helleres, strukturärmeres Cytoplasma besitzen, das aber auch Fibrillen und kleine runde Membranen aufweist.

Im übrigen sieht man ausgedehnte Areale von markarmen Nervenfasern, die in allen möglichen Richtungen angeschnitten und immer von einer Gliahülle umgeben sind. Wie erstmalig von Gasser (1) beobachtet, sind die Nervenfasern ähnlich in Gliataschen eingebettet, wie die inneren Organe in das Peritoneum: An einer Stelle entsteht eine sog. Duplikatur der Gliazellmembran, die als

„Mesaxon“ bezeichnet wird. Dadurch entsteht ein großflächiger ultrakapillärer Spalt zwischen Nervenfasern und Extrazellulärraum. Die die Nervenfasern umhüllende Doppelmembran ist also nicht einheitlichen Ursprungs: die innere Membran wird von der Nervenfasern selbst gebildet, während die äußere Membran eine Gliazellmembran ist. Die Nervenfasern zeigen entweder die gleiche Struktur wie die vorher beschriebenen Nervenzellen oder sie bestehen vorwiegend aus dicht gelagerten längs orientierten Fibrillen von etwa 40–50 Å Durchmesser. Dazwischen vereinzelt Vakuolen und kleine runde Membranen. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um zellferne Nervenfasern handelt. — Eine Unterteilung in Neuriten und Dendriten ist auf Grund unserer morphologischen Befunde nicht möglich.

Außer diesem typischen Bild der markarmen Nervenfasern ließen sich an unserem Material noch folgende Beobachtungen anstellen:

1. Während im allgemeinen zwei in einer Gliazelle eingebettete Nervenfasern immer durch eine Gliabrücke voneinander getrennt sind, sahen wir öfters eine zellnahe und eine zellferne Nervenfasern in direktem Kontakt miteinander, d. h. nur durch ihre eigenen Membranen voneinander getrennt; die äußere Membran, die von der Gliazelle gebildet wird, umfaßt beide Nervenfasern gemeinsam. In der zellfernen Nervenfasern sind an solchen Stellen besonders reichlich kleine runde Membranen, „synaptic vesicles“ (2), zu sehen, während die zellnahe Faser an solchen Kontaktstellen oft feinste röhrenförmige Membranausstülpungen besitzt.

2. An einzelnen Stellen erreicht die Nervenfasern das Niveau der Gliazelloberfläche dergestalt, daß das „Mesaxon“ auseinander gedrängt zu werden scheint und so eine breite Kontaktfläche der Nervenfasern mit dem Extrazellulär-Raum zustande kommt.

3. Auffallend ist ein zwischen den Gliazellen ausgebildetes Straßen- bzw. Kanalsystem, das sich bis tief in die Gliazellen hinein verfolgen läßt und an einzelnen Stellen bis an die Nervenfasern heranreicht. Es ist meist von einer homogenen Grundsubstanz ausgefüllt. Auf Flachschnitten durch Gliazellen ist

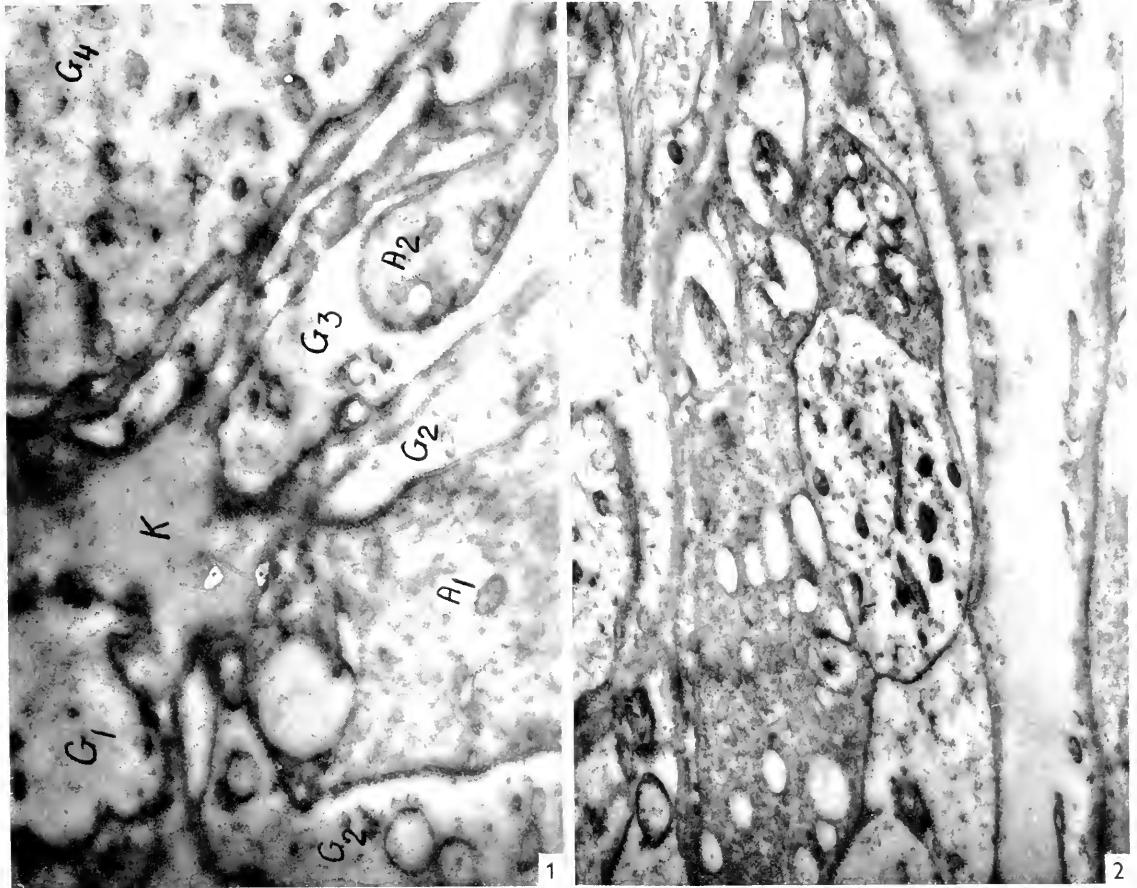


Abb. 1. Mehrere Gliazellanschnitte (G). In der Mitte oben Knotenpunkt (K) eines extrazellulären Kanalsystems, dessen feinere Ausläufer zwischen und in den Gliazellen eine homogene Grundsubstanz enthalten. Links unten ein Axon (A1), das durch Auseinanderschieben des Mesaxon eine breite Kontaktfläche zum Extrazellulär-Raum herstellt. Rechts unten eine weitere Nervenfasern (A2), die außer dem Mesaxon noch ein bis an das Axon heranreichendes Kanälchen erkennen läßt. Vergrößerung: 25 000 .

Abb. 2. Zwei direkt aneinanderliegende Nervenfasern (A1 und A2), die eine gemeinsame äußere Doppelmembran haben. Vergrößerung 16 000 .

dieses vielverzweigte und sich oft überschneidende Straßensystem besonders schön zu sehen.

Unsere Befunde sprechen dafür, daß eine Verbindung der prä- mit den postganglionären Fasern auf mehrfache Weise hergestellt werden kann, wobei den die Nervenfasern umhüllenden Gliazellen eine besondere Bedeutung zuzukommen scheint. Es handelt sich hierbei um im Verhältnis zu ihrem Kern auffallend große helle Zellen, deren Oberflächen amöboid-

artige Cytoplasmaausläufer besitzen, die auf Schnitten z. T. als zahlreiche kleine Zellanschnitte imponieren.

LITERATUR

1. GASSER, H. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1952).
2. DI ROBERTIS, E. und FRANCHI, C. M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* (1956).

Ultra-structure des cellules visuelles du Gecko.

Mise en évidence de prolongements cytoplasmiques infra-microscopiques au niveau du segment interne

NINA CARASSO

Laboratoire de Microscopie Electronique appliquée à la Biologie, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris

LA rétine du Gecko nocturne *Tarentola mauritanica* comprend uniquement des cellules visuelles à bâtonnets. Ceux-ci sont de deux sortes : bâtonnets simples, de type classique, et bâtonnets doubles, formés d'un bâtonnet principal accolé à un bâtonnet accessoire. A. Rochon-Duvigneaud (5), S. R. Detwiler (2), G. L. Walls (9) ont étudié la rétine du Gecko en microscopie optique. La microscopie électronique nous a permis d'y reconnaître des caractères nouveaux.

1° *Description des cellules visuelles.* Le segment externe des bâtonnets est formé de disques empilés dans lesquels nous n'avons pu reconnaître deux membranes séparées par un espace clair comme cela est le cas chez le Cobaye (6) et le Lapin (4). Seule la périphérie des disques comporte une sorte de gouttière qui, sur coupe, a la forme d'un châs d'aiguille (fig. 1).

Dans le cytoplasme se trouvent différentes enclaves : tout d'abord l'*ellipsoïde*, formé de mitochondries de très grande taille, tassées les unes contre les autres (7); le *paraboloïde*, homogène, séparé du cytoplasme sous-jacent par une membrane; puis épars dans le cytoplasme situé au dessous du paraboloïde, de fins granules accolés ou non à de minces membranes, que l'on peut assimiler à l'*ergastoplasme* ou *reticulum endoplasmique*. Cette manière de voir se trouve confirmée par la forte basophilie du cytoplasme, surtout au voisinage du paraboloïde et du noyau, basophilie qui disparaît après action de la ribonucléase.

Signalons enfin, dans la partie toute proximale du cytoplasme, au voisinage du noyau, la présence de doubles membranes et de grosses vésicules osmiophiles, que l'on peut sans doute rattacher à un *appareil de Golgi* assez atypique, dans lequel la partie lamellaire est des plus réduite et les vésicules osmiophiles, au contraire, très nombreuses et hypertrophiées.

2° *Description des prolongements cytoplasmiques.* La particularité la plus marquante des cellules visuelles du Gecko est cependant la présence, tout au long du segment interne et de la zone périnucléaire, de *prolongements cytoplasmiques* (1) pouvant affecter une longueur assez considérable. Ces prolongements sont tout à fait indépendants du prolongement terminal classique qui met en rapport les cellules visuelles avec les cellules bipolaires sous-jacentes

selon un mode synaptique qui a été étudié en microscopie électronique par Sjöstrand (8) et de Robertis (3, 4).

Les prolongements, sur coupes transversales ou longitudinales, apparaissent à peu près équidistants séparés les uns des autres par des distances de 300 à 400 $m\mu$ (fig. 2 et 3). Dans certaines cellules à cytoplasme par ailleurs beaucoup plus osmiophile, ces distances peuvent être moindres (moins de 200 $m\mu$). Sur coupes fortement obliques, la longueur des prolongements cytoplasmiques est beaucoup plus grande que sur coupes transversales. Leur orientation semble donc très oblique par rapport à l'axe des cellules visuelles. Sur coupes obliques passant au niveau de la limitante externe de la rétine, on voit que les prolongements ne traversent pas cette limitante et s'arrêtent tout près d'elle, sans cependant entrer en rapport avec elle.

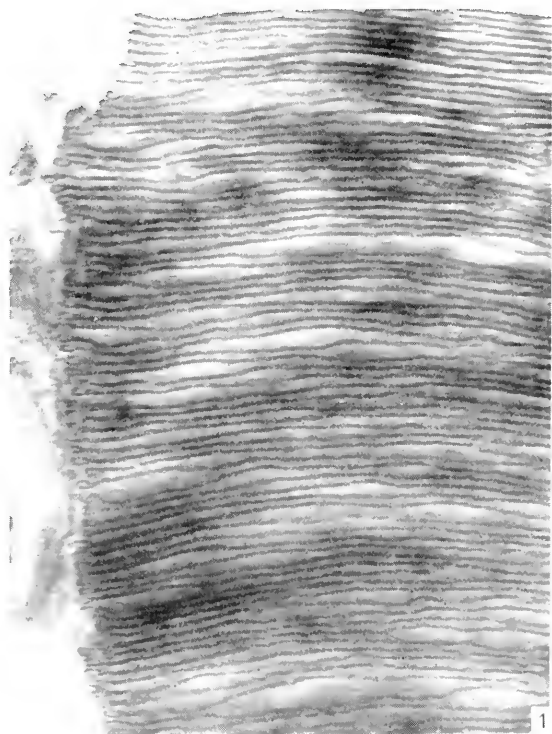


Fig. 1. Coupe d'un segment externe de bâtonnet. Les disques sectionnés présentent, en périphérie, un renflement en châs d'aiguille. 80.000.

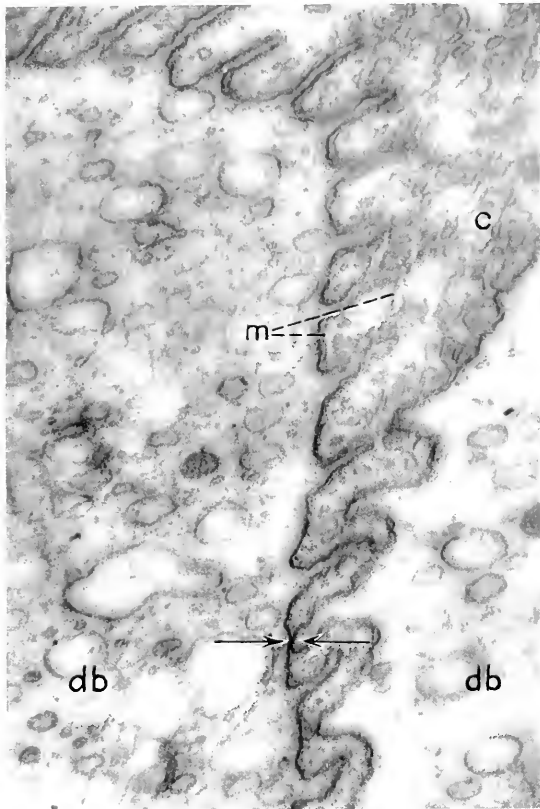


Fig. 2. Coupe transversale de bâtonnets rétiniens de Gecko. Entre les deux flèches, les deux doubles bâtonnets voisins *db* contractent entre eux des rapports directs d'apposition. *m*, fine membrane de l'élément interstitiel; de part et d'autre de *c*, aspect de canalicule, entre deux membranes. 30.000.

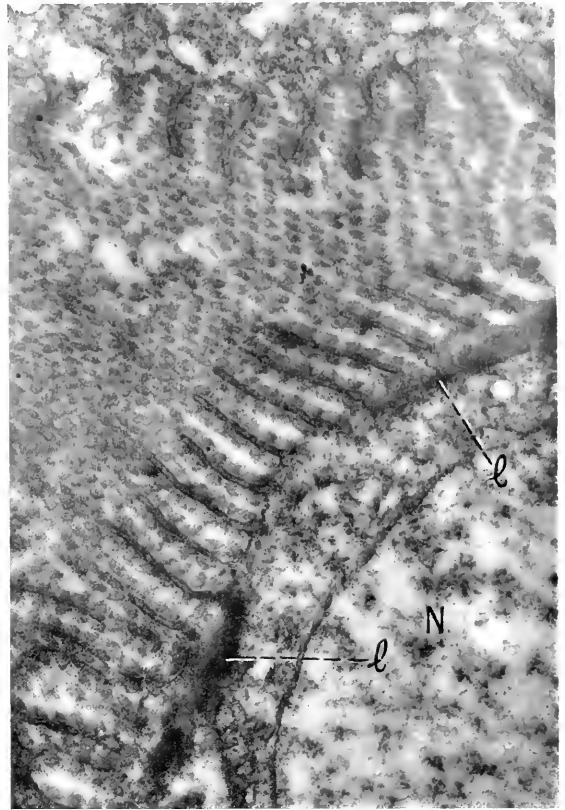


Fig. 3. Coupe très oblique de bâtonnets rétiniens. Les vésicules de l'élément interstitiel affectent ici une ordonnance très régulière le long des prolongements cytoplasmiques. *N*, noyau d'un bâtonnet; *l*, limitante externe. 25.000.

Les cellules visuelles et leurs prolongements sont limités par une membrane dont le contour apparaît sur les micrographies comme étant simple et fortement osmiophile. Ce contour apparaît souvent doublé par un liseré externe peu osmiophile et discontinu qui appartient non pas aux cellules visuelles mais à un système d'éléments interstitiels complexe.

Entre les cellules visuelles et leurs expansions se trouvent en effet des *vésicules de taille diverse*, de *minces membranes* délimitant des canalicules (fig. 2, de part et d'autre de *c*), ou s'appliquant contre le contour externe osmiophile des photorécepteurs. Il s'agit là vraisemblablement de formation névrogliales, en rapport peut-être avec les cellules de Müller qui, dans la rétine, sont excessivement ramifiées. Les vésicules, de forme plus ou moins ellipsoïdale selon l'incidence de la coupe, affectent souvent sur les micrographies une ordonnance remarquablement régulière (fig. 3).

La présence de prolongements cytoplasmiques dans les cellules visuelles du Gecko, et les rapports qu'ils contractent entre eux et avec les éléments interstitiel entraînent un certain nombre de consé-

quences sur lesquelles nous attirerons à présent l'attention.

A. De la sorte se trouve réalisé un *accroissement considérable des surfaces d'échange* au niveau du cytoplasme des photorécepteurs.

B. Les rapports des *photorécepteurs avec l'élément interstitiel* sont de deux sortes : il y a d'une part accolement étroit, à certains niveaux, du contour externe osmiophile des cellules visuelles aux minces membranes de l'élément interstitiel (les cellules visuelles semblent alors, à première vue, limitées par une membrane à double contour à ces niveaux); d'autre part, il existe un alignement très régulier des vésicules interstitielles le long des expansions cytoplasmiques (la fig. 3 est à cet égard suggestive).

C. Des rapports semblent exister *entre cellules visuelles* dans la zone des prolongements. Les prolongements appartenant à des cellules visuelles voisines *sont imbriqués* les uns dans les autres, ce qui apparaît bien dans la partie droite de la fig. 2. Dans la fig. 3, la présence de files régulières de vésicules interstitielles reliant entre elles les deux portions de cellules intéressées par la coupe montre également

qu'il y a imbrication des prolongements longés par les vésicules. Ici, les prolongements n'ont pas été intéressés sur toute leur longueur.

Un autre fait apparaissant sur la fig. 2 mérite d'être souligné : en certains points (région comprise entre les deux flèches), des cellules visuelles voisines peuvent contracter, au niveau des prolongements, des rapports directs d'apposition, sans interposition de l'élément interstitiel. De tels rapports sont très comparables à ceux observés, en microscopie électronique, au niveau des synapses centrales.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARASSO, N., *Compt. rend. acad. sci.* **242**, 2988 (1956).
2. DETWILLER, S. R., *J. Comp. Neurol.* **36**, 125 (1923).
3. DE ROBERTIS, E., *Acta Neurol. Latinoamericana* **1** (1955).
4. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 307 (1956).
5. ROCHON-DUVIGNEAUD, A., *Ann. Oculist.* p. 16, (1917).
6. SJÖSTRAND, F. S., *J. Cellular Comp. Physiol.* **42**, 15 (1953).
7. — *ibid.*, **42**, 45 (1953).
8. — *Z. wiss. Mikroskop.* **62**, 65 (1954).
9. WALLS, G. L., *Amer. J. Neurol.* **17**, 892 (1934).

Some Observations on the Structure of the Retinal Receptors of the Toad Eye as Revealed by the Electron Microscope

F. S. SJÖSTRAND and L. G. ELFVIN

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

IN earlier electron microscopic studies the receptor cells of the retina have been studied in guinea pig and perch eyes (4, 5) and in albino rat and mouse eyes (1, 2). In this paper the preliminary results are reported from a study of the rods and cones of the toad (*Bufo bufo*) retina.

The retinas from adult animals were fixed in a buffered, isotonic 1% osmium tetroxide solution (pH 7.4) at -4°C . Embedding in methacrylate and sectioning on a Sjöstrand ultramicrotome.

The receptors of the toad retina consist of rods, and single as well as double cones. The present analysis deals with the outer and inner segments.

The rods.—*The outer segment* consists of a stack of double membrane disks similar to those described in the guinea pig and perch retina (3, 4). They differ, however, from the latter as to dimensions and the number of incisions extending from their periphery towards the center. The stack of disks is enclosed in a membrane representing the plasma membrane. The dimensions of the double membrane disks are: base diameter $5-6\ \mu$, total thickness $110\ \text{Å}$. The osmiophilic layers of the two constituent membranes are about $40\ \text{Å}$ thick and the less osmiophilic layer separating the osmiophilic layers is about $30\ \text{Å}$ thick. The average spacing is $190\ \text{Å}$.

The inner segment contains the ellipsoid which occupies most of its distal part. The ellipsoid consists of densely packed mitochondria as in the perch retinal receptors (7). A Golgi apparatus has been observed just proximally to the ellipsoid.

The outer and inner segments are connected through a number of fibrillar structures which are in contact with the plasma membrane of the outer segment and penetrate into the inner segment laterally to the ellipsoid (fig. 1).

The cones.—*The outer segment* of the single cone cell consists of a stack of double membrane disks similar to those of the rod outer segment. However, these disks show no incisions. A cilia-like structure similar to that described in the guinea pig retina (5) seems to constitute the only direct connection between outer and inner segment. The outer segment is bounded by a plasma membrane. A number of cytoplasmic extensions from the inner segment surround the basal part of the outer segment.

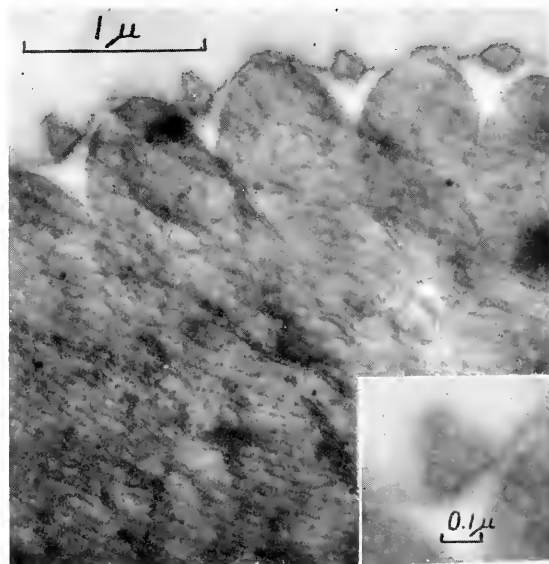


Fig. 1. Part of an oblique to transverse section through a rod outer segment. The fibrils, the surrounding membrane, and the outer segment incisions are easily seen. Magnification $\times 23,000$. Inset: Higher magnification of a fibril. Magnification $\times 49,000$.



Fig. 2. Longitudinal section of a proximal cell outer segment in a double cone. The double membrane disks are well demonstrated. Magnification 58,000.

In the double cones we may distinguish between one outer segment with a more proximal location than the other. The proximal outer segment is larger than the distal one and reminds of a rod outer segment. It is, however, lacking the incisions characteristic for the rod outer segment. The distal outer segment resembles that of the single cones.

In the single cones the dimensions of the double membrane disks are: total thickness 230 Å, base diameter 2–3 μ . The osmiophilic layers are 70 Å thick and the interposed, less osmiophilic layer 95 Å thick. The average spacing is 490 Å.

In the proximal cell of the double cones the dimensions of the double membrane disks are: total thickness 130 Å, base diameter about 2 μ . The average spacing is 220 Å (fig. 2).

In the *inner segments* of the single cones a strongly osmiophilic oil droplet may occur. It is almost completely surrounded by mitochondria. In some of the mitochondria located in contact with the oil droplet a system of 8–10 concentrically oriented and very densely packed double membranes may be observed.

The proximal component of the double cones contains distally in its inner segment an ellipsoid consisting of mitochondria. Proximally to the ellipsoid the well delimited paraboloid is observed. It consists of a homogeneous ground substance in which vacuoles and vesicles are present (fig. 3).

The cytoplasm of the distal component proximal to the ellipsoid contains irregularly outlined vacuoles of varying sizes. No paraboloid is present. The inner segments of the two components of the double cones are in close contact with the osmiophilic layer of their plasma membranes separated by a less osmiophilic interspace the thickness of which varies from 60 to 240 Å (fig. 4). This arrangement is similar to

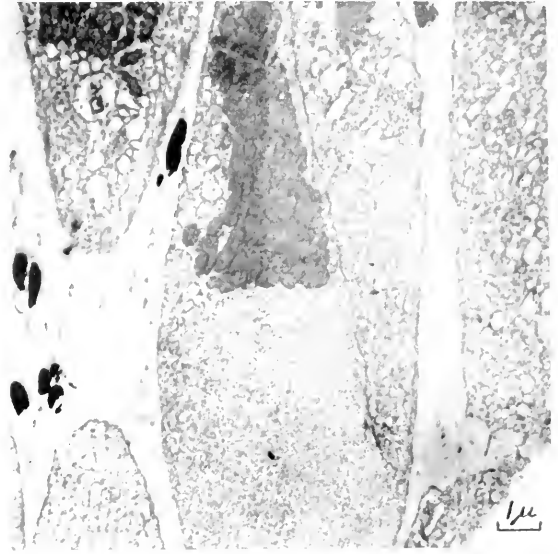


Fig. 3. A double cone. The inner segment of the proximal cell and part of the inner segment of the distal cell. Notice the difference of the cytoplasm in the two cells. Magnification 5600.

that of the plasma membranes at retinal synaptic contacts (6).

Electrophysiologic studies by Svaetichin (8) performed on twin cones in the fish retina have given support to the interpretation of twin cones as representing a system which is stimulated by two complementary colors. The contact surface between the inner segments has been interpreted by Svaetichin to act in a similar way as a synapse. The morphology of the double cones of the toad retina makes such an assumption quite justifiable from a morphologic point of view.

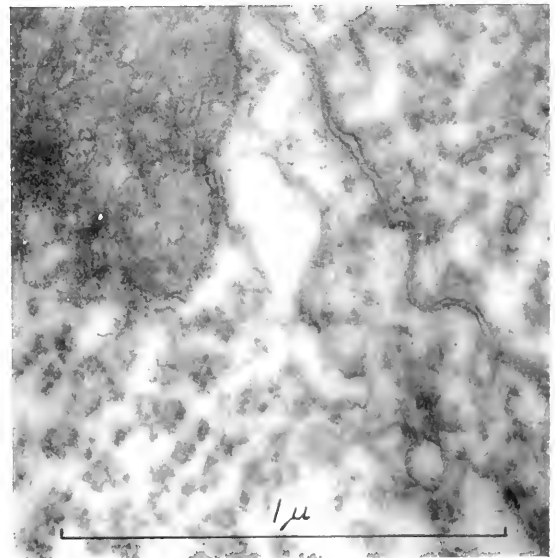


Fig. 4. The plasma membranes between the cells in a double cone. To the left the proximal cell with a part of its mitochondria aggregation and the paraboloid structure. Magnification 58,000.

REFERENCES

1. DE ROBERTIS, E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 319 (1956).
2. DE ROBERTIS, E. and FRANCHI, C. M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 307 (1956).
3. SJÖSTRAND, F. S., *J. Cell. Comp. Physiol.* **33**, 383 (1949).
4. — *ibid.* **42**, 15 (1953).
5. — *ibid.* **42**, 45 (1953).
6. — *J. Appl. Phys.* **24**, 1422 (1953).
7. — unpublished.
8. SVAETICHIN, G., *Acta Physiol. Scand.* **39**, Suppl. 134, 17-46 (1956).

Submicroscopic Morphology of the Retinal Pigment Epithelium

G. LION, C. MAERTENS and G. VANDERMEERSSCHE

Centre de Microscopie Electronique, Médical, Industriel et Agricole, Brussels-Uccle

THE aim of the present work is to bring out the possibilities and limitations of the electron microscope in a study of the fine structures of the eye. One of the present authors has done some work with the Philips electron microscope Type EM 100 (1); this work was done in collaboration with the Clinique Ophtalmologique of the University of Ghent and was solely concerned with suspension and replica techniques. A comprehensive study of the different ocular tissues, but this time by means of the thin-sections technique, has been undertaken by the present authors.

Two different types of electron microscopes are being used: the Philips EM 75 and the new type EM 100. The work done with the first electron microscope will be presented here while the rest of this work will be published elsewhere.

Material has kindly been provided by the Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie of the Ministry of Public Health, Brussels. The eyes of the following animals have been studied: monkey (*M. Cynomolgus*), guinea pig and pig. It has thus been possible to bring out differences in structural details of the eyes of these animals and those studied by several other workers (1-4, 9-12) in this field (man, guinea pig, carp, perch, ox, frog).

Our investigations were carried out on individual pigments which were fixed and embedded after isolation and on tissue fragments which were treated by the usual fixation and staining techniques. The isolation of the pigments has been described earlier (2, 3). They have been washed by repeated centrifugation and fixed in buffered 1% OsO₄ solution (7). As embedding medium (6) a 6-to-4 mixture of butyl and methyl methacrylate has been used. This mixture seems to give the best results with an extremely hard material such as the pigments. Extreme care had to be taken during the preparation of the retinal pigment epithelium itself: it is almost impossible to avoid retinal detachment. The only way which has given reasonably good results is to fix the posterior hemisphere as a whole after the eye has been opened at the front end, without removing the complete content of the vitreous body. The orientation of the tissue blocks is made possible by a technique described in a paper by Ruska, Stuart, Winsser (8), and which consists mainly in keeping the embedded material during polymerisation in an atmosphere of CO₂ inside a test tube in the desired position. The fixation technique described above does not give complete satisfaction in so far as the exact fine structure

of the rods is concerned, because of the presence of the remaining vitreous body (showing up the fixation of the retina), but it allows at least the observation of the distribution of the pigments in relation to the rods. The average thickness of the sections obtained with a Porter-Blum microtome was about 250 Å.

The pigments of the eyes of the monkey, pig and guinea pig show in sections the same typical elongated forms with rounded extremities as those which have been observed in suspension preparations (1-4) (figs. 1-2). So far, only the pigments of carp-eyes have shown a marked difference in shape and size.

The pigments of the eyes investigated here are usually grouped around some cellular residues but in a much smaller quantity than what has been observed in ox-eyes (1-4). Also the mosaic distribution described in the ox-eye has not been observed here.

Although the pigments are extremely hard to cut with glass-knives, good thin sections have been obtained and they seem to confirm the hypothesis of François and co-workers that no internal structure (2, 3) is present in the pigments. The parallel striations which can be seen in some of the micrographs are an artefact due to the hardness of the material.

The sections of the tissue blocks show the arrange-

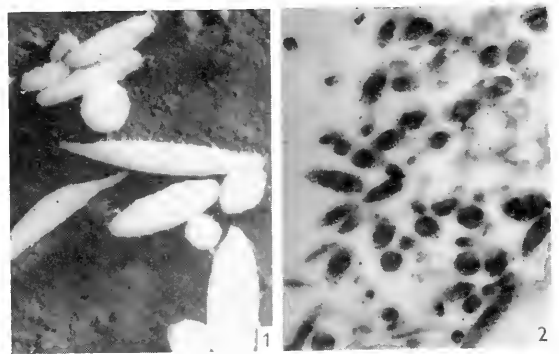


Fig. 1. Pigments from the retinal epithelium of a pig-eye. Pd.-shadowed. Magnification $\times 8000$.

Fig. 2. Thin section of pigments from the retinal epithelium of a pig-eye. The pigments are still attached to cellular residues. Magnification $\times 6000$.

ment of the pigments in relation to the rod extremities. The pigments are all grouped in the interior part of the pigment epithelium. The axes of the pigments remain parallel to the axes of the rods even where the angle of incidence of the latter is very small.

So far it has been generally accepted (5) that the inner surfaces of the epithelial cells send out protoplasmic processes around the rods and cones, thus providing each rod and cone with a pigment sheath. Following our observations with the electron microscope, it seems at first quite improbable that enough pigments would be present to form such a sheath. Not a single preparation has shown a place where the pigments were farther than the outermost part of the rods. Considering the importance of this problem, work has been started in order to elucidate this physiological aspect.

Preliminary Observations on the Ultrastructure of a Frog Muscle Spindle

J. D. ROBERTSON

Department of Anatomy, University College, London

FROG muscle spindles are sensory proprioceptive end organs consisting of bundles of small muscle fibers with afferent nerve endings encased in a distinctive connective tissue sheath. The spindle system of the m. ext. dig. long. IV of the frog (*R. temporaria*) has recently been the subject of a detailed histological study by Gray (2). The results of an electron microscope study of this same spindle system is reported here in preliminary form.

The muscle was fixed in 1% OsO₄ at about 5°C for about 90 minutes. The spindles were dissected out after fixation, rapidly dehydrated in alcohol, embedded in methacrylate and sectioned with a Porter-Blum microtome. Successive thin transverse sections were examined with a Siemens electron microscope at levels varying from two to fifty μ apart.

1. *The spindle sheath.*—The spindle sheath is divided into an outer (figs. 1-2) and an inner (fig. 3) component. The outer consists of several compact cytoplasmic layers about 1-3 μ thick with scattered concentrically elongated nuclei and associated bundles of collagen fibrils. The layers are formed by elongated sheet-like cells about 0.2-0.3 μ thick bounded on their free surfaces by a double membrane complex about 300-500 Å thick (fig. 2). Several of these thin cells are closely apposed to produce the compact cytoplasmic layers. The apposed cells are separated by simple double membranes about 250-300 Å thick (fig. 2). In some regions the cells separate to form tissue spaces occupied frequently by collagen fibrils. It appears that the indi-

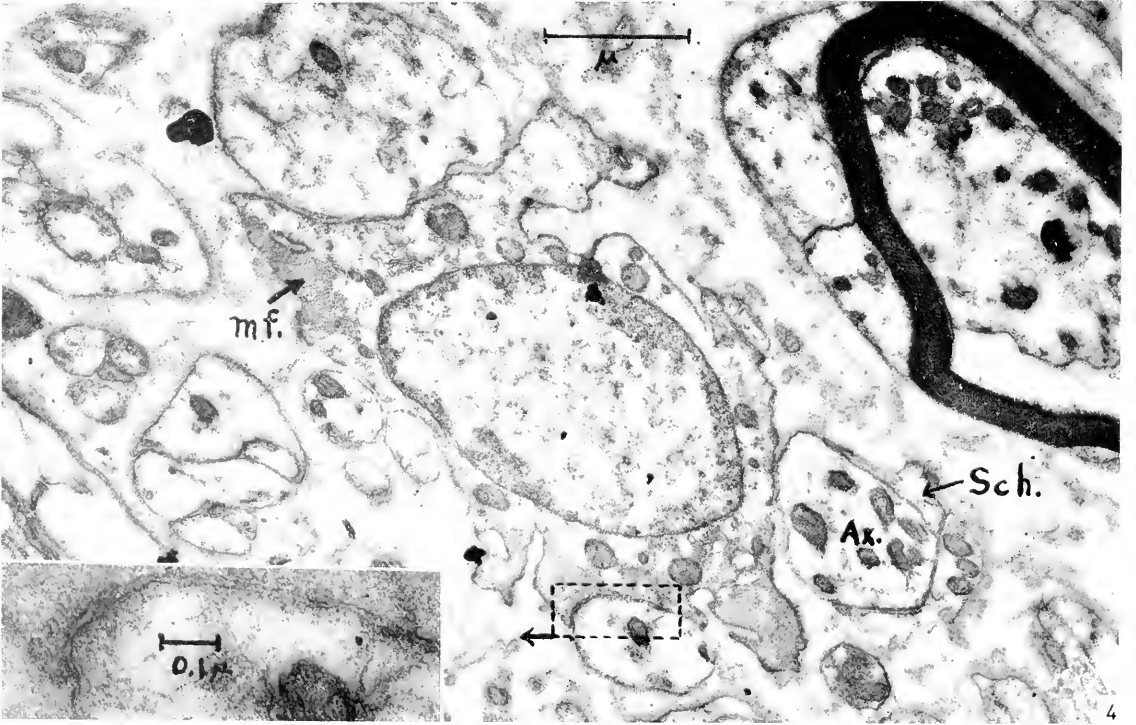
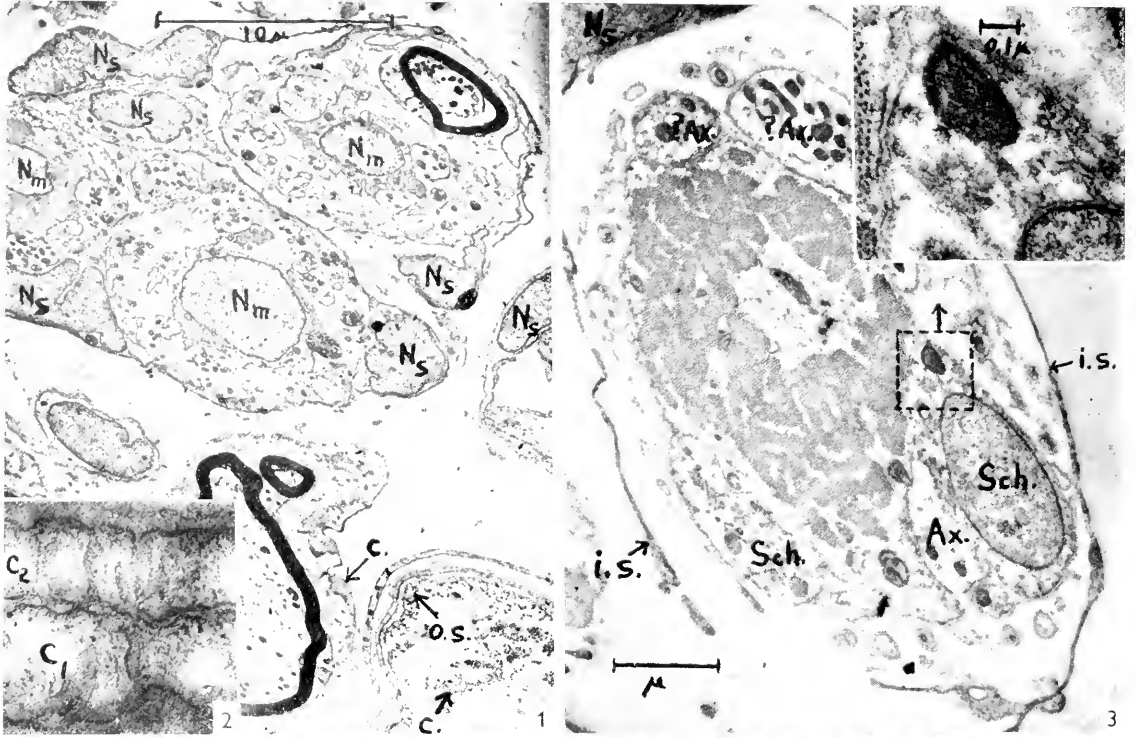
REFERENCES

1. FRANÇOIS, J., RABATY, M., and VANDERMEERSCH, G., *Natuurw. Tijdschr.* **34**, 191 (1952).
2. — *Ann. d'Oc.* **186**, 896 (1953).
3. — *Ophthalmologica* **126**, 347 (1953).
4. — Modern Trends in Ophthalmology—Electron Microscopy. 3rd Series. Butterworth and Co. London, 1955.
5. MAXIMOV, A. A. and BLOOM, W., Textbook of Histology. 6th ed., p. 557. W. B. Saunders Co. 1953.
6. NEWMAN, S. B., BORYSKO, E., and SWERDLOW, M., *J. Research Natl. Bur. Standards* **43**, 183 (1949).
7. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
8. RUSKA, H., STUART, D. C., JR, and WINSSER, J., *Arch. ges. Virusforsch.* **6**, 5 (1956).
9. SJÖSTRAND, F. S., *J. Appl. Phys.* **19**, 1188 (1948).
10. — *J. Cellular Comp. Physiol.* **33**, 383 (1949).
11. — *ibid.* **42**, 15 (1953).
12. — *ibid.* **42**, 45 (1953).

vidual cells do not split into several layers to form the composite lamellated structures but rather that each cytoplasmic layer belongs to a separate cell; the cells are packed together like the leaves in the center of a head of cabbage. The thin cytoplasm of these cells contains scattered mitochondria and numerous round or oval vesicular-appearing structures about 200-500 Å in diameter which sometimes appear to originate from the cell surface and sometimes appear to form tubular channels across the cytoplasm (fig. 2). These tubular channels drop out in serial sections.

A space about 5-10 μ wide lies between the outer and inner sheaths (fig. 1). This contains a few scattered collagen fibrils and occasionally a sheath cell is seen traversing the space to connect with the inner sheath. The inner sheath sometimes consists of only one cytoplasmic layer varying from 0.1 μ down to < 300 Å in thickness (fig. 3). Sometimes two or three slightly overlapping layers are present but they are not closely associated as in the outer sheath.

Between the inner sheath investing each intrafusal fiber and the surface of the muscle fiber there is present a space about 1-3 microns thick which is occupied by a material of low density and generally amorphous or delicately fibrillar appearance in which terminal nerve fibers are situated (fig. 1). This material is sometimes partly removed by treatment with phosphotungstic acid (fig. 3) except for a thin



layer 150–300 Å thick at the muscle and nerve surfaces. This layer is the outer dense layer of the muscle and nerve double surface membrane complex. Scattered longitudinally disposed collagen fibrils are present in this perimucular substance usually near the sheath cell surfaces.

2. *The intrafusal muscle fibers.*—The intrafusal muscle fibers in the spindle region vary in diameter from 5–10 μ . Their centrally or slightly eccentrically placed nuclei occupy the bulk of the sarcoplasm in the smaller fibers. The sarcoplasm of the larger fibers generally is filled by myofibrils (fig. 3). Moderate numbers of mitochondria are present. As the region of maximal innervation ("nuclear bag" region) is approached centrally placed closely spaced nuclei appear and mitochondria increase in relative number. Endoplasmic reticulum and vesicular-appearing bodies are sometimes prominent in the sarcoplasm (fig. 4). The diameter of the fiber decreases and the nucleocytoplasmic ratio increases. The number of myofibrils decreases and the scanty sarcoplasm sometimes exceeds the myofibrillar area in cross section. However, no section has yet been obtained in which no myofilaments at all can be identified. The surface of the muscle fiber is thrown into numerous folds and ridges which partially envelope the terminal nerve twigs. These folds sometimes extend as finger-like processes passing entirely through the middle of the muscle fiber. These penetrating channels contain the perimucular substance and sometimes axon or Schwann cell branches.

3. *The juxtaterminal nerve fibers.*—The spindle region contains numerous myelinated nerve fibers 5–10 μ in diameter. These penetrate the outer and inner sheath by passing between the sheath cells. The endoneurial sheath is here replaced by the

spindle sheath. Indeed, it appears that the spindle sheath may be simply a specialized endoneurial sheath. These fibers branch repeatedly as the inner sheath is penetrated and the myelin sheath is reduced in thickness to 0.1 μ . The inner or outer surface-connecting membrane (SCM) is sometimes visible in these fibers (figs. 1 and 4), (ref. 1, 5).

Inside the inner sheath increased numbers of unmyelinated fibers are seen with rare small myelinated fibers. The former consists of Schwann cells containing one or several axons each with one SCM. In rare instances intermediate fibers are seen consisting of a Schwann cell with one axon and one elongated SCM which partially surrounds the axon in a spiral fashion (1). In a few instances one axon is seen with two SCMs. To the lower right of fig. 4 may be seen an axon (*Ax*) which is only partly covered by its Schwann cell (*Sch*). One SCM is clearly shown. The axon presumably is leaving the Schwann cell via the second SCM.

4. *The nerve endings.*—The axons and Schwann cells develop an unusual number of mitochondria near their termination and this appears to be more pronounced in the axons. Vesicular- or tubular-appearing bodies (fig. 3 inset) about 250–300 Å in diameter are fairly prominent in Schwann cytoplasm and less so in axoplasm. Axoplasmic filaments are not prominent in the terminal axons despite their frequent prominence in the larger myelinated fibers. Endoplasmic reticulum is sometimes prominent in Schwann cytoplasm. The small terminal branches of both axons and Schwann cells appear so similar that sometimes it is difficult to identify them with certainty. Often a structure at first thought to be a terminal axon is proven to be a Schwann cell on deeper sectioning (fig. 3).

Fig. 1. Transverse section of spindle showing two intrafusal muscle fibers and a part of a third. A portion of the outer spindle sheath (*o.s.*) may be seen to the lower right and the middle right (*N_s*). Numerous collagen fibrils (*c.*) are present. Each intrafusal fiber contains a centrally placed nucleus (*N_m*) surrounded by a thin layer of sarcoplasm containing a few myofibrils. The surfaces of the muscle fibers are irregularly convoluted and in contact with terminal nerve branches. Some of the terminal nerve structures lie in the diffusely dense perimucular substance which is clearly shown about the central muscle fiber. The inner sheath appears as a very thin cytoplasmic layer in which nuclei (*N_s*) appear. A small myelinated nerve fiber appears inside the inner sheath to the upper right. The intrafusal fiber associated with this axon is enlarged in fig. 4. Magnification 3,100.

Fig. 2. Enlargement of two layers of an outer spindle sheath. Each cytoplasmic layer *c₁* and *c₂* is bordered above and below by a double surface membrane complex about 300–400 Å thick. A double membrane about 250–300 Å thick separates the two sheath cells. Tubular-appearing structures partially traverse each cell. These appear to be related to the surface membranes. Magnification 80,000.

Fig. 3. Single intrafusal fiber stained with phosphotungstic acid. The edge of a sheath nucleus (*N_s*) appears to the upper left. The delicate inner sheath (*i.s.*) partially surrounds the muscle fiber. The perimucular substance is practically absent.

Several terminal nerve processes are seen in the perimucular space. One Schwann cell (*Sch*) is seen in contact with the muscle and with an axon (*Ax*) which also contacts the muscle. Two fibers which may be axons (? *Ax*) are in contact with the muscle above. A fiber containing numerous vesicular-appearing bodies is in contact with the muscle to the lower left. This was proven in serial sections to be a Schwann cell. The dotted area is enlarged in the inset to show the double membrane between Schwann cytoplasm and sarcoplasm. Note to the right the tubular extension of the nuclear double membrane into Schwann cytoplasm and its suggestive relationship to the round and oval vesicular-appearing bodies in Schwann cytoplasm. Magnification 14,000. Inset, magnification 45,000.

Fig. 4. Enlargement of the intrafusal muscle fiber to the upper right in fig. 1. Myofibrils (*mf*) are present in the muscle fiber. Numerous unmyelinated nerve fibers are present in the scanty perimucular substance. One myelinated fiber with an outer SCM appears to the right. Note the axon (*Ax*) which is apparently leaving its Schwann cell (*Sch*) to the lower right. One SCM is present in this fiber. The terminal axon or Schwann cell in contact with the muscle fiber to the lower center is enlarged to the left to show the 200–300 Å thick double membrane. Magnification 19,000. Inset, magnification 73,000.

These terminal axons and Schwann cells contact the intrafusal muscle fibers in the nuclear bag region and an undifferentiated double membrane about 250–300 Å thick is formed in each instance (figs. 3–4). Motor endings have sometimes been observed in the same preparation on nearby extrafusal fibers. Here a five layered membrane complex 500–700 Å thick resembling closely the type of membrane complex observed previously in rat (3) and lizard (4, 6) motor end plates is seen. In this kind of frog motor ending the junctional folds are largely absent. It appears that the difference between the motor and sensory membranes may be helpful in differentiating motor and sensory neuromuscular junctions if followed in serial sections. This is necessary because a sensory terminal may display the motor type of membrane complex as the nerve twig parts from the muscle (fig. 4).

In the perimuscular substance are numerous terminal cytoplasmic profiles about 0.1–0.3 μ in diameter containing small mitochondria (figs. 3–4). These profiles often drop out in serial sections. But occasionally they expand in size and become packed with mitochondria or rarely enlarge greatly and develop a nucleus. To date no very reliable criteria other than serial sectioning for the identification of these terminal perimuscular profiles as axons or Schwann cell processes has been applied.

In summary the following kinds of axon, Schwann cell and muscle relationships have been observed inside the inner sheath: (1) Axon and Schwann cell together in perimuscular substance. (2) Axon and Schwann cell together in contact with the muscle

surface. (3) Schwann cell alone in contact with muscle. (4) Schwann cell alone in perimuscular substance. (5) Numerous terminating axon or Schwann cell twigs in contact with the muscle surface and in the perimuscular substance. If criteria for positively identifying terminal axon and Schwann cell processes had been applied a coherent picture of a systematic mode of termination could probably be presented. In the absence of these no definitive statements may be made at present. But a tentative working hypothesis involving some unproven assumptions might be considered. It appears that the axons and Schwann cells run along the muscle surface for some distance with a simple double membrane relationship shared between all three kinds of cytoplasm. The axons and Schwann cells separate from each other while maintaining their individual synaptic contact with the muscle fibers. Then each leaves the muscle fiber separately, branches and terminates in the perimuscular substance free of any terminal contact with other cells. While none of the facts contradict this interpretation the assumptions on which it is based require further investigation.

REFERENCES

1. GEREN, B. B., *Exptl. Cell Research* **7**, 558 (1954).
2. GRAY, E. G., *Proc. Roy. Soc. B* (in press).
3. PALADE, G. E., *Anat. Rec.* **118**, 335 (1954).
4. ROBERTSON, J. D., *Anat. Rec.* **118**, 346 (1954).
5. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 271 (1955).
6. — *ibid* **2**, 381 (1956).

VIII

MUSCLE AND OTHER CONTRACTILE ELEMENTS

Preliminary Observations on the Structure of Insect Flight Muscle

H. E. HUXLEY and JEAN HANSON

*Medical Research Council, Department of Biophysics, University College, London, and
Medical Research Council, Biophysics Research Unit, Wheatstone Laboratory, King's College, London*

THE structure of striated muscle from vertebrates has been analysed in considerable detail in recent years, particularly by the techniques of x-ray diffraction, electron microscopy, and phase-contrast and interference light microscopy. A theory has been developed which accounts for all the observed features of the structure, including the pattern of cross-striations and the changes in that pattern during contraction, in terms of a series of overlapping, interdigitating arrays of longitudinal filaments which slide into each other when the muscle shortens (2, 3, 5, 6). Two types of filament appear to be present; they differ in their location, diameter, and protein composition. The thicker filaments extend from end to end of the A-bands and account for the high density and birefringence of that band; they consist largely of myosin. The thinner filaments extend from the Z-line, through the I-band, into the A-band, up to the edge of the H-zone; these filaments contain actin. When the muscle shortens, these "secondary" filaments are apparently drawn further into the array of "primary" filaments which form the A-band.

In the electron microscope, cross-sections of muscle show a double hexagonal array of filaments in the A-bands where the two arrays of filaments overlap (Huxley, 1953). Each secondary filament is located symmetrically between three primary filaments, so that each primary filament has six secondary filaments around it which it shares with its six neighbouring primary filaments.

Insect flight muscle exhibits a pattern of cross-striations which is very similar in many respects to that of vertebrate striated muscle, but differs from it in that the I-bands are usually very short or entirely absent. However, such muscles undergo only very small changes in length (of the order of a few per cent) during activity, and it could be argued that if they contract by the same sort of process as has been suggested for vertebrate striated muscle, they do not need to have very long I-bands.

That the process of contraction should be similar in all types of striated muscle, would seem likely, but remains to be proven. Recently, studies of insect flight muscle have been made by Hodge (1955) and by Hanson (1). Hodge's observations on the effect of ATP on glycerinated flight muscle seemed to show a migration of A-substance to the Z-lines. Hanson, on the other hand, observed ATP-induced contractions of insect flight muscle which seemed very analogous to those given by vertebrate striated muscle, and she has been unable to repeat Hodge's observations. She has also made many other obser-

vations on insect flight muscle which show a very high degree of similarity to corresponding observations on vertebrate striated muscle.

On the basis of his electron-microscope and light-microscope observations, Hodge came to the conclusion that a double array of filaments is not present in insect flight muscle, but that, instead, a system of cross-bridges exists between the filaments. He has demonstrated the existence of these bridges by extremely elegant electron micrographs of cross-sections of flight muscle. The bridges appeared rather less well-organised in longitudinal sections, but no continuous axial structure was visible in his sections in between the main axial filaments.

We have now carried out the first stages of an electron microscope investigation of insect flight muscle. On the basic issue of whether or not two sets of filaments are present, the results are very clear-cut, and are in conflict with Hodge's conclusions; they appear to show that insect flight muscle has a structure which is highly analogous to that of vertebrate striated muscle, and it is these results which we shall now describe.

Materials and methods.—Insect flight muscle from *Calliphora* was fixed in osmic acid, dehydrated in alcohol, embedded in methacrylate, and sectioned on a modified version of the Hodge-Huxley-Spiro (4) microtome. Sections were mounted on carbon films and examined in the Siemens Elmiskop I. Additional staining was usually provided by 1% phosphotungstic acid.

Results.—Longitudinal sections of flight muscle fixed fresh usually show fibrils with virtually no I-bands. Z-lines are visible, and between them stretch longitudinal filaments (fig. 1). In cross-sections, these may be seen to form a very regular hexagonal array. Longitudinal sections often display a pattern of pseudo-striations when the plane of sectioning is not quite parallel to the layers of the lattice, and successive layers of filaments are seen.

Examination of very thin longitudinal sections at high magnification and high resolution shows that mid-way between each two primary filaments, a secondary filament is present (fig. 2). The secondary filaments are connected to the primary filaments on either side by cross-bridges which occur at moderately regular intervals of about 100 Å. This structure is observed with great consistency. The cross-bridges often appear to occur alternately on either side of the secondary filaments.

In cross-sections of these fibrils, the same structure is very clearly visible (fig. 3). The predominating feature of the secondary material in such cross-sections is the set of six secondary filaments around

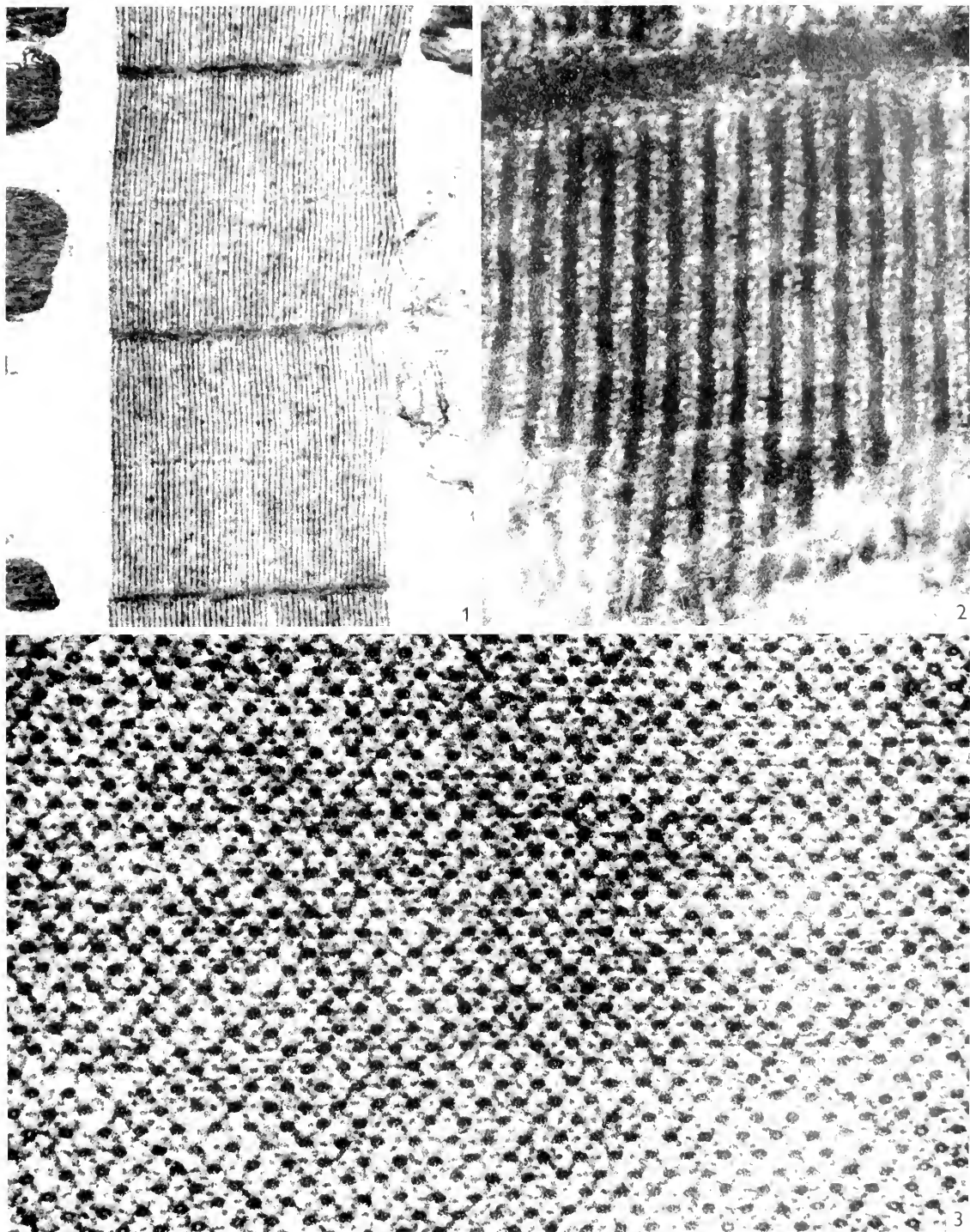


Fig. 1. Longitudinal section of insect flight muscle, showing array of longitudinal filaments. No I-bands are visible. Magnification 22,000.

Fig. 2. Longitudinal section of same muscle at higher magnification, showing secondary filaments between the primary filaments; primary and secondary filaments appear to be connected together by a system of bridges. Magnification 135,000.

Fig. 3. Cross-section of insect flight muscle showing double array of filaments; six secondary filaments may be seen around each primary filament, and each secondary filament is located midway between two primary filaments. Magnification 135,000.

each of the primary filaments. The arrangement is, however, not completely identical with that in vertebrate muscle; in insect muscle, the secondary filaments are located midway between *two* primary filaments, and not symmetrically between three primary filaments as in vertebrate striated muscle. The cross-sections also show in many places the bridges between the primary and secondary filaments.

It is apparent from the cross-sectional views that longitudinal sections which are very thin and which pass successively through different layers of lattice should in some areas contain only secondary filaments. This is in fact often observed. Detailed examination of such sections also confirms that the secondary filaments are not merely part of the primary filaments in adjacent layers.

Examination of the details of the structure in the neighbourhood of the Z-line is now proceeding.

Discussion.—The appearance of the double array of filaments in insect flight muscle confirms that its structure bears many resemblances to that of vertebrate striated muscle, and suggests that the contraction mechanism may be similar to the one suggested for the latter type of muscle. Hodge interpreted his results rather differently. However, reference to his published electron micrographs shows that the cross-sections could well be interpreted in many areas as showing the secondary filaments heavily cross-

bridged to the primary filaments, and located midway between each pair of them. Whether the “bridge” or the “filament” appearance of the secondary material predominates will depend very critically on the degree of staining, the section thickness, the orientation, and the exact plane of sectioning. The micrographs of longitudinal sections published by Hodge show the intact bridges much less clearly than do the cross-sections and the general contrast and orderliness is considerably less than on the cross-sections; the non-appearance of secondary filaments in these sections is not, we feel, completely conclusive. The system of cross-bridges clearly provides a means by which the secondary filaments could be pulled along relative to the primary ones, as indeed has already been suggested for vertebrate striated muscle. We have observed the filaments and the bridges together with such consistency that we feel that the secondary filaments are indeed a completely genuine structure.

REFERENCES

1. HANSON, J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* (1957, in press).
2. HANSON, J. and HUXLEY, H. E., *Nature* **172**, 530 (1953).
3. — *Symposia Soc. Exptl. Biol.* **9**, 228 (1954).
4. HODGE, A. J., HUXLEY, H. E., and SPIRO, D., *J. Exptl. Med.* **99**, 201 (1954).
5. HUXLEY, A. F. and NIEDERGERKE, R., *Nature* **173**, 971 (1954).
6. HUXLEY, H. E. and HANSON, J., *Nature* **173**, 973 (1954).

The Ultrastructure of Skeletal Muscle Myofilaments

F. S. SJÖSTRAND and EBBA ANDERSSON

*The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy,
Karolinska Institutet, Stockholm*

This study aims at a detailed analysis of the structural organization of the individual myofilaments of skeletal muscle at various states of shortening of the sarcomere.

Leg muscles and abdominal muscles from frog, intercostal muscles and abdominal muscles from mouse, were fixed *in situ* in the living anesthetized animal or rapidly after decapitation of the experimental animal. The frog muscle tissue was cooled by keeping the living frogs in a cold room at -3 to 5 C before dissecting free the muscle tissue. In most cases, a minute bundle of muscle fibers were dissected free *in situ* by means of fine glass needles and the rest of the muscle tissue removed. The excitability of the muscle tissue to direct electric stimulus was checked before the fixation. At the lowest temperatures, the excitability was greatly reduced. Contracted muscle tissue was obtained by continuous electric stimulation to tetanic contraction during the first 15 minutes of fixation.

A series of experiments were performed, in which

the muscle tissue *in situ* was subjected to extraction with a 1:1 glycerin–water solution and the standard solutions for myosin and myosin–actin extraction.

1 % isotonic solutions of osmium tetroxide buffered to various pH were used as well as buffered formalin solutions (10 %). The $\frac{1}{2}$ –4 hours' fixation was performed at -1 to $+2$ °C. Dehydration with ethyl or iso-propyl alcohol and embedding in methacrylate. For high resolution pictures, the ultrathin sections were mounted on metallized formvar nets and analyzed in an RCA EMU 2c electron microscope with double objective *without* objective aperture. The electron optical magnifications were 40,000–60,000 times.

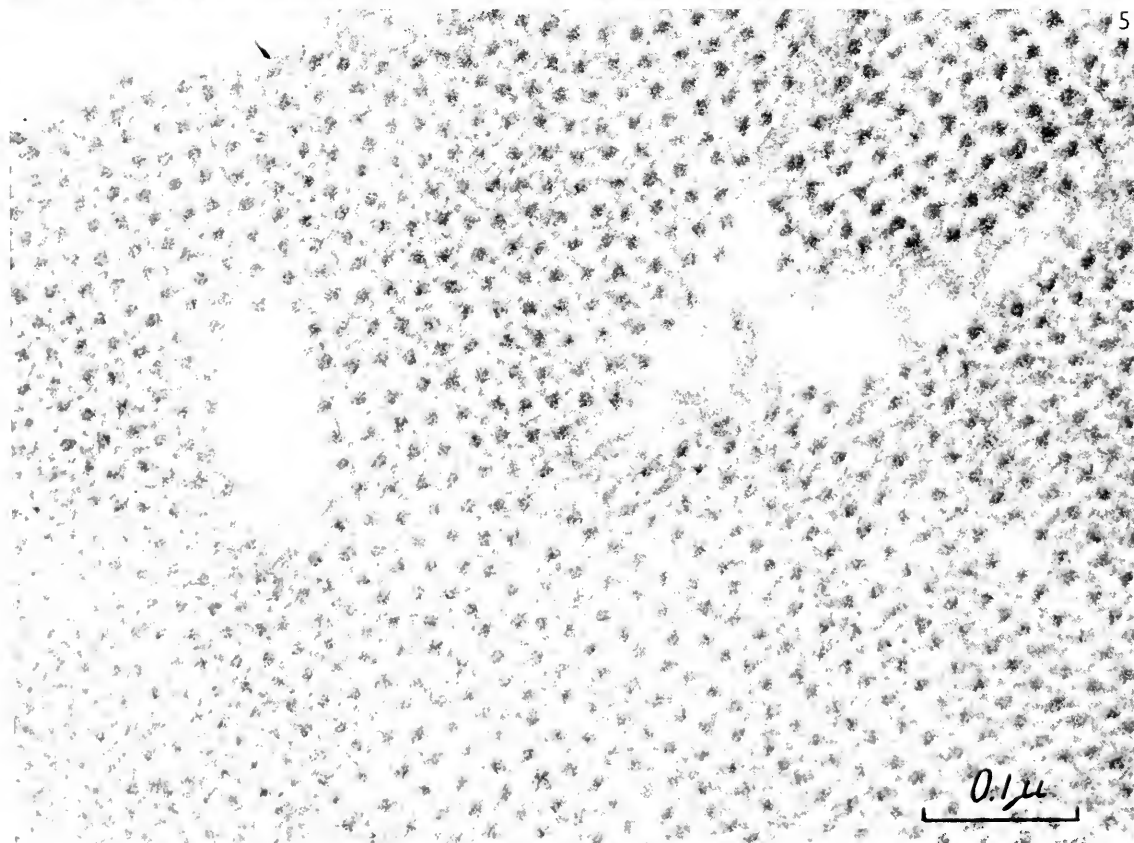
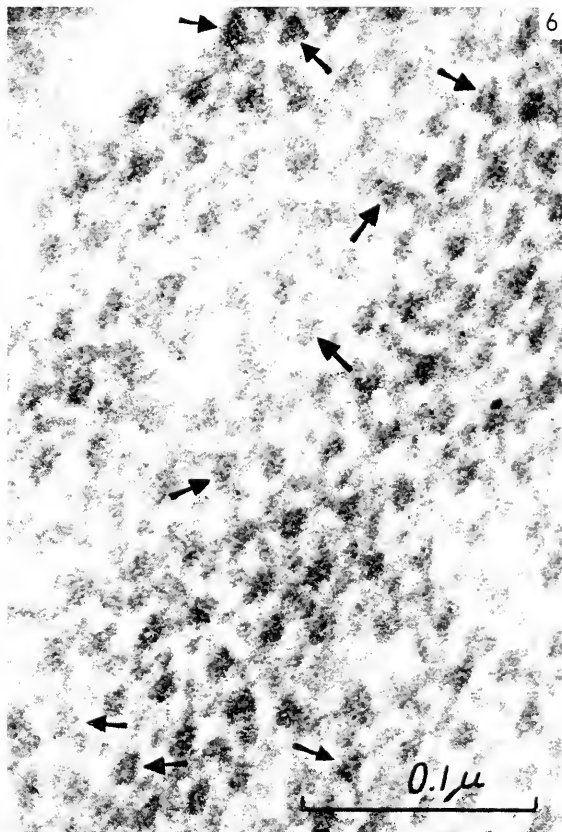
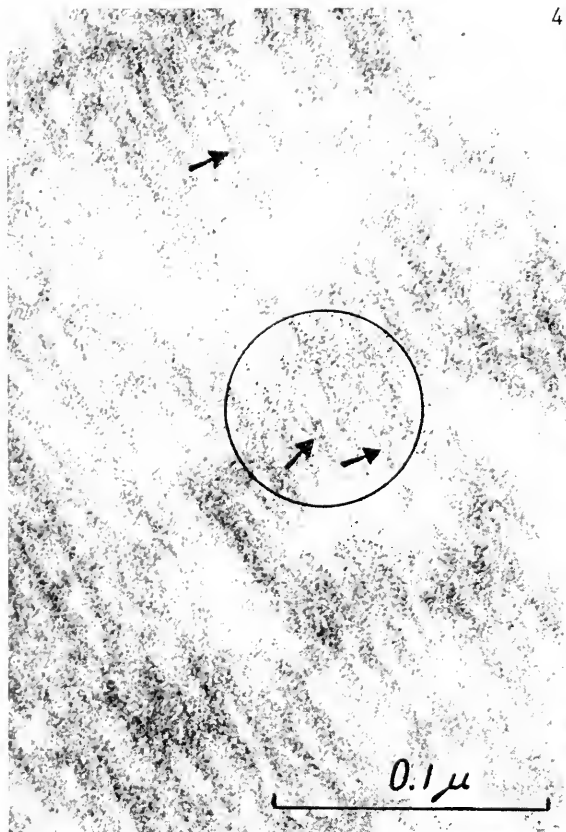
In the extensive material of skeletal muscle tissue that has been analyzed, only one type of myofilaments has been observed (8). The myofilaments run through the whole length of the sarcomere without interruption and continue through the Z-line (fig. 1). The diameter of the myofilament is different in the A- and the I-bands, which partly



Fig. 1. Survey picture of longitudinal section through shortened sarcomeres of frog leg muscle (*m. biceps femoris*). Magnification $\times 92,000$.

Fig. 2. Higher magnification of longitudinal section through shortened sarcomere of *m. biceps femoris* of frog. Notice the thick A-band part of the myofilaments with irregular outlines, interconnecting cross-bridges, and the transversal orientation of more opaque regions within the myofilaments. Magnification $\times 160,000$.

Fig. 3. Longitudinal section through stretched muscle fiber with elongated sarcomeres. Notice the difference in diameter of the myofilaments as compared to fig. 2. Magnification $\times 160,000$.



accounts for the difference in opacity existing between these two bands. The diameter is about 40 Å in the I-band. In the A-bands, the diameter of the myofilaments is a function of the degree of shortening, and varies between about 60 to 140 Å. The contours of the myofilaments are smooth within the I-bands but are irregularly zig-zag-formed in the A-band. Between the thick parts of adjacent myofilaments, interconnecting bridges are seen (fig. 2). The thickness of these cross connections may be as minute as 20–30 Å. The distance between the cross bridges extending between two adjacent myofilaments varies with the degree of shortening from 90 Å in sarcomeres which are shortened (to about 50 % of their equilibrium length) to 250 Å in extended sarcomeres.

Judging from the variations in the opacity of the individual myofilaments, these seem to represent rather complicated structural units. In the shortened sarcomeres, there are observed transversally oriented regions of high opacity alternating with less opaque sections along the myofilaments. The structural pattern observed in the myofilaments is rather irregular, but shows that on shortening there is a definite tendency of transversal orientation of material within the myofilaments. This fact in addition to the tightly arranged cross-bridges gives the impression of a marked transversal orientation of the structural components in the shortened sarcomere (fig. 2).

The modulation of the opacity within the myofilaments may be interpreted as due to their consisting of smaller structural subunits. Direct indications of such subunits may be observed, but the electron staining of the myofilaments is rather diffuse, which is obvious when comparing the resolution of the myofilament structure with that of more discrete structures in the pictures. In fig. 4, it is possible to observe in some places that the myofilaments are subdivided into smaller filamentous units with an estimated diameter of 10–20 Å. This picture is from an extended sarcomere in a muscle that was fixed in a stretched state. The thickness of the A-band part of the myofilaments is only about 60 Å as compared with 140 Å in a shortened sarcomere. It seems justifiable to correlate the longitudinal orientation of the subunits to this stretched state.

When examining cross sections (figs. 5, 6), the hexagonal arrangement of the myofilaments within the myofibrils is revealed (fig. 5). Cross bridges connecting adjacent myofilaments are also ob-

served. They do not pass straight over from myofibril to myofibril, but show a more irregular course with nicks. This may be explained by the shrinkage perpendicularly to the length of the myofilaments that takes place during fixation and embedding. At the nicks, the cross bridges may appear especially distinctly because they frequently are thicker at these sites. It might be these nicks in combination with superposition effects in too thick sections of crossing bridges that have been interpreted as cross sections of a second type of thinner myofilaments interposed between the thick myofilaments within the A-band region (4).

In high resolution pictures, it is striking to observe the angular shape of the myofilaments in cross sections and the rather high frequency of triangular cross sections. The interconnecting bridges between adjacent myofilaments, in most cases, extend between the corners of the triangular cross sections. In addition to the triangular form of the cross sections, there are other less well defined forms. The triangular form seems to correspond to the thickest regions of the myofilaments (fig. 6).

Measurements of the length of A- and I-bands as well as that of the sarcomeres at various degrees of shortening (1) have revealed that both I- and A-bands shorten with decreasing sarcomere length. The change is, however, more pronounced in the I-bands. As no definite new structural pattern than those characteristic for the I- and A-bands appear in connection with the shortening it seems justifiable to conclude that the I-band parts of the myofilaments structurally have changed to the organization characteristic for the A-bands.

The variations in the diameter of the A-band part of the myofilaments with varying degree of shortening, the variation in distance between the interconnecting bridges, and the transformation of the I-band part of the myofilament into an A-band type of structure are interpreted as pointing to a change in the organization of the individual myofilaments as responsible for the shortening of the sarcomere. The ultrastructure of the myofilaments indicate that these filaments consist of smaller subunits with a diameter of 10–20 Å. These units might represent thin ropes of Corey-Pauling's α -helices. The shortening would then be due to a folding of the compound α -helices or to a change in the spiralization with a shortening of the pitch of the secondary helices. Assuming that there are three main subunits in each myofilament would give a simple explanation to their triangular cross sections (9).

Fig. 4. Longitudinal section through stretched muscle fiber. Indications of subunits measuring 10–20 Å in some myofilaments. Notice the small diameter of myofilaments as compared to fig. 2. Magnification $\times 360,000$.

Fig. 5. Cross section through *m. biceps femoris* of the frog. Most of the section through the A-band region. In lower left corner the section cuts through the I-band region. Magnification $\times 200,000$.

Fig. 6. Higher magnification of cross section through *m. biceps femoris* of the frog. Notice the considerable number of triangular cross sections (indicated with arrows). Magnification $\times 300,000$.

In this investigation, it has not been possible to observe the two sets of myofilaments described by Huxley (4). An explanation for this mysterious discrepancy might be that we have studied muscle tissue that has been fixed in the fresh state, and have reduced the various stages in the preparatory technique to a minimum. Huxley investigated glycerinated muscle tissue. In such material, we have observed a splitting of the A-band part of the myofilament into thinner branches, each of which shows a folded or spiralized structure.

The interconnecting bridges are similar to those described by Hodge (3) in dipteran flight muscle but are thinner and more numerous in vertebrate muscle.

With such contradictory results as those presented here and the observations and interpretations of

Huxley and Hanson (2, 4, 5), it seems justifiable not to consider the morphologic background for the contractile process as definitely unveiled.

REFERENCES

1. ANDERSSON, EBBA, *Internat. J. Ultrastructure Research*, under preparation (1957).
2. HANSON, J. and HUXLEY, H. E., *Symposia Soc. Exptl. Biol.* 9, 228 (1955).
3. HODGE, A. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 361 (1955).
4. HUXLEY, H. E., *Biochim. Biophys. Acta* 12, 387 (1953).
5. HUXLEY, H. E. and HANSON, J., *Nature* 173, 973 (1954).
6. SJÖSTRAND, F. S., *Science Tools* 2, 25 (1955).
7. — *Exptl. Cell Research* 10, 657 (1956).
8. SJÖSTRAND, F. S. and ANDERSSON, EBBA, *Exptl. Cell Research* 11, 493 (1956).
9. —, *Internat. J. Ultrastructure Research*, under preparation (1957).

The Tubular System in the Striated Muscle Cell

EBBA ANDERSSON

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

ALREADY at the end of the 19th century Retzius (2) found in his material of gold-impregnated muscle tissue a network in the sarcoplasm between the myofibrils. Until recently rather little attention has been paid to the structure and function of this sarcoplasmic detail in the muscle cell, but with the development of the cell studies by means of electron microscopy this network has gained new interest. Bennett and Porter (1) have among others included this component in the rather all-round endoplasmic reticulum.

The muscle material investigated is mainly taken from skeletal muscle from frog and mouse. The material is fixed *in situ* in buffered isotonic osmium tetroxide solutions. Some material was stained with phosphotungstic acid dissolved in 70% ethanol after the fixation. The preparations were embedded in a *n*-butyl-methyl methacrylate mixture and sectioned with Sjöstrand ultramicrotomes. The micrographs were taken with a RCA EMU 2c electron microscope.

In a longitudinal section (fig. 1) the sarcoplasmic component is recognized as tubes passing in between the myofibrils. In the A-band region the tubes are oriented parallel to the axis of the myofibrils. In the I-band region they run in various directions,

partly perpendicular to the long axis of the myofibrils. In most of the preparations the tubes are dilated in the I-band region.

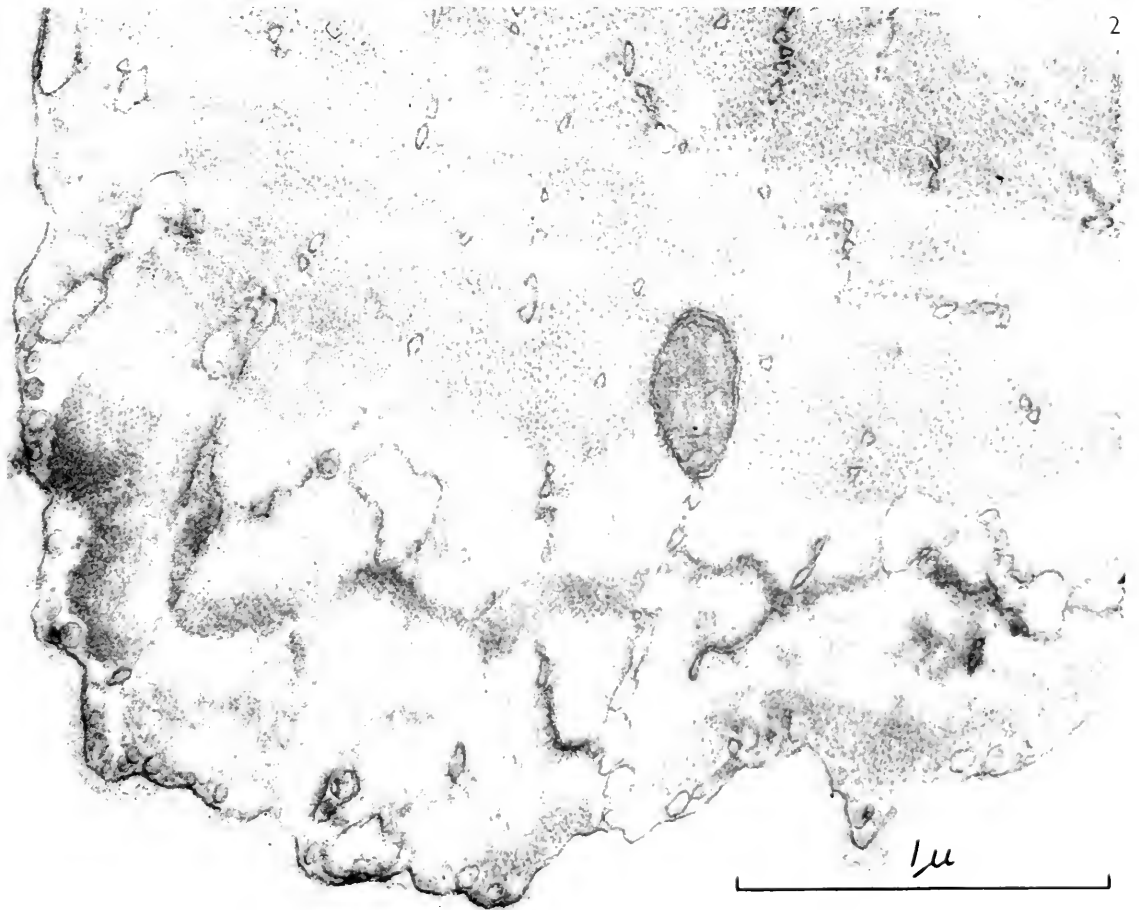
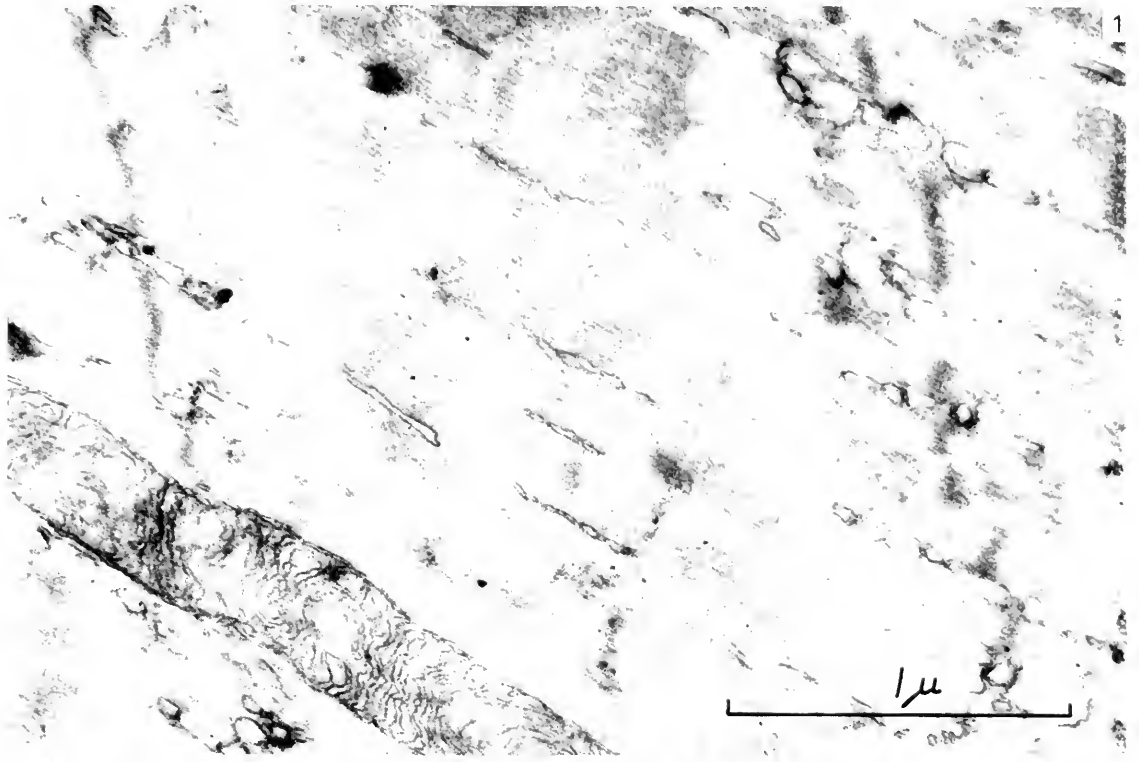
In a cross section (fig. 2) the tubes are cross-sectioned in the A-band area and more or less obliquely or longitudinally sectioned in the I-band area.

The diameter of the undilated tubes is 250–300 Å. The total thickness of the bounding membrane is about 60 Å and is triple layered with the layers measuring 20 Å in thickness. This is observed most easily in material stained with phosphotungstic acid. The tubes have a very intimate topographic relation to the myofilaments. In phosphotungstic acid stained material the bounding membrane of the tubes seems to be in direct contact with the myofilaments.

The relationship of the tubes to the mitochondria is very intimate. Any definite direct continuity between tubes and mitochondria has, however, never been observed. For the analysis of this relationship the mouse muscle has been used with its large number of mitochondria.

Fig. 1. Longitudinal section from frog skeletal muscle, fixed in osmic acid. The tubes are longitudinally sectioned in the darker A-band region and more or less cross-sectioned in the lighter I-band region. In the lower right part a longitudinally sectioned mitochondrion with its triple-layered outer and inner membranes. Magnification $\times 32,000$.

Fig. 2. Cross section through skeletal muscle from frog. Osmium fixation. The section has passed through both A and I-band regions. In the I-band region the tubes are somewhat dilated. In the A-band region to the right a cross-sectioned mitochondrion. Down in the lower part is the sarcolemma. Magnification $\times 36,000$.



The thickness of the tube wall and the cell surface membrane is of about the same dimensions. In some preparations where the tubes are dilated in the I-band region it seemed possible that the tubes were invaginations of the plasma membrane. This supposition has not as yet been confirmed, although an abundant material has been analyzed where special attention has been paid to those areas where the plasma membrane extends over the I-band regions. No definite indications of such a relationship could be found in serial sections.

As to the relation of the tubes to the Golgi apparatus it may be pointed out that the dimensions of the Golgi membranes and those of the tube walls

are similar. A direct continuity has not been established between these two components.

As to the function of these tubes there are two possibilities which are obvious. They may represent a structure for conduction of the excitation through the muscle fiber or they may represent a structure involved in the sarcoplasmic extra-mitochondrial metabolism.

REFERENCES

1. BENNETT, H. and PORTER, K. R., *Am. J. Anat.*, **93**, 61 (1953).
2. RETZIUS, G., *in* Biologische Untersuchungen **1** (1881).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte

HEDI GANSLER

Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf

Wir untersuchten die innere Ringmuskulatur von Ratten-Uteri, die unter den verschiedensten Ovarialhormonbedingungen standen: Uteri von infantilen Ratten, von normalen Ratten in verschiedenen Zyklusphasen, von kastrierten und von Daueroestrus-Ratten (Kastration mit anschließender FH-Applikation). Nach Decapitieren entnahmen wir aus dem mittleren Teil eines Uterushorns eine kleine Scheibe, die in kleine Stückchen zerschnitten wurde. An dicken Schnitten orientierten wir uns im Phasenkontrast-Mikroskop über die Topographie des eingebetteten Materials und nahmen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung nur die Blöckchen, bei denen das Endometrium mit längsgeschnittener innerer Ringmuskulatur zu sehen war. Das Material wurde in 1%iger Osmiumsäure nach Palade I St. bei Zimmertemperatur fixiert und in der üblichen Weise eingebettet.

Die Einteilung der glatten Muskelzelle in Endo-, Meso- und Exoplasma von Häggqvist (1) erwies sich als Schema auch für die Ultrastruktur der glatten Muskelzelle als sehr geeignet. Das Endoplasma umfaßt Kern, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Das Mesoplasma wird von den Myofibrillen gebildet, das Exoplasma besteht aus Zellmembran und angelagerten Kollagen- bzw. elastischen Fasern.

Im *infantilen Uterus* beobachteten wir folgende Strukturen:

Endoplasma: Kern lang gestreckt, parallel verlaufende Doppelmembran, ohne Fältelungen und Einbuchtungen, Karyoplasma homogen. Wenig kleine Mitochondrien mit normaler Innenstruktur.

Mesoplasma: Myofibrillen von etwa 50 Å Ø und unbestimmter Länge, die eine bevorzugte Längsorientierung erkennen lassen. Selten sieht man strichförmige Verdichtungen, die dadurch zustande kommen, daß um die Myofibrillen eine elektronenoptisch dichtere Substanz angelagert ist. Die Myofibrillen in diesen Bereichen zeigen dieselbe Dimension und Orientierung.

Exoplasma: Die einfachen Zellmembranen verlaufen leicht gewellt, annähernd parallel; mitunter sieht man Membranlücken von etwa 1000–2000 Å. An diesen Stellen besteht also ein direkter Kontakt zwischen dem Cytoplasma zweier benachbarter Zellen. Myofibrillen konnten wir in solchen Kontaktstellen nicht beobachten. Zwischen den Zellen sind mehr oder weniger zahlreich Kollagenfasern eingelagert. Sie scheinen an Membraneinbuchtungen büschelweise aus der Zellmembran herauszuwachsen, also ein Produkt der Muskelzellen selbst zu sein. Bindegewebszellen sind nur im Stroma des Endometrium bzw. der Gefäßschicht zwischen Ring- und Längsmuskulatur zu beobachten.

Normaler Uterus: Die Auswertung der Vaginalabstriche erfolgte nach dem Schema von Long und Evans (2). Um die Veränderungen am Myometrium zu beschreiben, unterscheiden wir eine Prä- und eine Postöstrusphase. Ein signifikanter Unterschied besteht insofern, als im Post-Östrus der gesamte Muskelzellverband aufgelockert ist, die Zellen heller und vakuolisiert sind.

Prä-Östrus: Endoplasma: Kerne meist mit zahlreichen tiefen Einbuchtungen, die auf Grund der Befunde an dicken Schnitten eine spiralförmige Verdre-

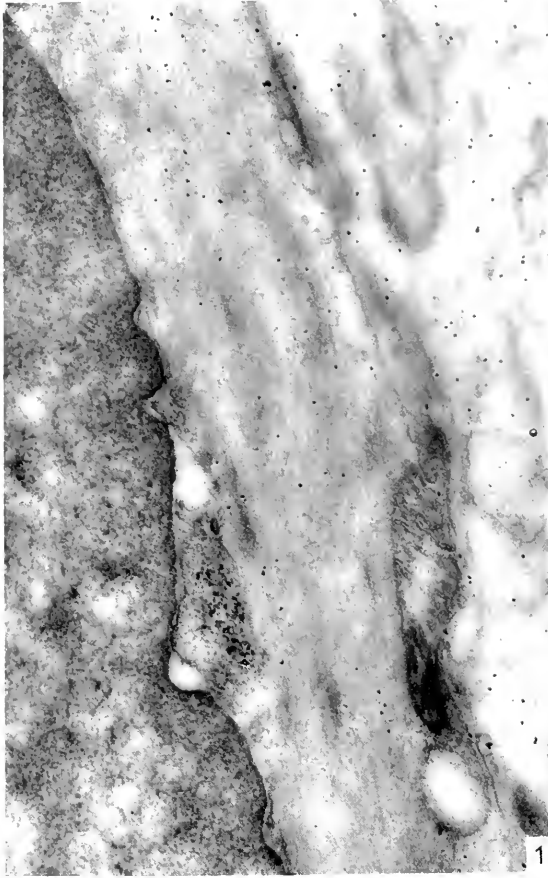


Abb. 1. Muskelzelle aus einem schwangeren Uterus: Kern- und Zellmembran langgestreckt. Das Mesoplasma besteht aus dicht gepackten, längs orientierten Myofibrillen ohne signifikanten Verdichtungen. Vergrößerung: 24600

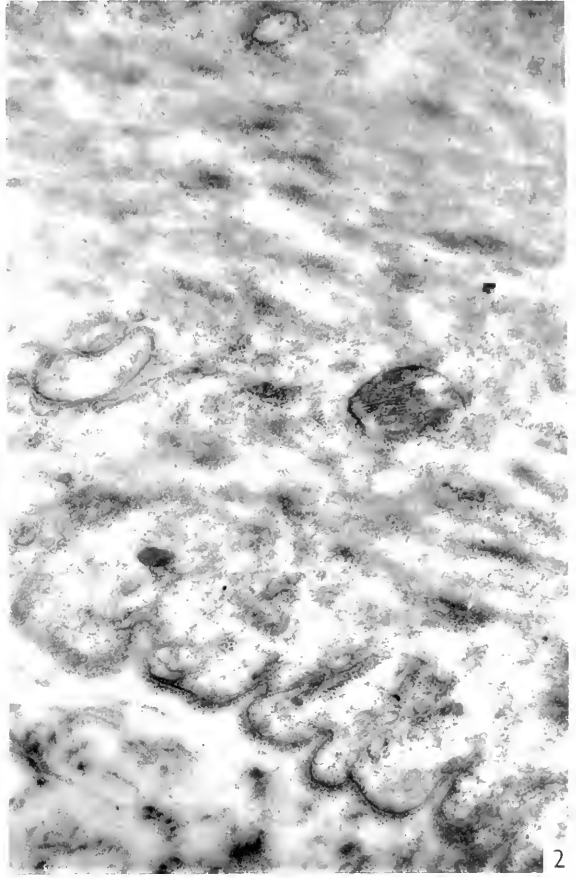


Abb. 2. Muskelzelle aus einem schwangeren Uterus: Zellmembran stark gefaltet, die Myofibrillenzone zeigt zahlreiche Verdichtungen. Vergrößerung: 22000

lung der Kerne wahrscheinlich machen. Das Karyoplasma ist inhomogen, die meist doppelte Kernmembran zeigt einen parallelen Verlauf. Kleine normale Mitochondrien, Golgiapparat und endoplasmatisches Retikulum nicht auffällig.

Mesoplasma: Myofibrillen wie zuvor beschrieben, aber zahlreiche spindelförmige Verdichtungen von 150–300 Å Breite. Zwischen den Myofibrillen vereinzelt kleine kreisförmige Membranen, die u. E. von Einstülpungen der Zellmembran herrühren.

Exoplasma: Membran leicht gefaltet, einfach konturiert, meist mit der Membran der Nachbarzelle parallel verlaufend, auch hier Membranlücken. Zwischen den Membranen entweder eine homogene Grundsubstanz oder Kollagenfibrillen. Die Membran zeigt zahlreiche röhrenförmige intracytoplasmatische Einstülpungen.

Post-Östrus: Kerne homogen, langgestreckt, Mitochondrien hell geschwollen mit ungeordneten Innenmembranen. Endoplasmat. Retikulum vakuolig erweitert. Um die Membranen und frei im Cytoplasma viel Paladsche Körnchen.

Mesoplasma: Myofibrillen reduziert, vorwiegend im peripheren Teil der Zelle, Längsordnung nicht so

eindeutig wie im Prä-Östrus. Verdichtungen sind nur selten zu sehen.

Exoplasma: Membranen gerade verlaufend, Abstände zwischen den einzelnen Zellen größer, dazwischen zahlreiche Kollagenfibrillen.

Schwangere Ratten: 15. Tag (Abb. 1 2). Abweichend von der eingangs beschriebenen Technik wurden die schwangeren Tiere narkotisiert und die Uteri *in situ* fixiert, um eine Kontraktion beim Aufschneiden der Uteri zu vermeiden. In verschiedenen Blöckchen fanden wir zwei verschiedene Zelltypen:

Typ 1: Endoplasma: Kerne langgestreckt, homogen, doppelte Kernmembran gerade verlaufend. Die Außenmembran ist deutlich von der Innenmembran abgehoben, mitunter zeigt sie kleine Ausbuchtungen in das Cytoplasma. Die Mitochondrien sind hell geschwollen, außerdem sieht man zahlreiche Vakuolen auch zwischen den Myofibrillen und eine stark entwickelte Golgi-Zone.

Mesoplasma: Myofibrillen wie zuvor beschrieben, nur füllen sie einen größeren Teil der Zelle aus. Nur wenig schmale und kontrastarme Verdichtungen.

Exoplasma: Zellmembranen gestreckt, parallel ver-

laufend, wie zuvor beschrieben, mit zahlreichen röhrenartigen Einstülpungen der Zellmembran. Interzellulär ist eine homogene Grundsubstanz und Kollagen, das oft verwaschen erscheint; dazwischen eingelagert sog. elastische Palcks. Diese Befunde sprechen u. E. im Sinne Wassermanns (3), der an einem prinzipiellen Unterschied von amorpher und strukturierter Interzellulärsbstanz nicht länger festhalten will.

Typ II: Endoplasma: Kerne gefältelt und eingebuchtet, Karyoplasma inhomogen, doppelte Kernmembran parallel verlaufend. Mitochondrien normal, Golgizone und endoplasmatisches Retikulum deutlich vermehrt.

Mesoplasma: Die Myofibrillen zeigen im Unterschied zu Typ I zahlreiche breite, stark kontrastierte Verdichtungen, in denen man teils längs verlaufende, teils ungeordnete und auch quer verlaufende Fibrillen erkennen kann.

Exoplasma: Zellmembranen gewunden verlaufend mit zahlreichen Einstülpungen, sonst wie zuvor beschrieben.

Kastrierte Ratten: Im Prinzip der gleiche Befund wie bei den infantilen Tieren.

Dauer-Östrus-Ratten: Endoplasma: Kerne homogen, langgestreckt, ohne Membranfalten und Einbuchtungen. Karyoplasma hell, homogen. Mitochondrien spärlich über die ganze Zelle verteilt, endoplasmatisches Retikulum spärlich.

Mesoplasma: Myofibrillen stark reduziert, oft noch in schmalen Bündeln im peripheren Zellbereich zu sehen; außerdem vereinzelt und ungeordnet liegende Fibrillen in einem hellen strukturarmen Cytoplasma. Verdichtungen fast ganz verschwunden.

Exoplasma: Zellmembranen langgestreckt, ohne intraplasmatische Einstülpungen. Zwischen den Zellen reichlich kollagene Fasern.

LITERATUR

1. HÄGGQVIST, GÖSTA, Hdb. d. mikrosk. Anat. d. Menschen, II, 4. Springer-Verlag, 1956.
2. LONG, J. A. und EVANS, H. M., The Oestrus-Cycle in the Albino-Rat. Memories of the Univ. of California, 1922.
3. WASSERMANN, F., *Erg. Anat. u. Entwicklungsgesch.* 35, (1956).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Gewebe des glatten Muskels

F. GUBA und G. HAJÓSSI-KEREK

Elektronenmikroskopische Abteilung des Instituts für Meßtechnik und Instrumentenwesen der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

DIE Zellen des glatten Muskels wurden mit einem Mikromanipulator isoliert, der sich in einer feuchten Kammer befand. Ein Plasmateilchen einer so isolierten Zelle ist in Abb. 1 ersichtlich. Das Gerüst des Zytoplasmas besteht aus longitudinal verlaufenden Subfibrillen, die einen Durchmesser von 700 Å und einen periodischen inneren Aufbau haben. Die Subfibrillen anstomisieren im distalen Zellenteil. Auf

Grund der Erfahrungen mit den isolierten glatten Muskelzellen wurde ihre Identifizierung möglich, so daß die mit dem Waring-Blendor hergestellte Muskelsuspension, die in größerer Menge für die chemische Untersuchung bereitet wurde, mit Sicherheit benutzt werden konnte. In den so hergestellten Präparaten konnte festgestellt werden, daß die Gewebe der glatten Muskeln von Säugern, Vögeln und Mollusken in gleicher Weise aus elementaren Subfibrillen bestehen und daß diese Bündel bilden. Es ist bemerkenswert, daß der Durchmesser der Subfibrillen bei den Mollusken um 30 % größer ist als bei den Säugern und Vögeln. Die Subfibrillen sind in einer strukturlosen, homogenen Substanz eingebettet, die am deutlichsten im Magen der Vögel erkennbar ist. In unseren Präparaten waren außerdem auch stets Kollagenfasern zu finden.

Die Fibrillensuspension wurde sowohl chemisch untersucht als auch auf die Objektfolie des Elektronenmikroskopes aufpräpariert, wobei sie der gleichen Salzbehandlung wie bei der chemischen Untersuchung ausgesetzt wurde. In Abb. 2 treten die Subfibrillen infolge der Wirkung der Hasselbachschen Auslösung (2) deutlich hervor, da sich die Grundsubstanz aufgelöst hatte. Auf die Auslösung

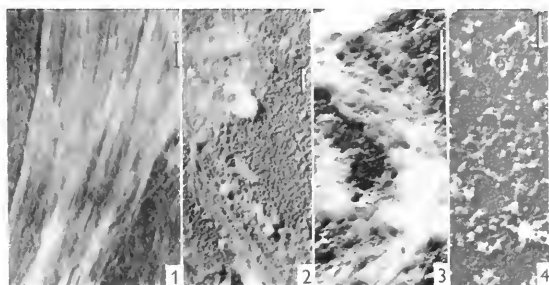


Abb. 1. Plasmateilchen einer mit Mikromanipulator isolierten Zelle.

Abb. 2. Muskel-Subfibrillen der Schnecke (*Helix pomatia*).

Abb. 3. Muskelsubfibrillen des menschlichen Uterus. Behandlung nach Weber-Edsall.

Abb. 4. Wie Abb. 3. Behandlung mit KSCN.

TABELLE 1.

Rind-Uterus (miometrium)	{	Trockensubstanz	180—15 mg/g
		Gesamtstickstoff	25—7 mg/g
		ATP-Abspaltung	0,03 μ M ATP/mgN min
<i>Helix pomatia</i>	{	Trockensubstanz	160—10 mg/g
		Gesamtstickstoff	20—3 mg/g
		ATP-Abspaltung	0,75 μ M ATP/mgN min

nach Edsall (1) und Weber (3) (Abb. 3) folgt der Abbau der subfibrillären Struktur. Der in der Abbildung sichtbare intakte Faden weist eine für Kollagenfasern charakteristische Struktur auf. Abb. 4 zeigt den Zustand nach Behandlung mit Kaliumsulfozyanid. Die Behandlung hatte eine völlige Destruktion der Muskelstruktur zur Folge.

In der Tabelle 1 sind die Angaben für die unbehandelten Muskelsuspensionen zusammengefaßt. Auffallend ist die hohe ATP-Abspaltungsfähigkeit der Schneckenmuskeln, was wahrscheinlich mit dem geringeren Bindegewebsgehalt des Schneckenmuskels zusammenhängt. Die Angaben der Tabelle 2, die den Zustand nach den in dieser Tabelle angeführten Behandlungen widerspiegeln, sind in Prozenten der entsprechenden Angaben der Tabelle 1 ausgedrückt. Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß die für Myosin charakteristische Komponente der Struktur nach der Edsall-Weberschen Auslösung eine tiefgreifende Veränderung erleidet. Es wurde auch die Struktur der ausgelösten Proteine mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Unter den ausgelösten Proteinen zeigt das nach Edsall-Weber ausgelöste einen fibrillären Charakter. Dagegen ist in dem nach Hasselbach gewonnenen Extrakt ein globuläres Protein zu sehen.

Vergleicht man die Angaben der chemischen Untersuchung mit den elektronenmikroskopischen Auf-

TABELLE 2.

Behandlung	Material	Ausgelöster N	ATP Empfindlichkeit	ATP Abspaltung
Wässrige Extraktion	Uterus miometrium	25	0	20
	<i>Helix pomatia</i>	40	0	65
Auslösung nach Hasselbach	Uterus miometrium	10	0	5
	<i>Helix pomatia</i>	20	0	10
Auslösung nach Edsall	Uterus miometrium	45	30	60
	<i>Helix pomatia</i>	40	14	30

Die Werte sind in Prozenten des nativen Muskels angegeben.

nahmen, so gelangt man zur Schlußfolgerung, daß sich in den glatten Muskelzellen der verschiedenen Lebewesen gleicherweise die subfibrilläre Struktur findet, deren Baustoff wahrscheinlich Aktomyosin ist. Die Löslichkeit der das fibrilläre System umgebenden Grundsubstanz ist bei den verschiedenen Organismen unterschiedlich. Was ihre chemische Natur anbelangt, so ist sie auf Grund ihrer Löslichkeit und ihrer Enzymaktivität myosin- bzw. myogenartig.

LITERATUR

1. EDSALL, J. T., *J. Biol. Chem.* **89**, 289 (1930).
2. HASSELBACH, W., *Z. Naturforsch.* **86**, 449 (1953).
3. WEBER, H. H., *Biochem. Z.* **158**, 433 (1925).

Mechanism of Pigment Migration within Teleost Melanophores

S. FALK and J. RHODIN

The Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm, and the Zoophysiological Institution, University of Lund

THE colour changes of animals are brought about by the aid of special cells in the dermis, so-called chromatophores. These many-branched cells contain the pigment in the form of small granules, which can perform distal and proximal migrations within the cell. Thus the pigment granules can be more or less dispersed or concentrated. In the former case the chromatophore is said to be dispersed and in the latter concentrated. The time required for these changes from fully dispersed pigment to fully concentrated or the reverse varies from some minutes to

a few hours depending on the different animal species.

According to the type of pigment the chromatophores are called melanophores, lipophores, allophores and guanophores. The melanophores contain a dark brown or black pigment, melanin.

Chromatophores are mainly to be found in Cephalopoda, Crustacea, Cyclostomata, Elasmobranchii, Teleostei, Amphibia, and Reptilia. The vertebrate chromatophores are stimulated directly by heat and light and indirectly by hormones and nerve action.

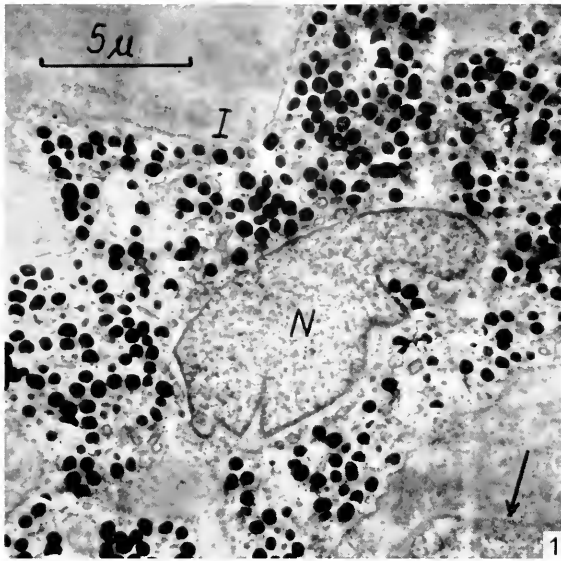


Fig. 1. A concentrated melanophore with nucleus (N) in the center. Part of the cell membrane at arrow. The inner cytoplasmic membrane (I) surrounds an inner sack. Magnification $\times 3800$.

They can be simple or double innervated. In the former case they only possess concentrating nerve fibres. In the latter case both concentrating and dispersing nerve fibres are present. The principal hormones acting upon the colour changes are intermediin, acetylcholine and nor-adrenaline, the former two generally dispersing the pigment granules, the latter concentrating them. Thus the chromatophores are a type of effectors.

In this investigation 2–3 cm long females of the common aquarium fish *Lebistes reticulatus* were used. By placing the fishes on black or white backgrounds during 15 minutes the melanophores in the dermis on the scales were fully dispersed respectively concentrated. Scales from the dorsal and dorso-lateral sides were then quickly removed and immediately fixed at $+4^{\circ}\text{C}$ during 5 minutes in a solution consisting of 0.289 g veronal-sodium, 0.190 g sodium acetate, 0.315 g sodium chloride, 12 ml HCl 0.1 N, 1 g OsO_4 and distilled water to make 100 ml. This solution is isotonic in relation to the blood of the fishes. After fixation the scales were washed with NaCl 0.1 N and dehydrated at $+4^{\circ}\text{C}$ over 70 per cent, 95 per cent and absolute alcohol, 10 minutes in each. The last change of absolute alcohol was carried out at room temperature. The scales were embedded in a mixture of *n*-butyl-methacrylate and methyl-methacrylate containing 0.3 per cent benzoyl-peroxide as a catalyst. Then the mixture was polymerized at 40°C .

The sections were made with the Sjöstrand Ultramicrotome. Without dissolving the embedding medium the sections were examined in an RCA EMU 2c electron microscope.

The melanophore is surrounded by a thick cell membrane with a structure similar to that of basement membranes in mammalian cells. The thickness of this membrane is about 1200 \AA . No internal structure can be observed. Outside the thick cell membrane a less dense zone is often present.

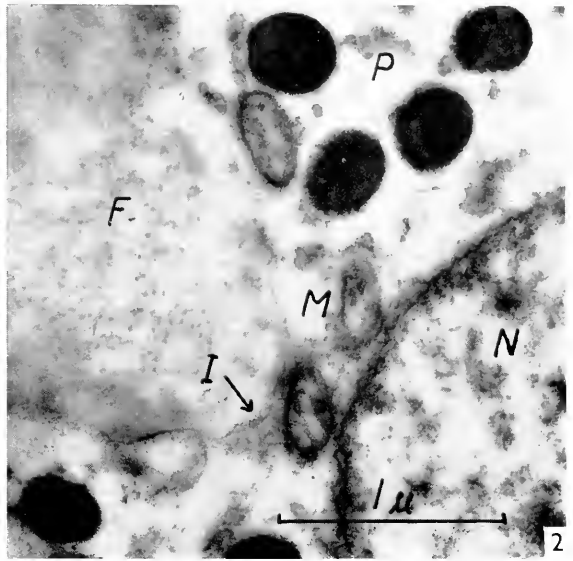


Fig. 2. Part of a concentrated melanophore. Nucleus (N), mitochondria (M), pigment granules (P), inner cytoplasmic membrane (I), fibrillar zone (F). Magnification $\times 29,000$.

An inner cytoplasmic membrane constitutes an inner "sack". This sack contains the nucleus, mitochondria and the dark pigment granules. The thickness of this inner cytoplasmic membrane is estimated to about 80 \AA (figs. 1–2).

The nucleus is about 6μ in diameter. The nuclear membrane consists of two opaque layers separated by a less dense zone with a total thickness of about 300 \AA . The nuclear content consists of about 170 \AA thick granules and a nucleolus, about 1μ in diameter.

The mitochondria are oval or rod-shaped and surrounded by an external double membrane. Inside this membrane is a system of internal double membranes arranged in an irregular way. No intermediate forms between mitochondria and pigment granules have been observed in contrast to du Buy *et al.* (2).

Within the sack there also appear special cytoplasmic structures. They consist of more or less dense annular and irregularly formed single membranes. They may represent the Golgi apparatus, but they can also be special structures in the melanophore cytoplasm.

The spherical pigment granules, containing melanin, range from 0.25μ to 0.55μ in diameter, the mean value being 0.40μ . They are surrounded by a membrane about 300 \AA thick. The granules generally contain a number of dense bodies, but may sometimes appear homogeneous.

Between the two cell membranes is a zone $0.5\text{--}3 \mu$ wide. This zone is transversely by fibrils, about 80 \AA thick. In general the fibrils do not seem to be attached to either of the two cell membranes. They are preferably arranged in a direction parallel to the cell

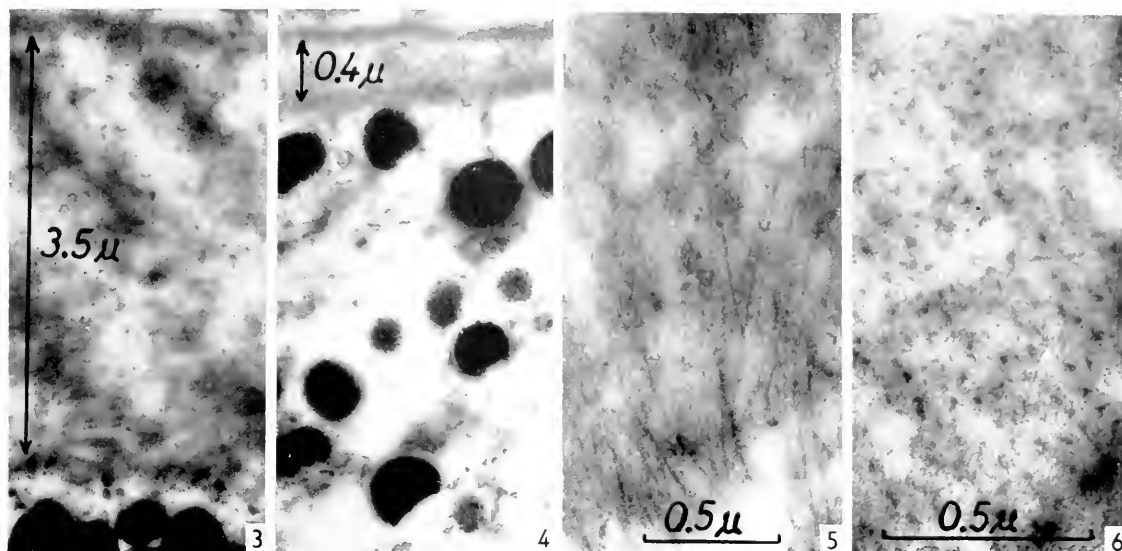


Fig. 3. Fibrillar zone of a contracted melanophore, the width being about 3.5 microns. Magnification $\times 20,000$.

Fig. 4. Fibrillar zone of a dispersed melanophore, the width being about 0.4 micron. Magnification $\times 17,000$.

Fig. 5. Longitudinally cut fibrils. Magnification $\times 33,000$.

Fig. 6. Transversely cut fibrils. Magnification $\times 55,000$.

membranes. The width of this fibrillar zone varies with the pigment dispersion. By fully dispersed melanophores the width is about 0.5μ and by fully concentrated melanophores the width is about 3μ (figs. 3-6).

The fibrils are regarded as representing contractile structures, which as a basket mesh-work surround the inner sack. Thus when the fibrils contract, the

sack diminishes and the pigment granules are concentrated. On the other hand when the fibrils relax, the sack can increase and the granules will be dispersed. The suggestion is thus made that the migration of the pigment granules within the teleost melanophores should be due to the contracting and relaxing fibrils in the zone between the two cell membranes. From a physiological point of view it also seems to be the concentration of the pigment granules that requires most energy.

This investigation gives a completely new explanation of the mechanism of pigment migration within teleost melanophores. It abolishes many previous theories of pigment migration (1, 3-9).

This work has been supported by a grant from the Kungliga Fysiografiska Sällskapet, Lund.

REFERENCES

1. BALLOWITZ, E., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **157**, 165 (1914).
2. DU BUY, H. G., WOODS, M. V., BURK, D., and LACKLY, M. D., *J. Nat. Cancer Inst.* **9**, 325 (1949).
3. FRANZ, V., *Z. Zellforsch.* **30**, 194 (1939).
4. HOOKER, D., *Amer. J. Anat.* **16**, 237 (1914).
5. KOLTZOVI, N. K., *Compt. rend. acad. sci. URSS, N.S.* **28**, 554 (1940).
6. MARSLAND, D. A., *Biol. Bull. Woods Hole* **87**, 252 (1944).
7. SCHMIDT, W. J., *Biol. Zentr.* **39**, 140 (1919).
8. SHANES, A. M. and NIGRELLI, R. F., *Zoologia* **26**, 237 (1941).
9. WRIGHT, P. A. and SABAL, J., *Biol. Bull.* **103**, 312 (1952).

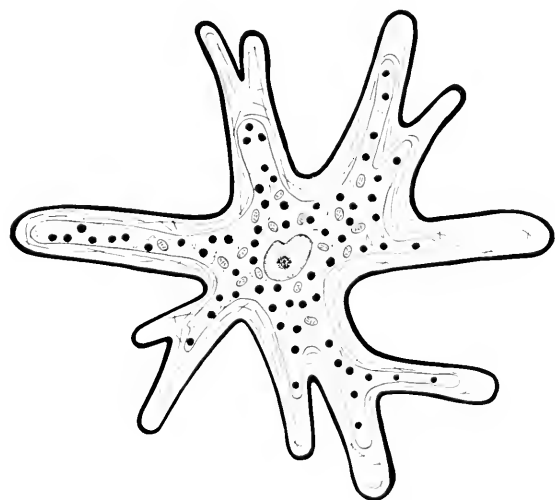


Fig. 7. Schematic representation of the observations made on teleost melanophores.

The Pharyngeal Protein Fibres of the Ciliates

CH. ROUILLER, E. FAURÉ-FREMIET and M. GAUCHERY

*Laboratoires d'Embryologie expérimentale et de Médecine expérimentale du Collège de France, Paris;
Institut de Recherches sur le Cancer Gustave Roussy, Villejuif*

THE Ciliates are distinguished amongst unicellular organisms by the diversity and complexity of their cytoplasmic differentiations. Electron microscopy allows us to make new studies both of the ultrastructure and comparative morphology of various organelles such as myoid fibres and certain skeletal apparatus (3-9).

Among the latter, we will examine here protein fibres which in the Gymnostomata and some Hypo-

stomata form below the mouth, in the endoplasm, a pharyngeal framework guiding the introduction of ingesta. The properties of these rigid and elastic fibres, birefringent and easily stained with mercuric bromophenol blue, are readily comparable to certain scleroprotein.

In the prostomal and pleurostomal Gymnostomata (called Rhabdophorina by Corliss (1), from Fauré-Fremiet (2)) this framework is built up from

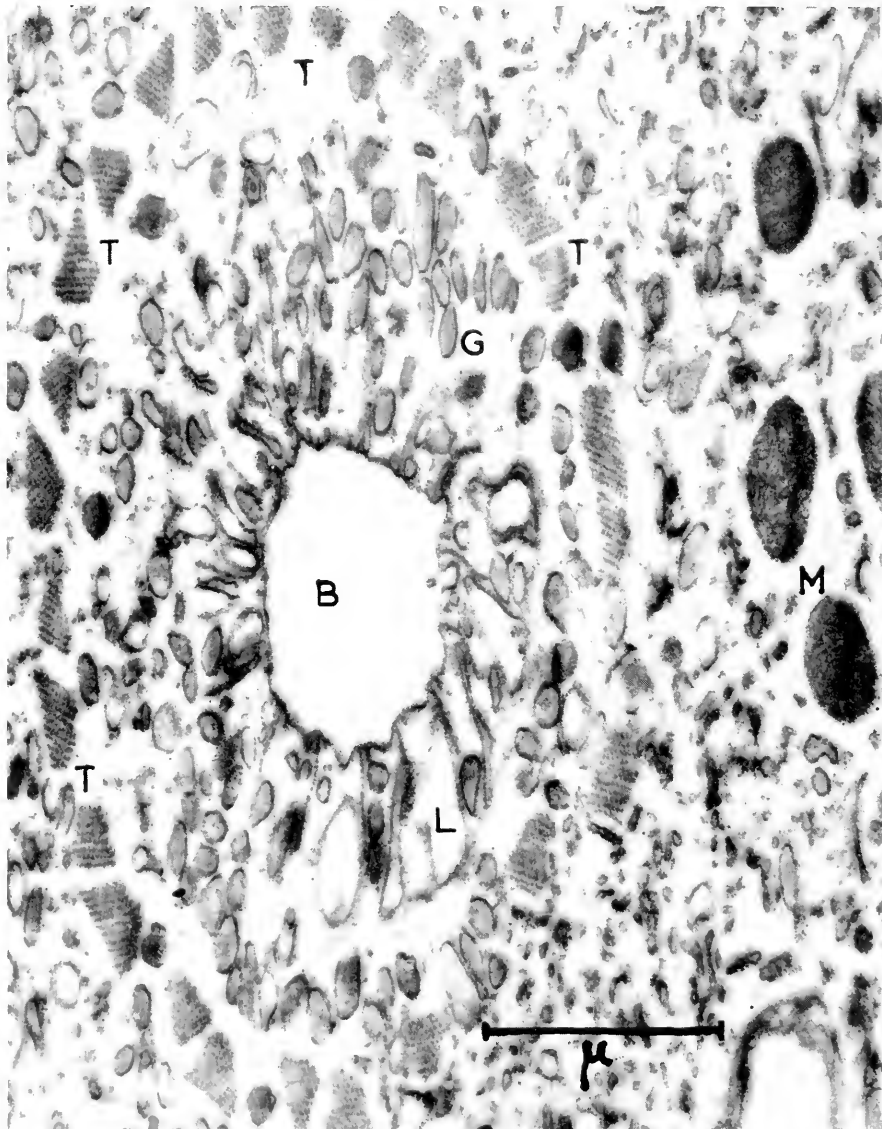


Fig. 1. *Coleps hirtus*. Cross section of the anterior part of the body. B, buccal depression. T, cross sections of the trichites constituting the pharyngeal framework around the buccal funnel. M, mitochondria. Around the buccal depression there are some radial cytoplasmic lamellae (L) and many granules (G). Magnification 31,000.

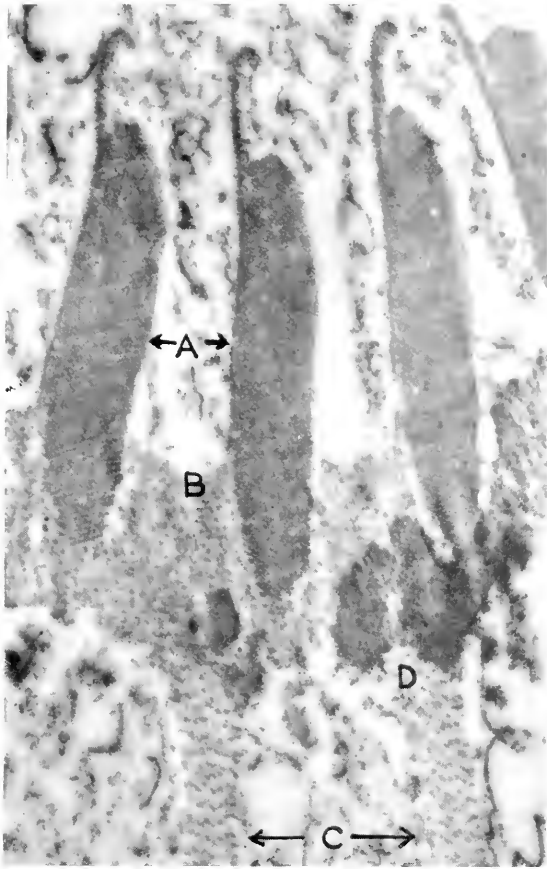


Fig. 2. *Nassula aurea*. Cross section of a part of the pharyngeal basket. A, proteic rods; B, peripheral sheath with (C) aliform crests, and (D) attempts at cristallisation. Magnification 31,000.

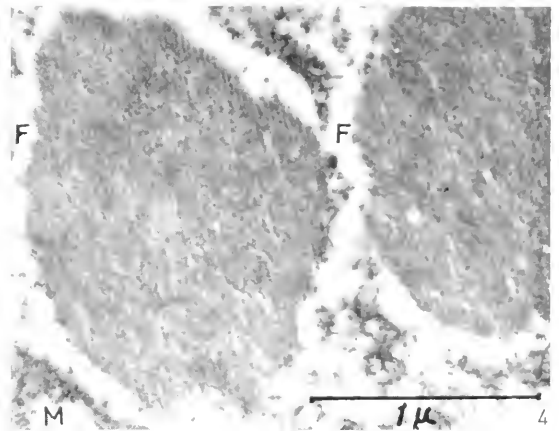
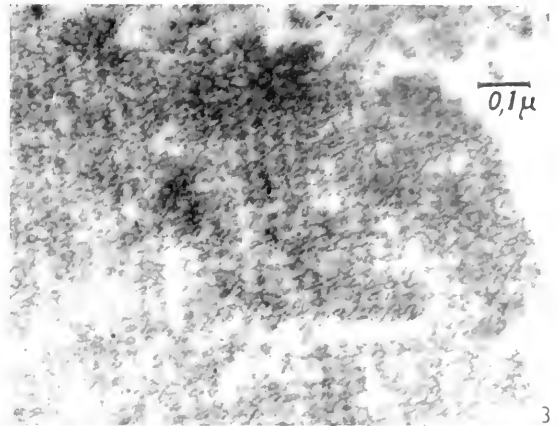


Fig. 3. *Nassula ornata*. Paracrystalline structure of a pharyngeal proteic rod. Magnification 68,000.

Fig. 4. *Frontonia marina*. Cross section of the pharyngeal proteic fibres (F). M, mitochondria. Magnification 30,000.

a nearly cylindrical bundle of protein rods—or trichites—quite distinct from the trichocysts which may coexist with them.

The transverse section on the level of the buccal depression of the *Coleps hirtus* (fig. 1) shows the order of these trichites. They are themselves built up from a bundle of long parallel homogeneous fibrils. To return to transverse sections one may see that these fibrils are regularly arranged on a series of longitudinal parallel planes and so evenly spaced that the structure has a crystalline appearance.

Comparable micrographs have been obtained from two species of *Prorodon*, but in one of these, *P. nucleolatus*, the arrangement of the fibrils is less regular, due to the presence, near the buccal extremity of the trichites, of an amorphous interstitial substance.

In the hypostomal Gymnostomata (called Cyrtophorina) the pharyngeal framework appears as a much more clearly defined organite, the basket, whose protein rods, in general thicker than the trichites, are united, near the mouth at least, by a peripheral sheath. This structure is shown by the different species of the genus *Nassula*. In *Nassula aurea*

(fig. 2) the twenty-five rods of the basket have an elliptical transverse section, and one of their side surfaces is extended into the pharyngeal cytoplasm by a fibrillar lamella. Their ultrastructure shows a dense and remarkably regular packing of longitudinal and parallel fibrillar planes. The peripheral sheath which unites the rods extends its outer surface with aliform crests. It is equally built up from an ensemble of longitudinal fibrils but these are loosely arranged, although there may be observed, from place to place, some attempts at cristallisation. *Nassula ornata* (fig. 3) shows the same structure with thicker rods of triangular cross sections.

The basket becomes more complicated in *Chlamydomon* where at the same time there may be observed a pharyngeal tube of lamellar structure which runs from the buccal epiplasm to the endoplasm. The protein rods include an axial mass which is apparently amorphous and around which the fibrils are assembled in a random manner. Their buccal extremity is differentiated and capped by a dense protein sheath conical in form, resembling a tooth. All these teeth form a maxillary crown.

This type of differentiation is accentuated in

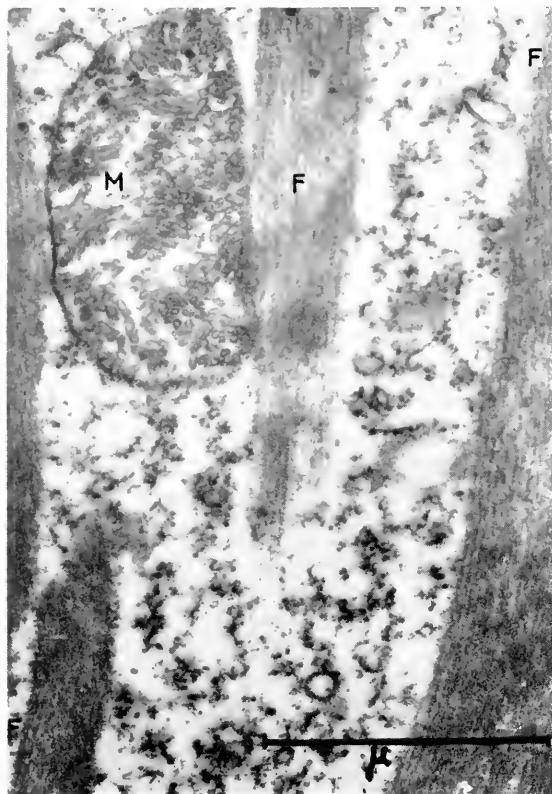


Fig. 5. *Frontonia marina*. Longitudinal section of some pharyngeal proteic fibres (F). M, mitochondria. Magnification $\times 34,000$.

Dysteria by the development of the pharyngeal tube and the reduction of the protein rods to two large stylets surmounted around the mouth by two complex maxillae.

It is known that in certain Hymenostomata a set of pharyngeal fibres dip from the mouth into the endoplasm. In *Frontonia marina* (figs. 4 and 5) these long and flexuous fibres appear on the same section, cut in various planes, beside of trichocysts and mitochondria. Of a protein nature, they are here also built up from a set of longitudinal homogeneous fibrils, regularly spaced in series of parallel planes.

By their structure and their position, these fibres are readily comparable to those which form the pharyngeal basket of *Nassula*. This fact should be remembered if one wishes to study the comparative morphology and evolution of the Ciliates. We have elsewhere described similar fibres found around the buccal infundibulum of the peritrichous Ciliates (5).

From the cytological point of view, we see that all the fibres examined are of proteic nature. They are rigid and elastic, birefringent and built up of elementary fibrils arranged to form a paracrystalline structure. The elementary fibrils seem to be of a fairly constant diameter, between 150 and 200 Å. Each of them must be considered as an already complex macromolecular entirety.

The elementary fibrils are always in a parallel arrangement but their mutual ordering may be either loose and irregular, or tight and regular in the transverse plane with respect to a definite pattern. In fact we have a system which we may name smectonematic since the fibrils are arranged in a parallel manner (as in the nematic mesomorphic states) but in addition on a series of parallel planes (the latter bringing to mind a smectic mesomorphic state).

Unfortunately, there is some doubt as to the origin of the fibres, that is to say their formation process, their growth, their assemblage, their pattern-making. The case of *Frontonia* indicates a possible relationship with the ciliary rootlets similar to those previously described in *Stentor* (3). It is not sure whether this is so with *Nassula* and *Chlamydomon*.

REFERENCES

1. CORLISS, J. O., *System. Zool.* **5**, 68-91, 121-140 (1956) and *Arch. Prot.* (1957, in press).
2. FAURÉ-FREMIET, E., *Bull. soc. zool. France* **75**, 109-122 (1950).
3. FAURÉ-FREMIET, E. and ROULLER, CH., *Compt. rend. acad. sci.* **241**, 678-680 (1955).
4. FAURÉ-FREMIET, E., ROULLER, CH., and GAUCHERY, M., *J. Protozool.* (1957, in press).
5. — *Bull. soc. zool. France* **81**, 77-85 (1956).
6. — *Arch. d'anat. microscop.* **45**, 139-161 (1956).
7. ROULLER, CH., FAURÉ-FREMIET, E., and GAUCHERY, M., *Compt. rend. acad. sci.* **242**, 180-182 (1956).
8. — *J. Protozool.* **3**, 188-193 (1956).
9. — *Exptl. Cell Research* **11**, 527-541 (1956).

IX

COLLAGEN, CARTILAGE, BONE

Kollagen

U. HOFMANN und K. KÜHN

*Eduard Zintl-Institut für anorganische und physikalische Chemie der
Technischen Hochschule Darmstadt*

Im Jahre 1942 haben zum ersten Mal Hall, Jakus und Schmitt (5) sowie etwas später Wolpers (15) eine Querstreifung des Kollagens mit einer Periode von ungefähr 650 \AA im Elektronenmikroskop nachgewiesen. Diese ersten Aufnahmen zeigten nur einen Hell- und einen Dunkelstreifen pro Periode. Bald darauf gelang es, die Querstreifung zunächst in drei (6, 16), später in sechs bis sieben Banden aufzulösen (12, 17).

Hofmann, Nemetschek und Graßmann (8) erreichten an Sehnenkollagen eine Auflösung in zunächst acht, dann zehn und schließlich dreizehn Querstreifen (9).

Um ein größeres Versuchsmaterial zu erhalten, untersuchten wir im folgenden Kollagenfibrillen verschiedenster Herkunft. So zeigten Fibrillen aus Kalbshaut zehn Querstreifen pro Periode. Es fällt auf, daß die Periodenlänge bei Kalbshaut durchschnittlich 100 \AA kürzer ist als bei Sehnenkollagen. — Die Fibrillen nicht ausgereifter Kollagenfasern, so z. B. von embryonaler Achillessehne, sind dünn und kontrastarm und von einer störenden Zwischensubstanz behaftet, die durch vorherige Behandlung mit Trypsin teilweise entfernt werden konnte. Wir konnten acht bis neun Querstreifen beobachten. — Auch Reticulinfibrillen zeigen eine periodische Querstreifung. Abb. 1 zeigt neun bis zehn Querstreifen pro Periode, deren Schwärzung aber vom Normalen abweicht, so daß eine Indizierung der einzelnen Streifen Schwierigkeiten macht. Nach Nemetschek, Graßmann und Hofmann (9) können aber auch bei normalem Sehnenkollagen die Intensitäten der einzelnen Querstreifen beträchtlich schwanken.

Behandelt man kollagenes Material mit verdünnten organischen Säuren (19) oder mit sauren Puffern (10), so geht ein Teil des Kollagens in Lösung. Aus diesen Lösungen kann man durch Dialysieren gegen verdünnte Kochsalzlösung oder schwachalkalische Pufferlösungen Fibrillen abscheiden, deren Querstreifungsmuster bis auf eine etwas abweichende Schwärzung mit dem des normalen Kollagens übereinstimmen. Abb. 2 zeigt dreizehn Querstreifen.

In Gegenwart von geringen Mengen kohlenhydrathaltiger Substanzen, wie α_1 -Glycoprotein oder

Chondroitinsulfat, kann (7) aus denselben Kollagenlösungen eine Kollagenart abgeschieden werden, die in der Natur nicht angetroffen wird, die sogenannten long-spacing-Fibrillen. Sie unterscheiden sich von normalem Kollagen durch eine weit größere Periode von 1500 bis 3000 \AA und einem völlig anderen, und zwar symmetrischen, Querstreifungsmuster.

In Gegenwart von Nucleinsäure oder Adenosintriphosphorsäure bildet sich noch eine andere Art, die sogenannten long-spacing-Segmente (13).

Bei den bestaufgelösten Kollagenfibrillen mit dreizehn Querstreifen dürften die kleinsten Einzelheiten, welche noch in Faserrichtung erkennbar sind, kaum größer als 15 \AA sein. Die photometrische Ausmessung der einzelnen Fibrillen über alle sichtbaren Perioden hinweg zeigt, daß innerhalb einer einzelnen Fibrille die Lage der Schwärzungsmaxima der einzelnen Querstreifen mit einem Fehler von weniger als 10 \AA festgelegt werden kann (8). Man stößt so mit optischen Mitteln in Bereiche vor, welche nur noch von der Größenordnung einiger Aminosäuren sind.

Für die Entstehung der Querstreifung hat man noch keine befriedigende Erklärung gefunden. Zwei Deutungen sollen erwähnt werden. Nach der einen werden die dunklen Querstreifen durch Anhäufung schwerer und Phosphorwolframsäure (PWS) bevorzugt bindende, also basische Aminosäuren, gebildet. Nach der anderen werden die dunklen und hellen Querstreifen durch verschiedene Anordnung der Eiweißketten gebildet.

Die Annahme (1), daß die ungeordneten und lockeren Teile der Periode die PWS bevorzugt einlagere und deswegen nach Anfärbung dunkler erscheine als die geordneten und an sich dichteren Teile, ist zweifelhaft, da man auch ohne PWS-Anfär-

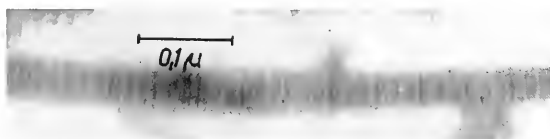


Abb. 1. Reticulumfibrille aus Katzenmilch mit Hyaluronidase und anschließend mit PWS behandelt. 10fach unterteilte Querstreifung. Elektr.-opt. Vergr.: 42000, Endvergr. 120000, Periode 500 \AA .



Abb. 2. Aus Citratlösung abgeschiedene Kollagen-Fibrille, mit PWS behandelt. 13fach unterteilte Querstreifung. (Ungeöhnliche Schwärzung einzelner Banden: a_3 besonders stark und scharf geschwärzt, b_1 intensiver als b_2). Elektr.-opt. Vergr.: 48000, Endvergr. 160000, Periode 800 \AA .

bung durch stärkere Bestrahlung im Elektronenmikroskop (8) und durch Erhitzen im Hochvakuum (9) eine hochunterteilte, wenn auch nicht so scharfe Querstreifung erzielen kann. Nach der Annahme von Bear und Mitarbeiter müßte die Aufnahme ein Negativ einer mit PWS angefärbten Faser sein, was nicht zutrifft.

Die Rolle der PWS ist noch ungeklärt. Wie wir finden, bindet Kollagen bis zu 80 % seines Gewichtes PWS. Diese läßt sich aber leicht bis zu 40 %, auswaschen, ohne daß dabei der Kontrast der Querstreifung schwächer wird. Die PWS kann also nicht nur eine beschwerende Wirkung haben, sondern scheint auch noch irgendwie chemisch auf die Kollagenfaser einzuwirken. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Banga und Balo (18) gefunden haben, daß Kollagen, welches mit PWS behandelt wurde, in Gegensatz zu nativem Kollagen von dem Enzym Elastase angegriffen wird. Vielleicht spielt hier die nicht unbedeutende Oxydationswirkung der PWS eine Rolle. Versuche in dieser Richtung sind bei uns im Gange, aber noch nicht abgeschlossen.

Hofmann, Nemetschek und Graßmann (8) haben gezeigt, daß intensive Bestrahlung im Elektronenmikroskop charakteristische Veränderungen hervorruft. Zunächst zerfallen die dunklen Querstreifen in dunkle, in der Längsrichtung der Faser orientierte Einzelstreifen. Bei stärkerer Belastung des Objekts entstehen anstelle dieser dunklen Längstreifen Löcher, das sogenannte „Glühstrumpfstadium“. Zuletzt bilden sich dunkle, kugelförmige Partikelchen, die unregelmäßig über die Fibrille verteilt sind. Ähnliche Veränderungen erzeugt auch das Erhitzen der Faser im Hochvakuum (9).

Die Kenntnis der chemischen Reaktionen, welche diese Veränderungen begleiten, ist von großer Wichtigkeit. Zu diesem Zweck haben wir Fasern mit charakteristischen Zersetzungsstadien, die wir durch Erhitzen im Hochvakuum herstellen, auf ihre Aminosäurezusammensetzung mit Hilfe zweidimensionaler Papierchromatographie untersucht. Die beiden ersten Stadien, also das Auftreten einer unterteilten Querstreifung und der Zerfall dieser Streifen in längsgerichtete dunkle Partikelchen lassen nur die Aminosäuren in normaler Zusammensetzung erkennen. Erst bei fortgeschrittener Zersetzung bemerkt man auf den Chromatogrammen dunkle Flecke mit sehr geringen Rf-Werten, wahrscheinlich Verkohlungsprodukte. Mit Sicherheit läßt sich sagen, daß bei den Belastungen, denen die Fibrillen im Elektronenmikroskop normalerweise ausgesetzt sind, keine durchgreifenden chemischen Umsetzungen vor sich gehen. Wie wir aber feststellten, werden mit Elektronen bestrahlte Fibrillen im Gegensatz zu nativem Kollagen von Trypsin angegriffen.

In den letzten Jahren ist öfters die Vermutung ausgesprochen worden, daß Kohlenhydratverbindungen eine wesentliche Rolle bei der Bildung und dem Aufbau von Kollagenfibrillen zukommt. So ent-

halten Kollagenfasern geringe Mengen von Kohlenhydraten (weniger als 1 %) (4). Die Grundsubstanz des Bindegewebes, in der sich die Kollagenfibrillen bilden, enthält Kohlenhydratverbindungen wie saure Polysaccharide, z. B. Chondroitinsulfat. Solche Verbindungen beeinflussen die Fibrillenbildung wesentlich (7).

Weiter wichtig ist der Befund, daß man Kollagenfasern durch Behandlung mit Natriumperjodat und Phenyljodosoacetat in Kettenabschnitte aufteilen kann, die nur noch 20–25 Aminosäuren lang sind (3). Diese spezifischen Oxydationsmittel greifen aber von den hier in Betracht kommenden Substanzen nur Kohlenhydrate oder vorsichtiger ausgedrückt kohlenhydratartige Substanzen an.

Die von Dettmer und Schwarz (2) entwickelte Perjodat-Silberurotropin-Reaktion, mit der man Kohlenhydrate im Elektronenmikroskop sichtbar machen kann, beruht ebenfalls auf der Oxydationswirkung des Perjodats. Die bei der Oxydation entstehenden Aldehydgruppen lagern bei der folgenden Versilberung Silberkörnchen an.

Mit der Perjodat-Silberurotropin-Reaktion konnte Pahlke (11) zeigen, daß die Einlagerung von Silberkörnchen bei embryonalen Sehnen vor allem in der amorphen Zwischensubstanz erfolgt. Mit zunehmendem Alter scheiden sich die Silberkörnchen immer mehr an der Oberfläche der Faser ab, um sich beim Erwachsenen schließlich periodisch in die Dunkelteile der Querstreifen einzulagern. Nach Schwarz (14) gilt nur die periodische Innenversilberung als charakteristisch für ausgereifte Kollagenfibrillen, denn Querstreifung nach PWS-Anfärbung zeigen auch embryonale und reticuläre Fibrillen.

Zur weiteren Klärung dieser Probleme haben uns hauptsächlich vier Fragen beschäftigt:

1. Lagern sich die Silberkörnchen bei der Perjodat-Silberurotropin-Reaktion nur in den Dunkelteilen der Fibrillen ab?
2. Ist eine geordnete Ablagerung von Silberkörnchen ein Merkmal gereifter und eine ungeordnete Ablagerung ein Merkmal unreifer Fibrillen?
3. Erfolgt die Ablagerung der Silberkörnchen im Innern der Fibrille durch ihren ganzen Querschnitt hindurch?
4. Kann man mit Hilfe von Enzymen, wie Hyaluronidase oder Trypsin, die perjodatempfindlichen Gruppierungen von den Fibrillen abtrennen?

Dazu untersuchten wir zunächst als Standardprodukt einer ausgereiften Fibrille die Achillessehne eines erwachsenen Menschen. Die Anfärbung mit der Perjodat-Silberurotropin-Reaktion zeigte das schon von Pahlke beschriebene Bild. Es hebt sich deutlich die normale Periode des Kollagens mit bis zu drei Silberquerstreifen pro Periode heraus.

Ähnlich ist es bei Fibrillen aus Kalbshaut: man kann einen Silberquerstreifen pro Periode erkennen. Auch bei embryonaler Achillessehne und bei reti-

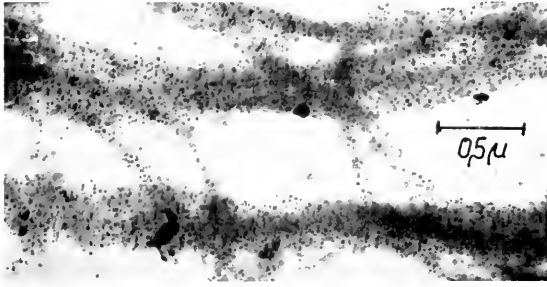


Abb. 3. Reticulumfaser aus Katzenmilz, mit Trypsin behandelt. Perjodat-Silberurotropin-Methode (15 Min. mit Natriumperjodat behandelt, 18 Stdn. versilbert). Elektr.-opt. Vergr.: 12 000 \times , Endvergr. 22 000 \times , Periode ca. 500 Å.

culären Fibrillen aus Katzenmilz, Abb. 3, konnten wir eine schwache aber doch typisch regelmäßige Versilberung beobachten, nachdem wir die störende silberanfärbbare Zwischensubstanz mit Trypsin entfernt hatten. Fibrillen aus Citratlösung weisen eine besonders regelmäßige und sehr scharfe periodische Silberablagerung auf mit drei Silberquerstreifen pro Periode, Abb. 4. Die Versilberung der long-spacing-Fibrillen läßt eine deutlich periodische Silberablagerung von mindestens sechs Querstreifen pro Periode erkennen. Die Schwärzung der Querstreifung haben wir beim gleichen Präparat und gleicher Entwicklung verschieden gefunden, Abb. 5, 6a.

Die Klärung der Frage, inwieweit sich die Silberkörner in den Dunkelteilen ablagern, ist aus den eben gezeigten Abbildungen nicht eindeutig zu entnehmen, weil die verhältnismäßig grobe Silberablagerung die Querstreifung verdeckt. Wir haben daher schwach versilberte Fasern nachträglich mit PWS angefärbt. Die Silberkörner lagern sich haupt-

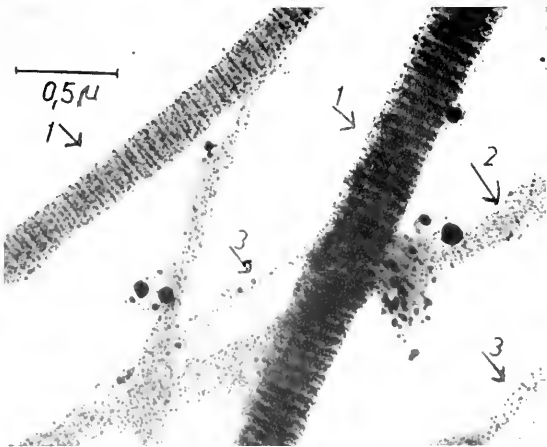


Abb. 4. Aus Citratlösung abgeschiedene Kollagen-Fibrillen, mit Trypsin behandelt, Perjodat-Silberurotropin-Methode (15 Min. mit Natriumperjodat behandelt, 8 Stdn. versilbert). Bis zu drei Silberquerstreifen pro Periode. Pfeil 1: Dicke Fibrillen, sehr regelmäßige Versilberung. Pfeil 2: Weniger dicke Fibrillen, periodische, aber schon etwas unregelmäßige Versilberung. Pfeil 3: Dünne Fibrille, unregelmäßig versilbert. Elektr.-opt. Vergr.: 11 600 \times , Endvergr. 27 000 \times , Periode ca. 650 Å.

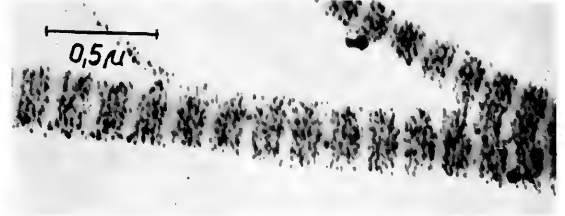


Abb. 5. Long-spacing-Fibrillen aus saurer Prokollagen-Lösung in Gegenwart von α_1 -Glycoprotein hergestellt, mit Hyaluronidase behandelt, Perjodat-Silberurotropin-Methode (15 Min. mit Natriumperjodat behandelt, 8 Stdn. versilbert). Bis zu sechs Silberquerstreifen pro Periode. Elektr.-opt. Vergr.: 11 700 \times , Endvergr. 29 000 \times , Periode 1500 bis 2000 Å.

sächlich in den Dunkelteilen ab, können aber auch in den Hellteilen beobachtet werden. In Abb. 6 haben wir Aufnahmen des gleichen long-spacing-Präparates einmal versilbert (Abb. 6a), einmal unbehandelt (Abb. 6b) einander zugeordnet. Die Zuordnung kann hier eindeutig erfolgen, da es Aufnahmen gibt, bei denen die Dunkelteile durch die Versilberung hindurch sichtbar sind. Man sieht, daß die intensiver hervortretenden Dunkelteile keineswegs auch bei der Versilberung betont sein müssen. Im Gegenteil treten hier die beiden Außenstreifen besonders hervor.

Eine regelmäßige periodische Silberablagerung ist nach unserer Meinung bevorzugt eine Folge der Dicke und Festigkeit der Fibrillen. Dies sieht man am deutlichsten in Abb. 4. Die dicksten Fibrillen zeigen eine sehr regelmäßige Ablagerung. Bei dünneren Fibrillen fällt die Versilberung nicht mehr so geordnet aus, während bei ganz dünnen Fibrillen Silberkörner unregelmäßig über die Fibrille verstreut sind.

Zu der Frage, ob die Silberkörner im Innern der Fibrille abgelagert werden, haben wir von allen hier gezeigten Fibrillen Stereoaufnahmen gemacht. Sie zeigen deutlich, daß der größere Teil der Silberkörner in den Außenbereichen der Fibrillen abgelagert werden, ein Teil befindet sich aber auch im Fibrillennern. Diese Ablagerung ist unabhängig davon,

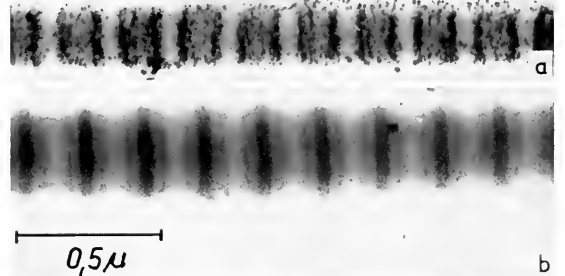


Abb. 6. Long-spacing-Fibrillen, wie bei Abb. 5 hergestellt, mit Hyaluronidase behandelt, a) nach Perjodat-Silberurotropin-Behandlung. Elektr.-opt. Vergr.: 12 600 \times , b) ohne Anfärbung Elektr.-opt. Vergr.: 12 600 \times , Endvergr. 38 000 \times , Perioden ca. 2000 Å. Gleiche Strukturelemente untereinander.

ob die Silberkörnchen regelmäßig oder unregelmäßig angeordnet sind.

Versuche, die perjodatemphindlichen Gruppierungen von den Fibrillen durch Hyaluronidase- oder Trypsinbehandlung abzutrennen, waren erfolglos. Im Gegenteil wurde bei embryonalen Fasern sowie bei Reticulin dadurch die störende Zwischensubstanz von den Fibrillen abgelöst, und die Versilberung wurde so deutlicher sichtbar.

Abschließend neigen wir auf Grund unserer elektronenoptischen Untersuchungen sowie auf Grund der chemischen Studien über den Perjodatabbau des Kollagens zu der Annahme, daß die perjodatemphindlichen Substanzen eng mit dem molekularen Aufbau der Kollagenketten zusammenhängen. Nach unserer Meinung besteht zwischen dem chemischen Aufbau embryonaler und reticulärer Fibrillen einerseits und ausgereiften Kollagenfibrillen andererseits kein grundlegender Unterschied. Berühmend ist, daß die Versilberung, wenn auch im Großen, denselben periodischen Aufbau zeigt wie die Feinstruktur nach PWS-Anfärbung, so daß die Annahme bestätigt wird, daß auch die Feinstruktur nach PWS-Anfärbung den molekularen Aufbau des Kollagens widerspiegelt.

LITERATUR

1. BEAR, R. S., BOLDUAN, O. F. A., und SALO, T. P., *J. Amer. Leather Chemists' Assoc.* **46**, 106 (1951).
2. DEUFNER, H. und SCHWARZ, W., *Z. wiss. Mikroskop.* **61**, 423 (1952/53).
3. GRASSMANN, W. und KÜHN, K., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **301**, 1 (1955).
4. GRASSMANN, W. und SCHLICH, H., *Biochem. Z.* **272**, 320 (1935).
5. HALL, C. L., JAKUS, M. A., und SCHMITT, F. O., *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 1234 (1942).
6. *Biol. Bull.* **90**, 39 (1946).
7. HIGBERGER, J. H., GROSS, J., und SCHMITT, F. O., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 286 (1951).
8. HOLMANN, U., NEMESCHIK, TH., und GRASSMANN, W., *Z. Naturforsch.* **7b**, 509 (1952).
9. NEMESCHIK, TH., GRASSMANN, W., und HOLMANN, U., *Z. Naturforsch.* **10b**, 61 (1955).
10. ORECHOWITSCH, K. D., *Compt. rend. acad. sci. URSS* **71**, 521 (1950).
11. PAHLKE, G., *Z. Zellforsch. mikroskop. Anat.* **39**, 421 (1954).
12. SCHMITT, F. O. und GROSS, J., *J. Amer. Leather Chemists' Assoc.* **43**, 658 (1948).
13. SCHMITT, F. O., GROSS, J., und HIGBERGER, J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **39**, 459 (1953).
14. SCHWARZ, W., Die Zwischensubstanz des Bindegewebes. Hamb. Symp. über Kapillaren und Interstitium. G. Thieme, Stuttgart, 1955.
15. WOLPERS, C., *Klin. Wochschr.* **22**, 624 (1943).
16. — *Virchow's Arch. pathol. Anat. u. Physiol.* **312**, 292 (1944).
17. — *Makromolekulare Chem.* **2**, 37 (1948).
18. BANGA, I. und BALO, J., *Acta Physiol.* **4**, 235 (1954).
19. NAGLOTTE, J., *Compt. rend. acad. Sci.* **184**, 115 (1927).

Neue Befunde zur Struktur der Sehnenfibrille an Hand von Dünnschnitten

E. KUHNKE und K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN

*Physiologisches Institut und Zentral-Laboratorium für angewandte
Übermikroskopie der Universität Bonn*

DIE völlige Aufklärung des Feinbaues der Sehnenfibrille ist trotz vieler Bemühungen noch nicht gelungen. Wir glauben an Hand unserer Dünnschnitte, unter Berücksichtigung zahlreicher Befunde anderer Autoren sowie der Tatsache, daß sich das sog. Kollagen als chemisch nicht einheitlich erwiesen hat (2, 9, 13, 22) eine Vorstellung über den Aufbau der Sehnenfibrille entwickeln zu können, die nicht nur den neuen Befunden, sondern auch der physiologischen Funktion der Sehne, starken Zugbeanspruchungen zu widerstehen, genügt.

Achillessehnen von Rindern wurden etwa 1 St. nach der Schlachtung als $\frac{1}{2}$ mm breite Stückchen entweder in 10%igem neutralisierten Formalin oder in 1%iger Osmiumtetroxydlösung, beide gepuffert mit Veronalacetat auf pH 7,0–7,2, fixiert und mit 1%iger Phosphorwolframsäure in 70%igem Alkohol kontrastiert. Ein Teil der Präparate wurde vor der Fixierung in aqua dest. bei 65°C eine Stunde mechanisch gezerrt. Dabei wurde die Faser etwa 10mal in der Sekunde durch einen Exzenter

abwechselnd stark angespannt und entspannt. Einbettung in Methylmethacrylat Butylmethacrylat im Verhältnis 1:5. Schnitte: Sjöstrand-Mikrotom. Aufnahmen: Siemens-Übermikroskop Typ 100 d, 80 kV.

Unsere Längsschnitte zeigen die bekannte Querstreifung. Ist der Schnitt genügend dünn, kann die Querstreifung teilweise oder auch vollständig fehlen. An gebogen im Schnitt verlaufenden Fibrillen findet sich öfter ein nur lokales Fehlen der Querstreifung (Abb. 1), ein Beweis dafür, daß die betreffende Fibrille überhaupt eine Querstreifung besitzt. In Abb. 2 ist die Querstreifung lediglich auf einer Seite der Fibrillenachse weggeschnitten. Bei paralleler Schnittführung kann sich ein solches Bild nur bei polygonalem Fibrillenquerschnitt ergeben. Daß der elektronenoptisch dichtere D-Teil der Querstreifung nicht scheibenförmig die ganze Fibrille durchsetzt, sondern eine ringartige, peripher gelegene Struktur darstellt, ergibt sich auch aus Schrägschnitten. Wir

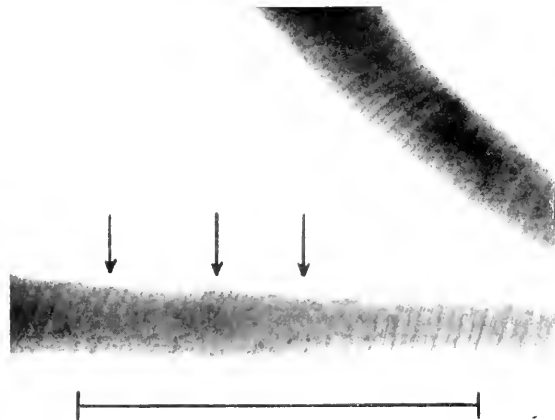


Abb. 1. Längsschnitt durch Achillessehne Rind. Lokal fehlende Querstreifung. Fixation mit 1%iger OsO_4 . Vergr. 53 000 .

fassen die periodischen D-Anteile der Fibrille (15) als eine transversale Querstruktur auf, die auf das Gebiet der Fibrilloberfläche beschränkt ist.

In unmittelbarer Nähe der Fibrillen findet sich gehäuft eine elektronendichtere Substanz (Abb. 3, ↑), durch die eine interfibrilläre „Brücken“bildung zustandekommt (Kittsubstanz?). Die hohe Reißfestigkeit der Sehne quer zu ihrer Länge könnte hierauf sowie auf dem Vorhandensein der die Fibrillen verbindenden Querstrukturen (Abb. 4) beruhen.

Für den Aufbau der D-Ringe aus 2 oder mehr quer zur Fibrillenachse verlaufenden Untereinheiten, die vermutlich das Substrat der von Wolpers (26) beobachteten Lamellierung der D-Teile bilden, fanden wir zwei Anhaltspunkte: 1. Schräg angeschnittene Querstrukturen lassen eine Auflösung des scheinbar einheitlichen D-Teiles in Doppellinien er-

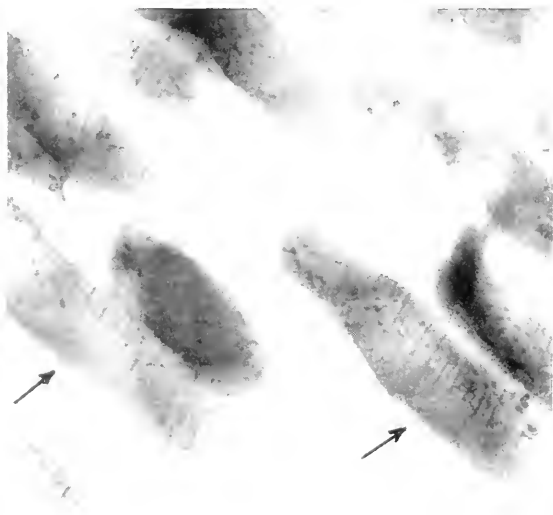


Abb. 2. Längsschnitt durch Achillessehne Rind. Die Querstreifung ist bei einigen Fibrillen nur auf einer Seite der Längsachse weggeschnitten. Fixation mit 10%igen neutralem Formalin. Vergr. 50 000 .

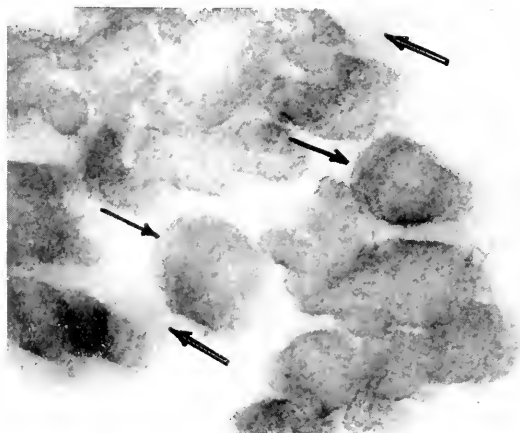


Abb. 3. Schräger Querschnitt durch Achillessehne Rind. Ringartige, periphere Lage der dichteren Substanz. ↑ : Unstrukturierte, zwischen den Fibrillen liegende Substanz (Kittsubstanz?). Fixation mit 10%igen neutralem Formalin. Vergr. 60 000 .

kennen. 2. In den meisten Fällen liegen identische Abschnitte der Fibrillen nebeneinander (3, 25). Bei den sich manchmal ergebenden Versetzungen dieser homologen Strukturen gegeneinander zeigt sich, daß die Querstrukturen im Sehnenverband nicht selten kontinuierlich auf die Nachbarfibrillen übergehen. An den eben erwähnten versetzten Stellen der Querstreifung läßt sich meist eine Aufteilung der D-Struktur in zwei Halbbänder erkennen. Diese können auf der benachbarten Fibrille z. B. die beiden dünneren H-Lamellen bilden.

Gegen einen röhrenartigen Aufbau der Kollagenfibrille (27) sprechen Querschnitte, wie die Abbildungen 2 und 3 zeigen. In den Fibrillen fehlt der Hohlraum, der ihre Charakterisierung als Röhren

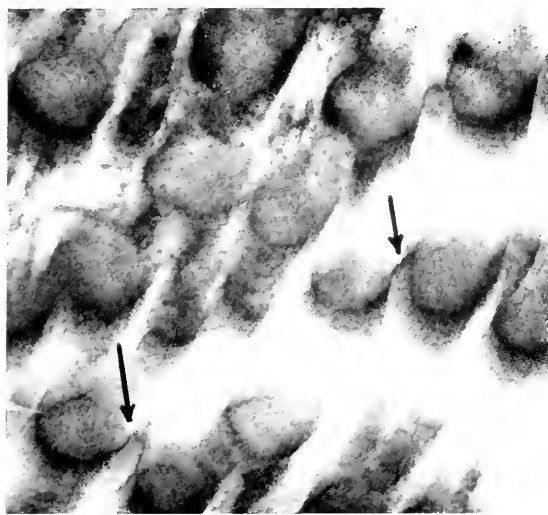


Abb. 4. Schräger Querschnitt durch Achillessehne Rind. Querverbindungen zwischen den Fibrillen durch die elektronenoptisch dichtere Substanz. Fixation mit 1%iger OsO_4 . Vergr. 60 000 .

erlauben würde. Außerdem umschließen die massendichteren Randlinien die Fibrillen nur teilweise. An den übrigen Randteilen fehlt jedes Anzeichen einer Verdichtung. Dadurch kann eine artifizielle Natur dieser Randlinien ausgeschlossen werden. Im Inneren der Querschnitte sind weiterhin dichtere, mit den peripheren D-Strukturen verbundene Netze erkennbar.

Die im Inneren der Fibrille vorhandenen Längsstrukturen, die wahrscheinlich mit den beschriebenen Sub- oder Prototibrillen identisch sind (4, 8, 14, 17, 19, 20, 23, 24), werden mit abnehmender Schnittstärke und besonders nach dem Wegschneiden der Querstreifung sichtbar.

Der Verlauf der Längsstrukturen ist, wie sich aus Längs-, Schräg- und Querschnitten ergibt, nicht genau parallel der Fibrillenachse. Zahlreiche Befunde ließen an eine Torsionsstruktur (12, 16) denken. Bei den in warmen Wasser gezerrten Präparaten ist der Verlauf in der Form eines abgeplatteten S erkennbar.

Die Längsstrukturen stehen wahrscheinlich mit einem interfibrillären Kanalsystem in Zusammenhang. In einigen Bildern fanden wir Einmündungsstellen. Ob dieses Kanalsystem, das keine eigene Wandung zu besitzen scheint und in seiner Größe erheblich unter dem Durchmesser der Blut- und Lymphcapillaren steht, eine Ernährungsaufgabe besitzt, läßt sich z. Zeit noch nicht entscheiden.

Zusammenfassend erweist sich die Querstreifung der Sehnenfibrillen als eine *periphere*, die Fibrille ringartig umfassende massendichtere Struktur filamentärer Bauelemente, die, sich verzweigend, auch die Nachbarfibrillen umgreifen können, wodurch der laterale Zusammenhang der Sehne gesichert wird.

LITERATUR

1. ASCENZI, A., *Scientia Med. Ital.* **3**, 701 (1955).
2. BANGA, J., *Acta Morphol. Suppl.* **4** (1955).
3. BYERSDORFER, K., *Z. Naturforsch.* **6**, 57 (1951).
4. BORASKY, R. und ROGERS, I. S., *J. Am. Leather Chemists' Assoc.* **67**, 312 (1952).
5. CRUISE, A. J., *Nature*, **174**, 888 (1954).
6. DELIMER, N., NECKEL, J., und RUSKA, H., *Z. wiss. Mikroskop.* **60**, 290 (1951).
7. DELIMER, N. und SCHWARZ, W., *Z. wiss. Mikroskop.* **61**, 423 (1954).
8. GROSS, J. und SCHMIDT, F. O., *J. Exptl. Med.* **88**, 555 (1948).
9. HARKNESS, R. D., MARKO, A. M., MUIR, H. M., und NEUBERGER, A., *Biochem. J.* **56**, 558 (1954).
10. KENNEDY, J. J., *Science* **121**, 673 (1955).
11. KRÜGER, F., WOHLFARTH-BOTTFERMANN, K. E., und PIFFERKORN, G., *Z. Naturforsch.* **7 b**, 407 (1952).
12. NECKEL, J., *Z. wiss. Mikroskop.* **60**, 298 (1951).
13. NODA, H., *Biochim. et Biophys. Acta*, Amsterdam, **17**, 92 (1945).
14. PORTER, K. R. und VANAMEL, P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **71**, 513 (1949).
15. PRATT, A. W. und WYCKOFF, R. W. G., *Biochim. et Biophys. Acta*, Amsterdam, **5**, 166 (1950).
16. REID, R., *Nature* **177**, 697 (1956).
17. SCHMITT, F. O., HALL, C. E., und JAKUS, M. A., *J. Cellular Comp. Physiol.* **20**, 11 (1942).
18. SCHWARZ, W., *Z. Zellforsch.* **38**, 26 (1952).
19. SEKI, M., *Arch. Histol. Jap.* **3**, 465 (1952).
20. SIZER, J. W., *Enzymologia* **13**, 293 (1948).
21. SWERDLOW, M. und STROMBERG, R. R., zit. d. BAHR, G. F., *Ärztl. Forsch.* **10**, 255 (1956).
22. SZABÓ, D. und BANGA, I., *Acta Morphol.* **4**, 3 (1955).
23. WASSERMANN, F., *Anat. Rec.* **111**, 145 (1951).
24. — *ibid.* **115**, 443 (1953).
25. WOHLFARTH-BOTTFERMANN, K. E. und KRÜGER, F., *Z. Naturforsch.* **9**, 30 (1954).
26. WOLPERS, C., *Makromol. Chem.* **2**, 37 (1947–48).
27. WYCKOFF, R. W. G., zit. in KENNEDY, J. J., *Science* **121**, 673 (1955).

The Proteolytic Action of Papain Studied by Means of the Electron Microscope

G. LELLI and G. ARANGIO-RUIZ

Istituto Superiore di Sanità, Roma

THE interest in morphological data on the proteolytic activity of various ferments gave rise to an electron microscopic study of the changes that occur in collagen fibrils after treatment with papain.

Little of this kind of research is found in the literature, as enzymic activity is usually studied only from the chemical side. Rudall (6) observed electron-microscopically that lacerated bull tendon subjected to the *collagenase* of *Cl. Welchii* showed a pointing of the ends of the smaller fibrils and a broken-up

appearance of the larger ones. This morphological finding has been reported in an authoritative article by Robb-Smith (5).

Different agents can produce varying changes in collagen more or less easily visible electron microscopically. Collagen fibrils are very sensitive to changes in the pH of the surrounding medium (4, 9). These changes differ, often greatly, according to the age of the body. Both acidity and alkalinity bring about very considerable damage to the delicate structure.

TABLE 1. *The damage of collagen fibrils through papain treatment.*

Papain	Powder	Saturated solution		2% solution			
		24 C		50 C			
Temp.	24 C	20'	24 h	1 h	5 h	14 h	24 h
Time	24 h	20'	24 h	1 h	5 h	14 h	24 h
Effects	+	-	+++	+	++	+++	+++
			+			++	++
						+	+

Biochemically the proteolytic action of papain, like that of pepsin, leads to the formation of peptones. By means of activators, particularly hydrocyanic acid, its action becomes intensified, leading to the formation of three times the amount of aminoacids such as tyrosine, tryptophane, leucine, glycocole, alanine, proline and arginine as in the proteinic decomposition due to trypsin. The action of papain thus stands between that of trypsin and pepsin (1).

Papain develops its optimal activity at pH 5 (trypsin's optimum pH 9) with a rapid decrease towards the acid side, and its solutions are usually neutral.

The collagen used in these studies was obtained by lacerating in distilled water fragments of guinea pig skin and tendons of rabbits and calves. The papain was obtained from the Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, and was used without activators. In some cases we used "papaiotin" (E. Merck A. G., Darmstadt) which is the almost pure ferment extracted from *Carica papaya*.

As according to Willstaetter & Grassmann (7) papain has an optimal temperature of 65-70 C we have experimented with different temperatures without, however, reaching such degrees as would be able to produce directly changes in the collagen fibrils (3).

The properly lacerated material was washed several times in double distilled water after treatment with the enzyme and then chromium shadowed before being examined in the electron microscope.

The tables 1-2 summarize the results obtained.

It is clear that the most severe lesions right up to the almost complete destruction of the fibrils are produced by the 2% solution of papain after 14-24 hours of exposure in a thermostat at 50 C. Alterations of a proportionately lesser degree are seen

TABLE 2. *Controls in distilled water.*

Temp.	24°C		50°C			
	20'	24 h	1 h	5 h	14 h	24 h
Time	-	-	-	-	-	-
Effects	-	-	-	-	-	-

in the other groups with lower temperatures and shorter times.

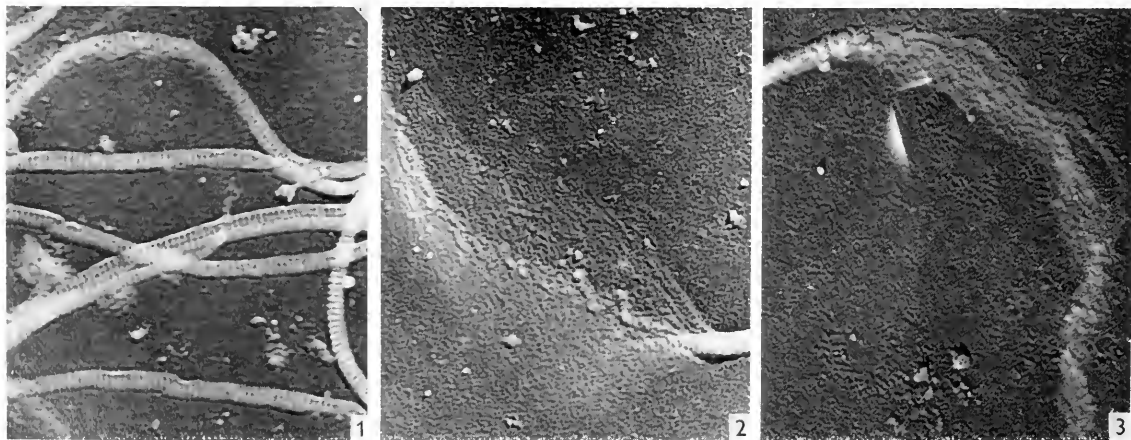
These electron microscopic results are in complete agreement with what is already known chemically.

However, we often found even considerable differences in the severity of the damage to the fibrils, in spite of identical physical and chemical experimental conditions, which we could with certainty attribute to differences in the quality of the collagen used.

The changes we observed ranged from a sort of loss of tone of the fibril, which became flat and assumed a tape-like shape (fig. 1), to a swelling of varying degree up to a more or less complete dissolution into filaments (fig. 2). In some cases it was chiefly the periphery of the fibrils that was damaged while the central zone tended to stay compact. The periodic structure sometimes persists in the damaged zone, particularly in the axial part of the fibril; in other cases it is completely lost (fig. 3). The lesions described are sometimes interrupted along the fibrillar axis by relatively normal areas.

When powdered papain is applied directly to the collagen there is much less damage. It is characterized by the tape-like appearance of the fibrils or by superficial erosions without any appreciable swelling.

These changes in the collagen fibrils are very similar to those produced by other factors, particularly acid or alkaline solutions and moist heat. These too show varying degrees of severity and extension in the same specimen of collagen; they often have a segmental distribution along the axis of the fibrils and range from a simple loss of tone of the fibril to swelling



Figs. 1-3. Morphological changes in collagen fibrils produced by papain digestion. Fig. 1. Flat, tape-like fibrils. Figs. 2-3. Dissolution of collagen fibrils into filaments, in fig. 3 with loss of the periodic structure.

and almost complete destruction. There are, however, differences in the behaviour of the periodic structure of the fibrils. When treated with papain this characteristic structure is preserved when the damage is slight or of moderate severity. It nearly always disappears when the damage is severe. But in fibrils treated with acid solutions it persists even in the zones of severest damage. In fibrils treated with moist heat above 60 C the periodic structure always disappears by a transformation into collagenous gelatin, regardless of the degree of fibrillar damage.

The changes produced by papain and papaïotin are morphologically similar but not identical with those produced by other factors. These changes are as much proof of the proteolytic action of the ferment as is the formation of amino acids from the chemical point of view. It thus seems possible that a technically perfected morphological examination

may one day furnish us with a simple method for an approximate assay of the proteolytic action of some ferments.

REFERENCES

1. ALESSANDRINI, M. E., *Rend. ist. super. Sanità* **10**, 517 (1947).
2. HALL, C. E., JAKUS, M. A., and SCHMIDT, F. O., *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 1234 (1942).
3. LELLI, G., *Jornada med.* **5**, 397 (1952).
4. LELLI, G. and MAROTTA, U., *Rend. ist. super. Sanità* **13**, 518 (1950).
5. ROBB-SMITH, A. H. T., Significance of Collagenase. Nature and Structure of Collagen. Butterworths Scient. Publ. London, 1953.
6. RUDALL, K. M. (1952) quoted by Robb-Smith, see ref. (5).
7. WILLSAETTER and GRASSMANN, *Z. physiol. Chem.* **138**, 184 (1924).
8. WOLPLERS, C., *Klin. Wochenschr.* **22**, 624 (1943).
9. WYCKOFF, Electron Microscopy. Interscience Publ. New York, 1949.

Electron Microscopic Observations on Frozen Collagen

G. LELLI and G. ARANGIO-RUIZ

Istituto Superiore di Sanità, Roma

It is known that the fibrils of collagen are particularly sensitive to variations in pH so that even weak acid solutions can seriously damage them. When such damage is slight, it consists of a flattening and enlargement of the fibrils, when it is severe it produces swelling which may be total or partial up to the complete dissolution of the fibrils in the liquid medium.

The varying degree of damage is generally related to the duration of contact with the acid solution, its temperature and the quality and age of the collagen.

In the course of electron microscopic studies on this subject we happened to notice that collagen preserved at low temperatures sometimes showed a greater resistance to the disintegrating action of acid solutions.

The material used in these experiments was collagen from guinea pig skin and rabbit or calf tendon.

In a first group of experiments carried out on 20 samples of collagen, half of each sample was frozen in a refrigerator at -70°C for a period ranging from 20 to 144 hours. It was then lacerated in water, treated with a lactic acid solution of a pH 3.5 for 20 minutes, then washed in water and examined electron microscopically.

The other half of each sample was used as a control and treated in exactly the same way without previous freezing.

The action of the acid solution was always visible electron microscopically and showed the usual fibrillar damage. When the increased resistance of the frozen fibrils, as compared with the controls, was so great as to produce a marked difference in the number and severity of the lesions (fig. 1) this was recorded as a positive result. This criterion,

although admittedly of only approximative value, has none the less yielded some interesting data on the existence of the phenomenon. The number of positive readings show that in at least 80 % of the cases the collagen fibrils of frozen tissue offer more and even double the resistance to acid solutions as compared with non-frozen material.

In a small number of tests (5) the lactic acid was replaced by a 2 % solution of papain for 24 hours at 30 C.

The results as judged by the same criteria as were used in the case of the acid solution, also showed the greater resistance of frozen collagen fibrils to the disintegrating action of the proteolytic enzyme.



Fig. 1. Damage of the structural organization of collagen fibrils produced by treatment in acid solution.

In a second group of experiments in which we looked for possible structural modifications of the collagen fibrils after freezing we divided the tests, 20 in all, into two subgroups.

In the first of these we subjected samples of collagen to temperatures ranging from -50°C to -70°C for 24 hours, they were then lacerated in double distilled water and examined. Nothing particular regarding the thickness, the periodic structure and the length of the period was found in these fibrils.

In the second subgroup, designed to obtain more exact information, the collagen fibrils were lacerated in double distilled water and then examined and repeatedly photographed. They were then subjected for 24 hours to a temperature of -70°C and then again photographed electron microscopically in the same microscopic field.

A comparative study of the electron micrographs thus obtained and an accurate measurement of the length of many periods showed that freezing produced no substantial changes in the periodic structure of the collagen. However it was evident from visual observation and even more so from checks of the electron micrographs with the comparator that there is a constant and uniform thinning of the fibrils after

freezing. The degree of thinning is usually moderate and at most one fifth of the original thickness.

Conclusions.—(a) Extreme cold applied to collagen produces in the fibrils an increased resistance to the destructive action of acid solutions and to the action of some proteolytic enzymes such as papain.

The hardening which may occur in frozen meat may be due to this increase in the resistance of the collagen.

(b) Cold does not produce appreciable structural changes in the collagen fibrils when seen in the electron microscope. This is in agreement with earlier observations (1, 2).

(c) Cold produces a greater or lesser degree of thinning which is constant in collagen fibrils.

REFERENCES

1. LELLI, G., BONANOME, A., and SAPPÀ, M., *Z. wiss. Mikroskop.* **61**, 298 (1953).
2. NEMETSCHKE, TH., GRASSMANN, W., and HOFMANN, U., *Z. Naturforsch.* **10b**, 61 (1955).

Electron Microscopic Observations on Collagen Exposed to X-Rays

G. LELLI, U. MAROTTA and A. D'AMORE

Istituto Superiore di Sanità, Roma

IN view of the ever-increasing application of radium and x-ray therapy in neoplastic diseases, the study of the effects of irradiation on the connective tissue is of great practical interest.

By means of the electron microscope we have studied the effects of x-rays on the collagen fibrils.

We have irradiated at varying doses the abdominal skin of 7 pigs aged 3 months, weighing about 15 kg, of 6 guinea pigs weighing about 700 g, and some bits of skin taken from animals of the same species before irradiation.

All treated animals showed rather early manifestations of circumscribed radiodermatitis, apart from the general toxic symptoms which in some cases killed the animal in the course of a few days.

Specimens for biopsy were taken regularly from the irradiated area of the skin.

In four cases the first biopsy was done immediately after the irradiation, and successive ones after 4, 8, 16 and 24 days, provided the animal was still alive.

In two cases 6 biopsies were done 24 hours after each irradiation and after 8, 16 and 24 days if the animal was then still alive.

The dermis was isolated from the biopsy material and from the pieces of skin removed prior to irradiation. It was then lacerated in double distilled water and examined under the electron microscope after previous chromium shadowing.

Careful examination of a very large number of electron microscopic photographs showed that the collagen fibrils had a normal transverse striation, usually without changes of either shape or thickness. We only occasionally encountered a fibril which was

swollen, ruptured, flattened, winding and apparently disintegrated in some parts.

We attach little importance to such changes, as identical pictures were seen in the controls. Moreover, these changes were not in any way related to the x-ray dosage applied.

Nemetschek *et al.* (2) using x-ray doses smaller than ours, found under the electron microscope that the normal transverse striation of the fibrils persisted and that these showed a fine granular appearance. This we could not see in our material which was always examined after chromium shadowing.

Also Marotta (1) excludes electron microscopically demonstrable changes in the collagen fibrils after a single dose of 700 r.

Our negative results are also in agreement with those recently obtained by Nerli (3) using the method of x-ray diffraction. Indeed this author found no difference whatsoever in the diagrams he obtained using dermis from the skin of rats irradiated with a single dose of 1200 r without filter and non-irradiated derma. According to Nerli this suggests that "x-ray irradiation does not change the basic structure of the polypeptide chains of the collagen".

REFERENCES

1. MAROTTA, U., *Rend. ist. super. Sanità* **18** (1955).
2. NEMETSCHKE, TH., GRASSMANN, W., and HOFMANN, U., *Naturwissenschaften* **16**, 371 (1954).
3. NERLI, A., *Radioter. Radiobiol. e Fis. Med.* **2**, 166 (1956).

Studies on the Fibrogenesis of Collagen

SYLVIA FITTON JACKSON

Medical Research Council Biophysics Research Unit,
Wheatstone Laboratory, King's College, London, W.C.2

COLLAGEN protein is widely distributed in the various phyla of the animal kingdom (3; Rudall, 1955). Recognition of its presence may be based in the characteristic fibre diagrams obtained from various materials by means of high angle x-ray diffraction. Though different sources of collagen give fibre diagrams indicating substantial differences of orientation and crystallinity, they are all recognizably belonging to the same class of protein. On the other hand, there are variations, for instance, in the amino-acid composition and in the structure of the constituent fibrils as seen by means of electron microscopy.

It is of interest, therefore, that though a typical fibre diagram for collagen is obtained from the cuticle of annelids (1), the characteristic axial periodicity of about 640 Å of the fibrils is apparently lacking (4). It was thought that an investigation of the fine structure of the cuticle of the annelid, *Lumbricus sp.*, by the use of thin sections in the electron microscope might help to elucidate the

method whereby the protein molecules became orientated into the distinctive layered structure which has been shown to be a feature of this material.

This work is still in a preliminary stage, but it has been found that the cuticle is composed of five regions. The region adjacent to the main body of the epidermal cells, which lie immediately beneath the cuticle, contains many evenly spaced folds of cytoplasm; these folds appear to taper into fine cytoplasmic processes which penetrate through the cuticle and are connected to the exterior membrane of the worm (fig. 1). In sections cut parallel to the surface of the worm, these processes are seen to be arranged in rows; they are usually about 700–1000 Å in diameter and about 2000 Å apart. Each row appears to be embedded in a ribbon of less dense material about 2500 Å wide. It is possible that the processes correspond to the granular layer recorded by Read and Rudall (4) in replicas of the earthworm cuticle.

Region 2, immediately above this lowest layer, contains fibrils about 200 Å in diameter; there are about 4 layers of fibrils in this region. Region 3, which is about 5 μ thick, is composed of about 18 layers of apparently unbanded fibrils. Transverse sections show that the fibrils are irregular in outline, in fact some are nearly square, and measure up to about 2000 Å across (fig. 2). Longitudinal sections demonstrate that the fibrils are in layers, which confirms previous observations. Measurements have shown that the layers of fibrils are orientated from 74° to 106° to each other; these measurements vary depending on whether the worm was contracted or extended on fixation, and suggest that the layers

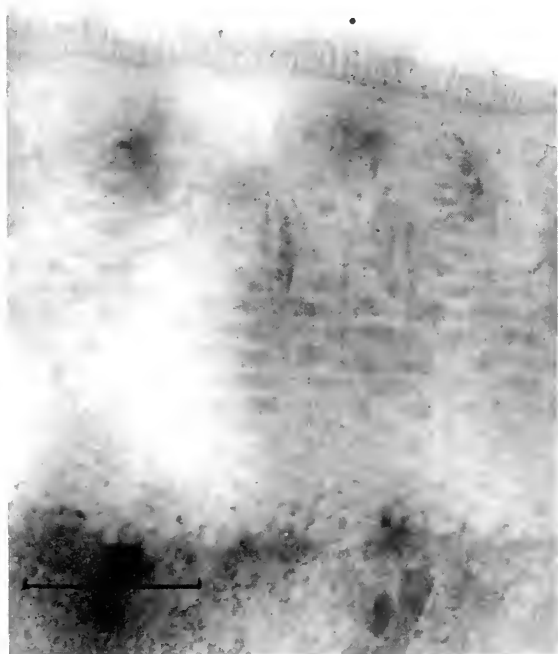


Fig. 1. Section through the cuticle of *Lumbricus sp.* which shows the layers of fibrils which lie adjacent to the epidermal cells. Cytoplasmic processes stretch between the cell surface and the outer membrane of the worm, and form a basket-weave pattern with the fibrils. The microvilli on the outer surface of the worm are seen at the top of the micrograph. Magnification 23,000.

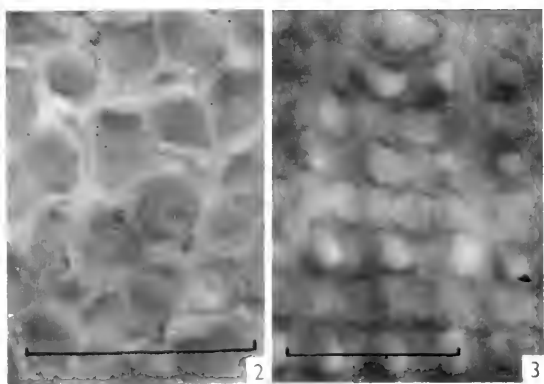


Fig. 2. Transverse sections of the fibrils of the cuticle, which shows they are irregular in outline. Magnification 30,000.

Fig. 3. The fibrous honeycomb of amorphous material which surrounds each fibril. Magnification 23,000.

may slide over each other to allow for the alteration in the contour of the animal. No banded structure has been observed, but the fibrils are surrounded by an amorphous material which tends to make precise observation difficult. This latter material is formed into a fibrous honeycomb which surrounds each fibril (fig. 3). It is possible that this material may represent a mucopolysaccharide; hence it may form an underlying lattice system which may be connected with the mechanism of determining the orientation of the fibrils.

Region 4 lies just beneath the outermost layer; it sometimes contains a few fibrils but more often consists only of a thin amorphous zone. The outermost layer, region 5, is composed of a double membrane, from which project numerous microvilli about 1500 Å long and 500 Å in diameter. Reed and Rudall (4) described this region as a corpuscular layer, but observations on transverse sections of the cuticle show clearly that the exterior of the worm is covered by a system of microvilli. This finding may account for the presence of the numerous fine cytoplasmic processes which penetrate the cuticle, for it is unlikely that the microvilli could exist in an extracellular position.

Previous work has demonstrated that in avian tendon the collagen fibrils of developing tissue increase in diameter while there is a relative decrease

in the amount of interfibrillar material which surrounds the fibrils; it has been concluded that this material contains collagen molecules which are deposited onto the growing fibrils in the form and packing appropriate to the characteristic fibre diagram of the collagen protein (2). In the present work, it is apparent that the layers of fibrils adjacent to the epidermal cells are of smaller diameter than the main fibrils of the cuticle. If it is assumed that the epidermal cells secrete the precursors of the cuticle, it follows that the internal layers may be composed of fibrils that are in the process of growing. Thus, it may be suggested that, as each fibril layer is formed, the next adjacent layer may determine the orientation of this new layer. On the other hand, it is possible that the precisely arranged cytoplasmic processes may take part in the orientation of the fibril layers. It is hoped that future studies on the regeneration of the cuticle will clarify the method of fibril elaboration and layer formation.

REFERENCES

1. ASTBURY, W. T., *Essays on Growth and Form*. P. 309 (1945).
2. JACKSON, S. FITTON, *Proc. Roy. Soc. B.* **144**, 553 (1956).
3. MARKS, M. H., BEAR, R. S., and BLAKE, C. H., *J. Exptl. Zool.* **111**, 55 (1949).
4. REED, R. and RUDALL, K. M., *Biochim. Biophys. Acta* **2** 7 (1949).

Further Observations on the Transformation of Collagen Fibrils into "Elastin"

M. K. KEECH and R. REED

Departments of Medicine and Leather Industries, Leeds University, Leeds

THE dermis consists mainly of collagen (70–80 g per 100 g dry tissue) and a small quantity of elastin, all embedded in the jelly-like ground substance. Previous work (7) on the action of collagenase on human abdominal skin from different age-groups, described a breakdown product called "moth-eaten" fibres (MEF). They figured prominently in collagenase-treated material derived from persons between the ages of 1 and 20 years, but their numbers steadily decreased as the age of the collagen source increased. At first sight it was difficult to understand the appearance of these large and very dense structures during an enzyme degradation process, so further investigations were undertaken in an effort to establish their identity (8). Identical experiments designed to obtain more information about the "alkali-produced elastin" (APE) described by Burton *et al.* (1) were also reported.

Prepared collagen.—Samples of the same substrates used in previous work (5, 6, 7) were employed, i.e., human abdominal skin collagen from persons of different age-

groups, purified by the method of Neuman (9, 10) as shortened by Keech (5, 6). This material contained a very small quantity of the three morphological varieties of fully-formed elastin described below.

Preparations of "moth-eaten" fibres (MEF).—Prepared collagen was incubated with collagenase in phosphate buffer (pH 7.4) for 24 hours at 37°C. The remaining material was centrifuged, and the pellet treated one of the following ways:—

(a) Re-suspended in sterile distilled water, pH 5.6, and heated at 55°C for 1 hour, at 75°C for a further hour and finally at 100°C for 1 hour.

(b) Re-suspended in a mixture of 1% sodium metaperiodate and 1% NaCl in phthalate buffer at pH 5.0 and incubated for 1½ hours at 37°C.

(c) Re-suspended in borate buffer (pH 8.8) containing 0.2 mg elastase and incubated for 6 hours at 37°C.

(d) Re-suspended in 2% acetic acid, allowed to stand at room temperature for an hour and then heated at 100°C for 1 hour.

Preparations of alkali-produced "elastin" (APE).—The method used in previous work (1, 3) to effect the apparent transformation of collagen into elastin was employed, i.e., prepared collagen was incubated in borate buffer (pH 8.8) for 24 hours at 37°C. The centrifuged pellet was then treated as in (a) and (d) above. In addition it was

incubated in phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.2 mg elastase for 6 hours at 37 C.

0.05 ml. of a penicillin and streptomycin mixture was added to each test tube in the above experiments, and this successfully prevented bacterial contamination.

Cl. histolyticum collagenase was kindly supplied by Dr. J. D. MacLennan; the elastase was prepared by Hall and Gardiner (2).

Samples of three of the substrates (aged 2, 9 and 78 years) were heated in sterile distilled water to 55 C for 1 hour, to 75 C for a further hour, and finally to 100 C for an hour. Prior treatment with either collagenase or alkaline buffer was of course omitted.

Samples for electron microscope examination were taken at each stage in the experiments, and ground gently in a glass tissue-grinder until the material appeared milky; drop preparations were made which were shadowed with chromium and examined in a Siemens electron microscope, type UM 60 C.

Counts of the different kinds of elastic structures were made by carefully scanning two grids from each sample. The grids contained 16 squares, and each part of each square was examined in sequence. As about 20 fields covered a square, a total of 640 fields was scrutinised from each specimen.

The wide spectrum of morphological change produced exhibited marked age-differences.

1. *Heat controls.* Heat alone on the untreated 2-, 9- and 78-year-old prepared collagen samples simply produced progressive gelatinisation as the temperature increased, which was complete after boiling for one hour. There was no age-difference, no increase in elastic structures and none of the new structures described below. The fully-formed elastin present in the starting material was somewhat reduced in quantity, whilst the component elastin filaments became particularly well defined.

Fully-formed elastin. This is a normal component of human fresh whole dermis and prepared dermal collagen from all age groups. Natural elastin forms about 1-5 % of the histologically stained dermis, but the amount normally present increases with age. The following variants can be distinguished and counted under the electron microscope:

(a) Skin-type elastin (which forms about 95 % of the elastin) denotes dense, irregular, structures without any regular features (fig. 1).

(b) Filamenting elastin (which constitutes about 5 % of the elastin) is usually found in long, twisting, ribbons.

(c) Large natural networks (which account for 1 % of the elastin) differ from the manufactured networks (MN) described below in being completely free of amorphous material or dense bits and seem to be a network variety of skin-type elastin. They occurred sporadically in all preparations examined.

This fully-formed elastin was unaffected by heat, although in the 56- and 78-year-old preparations there was a suggestion of concentration (i.e. higher counts) as the collagen gelatinised.

2. *Effect of heat on collagenase-treated preparations.* Over the age of 50 years collagenase only produced slight macroscopic digestion of the collagen samples without the production of true MEF.

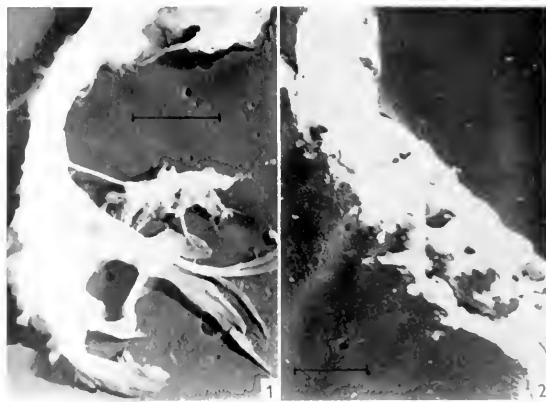


Fig. 1. Typical example of skin-type elastin from the fresh dermis of an individual aged 66 years. This variant forms 95% of natural (fully-formed) elastin and contains a fair amount of dense amorphous material (elastomucin). The other variants (filamenting and large networks) have less elastomucin so their component filaments are better visualised. Magnification $\times 12,000$.

Fig. 2. Typical "moth-eaten" fibre (MEF) from the prepared dermal collagen of a 2-year-old child after incubation for 24 hours at 37 C with collagenase (*Cl. histolyticum*) in phosphate buffer pH 7.4. Note the beaded fibrils and numerous "beads" in the background. Magnification $\times 10,000$.

Thus the starting material consisted simply of striated collagen showing slight "standard" collagenase change (7) and the usual quantity of fully-formed elastin. These components responded to heat in identical fashion to the heat controls described above. However, samples from the child and young adult substrates gave a very different picture. 85-90 % of the collagen was digested, and the deposit consisted mainly of typical MEF (fig. 2). Gentle grinding fragmented these thick, dense fibres into portions of different lengths accompanied by a large number of angular, dense bits. These MEF proved relatively heat-resistant, a considerable degree of breakdown occurring only after boiling. In addition many portions of MEF were found to terminate as "elastic networks" (MEFC) and a number of isolated networks (MN) were also seen.

MEF conversions (MEFC) (figs. 3 and 4) denote moth-eaten fibres transforming into "elastin networks", identical with the manufactured networks (MN) described below. In the two child substrates some of the MEF appeared to be transforming into sheet-like elastin in addition to the usual network type and heat markedly increased the numbers so transformed. The substrate from the 27-year-old was outstanding in consisting almost entirely of large MEF conversions throughout, in fact the starting material resembled the heat-treated preparations from the 2- and 9-year-old substrates. The 28- and 43-year-old starting material showed no definite MEFC or MN but both these structures became definite and easily identifiable after heating. No conversions were seen in material over the age of 50.

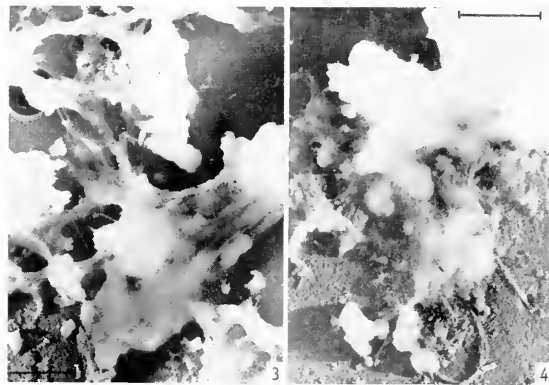


Fig. 3. "Moth-eaten" fibre disintegrating into an "elastin network" (MEFC). Obtained after heating the MEF preparation from a 9-year-old child in water for 1 hour at 55°C and a further hour at 75°C. Magnification 11,000.

Fig. 4. Another example of a "moth-eaten" fibre conversion structure (MEFC) from the same preparation as fig. 3. Magnification 11,000.

The *manufactured networks (MN)* were found only in the presence of MEFC and probably represent the complete conversion or separated portions of these structures. Similar MN occurred after heating "alkali-produced elastin".

Collagen was seen only in the adult specimens and exhibited slight "standard" collagenase change.

3. *Effect of other reagents on MEF.* A dramatic change from 90% MEF to 85-90% large "elastic networks" was produced by 1% sodium periodate (in buffer pH 5.0) and by elastase (acting at its optimum pH of 8.8). Also numerous large and small dense bits were noted, either converting into "elastin" individually or situated in groups linked together by "elastin". A more prolonged incubation with periodate (3 hrs. at 37°C) caused disappearance of the MEF and elastic structures, but numerous small, round, dense balls were found, similar to those described by Hall *et al.* (4) as a product of the action of elastase on elastin. Incubation of the starting material in borate buffer pH 8.8 alone did not produce any change, but prolongation of incubation with elastase caused rapid digestion of the "elastic networks".

Two per cent acetic acid at room temperature produced no macroscopic change but under the electron microscope the dense bits were broken up into smaller pieces and MEFC and MN were seen. After 1 hour at 100°C the dense bits were markedly decreased, accompanied by a great increase in MEFC, MN and fenestrated sheets. The latter were only seen after treatment with acetic acid, and probably represent MN with a thicker layer of amorphous material than usual.

4. *Effect of various agents on "alkali-produced elastin" (APE).* Collagen and elastin have always

been considered as two separate and distinct entities with different chemical and tinctorial properties. But the problem of material apparently intermediate between them, found in senile and pathological skin, has been a repeated source of debate by histologists over the past 90 years. Recent work (1, 3) has produced biochemical, histological, and electron microscopic evidence that collagen can be converted into "elastin" *in vitro* by agents such as periodate and alkaline buffer (pH 8.8). For this reason, the elastase in the present study was incubated at *neutral* pH in order to avoid the continued production of APE at the optimum pH value of the enzyme 8.8. The "alkali-produced elastin" (APE) proved sensitive to the elastase.

The addition of 2% acetic acid to APE led to immediate dispersal of the collagen suspensions which then appeared gelatinous. This contrasted with the lack of macroscopic effect when acetic acid was added to the (collagen-free) suspensions of MEF. Under the electron microscope the collagen exhibited typical acid disintegration and there was a marked reduction of amorphous material and dense bits together with the appearance of MEFC, MN and fenestrated sheets.

The effect of heat on APE produced a dramatic change to numerous MEFC and MN with total disappearance of the collagen.

Concurrent biochemical and histological studies on the same material used in this investigation lead us to believe that "moth-eaten" fibres are intermediate structures, midway between collagen and elastin.

In the rheumatic group of diseases, the fibrous components of the connective tissue exhibit histological damage. Until the *reactivity* of the various connective tissue components to a wide range of stimuli (physical, chemical or enzymatic) is elucidated and their *normal interrelationships* established, one cannot interpret the *pathological* tissue found in disease.

REFERENCES

- BURTON, D., HALL, D. A., KEECH, M. K., REED, R., SAXL, H., TUNBRIDGE, R. E., and WOOD, M. J., *Nature* **176**, 966 (1955).
- HALL, D. A. and GARDINER, J. E., *Biochem. J.* **59**, 465 (1955).
- HALL, D. A., KEECH, M. K., REED, R., SAXL, H., TUNBRIDGE, R. E., and WOOD, M. J., *J. Gerontol.* **10**, 388 (1955).
- HALL, D. A., REED, R., and TUNBRIDGE, R. E., *Exptl. Cell Research* **8**, 35 (1955).
- KEECH, M. K., *Anat. Rec.* **119**, 139 (1954).
- *Yale J. Biol. and Med.* **26**, 295 (1954).
- *Ann. Rheumatic Diseases* **14**, 19 (1955).
- KEECH, M. K., REED, R., and WOOD, M. J., *J. Pathol. Bacteriol.* **71**, 477 (1956).
- NEUMAN, R. E., Ph.D. Thesis, University of Cincinnati. (1949).
- *Arch. Biochem.* **24**, 289 (1949).

Osteoarthritis of the Hip Joint

K. LITTLE and L. H. PIMM

*The Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford, and
The Atomic Energy Research Establishment, Harwell*

WITH the increasing longevity of the population as a whole the degenerative wear and tear changes which occur in the joints are becoming one of the greatest problems facing modern orthopaedics. These changes, which we term "Osteoarthritis", affect principally the main weight-bearing joints, and thus the head of the femur in the hip joint is most often involved. The gross and microscopic changes of the established condition have been studied for many years, but little is known of the pathology underlying the origin of the lesion.

In an attempt to elucidate the problem a considerable amount of work has been carried out at the Nuffield Orthopaedic Centre, Oxford, and studies of the histological changes and vascular patterns have been published by Trueta, Harrison and Schajowicz (3, 9). One of their fundamental discoveries was that the initial lesion is in the hyaline articular cartilage covering the head of the femur and in the *non*-pressure area, contrary to what might be expected.

The light microscope shows disruption of the superficial layer of cartilage, followed by the appearance of collagen bundles, fissuration and an alteration in staining properties, leading ultimately to ulceration and destruction of the cartilage and its replacement by fibrocartilage. The bony changes occur later and are secondary.

This study and the work carried out in Sweden by Ingelmark and Sääf (5), Ingelmark (4), Ekholm (1) and Ekholm and Norbäck (2) suggests that mechanical forces are concerned with the nutrition of the cartilage from vessels lying immediately below it in the bone and probably also from the synovial fluid as there are never any vessels in hyaline cartilage itself. It seems possible that there is some intermittent pumping action as the pressure on the segments of cartilage varies, the cartilage itself behaving something like a sponge. Müller as long ago as 1929 suspected something like this and in support of the hypothesis Matthews (6) has shown that the weight bearing areas do comprise the thickest cartilage with the highest mucopolysaccharide content; whereas the *non*-pressure areas suffer nutritional deficiency changes first.

Electron microscopy has made it possible to see that the collagen fibrils are closely surrounded by the polysaccharide containing matrix which appears to be of a gelatinous or spongy nature. Four distinct sizes of collagen fibrils have been noted, and in the normal articular cartilage these fibrils are present in a three dimensional network with no preferred orientation and surrounded by the ground substance.

In the hyaline cartilage from the arthritic joint two differences are apparent. Firstly the collagen has a very definite orientation (figure 1). Secondly the electron microscope shows a decreased proportion of ground substance, so that the material in the section has a rather more open appearance (figure 2). This is in agreement with the chemical analyses performed by Matthews (7), in which it was found that the total quantity of polysaccharide was decreased considerably in arthritic cartilage.

Although the onset of orientation changes can be seen easily in sections viewed in the electron microscope, the area of specimen examined, and indeed the whole specimen, is so small, being only about $\frac{1}{2}$ mm across, that finding the direction of this orientation is difficult. Information on this point can be gained by using x-ray diffraction in conjunction with electron microscopy. A survey of the changes in orientation produced both by normal ageing and by the onset of osteoarthritic changes has therefore been carried out using x-ray diffraction.

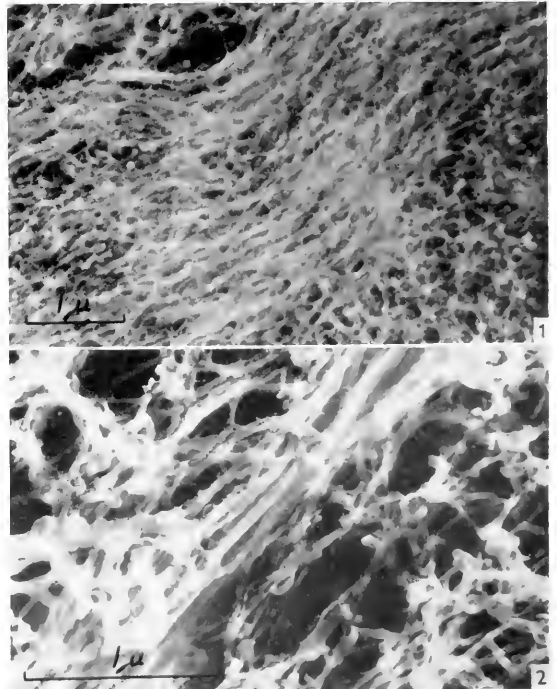


Fig. 1. Hyaline cartilage from an osteoarthritic hip joint showing the definite orientation of the fibrils. Magnification 13,000.

Fig. 2. Hyaline cartilage from an osteoarthritic hip joint showing the open appearance of the ground substance typical in this condition. Magnification 26,000.

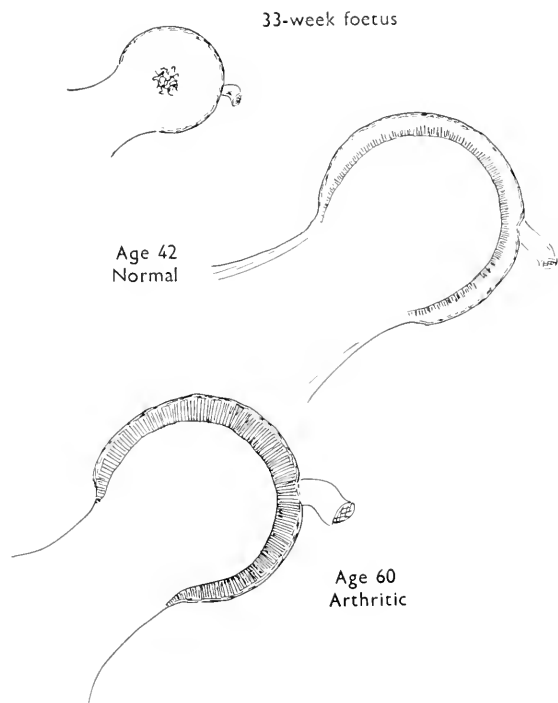


Fig. 3. Diagram showing direction of orientation of the collagen fibrils in the articular cartilage of the femoral head (a) of a 33-week stillborn foetus, (b) of a normal adult aged 42, (c) of an osteoarthritic subject.

In the foetus and newborn child diffraction shows that the whole of the cartilage is unorientated except for the immediate surface layer in which the collagen fibrils lie parallel to the surface. This lack of orientation as demonstrated by x-ray diffraction could be due to one of two causes. Either, as in the present case, because the collagen fibrils themselves are randomly orientated, or as in fibrocartilage, because the bundles of collagen are randomly orientated. It requires the electron microscope to distinguish between these two.

In normal ageing, by the time middle age is reached the orientation on the surface is still parallel with that surface with a tendency towards preferred orientation away from the ligamentum teres. The outer two thirds or so of the articular cartilage remains unorientated (figure 3), but there is a tendency for the inner layers of cartilage adjacent to the bone to show definite orientation at right angles to the surface.

In arthritic hips the entire thickness of the cartilage has its collagen fibrils orientated at right angles to the surface of the bone, with the exception still of the fibrils in the surface layer of the cartilage which remain parallel to the surface till the cartilage has begun to split and wear away. It seems that this change in the direction of the collagen fibrils is most easily explained in terms of tensional forces across the joint which is in agreement with the observation that arthritis first appears in the non-weight bearing areas.

With regard to the cartilage cells both living and dead cells have been encountered at all ages and in all states of the cartilage, and with the electron microscope it has been so far impossible to establish any relationship between the cartilage cells and the well-being or otherwise of the cartilage.

REFERENCES

1. EKHMOLM, R., *Acta Anat.*, Suppl. **15**, 1 (1951).
2. EKHMOLM, R. and NORBÄCK, B., *Acta Orthopaed. Scand.* **21**, 81 (1951).
3. HARRISON, M. H. M., SCHAJOWICZ, F., and TRUETA, J., *J. Bone and Joint Surg.* **35 B**, 598 (1953).
4. INGELMARK, B. E., *Acta Orthopaed. Scand.* **20**, 144 (1950).
5. INGELMARK, B. E. and SÄÄF, J., *Acta Orthopaed. Scand.* **17**, 303 (1948).
6. MATTHEWS, B. F., *Brit. Med. J.* **2**, 1295 (1952).
7. — *ibid.* **2**, 660 (1953).
8. MÜLLER, W., *Biologie der Gelenke*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1929.
9. TRUETA, J. and HARRISON, M. H. M., *J. Bone and Joint Surg.* **35 B**, 442 (1953).

Correlation of Electron Microscopy with X-Ray Diffraction and Optical Birefringence in the Study of the Bone

V. CAGLIOTI, A. ASCENZI and A. SANTORO

*Institute of General and Inorganic Chemistry and Institute of Morbid Anatomy,
University of Rome*

ENGSTRÖM and Finean (8, 10, 11), and Carlström and Finean (6) demonstrated that in addition to the wide angle x-ray diffraction pattern, bone tissues also give a diffuse low-angle scatter. The same authors assumed that the low-angle scatter could be treated as a particle scatter pertaining to the inorganic or mineral fraction. In this way they conclude

that the particles are rod-shaped, the long axis of rods being aligned in the direction of the longitudinal axis of the bone, and parallel to the collagen fibres. In the intact human bone these particles appear to have a diameter of about 73 Å and a length of about 210 Å.

Recently Robinson and Watson (15) have criti-

cized the conclusions of Engström and Finean, because observations with the electron microscope do not support the view that the inorganic particles are rod-shaped.

On the other hand North, Cowan and Randall (14) have been able to show that the collagen gives a low-angle scatter not dissimilar to that obtained by Engström and Finean.

The array of results referred to show such divergent points that they deserve a deeper critical examination. In the hope of contributing to the solution of the problem, we have taken up Finean and Engström's researches on human and cow bone, integrating them with further observations with the polarizing and electron microscope.

A low-angle scatter apparatus somewhat similar to that employed by Finean (9) was used. The scatter was recorded using Ni-filtered $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). We did not think it advisable to use monochromatic radiation since with a system of the type existing in the bone tissue, the use of Ni-filtered radiation ($\text{CuK}\alpha$) does not entail more substantial errors than the use of a monochromatic radiation. The intensity variation of the low-angle scatter was measured using a Leeds and Northrup automatic recording microphotometer.

The electron microscope preparations were obtained employing both the mechanical dissociation in a Waring blender and the pseudo-replica technique. The detailed description of these techniques has been reported in previous papers (2, 3).

X-ray, polarizing microscope and electron microscope investigations were performed on samples of cow's and human bone. This last pertained to foetus, adult and old man. The samples comprehended untreated bone, decalcified bone and bone from which ossein had been removed by trypsin digestion or according Gabriel's method.

In agreement with the results obtained by Engström and Finean, the low-angle scatter of x-rays from sections of bone suggests that the scattering elements are well aligned and symmetrical around their long axes. Therefore the same elements appear as if they were the same as ellipsoids of revolution, the long axes being aligned in the direction of the longitudinal axis of the bone. The short diameter of the ellipsoids is of about 70 \AA and the long one of about 200 \AA .

Still in agreement with the results of Engström and Finean, the low-angle scatter from the longitudinal sections of bone from which ossein has been removed according to Gabriel's method, suggests that the shape and the dimensions of the scattering elements are changed. In fact the short diameter of the ellipsoids is about 80 \AA , while the long diameter is reduced to about 130 \AA . In addition, the intensity of diffraction seems greatly increased by the removal of ossein.

These results provide arguments for the following discussion.

The low-angle x-ray scatter might be interpreted either in terms of the *holes* irregularly placed inside a homogeneous body or in terms of a *particle scatter*, when inter-particle interference is not taken into

consideration. In the general equation adopted by Guinier (12) in treating the scatter from such systems, the intensity of the scattered radiation appears as a function of the square of the difference of the electron densities pertaining to the single components responsible for the scatter (particles and surrounding medium or homogeneous body and the holes). Such a condition does not enable it to be established *a priori* to which of the two aforesaid systems a low-angle scatter is related. In this respect the choice of the system is suggested by evidence deriving from the data of other investigations.

The identity in the low-angle x-ray diffraction pattern pertaining, respectively, to the bone, collagen tissue (14) and calcified collagen (10) does not permit the acceptance of the theory that the scattering units pertain to inorganic particles, these latter being completely lacking in collagen tissue. Therefore the scattering units must be considered as related to ellipsoidal entities ($200 \times 70 \text{ \AA}$) pertaining to the collagen and oriented in parallel. In bone and calcified collagen the calcium salts, enclosing the organic ellipsoids, increase the difference in electronic density between the same organic particles of collagen and surrounding medium.

This interpretation of the low-angle x-ray scatter from bone tissue in terms of holes (containing the organic particles) irregularly placed inside a homogeneous body (the inorganic bone fraction) is also supported by the following arguments.

(a) The form birefringence of the bone tissue from

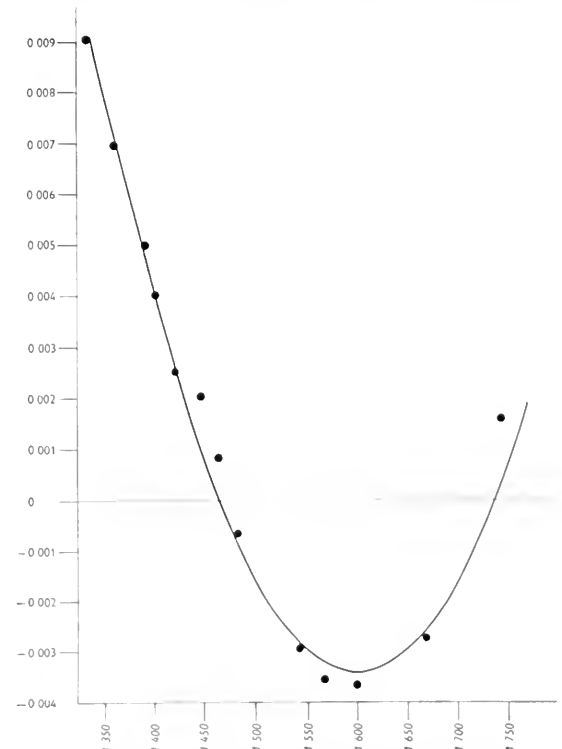


Fig. 1. Graph of the form birefringence obtained from bone deprived of ossein according to Gabriel's method.



Fig. 2. Pseudo-replica of bone, etched with a 1% HNO_3 solution.

which ossein has been removed (see fig. 1) follows the Wiener law on the mixed rod-shaped body (1, 7, 16). According to Schmidt who made special observations in this connection, such an optical behaviour is due to the penetration of fluids at different refraction indices in the ultramicroscopical holes already occupied by the micellae of osteomucoid and osteoalbuminoid.

(b) A bone system resulting from inorganic particles or crystallites dispersed in the ossein, according to Engström and Finean, could not subsist when ossein had been removed, as the particles would break down into an "incoherent" powder. On the contrary, bone from which ossein has been removed, subsists as a coherent structure though its resistance is greatly decreased. In addition, the polarizing microscope and the low- and wide-angle x-ray diffraction patterns demonstrate that the structural orientation of the inorganic fraction is unmodified. Finally the curve of form birefringence can be recorded from the bone without ossein (see above).

(c) It is very important to note that the change observed in the low-angle scatter of the bone from which ossein has been removed according to Gabriel's method appears as new evidence of the necessity to interpret the low-angle scatter of the bone as organic ellipsoidal particles enclosed in the holes circumscribed by the inorganic fraction. Indeed such a change is neither related to the orientation nor the physical state of the inorganic crystallites, both conditions being unmodified by Gabriel's treatment, according to the wide-angle x-ray diffraction patterns. Therefore it is more plausible to maintain that in the homogeneous body pertaining to the inorganic bone fraction the removal of the organic substance from the hole results in an arrangement of the

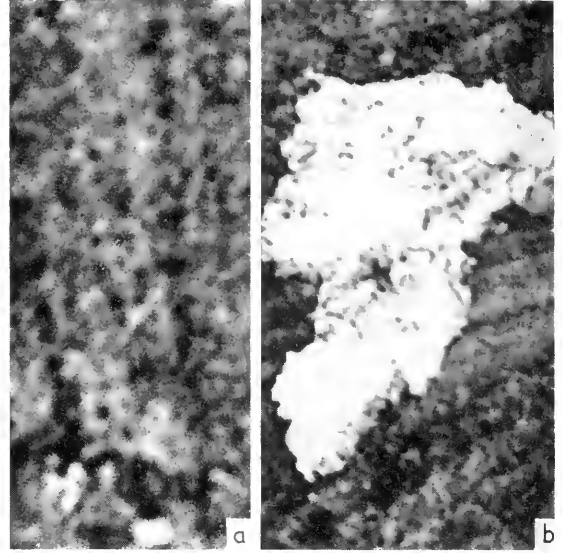


Fig. 3 *a* and *b*. Pseudo-replicas of bone digested with trypsin. In *b*, a thin fragment of bone stripped off the replicated surface.

material delimiting the same holes. This view finds ready support in the existence of the chemical bonds between ossein and the inorganic bone fraction (5).

(d) Our studies in progress suggest that in foetal bone the low-angle scattered radiation shows interference patterns. This finding can be interpreted as the result of the higher concentration of the scattering elements. It may be assumed therefore that organic elements are responsible for the x-ray scatter, as they are less dispersed in foetal bone in consequence to lower content of calcium salts.

This array of arguments is supported by the present electron microscopical investigations. The results shown in figs. 2 and 3 give the most outstanding findings. In fig. 2, corresponding to the pseudo-replica prepared from bone previously etched with a 1% HNO_3 solution, the ground substance is made up of small globules or particles apparently spherical in shape. The same globules are often arranged end to end, building up a network of regularly aligned fibrils. Pseudo-replicas obtained from bone digested with trypsin (fig. 3*a*) show a very fine framework, the meshes of which delimit spaces corresponding in size to globules which have been removed, belonging to the ground substance. Fig. 3*b* shows a thin fragment of digested bone removed from the sample in stripping the pseudo-replica. The structure appears as a very fine framework delimiting round spaces. The maximum diameter ranges from 200 to 250 Å.

According to the electron microscope investigations of Barbour (4) the diameter of the holes pertaining to the inorganic bone fraction ranges from a minimum of 62 Å to a maximum of 225 Å.

The inorganic bone fraction may be regarded as a homogeneous body with holes occupied by the

micellae of the organic substance. The holes correspond to ellipsoids of revolution and are aligned with the axis of the bone. The present interpretation appears to be in agreement with the properties of the bone and not in contradiction to the knowledge derived from the wide-angle diffraction pattern. The latter corresponds to the crystalline units. From their aggregation derives the homogeneous body with holes responsible for the low-angle x-ray diffraction pattern (13, pp. 164-165).

REFERENCES

1. ASCENZI, A., *Science* **112**, 84 (1950).
2. — *Sci. Med. Italica* **3**, 701 (1955).
3. ASCENZI, A. and CHIOZZOTTO, A., *Experientia* **11**, 140 (1955).
4. BARBOUR, E. P., *Am. J. Phys. Anthropol.* **8**, 315 (1950).
5. CAGLIOTTI, V., ASCENZI, A., and SERROCCO, *Experientia* **10**, 371 (1954).
6. CARLSTRÖM, D. and FINLAN, J. B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 183 (1954).
7. DALLMAGNI, M. J. and MELOS, J., *J. Washington Acad. Sci.* **36**, 181 (1946).
8. ENGSTRÖM, A. and FINLAN, J. B., *Nature*, **171**, 564 (1953).
9. FINLAN, J. B., *J. Sci. Instr.* **30**, 60 (1953).
10. FINLAN, J. B. and ENGSTRÖM, A., *Biochim. et Biophys. Acta* **11**, 178 (1953).
11. *Experientia* **10**, 63 (1954).
12. GUNIER, A., X-Ray Crystallographic Technology. (English transl. by T. E. TIPPIN.) Ed. by K. LONSDALE, Hilger and Watts Ltd. London, 1952.
13. GUNIER, A. and FOURMÉ, G., Small-Angle Scattering of X-Rays. J. Wiley & Sons, New York, 1955.
14. NORTH, A. C. T., COWAN, P. M., and RANDALL, J. T., *Nature* **174**, 1142 (1954).
15. ROBINSON, R. A. and WATSON, M. L., *Ann. New York Acad. Sci.* **60**, 596 (1955).
16. SCHMIDT, W. J., *Ber. Oberhess. Ges. Natur- u. Heilk., Naturw. Abt., Giessen*, **15**, 219 (1933).

X

PATHOLOGY

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des experimentellen Lungenödems

H. SCHULZ

Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf und Laboratorium für biologische Feinstruktur-Forschung der Anatomischen Abteilung des Karolinska Institutes, Stockholm

IN der Entstehung des Lungenödems ist die Transsudation von Flüssigkeit aus den Lungenkapillaren von besonderer Bedeutung für die Erschwerung des Gasaustausches zwischen Kapillarblut und Alveolarluft. Die aus den Lungenkapillaren filtrierte Flüssigkeitsmenge wird bestimmt von der Höhe des Kapillardrucks, von der Oberfläche des Kapillarbettes, vom kapillären Blutstrom je Zeiteinheit, vom onkotischen Druck des Plasmas, sowie von der Kapillarpermeabilität. Außerdem gehört zu diesen Faktoren der Lungengewebsdruck, der entsprechend der Lungenstruktur niedrig ist.

Zusammenfassende Darstellungen zur Pathogenese des Lungenödems geben Altschule (1) und Hayward (6). Über die pathologische Anatomie des Lungenödems nach Befunden der Lichtmikroskopie wurde durch Ceelen (3) und v. Hayek (5) berichtet. Im submikroskopischen Bereich sind bisher keine Befunde über das experimentelle Lungenödem mitgeteilt worden. Die Ultrastruktur der normalen menschlichen Lunge und der verschiedener Tierarten wurde inzwischen untersucht. Swigart und Kane (16), Low (9), Policard (10) sowie Schlipkötter (13) befaßten sich vor allem mit der Lungenalveole der Ratte; Kisch (8), Karrer (7) und Bargmann (2) berücksichtigten vorwiegend die Ultrastruktur der Lungenkapillaren von Vögeln, Amphibien und Säugern. Die normale menschliche Lunge konnte in eigenen elektronenoptischen Untersuchungen studiert werden (15), sowie von Gieseking (4).

Zur Erzeugung eines experimentellen Lungenödems wurden Ratten desselben Stammes bei normalem Luftdruck einem Gasgemisch von 3 % Kohlenäure mit Luft und konzentriertem O₂ ausgesetzt. Das Lungenödem ist hierbei auf die unmittelbare Einwirkung der Gase auf die atmende Oberfläche zurückzuführen. In einer zweiten Versuchsgruppe wurden Ratten intraperitoneal mit 30 mg/kg Körpergewicht Thiosemikarbazid (Tennekoon (17)) bzw. mit 50 mg/kg Körpergewicht alpha-Naphtylthioharnstoff (ANTU, Richter (11)) behandelt, um das Lungenödem vom Blutwege her zu bewirken. Die Tiere wurden jeweils 10, 20 und 60 Minuten nach der Injektion getötet. In einer dritten Versuchsgruppe erzeugten wir an Ratten ein mechanisches Stauungsödem durch operative Abschnürung des Hauptstammes der Vena pulmonalis eines Lungenlappens. Die Lungenlappen wurden einmal nach fünf, ein anderes Mal nach 15 Minuten entfernt. Die Lungenstückchen der ersten Versuchsgruppe wurden nach Palade, die der beiden anderen nach Sjöstrand fixiert. Die

Schnitte fertigten wir an mit dem Ultramikrotom nach Sjöstrand. Für die Aufnahmen benutzten wir das RCA EMU 2c Elektronenmikroskop.

Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben wir auf die Fragen gerichtet, die lichtmikroskopisch nicht geklärt werden konnten. Besonders berücksichtigten wir den Prozeß des Protoplasmaödems, die Veränderungen an der Basalmembran der Lungenkapillaren sowie die Veränderungen des Kapillarendothels.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen pathologische Veränderungen an allen Strukturen des Blut-Luftweges. In den Anfangsstadien des Lungenödems besteht ein intraepitheliales Ödem (Abb. 1). Die Alveolarepithelfortsätze über den Kapillaren, die in Normalfällen bis zu 0,1 μ schmal sein können, schwellen bis zu einer Breite von 2,5 μ . Über den Kapillarvorwölbungen ist dem Flüssigkeitsaustritt der geringste Gewebswiderstand entgegen gesetzt. Daher kommt es zuerst an diesen Stellen zur Entwicklung eines Lungenödems. Die schmalen



Abb. 1. Intraepitheliales Ödem mit Schwellung des Alveolarepithels. Keine Abhebung der Zelle von der Kapillarwand. Intakte Membranen. Elektronenoptisch: 7900 \times , Abb. 16000 \times .



Abb. 2. Beginnende Schwellung und Aufhellung des Alveolarepithels im Bereich des Blut-Luftweges der Rattenlunge. 210–315 Å weite schleusenartige Öffnungen der basalen Membran der Alveolarzelle (s. Pfeil). Elektronenoptisch: 17000 \times , Abb.: 49000.

Epithelfortsätze runden sich mit zunehmender Aufquellung ab. Die seitlichen Zellgrenzen der Alveolarepithelien verlieren dadurch den engen Kontakt zu den Nachbarzellen. Die cytoplasmatische Matrix des Epithels im Bereich des Blut-Luftweges ist elektronenoptisch aufgehellt. Sie besteht aus feinen fädigen Strukturen und einzelnen, sehr kleinen ovalen Gebilden, die den Zellgrenzen anliegen. Die in den Alveolarbuchten liegenden kernhaltigen Abschnitte der Alveolarzellen zeigen eine tubuläre und vakuoläre ödematöse Durchsetzung. In der Entwicklung des Ödems kommt es nicht zu einer Abhebung der Epithelzellen von den Kapillarwänden. Die basale Membran der Epithelzelle bleibt beim Ödem eng an den periendothelialen Streifen gebunden. Auch kommt es nirgends zu einer Unterbrechung der alveolenwärts gerichteten Epithelmembran. Die Alveolarepithelien besitzen bei intakten Membranen eine große Kapazität, Flüssigkeit aufzunehmen. Erst wenn durch die maximale Schwellung der Epithelzellen die zum Luftraum gerichteten Alveolarmembranen reißen, besteht die Möglichkeit eines intraalveolären Ödems. Ein typisches intraalveoläres Ödem findet sich elektronenoptisch auch in Alveolen, an denen die Alveolarepithelien nicht gequollen sind. Hier kommt das Ödem entweder von anderen Alveolen oder von gerissenen Membranen anderer Alveolarseiten her.

Ungeklärt bleibt die Frage der Rückresorption der Flüssigkeit. In den Alveolarsepten der Rattenlunge gibt es keine Lymphgefäße; auch fehlen im Bereich des Blut-Luftweges Spalträume, aus denen Flüssigkeit rückresorbiert werden könnte. Beim Lungenödem ist lediglich eine geringe Verbreiterung

der interzellulären Räume mit einer Schwellung der kollagenen Fasern nachzuweisen.

Am periendothelialen Streifen finden sich bei den mit Thiosemikarbazid behandelten Tieren Unterbrechungen der basalen Membran der Alveolarepithelien und der Kapillarendothelien. Die basale Membran des Alveolarepithels besitzt 210–315 Å weite schleusenartige Öffnungen (Abb. 2). Von durchgehenden Poren innerhalb des periendothelialen Streifens darf man aber nicht sprechen; dieser ist elektronenoptisch nach wie vor homogen. Auf anderen Bildern besteht eine homogene Aufquellung und Verbreiterung des periendothelialen Streifens bis zu einer Breite von 0,4 μ . Wir rechnen diese Veränderung zu den Spätstadien des Lungenödems, da die normale Struktur der Kapillarwand mit ihren scharf konturierten Membranen nicht mehr zu erkennen ist. Die Auflösung des Membransystems, sowie die schleusenartigen Öffnungen der basalen Membran bilden die Ursachen für eine Störung der Permeabilität.

Im Kapillarendothel lassen sich im Beginn des Lungenödems an den Tieren der zweiten Versuchsgruppe zahlreiche, dicht aneinanderliegende etwa 500 bis 1000 Å kleine Vakuolen nachweisen, die zum Cytoplasma durch einfachkonturierte Membranen begrenzt sind. Die kleinen Vakuolen können bis zu 2 μ großen, mit Ödemflüssigkeit angefüllten Blasen werden. In diesem Stadium haben die Endothelblasen doppelkonturierte Membranen, die aus zwei Eiweißschichten bestehen (Abb. 3). Die äußere, später hinzukommende zweite Membran wird von der zum Kapillarlumen gerichteten Endothelmembran gebildet. Bargmann (2) beschreibt ein ähnliches Bild an normalen Endothelien der Lungenkapillaren. Wir nehmen jedoch an, daß es sich bei den von

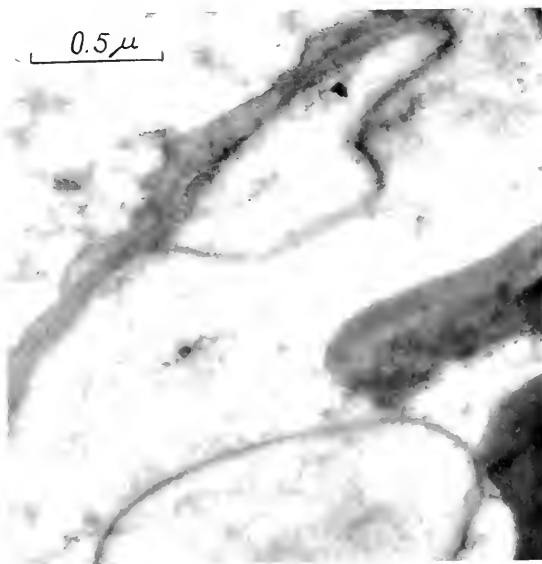


Abb. 3. Große Endothelblasen der Lungenkapillare. In der Alveole Ödemflüssigkeit. Elektronenoptisch: 14000 \times , Abb.: 36000.



Abb. 4. Große Cytoplasmafüßchen des Alveolarepithels. Bandförmige Transformation der Mitochondrieninnenmembranen. (CO₂-Versuch.) Elektronenoptisch: 16000 \times , Abb.: 33000 \times .

Bargmann zeigten gekammerten, blasigen Hohlräumen bereits um beginnende ödematöse Veränderungen handelt. Offen bleibt die Frage, wie die Endothelkammern entstehen. Sie können die Folgen einer toxischen Schädigung sein oder das anatomische Substrat eines Resorptionsvorganges darstellen.

Auf einige Besonderheiten, die im CO₂-Versuch auftreten, möchten wir kurz hinweisen. Die Lungenkapillaren zeigen eine maximale Dilatation mit einer Verdünnung des Endothels zu einer etwa 100 Å dünnen osmiophilen Linie. Die Zahl der Cytoplasmafüßchen der Alveolarepithelien ist im Kohlensäureversuch, gegenüber der normalen Rattenlunge, deutlich vermehrt. Die Cytoplasmafüßchen sind bis zu 0,6 μ lang und 500 Å breit. Das Chondriom der Alveolarzellen ist vergrößert. Die einzelnen Mitochondrien weisen charakteristische Veränderungen an den Innenmembranen auf, die wir als „bandförmige Transformation“ beschrieben haben (Abb. 4) (14).

Unsere elektronenmikroskopischen Beobachtungen (in Abb. 5 schematisch dargestellt) machen es möglich, einige der bisher unsicheren Faktoren des Diffusionskoeffizienten D in der Diffusionsgleichung (12): $Q = D \cdot (p_{\text{alv}} - \bar{p}) \cdot t$ genauer zu bestimmen. Das

betrifft besonders die Angabe für den Diffusionsweg der Atemgase zwischen Alveolarluft und Kapillarblut.

Der mittlere Wert des Blut-Luftweges beträgt, ohne Berücksichtigung des intraalveolären Ödems, im Anfangsstadium des Lungenödems in der Rattenlunge 1,8 μ, im Spätstadium 2,5 μ (Normalwert: 0,6 μ). Viel schwieriger ist es, den Diffusionsquerschnitt für die gesamte respiratorische Oberfläche anzugeben, da durch die präparative Technik eine Verformung des Alveolarlumens eintritt. Es kann aber auf Grund der elektronenoptischen Ergebnisse gesagt werden, daß durch das Vorhandensein zahlreicher Protoplasmafüßchen des Alveolarepithels die Oberfläche der Alveolarwand vergrößert wird.

LITERATUR

1. ALTSCHULT, M. D., *Klin. Wochschr.* **34**, 169–174 (1956).
2. BARGMANN, W. und KNOOP, A., *Z. Zellforsch.* **44**, 263–281 (1956).
3. CHILDS, W., *Handbuch d. spez. path. Anat. u. Histol.* III 3, 132–145. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1931.
4. GILSEKING, R., *Beitr. pathol. Anat.* **116**, 177–199 (1956).
5. VON HAYEK, H., *Wien. Klin. Wochschr.* **65**, 740–743 (1953).

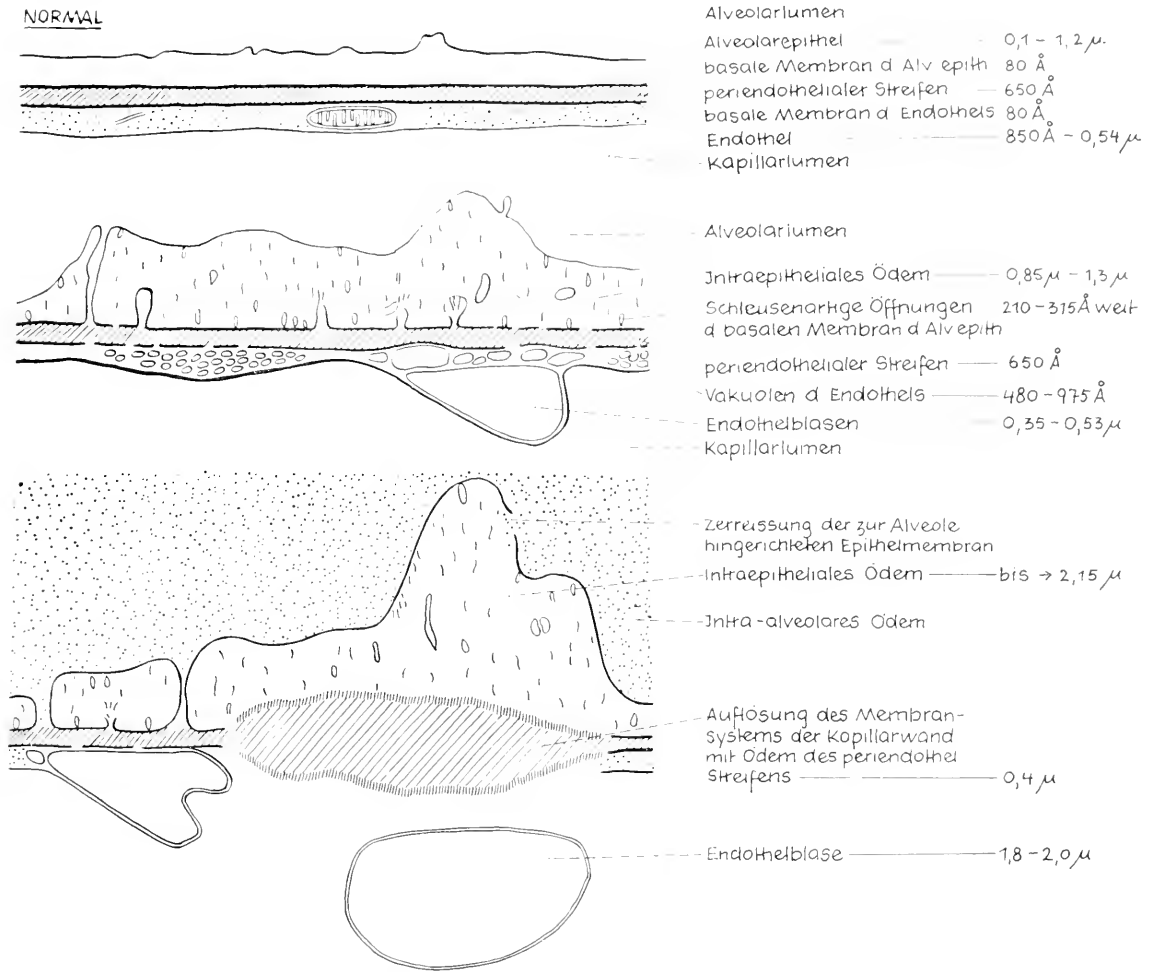


Abb. 5. Schematische Darstellung der Stadien der Entwicklung eines experimentellen Lungenödems im Bereich des Blut-Luftweges bei der Ratte.

<p>6. HAYWARD, G. W., <i>Brit. Med. J.</i> 1, 1361-1367 (1955).</p> <p>7. KARRER, H. E., <i>Bull. Johns Hopkins Hosp.</i> 98, 65-85 (1956).</p> <p>8. KISCH, B., <i>Exptl. Med. Surg.</i> 13, 101-117 (1955).</p> <p>9. LOW, F. N., <i>Anat. Rec.</i> 117, 241-264 (1953).</p> <p>10. POFICARD, A., COLLET, A., und GILTAIRE-RAVETI, L., <i>Presse méd.</i> 86, 1775-1777 (1954).</p> <p>11. RICHTER, C. P., <i>J. Thoracic Surg.</i> 23, 66-91 (1952).</p> <p>12. ROSSER, P. H., BÜHLMANN, A., und WISINGER, K., <i>Physiologie und Pathophysiologie der Atmung</i>, S. 43:</p>	<p>Gasdiffusion durch die „alveolo-capilläre Membran“.</p> <p>Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956.</p> <p>13. SCHLIPKÖTTER, H. W., <i>Deut. med. Wochschr.</i> 45, 1658-59, 1675 (1954).</p> <p>14. SCHULZ, H., <i>Naturwissenschaften</i> 43, 205-206 (1956).</p> <p>15. — <i>Virchow's Arch.</i> 328, 582-604 (1956).</p> <p>16. SWIGART, R. H. and KANI, D. J., <i>Anat. Rec.</i> 118, 57-72 (1954).</p> <p>17. TENNEKON, G. E., <i>J. Pathol. Bacteriol.</i> 67, 341-347 (1954).</p>
--	--

Electron Microscope Studies on Alveolar Cells from Mammals

A. POLICARD, A. COLLET and S. PRÉGERMAIN

with technical assistance of C. REUET

*Centre d'Etudes et Recherches des Charbonnages de France,
Paris-Verneuil en Halatte, France*

THE general organization of alveolar walls studied with electron microscopy seems now to have been made quite clear as a result of recent investigations (1-10, 14-16).

Our work, based on the findings of these authors and on our own results, led us to the schematic representation shown in figure 1. The true alveolar wall consists of a connective space containing an amorphous substance of weak electron density, of collagen fibrils and septal histiocytic cells. The septal space is limited on either side by a vitreous basement membrane. This basement membrane forms an Y-shaped connection with the capillary basement membrane, thus incorporating in a peculiar way the blood vessels in the alveolar wall. The basement membranes are covered continuously with a thin cytoplasmic layer produced from the small alveolar cells and having the appearance of very long prolongations. At long intervals, large alveolar cells, partly capped by the cytoplasmic layer from the small cells, are attached to the basement membrane. Finally, free cells are seen in the alveolar cavity.

The object of this paper is to discuss some of the aspects of the ultrastructure of the large alveolar cells and to define the problems arising from them.

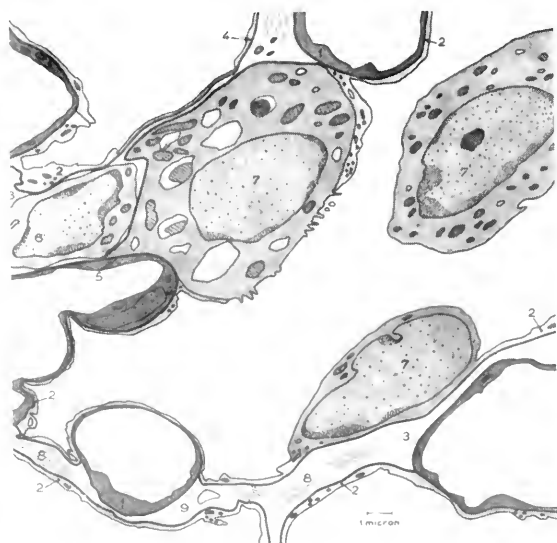


Fig. 1. Semi-diagrammatic representation of the general structure of the lung alveolus. 1, capillary endothelium; 2, cytoplasmic layer; 3, septal space; 4, vitreous basement membrane; 5, endothelial cell junction; 6, intraseptal cell; 7, alveolar cells (large, small and free); 8, collagen fibrils; 9, elastic fibers.

On the other hand, evidence is presented on the pathological changes of these elements under the action of an irritating process.

Rats narcotised with Nembutal were injected intratracheally with Palade mixture. Small pieces of tissue were fixed for 2 hours and embedded in prepolymerised butyl methacrylate containing 1 per cent benzoyl peroxide. Sectioning was done by means of a Porter microtome. An RCA EMU 3A electron microscope was used.

The relations between the cytoplasmic alveolar lining and the large cells are rather peculiar. The large alveolar cell is partly capped, sometimes on a great length (5 microns) by the cytoplasmic layer. The large alveolar cell is then set in the prolongations of the small cells and if the observer could look at the front, only a part of its front surface would be seen.

It will be noted that the microvilli of the large alveolar cell appear only at the extremity of the cytoplasmic lining. The boundary between the two cellular surfaces seems to be the continuation of the basement membrane which inserts the cytoplasm. It is thought that they probably have the same mucopolysaccharidic nature.

The appearance of the mitochondria is variable. Cristae are numerous and sometimes pressed close together. Their aspect varies according to the orientation of the section. Images of tubules in cross-section

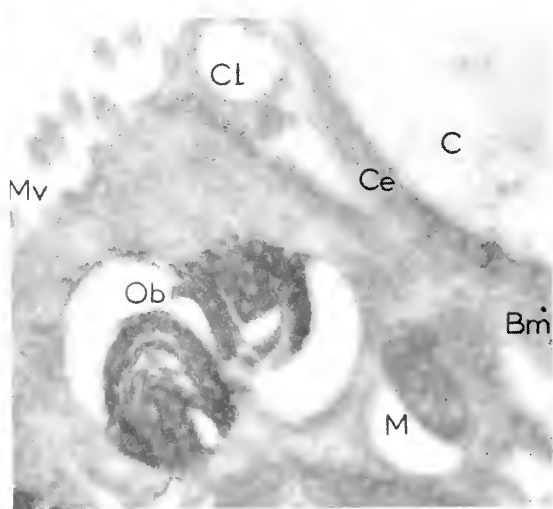


Fig. 2. Rat lung. Large alveolar cell: relations of the cytoplasm with basement membrane and cytoplasmic layer (CL). Microvilli (Mv). Osmiophilic bodies (Ob). Mitochondria (M). Prolongation of the basement membrane by the intercellular limits.

are often met with the pictures of cristae. More frequently, however, the boundaries of these cristae are not parallel but have narrow passages.

Osmiophilic bodies (fig. 2), first described under the name of "Plasmasome" by Kisch (5) and by various authors, are permanent structures pertaining to the large alveolar cells. They have two aspects depending on their state of completeness. When entire they are oval, with a size of 0.9 micron along the major axis. They consist of laminated or tubular elements with very dense outer limits, the middle region being less dense.

The thickness of the lamellae (or sheets) is about 250 Å, corresponding to that of the mitochondrial cristae. Moreover, the dark limits are often joined together, as those of the mitochondrial cristae. The structural elements are very often concentric and sealed or folded. They are sometimes parallel, rather like the mitochondrial cristae.

The various observations mentioned above prompt us to suggest that osmiophilic bodies are derived from mitochondria. The cristae could have become more frequent and elongated, laden with lipids which

had possibly come from the partial decomposition of the mitochondria; this would account for the electron density after osmic fixation. We also think that these bodies can come out of the cell, because free bodies have been observed outside the cytoplasm.

When the osmiophilic bodies are incomplete, they make the bounds of a transparent cavity in the cytoplasm; this cavity is carpeted with some dense fragments which are the remains of the whole body. These cavities perhaps correspond to the vacuoloids which are observed with the light microscope in certain alveolar cells. In this condition they reach or exceed 1 micron in diameter.

The *Golgi apparatus* consists of little groups of lamellae or tubules, similar to the endoplasmic reticulum. They are joined close together in parallel bundles, very often in contact with one or several small vacuoles. Small dark granules are not very numerous in these regions. In the cell, the Golgi apparatus is scattered in the form of small groups around the nucleus, which are separated by cytoplasm, mitochondria or osmiophilic bodies.

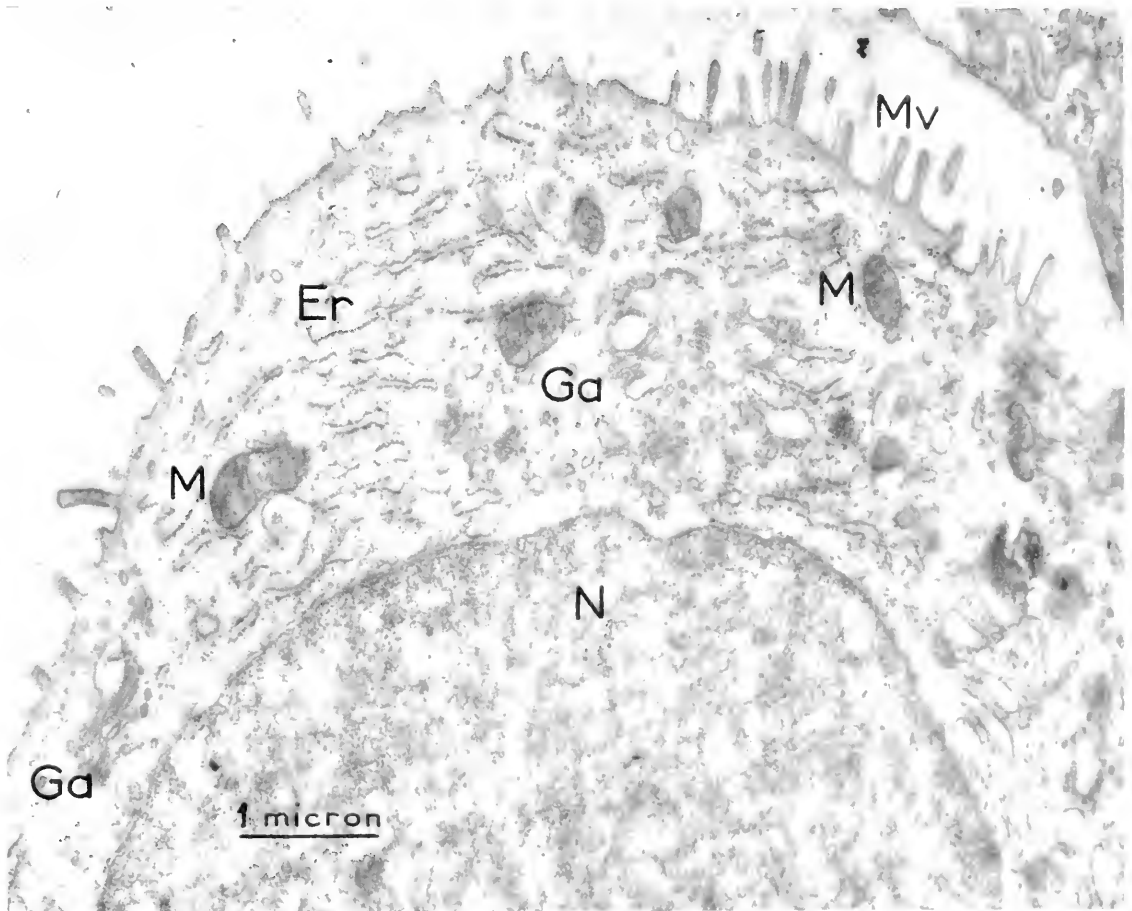


Fig. 3. Large alveolar cell in the course of its histiocytic transformation. Rat lung 48 hours after injection of colloidal silica. Modifications of mitochondria (M). Presence of ergastoplasm (Er). Parts of Golgi apparatus (Ga). Nucleus (N). Magnification 14,000.

We could observe *unusual corpuscles* having an approximatively circular section, 0.1 micron in diameter, limited by a dark simple line; they contained a cytoplasmic material identical with the ground cytoplasm of the cell and images of spheres or tube sections having from 250 to 750 Å. These structures are closely related to those described in the tracheal epithelial cells (13).

In *course of the inflammation*, the alveolar cells undergo profound changes (11, 12). These are true metaplastic changes in the cell which tends to be transformed into an histiocyte.

The first step of this transformation is the formation of cytoplasmic microvacuoles and an increasing number of dark granules in the cytoplasm. The mitochondria are deteriorated. The volume of the cell increases.

The microvacuoles are then replaced by characteristic ergastoplasmic structures with small dark granules on their surface (fig. 3). The cytoplasm has a weak density; the mitochondria are small, their cristae are farther apart and more regular. The osmiophilic bodies are scarce and atypic. The Golgi apparatus does not seem to have changed in shape. Finally one can observe that the microvilli are longer and more numerous than usual, an indication of the change in the consistency of the cytoplasm.

It is thought that the most remarkable change lies in the appearance of ergastoplasm in a cell which is normally deprived of it. This ergastoplasm seems to originate from the tubules of the endoplasmic reticulum. At first the tubules were swollen, dark granules stuck to them and their number increased

in the ground cytoplasm. Observations with the light microscope after Unna-Pappenheim stain revealed that basophilic reaction had increased in accordance with the increasing number of small dark granules, then with the appearance of ergastoplasmic structures.

The possibility of metaplasia produces another evidence proving that alveolar cells are connective tissue elements by nature and that the whole alveolar wall has a mesenchymal origin. Only the cells of the bronchi should be called epithelial. These considerations apply to the whole field of lung pathology.

REFERENCES

1. BARGMANN, W. and KNOOP, A., *Z. Zellforsch.* **44**, 263–281 (1955).
2. CLEMENS, H. J., *Z. Zellforsch.* **40**, 1–7 (1954).
3. KARRER, H. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 241–252 (1956).
4. — *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **98**, 65–84 (1956).
5. KISCH, B., *Exptl. Med. Surg.* **13**, 101–117 (1955).
6. LOW, F. N., *Anat. Rec.* **113**, 437–443 (1952).
7. — *ibid.* **117**, 241–252 (1953).
8. — *ibid.* **120**, 827–852 (1954).
9. POLICARD, A., COLLET, A., and GILTAIRE-RALYIE, L., *Presse méd.* **62**, 1775–1777 (1954).
10. — *Compt. rend. acad. sci.* **240**, 2363–2365 (1955).
11. — *Presse méd.* **63**, 1775–1777 (1955).
12. — *Compt. rend. acad. sci.* **240**, 2473–2475 (1955).
13. RHODIN, J. and DALHAMN, T., *Z. Zellforsch.* **44**, 345–412 (1956).
14. SCHLIPKÖTER, H. W., *Deut. med. Wochschr.* **79**, 1658–1675 (1954).
15. SCHULZ, H., *Virchow's Arch.* **328**, 582–604 (1956).
16. SWIGART, R. H. and KANE, D. J., *Anat. Rec.* **118**, 57–71 (1954).

Vergleichende Untersuchungen der Mitochondrien in Rattenlungen nach intratrachealer Injektion von Kieselsäure

W. KIKUTH, H. W. SCHLIPKÖTER und P. SCHROETELER

Institut für Hygiene u. Mikrobiologie der medizinischen Akademie, Düsseldorf

BEI den Bemühungen um die Entstehung der Silikose wiesen Kikuth, Schlipköter, Schwarz und Staudinger in letzter Zeit auf die besondere Bedeutung zellulärer Angriffspunkte bei den silikotischen Schädigungen hin. Schlipköter konnte bei Untersuchungen von Rattenlungen, die Quarzgranulome enthielten, Veränderungen an den Mitochondrien und eine Vermehrung konzentrisch geschichteter, osmiophiler Zelleinschlüsse nachweisen, die nach Ansicht von Bargmann und Knoop Umwandlungsformen von Mitochondrien sein sollen. Von biochemischer Seite erfolgte durch Staudinger und Kersten insofern eine Bestätigung, als sie eine spezifische Schädigung in der Atmungskette der Mitochondrien

durch Quarzwasser zeigen konnten. Wir haben deshalb die Frage erneut aufgegriffen, ob auch nach Applikation von amorpher Kieselsäure in den granulomhaltigen Lungen submikroskopisch sichtbare Veränderungen festzustellen sind.

Zunächst wurden Untersuchungen an Lungengewebe von normalen Ratten vorgenommen. Es kann heute als bewiesen angesehen werden, daß die Alveolen von einer kontinuierlichen Zytoplasmenschicht ausgekleidet sind.

Der Zytoplasmabelag wird offensichtlich von den Alveolarepithelien gebildet und als Ausläufer dieser Zellen angesehen. Die Zellausläufer, die die Alveolarwand auskleiden, enthalten einige Mitochondrien

sowie zahlreiche Eiweißstrukturen, die sich als fadenförmige Doppellmembranen oder als ringförmige Granula darstellen. Im normalen Lungengewebe findet man konzentrisch geschichtete osmiophile Zelleinschlüsse, die von Schlipkötter zuerst 1953 beschrieben wurden und inzwischen auch von Kisch sowie von Policard und Mitarb. nachgewiesen werden konnten. Bargmann und Knoop beschrieben sie bei verschiedenen Tierarten und Schulz in der menschlichen Lunge. Sie sollen Umwandlungsprodukte der Mitochondrien sein.

Bargmann und Knoop nehmen an, daß diese Formen schließlich in die Alveolarlichtung ausgestoßen werden. Es ist nur verwunderlich, daß man diese Umwandlung in Zellen anderer Organe nicht beobachtet und daß sie in der Lunge vor allem in den Alveolarepithelien stattfindet. Auch andere Einschlüsse, osmiophile und als Vakuolen erscheinende Formen, sind im Zytoplasma der Epithelzellen nachzuweisen.

Nach mehrfachen intratrachealen Injektionen feinkörniger (200 Å) amorpher Kieselsäure tritt in den Rattenlungen nach relativ kurzer Zeit eine noduläre Fibrose auf, die am 75. Tag dem Grad II entspricht. Diese Granulome, die sich sehr zahlreich in den beiden Lungenflügeln entwickeln, wurden nach Palade in der gleichen Weise fixiert, eingebettet und geschnitten. Über die submikroskopischen Veränderungen des Lungengewebes unmittelbar nach intratrachealer Injektion eines Kieselsäuresols wurde von Policard, Collet und Giltaire-Ralyte berichtet und Veränderungen am Zytoplasma und am Kern beschrieben. Bei unseren Versuchen haben wir besonders darauf geachtet, daß der Zwischenraum zwischen der letzten intratrachealen Injektion der Kieselsäuresuspension und der Tötung des Tieres möglichst groß war, damit Veränderungen, die durch den Eingriff selbst und durch Eiweißfällungen hervorgerufen werden, nicht in den Vordergrund treten. Die zahlreichen Zellen in den Kieselsäure-Granu-

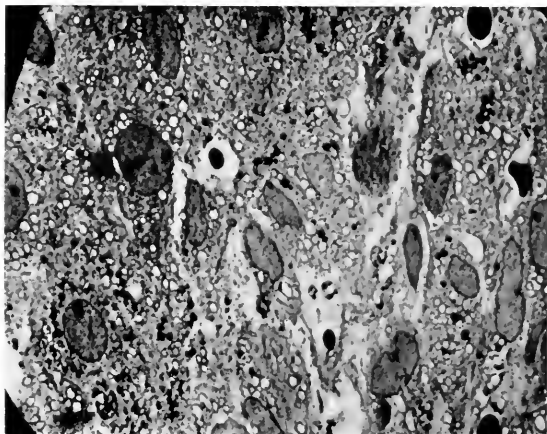


Abb. 1. Rattenlunge nach fraktioniert intratrachealer Injektion von feinkörnig (200 Å) amorpher Kieselsäure. Vergr. 1500 .

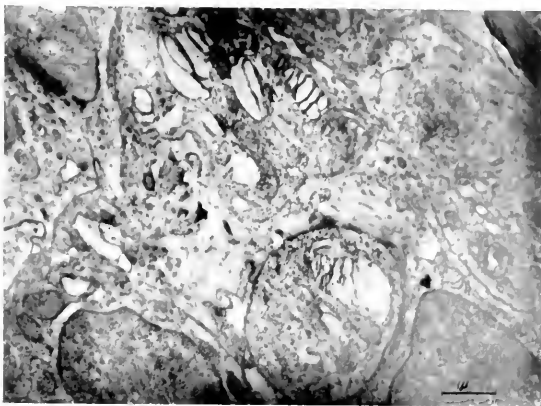


Abb. 2. Rattenlunge nach fraktioniert intratrachealer Injektion von feinkörnig (200 Å) amorpher Kieselsäure. Vergr. 8000 .

lomen ließen schon bei den Übersichtsaufnahmen (Abb. 1) Unterschiede erkennen. Im Zytoplasma der Zellen waren auf der einen Seite die schon beim Quarzknötchen beschriebenen stark osmiophilen Einschlusskörper in großer Zahl vorhanden und außerdem erschienen die Zytoplasmateilchen schon bei dieser Vergrößerung vakuolisiert und gequollen, so daß man zunächst den Eindruck eines Fixationschadens haben kann. Diese Annahme hat sich jedoch nicht bestätigt, weil bei allen Präparaten mehr oder minder deutlich das gleiche Bild auftrat und vor allem, weil die bei höheren Vergrößerungen (Abb. 2) sichtbaren feinen Strukturen an den Kernen, am Zytoplasma und an den Zwischensubstanzen als sicherer Beweis einer ausreichenden Fixierung angesehen werden können. Bei allen Untersuchungen fanden wir — ebenso wie bei den Quarzgranulomen — weder Veränderungen der Zellkerne noch der Zwischensubstanzen.

Bei der näheren Betrachtung der Zytoplasmastrukturen sahen wir verschiedene Partikelformen, die sich in 6 Gruppen einteilen lassen, unter denen jedoch die verschiedensten Übergangsformen vorkommen.

- A. Zytoplasmateilchen mit doppelter Begrenzungsmembran und einer aus parallel angeordneten Doppellamellen bestehenden Innenstruktur.
- B. Zytoplasmateilchen mit doppelter Begrenzungsmembran. Randständig erkennt man Reste von Doppellamellen, die noch eine parallele Anordnung zeigen. Im Zentrum fehlt jede Innenstruktur.
- C. Zytoplasmateilchen mit doppelter Begrenzungsmembran und mehreren weitgehend ungeordneten Bruchstücken von Doppellamellen.
- D. Zytoplasmateilchen mit nur vereinzelt sichtbarer doppelter Begrenzungsmembran und ungeordneten, oft körnigen Innenstrukturen, aber zahlreichen unterschiedlich großen, osmiophilen „Ausfällungen“, die als Granula

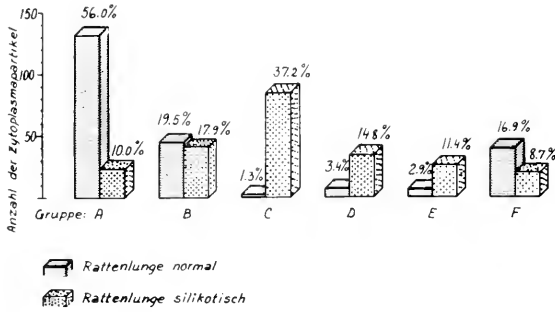


Abb. 3. Gegenüberstellung der Zytoplasmartikel bei Rattenlunge normal und silikotisch. Gesamtsumme der ausgesuchten Zytoplasmartikel bei Rattenlunge normal 236, silikotisch 229.

mit hoher elektronenoptischer Dichte hervortreten.

- E. Zytoplasmartikel mit quergestellten, unterschiedlich breiten osmiophilen Bändern.
- F. Osmiophile, konzentrisch geschichtete Zytoplasmartikel.

Die Gruppen A, B und C sind auf Grund der vorhandenen Strukturen mit Sicherheit als Mitochondrien anzusprechen.

Bei normaler Rattenlunge ist die Beteiligung des Typs A der Mitochondrien am größten. Die Gruppe B ist in etwas geringerem Maße vertreten, während die Gruppe C nur 1,3 % der gesamten ausgezählten Zytoplasmartikel beträgt. Die Gruppen D und E fanden wir in wesentlich geringerem Maße als Zytoplasmartikel der Gruppe F.

Bei Rattenlungen nach intratrachealer Injektion von amorpher Kieselsäure ist dagegen der Mitochondrien-Typ A wesentlich seltener vorzufinden. Mitochondrien der Gruppe B sind in etwa gleicher Häufigkeit wie bei normaler Rattenlunge anzutreffen, während Mitochondrien der Gruppe C eine vermehrte prozentuale Beteiligung zeigen. Die Zytoplasmartikelhäufigkeit der Gruppe D ist bei silikotischer Rattenlunge gegenüber normaler wesentlich vermehrt.

Aus der Gegenüberstellung der Zytoplasmartikel von normaler und silikotischer Rattenlunge (Abb. 3) ist ersichtlich, wie unterschiedlich sich die prozen-

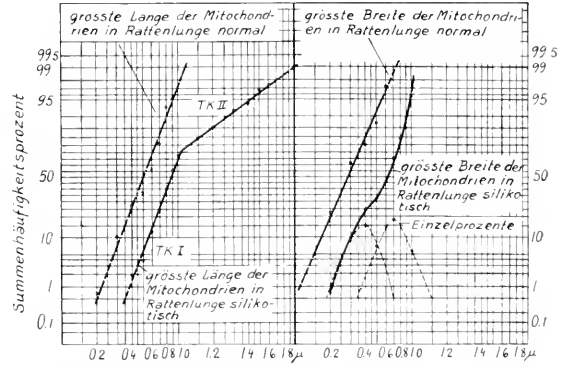


Abb. 4. Wahrscheinlichkeitsnetz. Anzahl der ausgesuchten Mitochondrien bei Rattenlunge normal 288, silikotisch 354.

tualen Beteiligungen der einzelnen Gruppen zu einander verhalten.

Da wir bei der Durchsicht der elektronenoptischen Bilder den Eindruck hatten, daß die mit Sicherheit als Mitochondrien anzusprechenden Zytoplasmartikel im Lungengewebe der Ratten, die fraktioniert feinkörnige amorphe Kieselsäure erhalten hatten, im Vergleich zu den normalen Rattenlungen vergrößert waren, haben wir die den Gruppen A, B und C zugehörigen Formen ausgemessen. Hierzu wurde jeweils die größte Länge und die größte Breite bestimmt und die Werte getrennt in zwei Kurven eingetragen. Die Häufigkeitsverteilung der Mitochondrien in Rattenlungen nach intratrachealer Injektion von amorpher, feinkörniger Kieselsäure zeigt eine deutliche Verschiebung nach rechts, und auch die Eintragung der Summenhäufigkeitsprozente im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abb. 4) läßt eindeutig erkennen, daß die Mitochondrien in den Zellen der Kieselsäuregranulome vergrößert sind, wobei zwei Teilkollektive überlagert sind.

Aus den Beobachtungen, Auszählungen und Ausmessungen, die noch durch ein größeres Zahlenmaterial ergänzt werden müssen, geht hervor, daß die Veränderungen, die beim Quarzgranulom gefunden worden sind, in den Lungen der Versuchstiere nach fraktionierter Kieselsäureapplikation in ganz ähnlicher Form auftreten.

The Lung Tissue in Mice Infected by Tubercle Bacilli

B. CEDERGREN

Department of Bacteriology and the Laboratory for Biological Ultrastructure Research of the Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm

MICE of the same sex and age weighing about 20 g have been infected through the intravenous route with a known dosage (0.1 or 1.0 mg tbb) of a bovin strain of tubercle bacilli. After different intervals—1 to 8 weeks—the lungs have been prepared for light and electron microscopy.

The specimen for light microscopy have been stained according to Ziehl-Neelsen. The specimens for electron

microscopy have been essentially prepared after a scheme used at the Department of Anatomy.

Very soon after infection—one or two weeks—pathological alterations are seen with the light microscope. The most obvious ones are circumscribed areas—granuloms—containing a great number of tubercle bacilli and different kinds of tissue cells.

Most of the material presented is from such an area in an animal killed eight weeks after infection.

In the electron microscopic picture most obvious are the great number of cells containing lots of black homogeneous, rounded granules about 0.5 to 1 μ in diameter. Some of them have been recorded with surrounding concentrically layered membranes, each with a thickness of about 100 \AA .

In the neighbourhood of these cells are others filled with vacuolar structures of about the same size.

In most of the cells containing these black granules a rather high number of tubercle bacilli and often some other characteristic structures described below, have been found. They are supposed to be stages in the degeneration of cells, in this experiment caused by the tubercle bacilli.

One type of these granules (A) is rounded with a fine-granulated ground substance, rather poor in contrast and of varying size about 0.2-0.5 μ . Within these granules are sometimes seen rounded clusters of strong osmiophilic granules (B), 50-100 \AA in size. A more complicated type of granules (C) about 0.5 to 1 μ in width and often of a characteristic shape is also observed. This structure seems to consist of a great number of peripheral concentrically layered membranes, approximately 100 \AA in width and a medulla consisting of small osmiophilic granules, the most peripheral of which seem to be

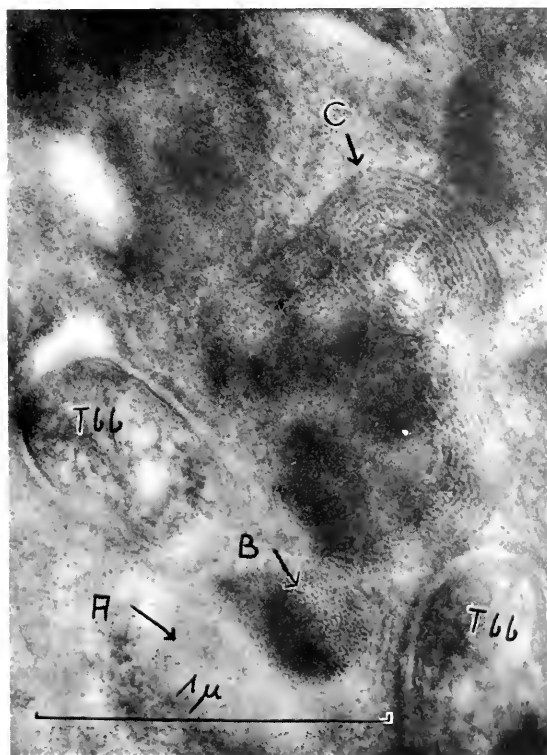


Fig. 1. Clusters of small B-granules in an A-granule. The very characteristic C-granule with its many concentric membranes is also seen. Two tubercle bacilli (tbb) are seen. The picture is supposed to demonstrate an early stage of cell destruction. Magnification 46,000.

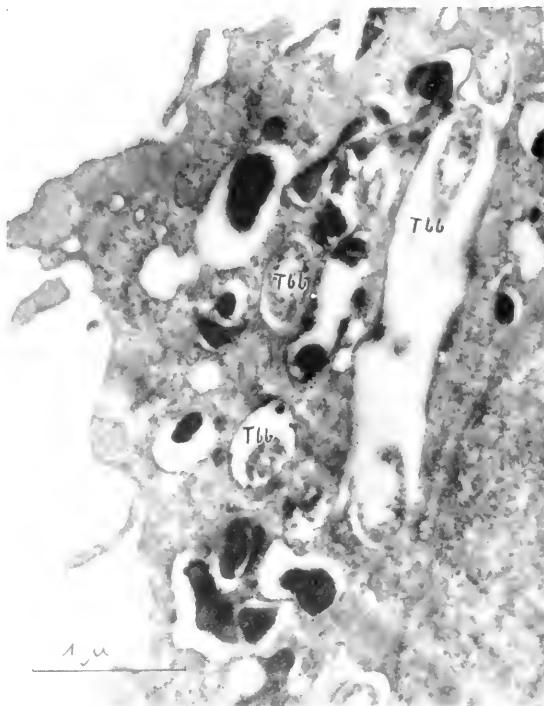


Fig. 2. Tubercle bacilli in a cell containing black granules within vacuoles. The picture is supposed to demonstrate a later stage of cell destruction. Magnification 20,000.

arranged in parallel rows. The C-granules are sometimes more or less covered by a black osmiophilic homogeneous substance.

The different types of granules just described have been recorded in the same section (fig. 1) as well as some others which according to their ultrastructure (number of concentric membranes and granulated centers etc.) very possibly could be intermediate stages.

The different granules and vacuoles are supposed to be stages in the degeneration of cells, where "A-, B-, and C-granules" are found in the early stages. The black granules could be intermediate products, which later on are dissolved leaving vacuoles in the cell. (The cells containing the black granules are in this case supposed to be macrophages.)

The degeneration is believed not to be absolutely specific for the tuberculous inflammatory reaction. The reason for this conclusion is that a very few opaque granules of about the same size can be seen in normal lung tissue cells and to a certain extent have also been observed in lung tissue from pneumococcus-infected mice.

This experiment, however, has shown a distinct increase in the number of the characteristic black granules. My interpretation is, that normally cells are to a certain extent degenerating and dying. In the infected tissue, however, where the infecting agent is localized in the cell proper, this degeneration is proceeding rapidly and intensively thus giving very obvious alterations.

The Importance of an Accurate Size Determination of Fine Particles when Investigating Their Biological Effects

G. BLOOM, J. GLÖMME and Å. SWENSSON

Department of Occupational Medicine, Karolinska sjukhuset;
King Gustaf V Research Institute and the Department of Histology, Karolinska Institutet, Stockholm

WHEN studying the biological reactions to different particles it has become evident that the size of the latter is of importance. With the aid of the microscope it is possible to obtain a particle size distribution of a given sample, but this method is naturally limited by the resolving power of the microscope used. As the biologically most active particles often are of such a size that a closer examination of them is not possible in the ordinary light microscope, indirect methods have been used to determine their

sizes. These methods are all suffering from considerable errors.

A great need for new possibilities of examining very fine particles has arisen. In modern dust combating rather effective methods have been worked out for eliminating particles of light microscopical size, but these methods are less effective with regard to submicroscopical particles. Thus recirculation of air in dustladen workrooms may cause a concentration in the air of submicroscopical particles which pass

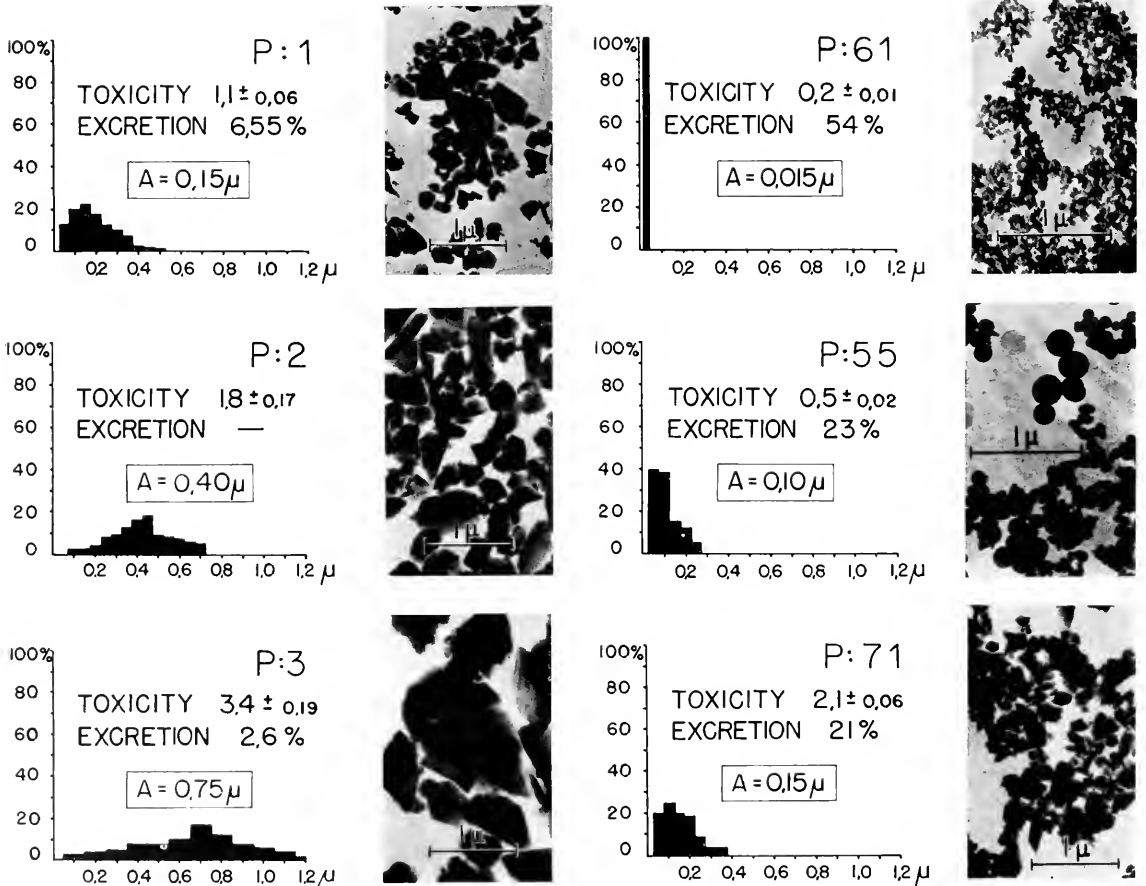


Fig. 1 (left). P:1, P:2 and P:3—different size fractions of the same sample of 99 % α -quartz. Toxicity: Acute toxicity in mg per 30 g mouse by fractioned intravenous injection *ad modum* Dale and King (1953). Excretion: Urinary excretion after intraperitoneal injection during first five days in per cent of injected amount. A: Average particle size.

Histograms: Particle size distribution.

Electron micrographs: The different particle samples, see text.

Fig. 2 (right). P:61, Aerosil, Gold- und Silberwerke. P:55, amorphous silica prepared by combustion of SiCl_4 *ad modum* Flemmert. P:71, ground, fused silica.

Other items as in fig. 1.

through the dust filter. These fine particles do not easily lend themselves to ordinary industrial hygienic control measures. Little is known of their biological effects, and it is difficult to discuss their practical importance, adequate protection against them, etc.

The electron microscope has made possible closer examinations of these extremely small particles both with regard to general appearance and to size. Several methods have been proposed for preparing samples for electron microscopical examination. Special devices have been made and standardized for collecting particle samples from air directly or indirectly via millipore filters onto specimen grids, and in such a way as to make the sample representative of what is contained in the atmosphere. Such investigations of the atmosphere at workplaces where a risk for silicosis exists have shown that the percentage of particles in the submicroscopical range is very high. It has also been shown that dust-combating methods, such as wet drilling in mines, chiefly influence the somewhat larger particles.

In our experimental investigations we have been interested chiefly in determining the particle size distribution of particle samples used for biological investigations. For the preparation of samples we have applied different methods but chiefly we have dispersed the particles in water with the aid of a colloidal mill. The same method has also been used for preparing the particle suspensions used for the biological experiments.

The particle size distribution was determined by measurements performed on electron micrographs. As the irregular particles of ground silica have no definite geometric diameter we have consequently measured in a horizontal direction the distance between two extreme points on the particle.

It has been known for some time that the biological reaction depends on the particle size, but mostly only gross differences of size have been registered. In the following some examples will be given of the relationship between particle size and biological reaction of particles of silica of different kinds.

The importance of the particle size is seen in fig. 1, which shows three fractions from the same ground

sample, of almost pure (99 %) α -quartz. There is a close relationship between particle size and toxicity in such a way that the toxicity decreases with increasing particle size. The excretion values indicate a similar relationship with an increased excretion with decreasing particle size.

In fig. 2 corresponding investigations on samples of amorphous silica prepared in different ways have been grouped together. The relationship between particle size on the one hand and toxicity and excretion on the other is evident also here. It is, however, obvious that also factors other than particle size must be of importance, which is natural with regard to the differences in mode of preparation and structure of the various samples.

Regarding the fibrogenetic effect, it is well established that this effect is marked in all the different crystalline samples. As for the fine amorphous samples of silica the situation is somewhat more complicated. This is exemplified by the reactions to two different samples prepared in the same way but having different particle sizes (P:51, average particle size 0.01 microns, toxicity 0.2 ± 0.01 , and P:55, cf. fig. 2). Sample P:55 one month after intraperitoneal injection in the rat gives a marked cellular reaction with moderate fibrosis, which after 7 months is poorer in cells and slightly more fibrotic than after 1 month. With sample P:51, the reaction after 1 month is chiefly a relatively mild cellular reaction with some reticulin reaction. After 7 months the cellular reaction is almost gone and reticulation is minimal. A definite regress has taken place. Macroscopically it is not possible with this sample to see any changes at all in the peritoneum after 7 months.

According to these investigations the biological effect of silica particles seems to be highly dependent on the particle size.

Detailed knowledge about the particle size distribution is a necessary basis for a scientific discussion of these problems, and more important than hitherto supposed.

Reports on results obtained will be published in *Arch. Ind. Health*, *Acta physiol. Scand.*, and *Acta pharmacol. et toxicol.*

Elektronenoptische Untersuchungen von Staubkorngrößen in Staublungen

H. W. SCHLIPKÖTER und A. COLLI

Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Medizinischen Akademie, Düsseldorf

Aus dem großen Problemenkreis der Staublungenerkrankungen, vor den sich die medizinische wie auch die physikalische und die chemische Forschung gestellt sieht, ist die Frage nach der Staubkorngröße von wesentlicher Bedeutung. Ausmaß und Stärke

der Gewebsreaktion sind weitgehend von ihr abhängig. Besonders für Abwehrmaßnahmen, vor allem für die Staubbekämpfung, ist es wichtig zu wissen, wie groß die Teilchen sind, die die Staubschädigungen in den Lungen hervorrufen.

Die Bestimmung der Staubkorngröße ist daher seit längerer Zeit Gegenstand vieler Untersuchungen. Bisher konnten aber keine einheitlichen Ergebnisse, vor allem über die untere Grenze der gefährlichen Kornfraktionen erzielt werden. Dabei bediente man sich der verschiedensten Methoden, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann. Es sei nur hingewiesen auf die theoretischen Arbeiten von Findeisen und Davies und auf die Retentionsmessungen von Brown, Ney, Hatch und Cook, wie auch von Worth und Schiller und auf die chemischen Aufschlußmethoden staubhaltiger Lungen von King, Pfefferkorn, Gessner, Rüttner und Bühler, Thomas und Stegemann. Die hierbei gefundenen *Korngrößenwerte* zwischen $0,7$ und 5μ wurden lichtoptisch ermittelt. Dabei blieb aber immer die Frage offen, inwieweit auf diese Weise die feineren Kornfraktionen erfaßt werden können. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops wurde es nun möglich, auch feinste Partikel sichtbar zu machen. Allerdings entstanden dabei methodische Schwierigkeiten. Policard und Mitarb. versuchten dieses Problem zu lösen, indem sie silikotisches Lungengewebe mit Mikronadeln zerzupften. Zebel untersuchte Lungenstaub, der nach der Formamid-Methode von Thomas und Stegemann eliminiert worden war. Dabei zeigte sich, daß die Hauptmenge der Staubteilchen zwischen $0,1$ und 1μ lag.

In eigenen Untersuchungen wurden nun, um eventuelle, durch chemische Einflüsse hervorgerufene Veränderungen des Lungenstaubes auszuschließen, von silikotischen Sektionslungen Dünnschnitte hergestellt. Das Lungengewebe wurde in Methacrylat eingebettet. Auf eine OsO_4 -Fixierung mußte verzichtet

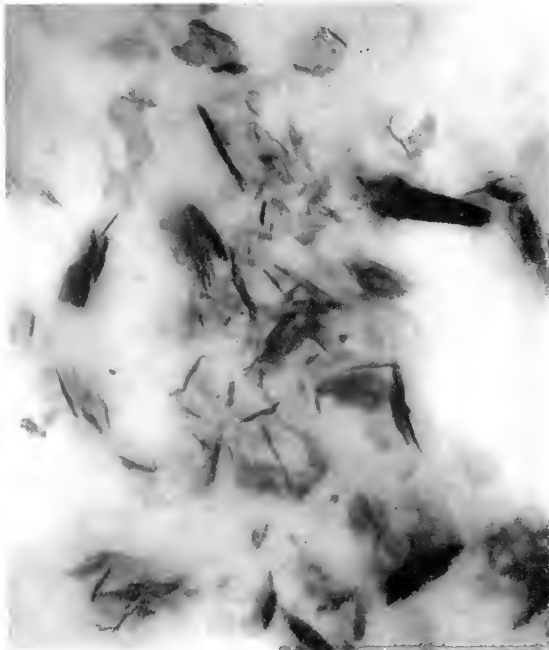
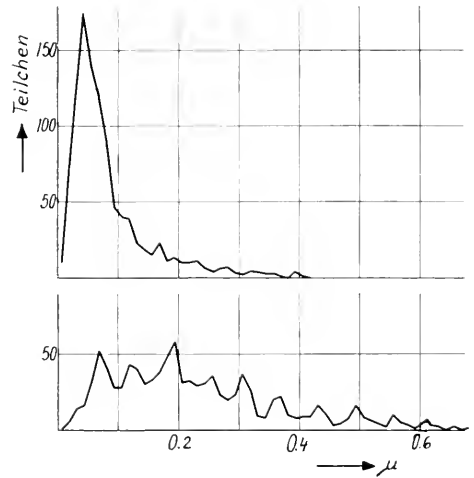


Abb. 1. Schnitt durch Sandstrahlbläserlunge. Elektr. Opt. 7900 \times ; Abb. 18 000 \times .

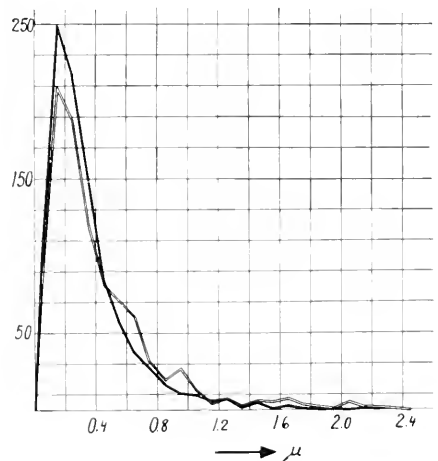


Kurve 1. Häufigkeitsverteilung der Korngrößen von Staubteilchen in einer Sandstrahlbläserlunge. Obere Kurve Breite und untere Kurve Länge der Teilchen.

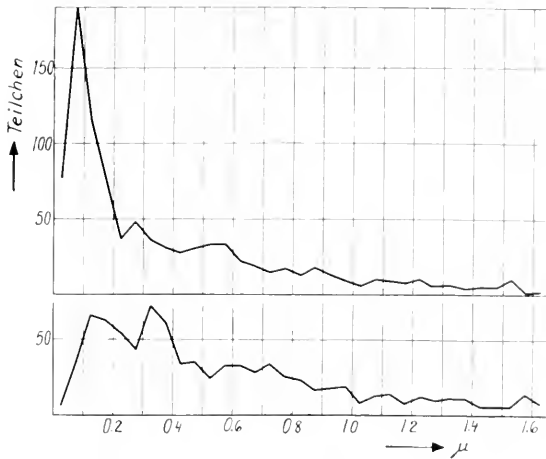
werden, da es sich nicht um frisches Gewebe handelte. Morphologische Strukturen des Lungengewebes konnten daher nicht sichtbar gemacht werden. Dieser Mangel brachte aber den Vorteil mit sich, daß man den Staub klar und ohne störende Gewebesteile sehen konnte.

Es wurden fünf Staublungen untersucht und zwar handelte es sich dabei um die Lungen von einem Sandstrahlbläser, einem Steinmüller und drei Kohlenhauern.

Bei der Sandstrahlbläserlunge wurden 1025 Teilchen ausgemessen. Das elektronenoptische Bild läßt nadelförmige Teilchen erkennen (Abb. 1). Die größte gemessene Länge betrug $1,31 \mu$, die kleinste $0,0125 \mu$. Die meisten Teilchen wurden bei einer Länge von $0,15 \mu$ im Mittel gefunden (Maximum). Zwischen $0,6$ und $1,31 \mu$ waren nur noch ganz vereinzelt Teilchen zu beobachten, die deswegen nicht in der Kurve eingezeichnet sind (Kurve 1).



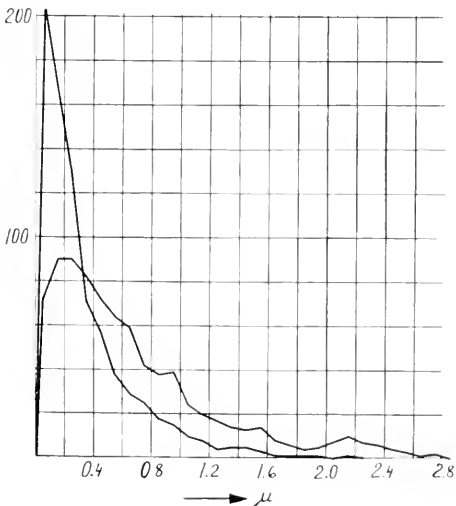
Kurve 2. Häufigkeitsverteilungskurven der Korngrößen von Staubteilchen in einer Steinmüller-Lunge. Breite Linie zeigt Breite und Doppellinie zeigt Länge der Teilchen.



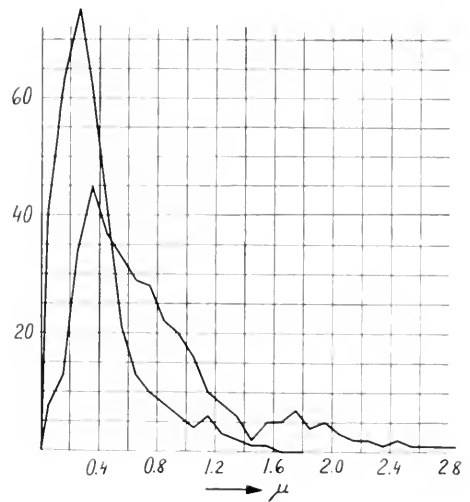
Kurve 3. Häufigkeitsverteilung der Korngrößen von Staubeilchen in einer Kohlenhauerlunge (Nr. I). Obere Kurve Breite und untere Kurve Länge der Teilchen.

Im Gegensatz zu der verhältnismässig lang ausgezogenen Kurve für die Teilchenlänge ist das Kurvenbild für die Breite der Teilchen ein ganz anderes. Diese Kurve steigt sehr schnell und steil bis zum Maximum, das hier bei $0,045 \mu$ liegt, an, und dann bis auf 45 Teilchen bei $0,1 \mu$ ebenso steil wieder abzufallen. Bei der Steinmüllerlunge zeigt die elektronenoptische Aufnahme im Gegensatz zu der Sandstrahlbläserlunge, daß die Form der Partikel quadratisch ist.

Die Kurven, die sich bei der Auszählung von 993 Teilchen in der Steinmüllerlunge für die Länge und Breite ergaben, ähneln einander sehr. Sie weisen beide in ihrem Verlauf einen steilen Anstieg auf und erreichen beide das Maximum bei $0,15 \mu$. Die Werte fallen dann bis zu zwei bzw. 4 Teilchen bei $1,35 \mu$ ab. In der Größenordnung zwischen $1,35 \mu$ und $2,45 \mu$ fanden sich nur wenige Teilchen (Kurve 2).



Kurve 4. Häufigkeitsverteilungskurven der Korngrößen von Staubeilchen in einer Kohlenhauerlunge (Nr. II). Spitzige Kurve Breite und stumpfe Kurve Länge der Teilchen.



Kurve 5. Häufigkeitsverteilungskurven der Korngrößen von Staubeilchen in einer Kohlenhauerlunge (Nr. III). Die Kurve mit dem höchsten Maximum zeigt die Breite und die andere Kurve die Länge der Teilchen.

Bei der ersten Kohlenhauerlunge wurden 1012 Teilchen gemessen (Kurve 3). Die Häufigkeitsverteilungskurve für die Breite der Teilchen zeigt auch hier wieder das charakteristische Bild, wie es schon von vorher gezeigten Kurven bekannt ist: steiler Anstieg und fast ebenso steiler Abfall der Kurve. Das Maximum findet sich bei $0,075 \mu$. Das Kurvenbild für die Teilchenlänge zeigt dagegen einen verzögerten Anstieg und einen noch langsameren Abfall. Der Grund dafür ist wohl in der besonders uneinheitlichen Länge der Partikel zu suchen. Das längste Teilchen, das hierbei gemessen wurde, war $5,52 \mu$ groß. Das Maximum liegt bei $0,23 \mu$ (Kurve 3).

Die zweite Kohlenhauerlunge weist ein ganz ähnliches Kurvenbild wie Nr. 1 auf (Kurve 4). Die Anzahl der ausgezählten Teilchen betrug 787. Für die Breite liegt die Hauptmenge der Partikel bei $0,06 \mu$, während das Maximum für die Länge bei $0,2 \mu$ liegt.

Eine leichte Verschiebung nach rechts, d. h. zu höheren Teilchengröße hin, zeigt die Kurve der dritten Kohlenhauerlunge. Das Maximum für die Breite der Teilchen liegt bei $0,25 \mu$ und das der Länge bei $0,35 \mu$ (Kurve 5). Allerdings war die Anzahl der gemessenen Partikel wesentlich geringer als bei den beiden anderen Kohlenhauerlungen. Sie betrug nur 375 Teilchen. Das größte hier beobachtete Teilchen hatte eine Länge von $4,7 \mu$.

Zur Identifizierung des Staubes wurde die Methode der Elektronenbeugung angewandt. Da es sich bei den vorliegenden Präparaten nicht um isolierte Stäube, sondern um staubhaltiges Gewebe handelt, konnten nur von einzelnen Partikeln mit Hilfe der Feinbereichsbeugung Beugungsbilder erzielt werden. Nach den ausgemessenen Netzebenenabständen dürfte es sich bei den in der Sandstrahlbläserlunge gefundenen Teilchen vorwiegend um das Silikat

Hektorit oder um das ebenfalls zur Montmorillonitreihe gehörende Nontronit handeln.

Die bei der Steinmüllerlunge gemessenen Netzebenenabstände entsprechen dem Bild des Montmorillonits.

Das Beugungsbild, das bei der Kohlenhauerlunge erhalten wurde, ließ sich nur schwer einordnen. In der Mehrzahl stimmen die Netzebenenabstände und die Intensität der einzelnen Beugungsringe mit denen des Quarzes überein.

Bei einem Vergleich der fünf in dieser Arbeit aufgezeigten Häufigkeitsverteilungskurven ergibt sich, daß die Maxima für die Länge der Teilchen zwischen $0,15 \mu$ und $0,35 \mu$ bzw. für die Breite zwischen $0,045$ und $0,15 \mu$ liegen. Das bedeutet, daß ein erheblicher Größenunterschied zwischen früheren lichtoptischen und den vorliegenden elektronenmikroskopischen Staubkorngrößenbestimmungen besteht. Die Frage, wie es zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen

kommt, läßt sich leicht an Hand eines höher vergrößerten Staublungenschnittbildes klären. Es zeigt sich hier nämlich, daß Partikel, die bei geringerer Vergrößerung als wenige große Teilchen erscheinen müssen, in Wirklichkeit viele zusammengelagerte feinste Teilchen sind.

Die Konsequenzen, die sich aus diesen Ergebnissen für die Staubbekämpfung und damit für die Verhütung der Silikose ergeben, sind leicht einzusehen. Bei den praktischen Staubmessungen und den bisherigen Abwehrmaßnahmen gegen die schädigenden Lungenstäube wurden nämlich vorwiegend Partikel höherer Größenordnungen berücksichtigt. Nach diesen und anderen elektronenoptischen Untersuchungen dürfte aber nur eine solche Prophylaxe Aussicht auf Erfolg haben, die es versteht, auch — und man darf wohl sagen: vor allem — die Feinststäube unter $0,5 \mu$ aus der Lunge fernzuhalten.

Electron Microscopy of the Glomerular Basement Membrane in Experimental Amyloidosis of the Mouse

F. MILLER and A. BOHLE

*Department of Pathology and Laboratory of Electron Microscopy, University of Innsbruck, Austria,
and Department of Pathology, University of Heidelberg, Germany*

RECENT investigations of the renal glomerulus (13, 14, 18, 21) with improved technique have placed on a firmer basis our concepts of this complicated structure. The continuous basement membrane of the capillary tuft is covered on the inside by the attenuated and porous sheet of the endothelium and on the outside by the interdigitating foot processes of the visceral epithelial cells. The basement membrane is built up of three layers. A dense osmiophilic middle layer (lamina densa, Yamada (21)) is lined on either side by a less osmiophilic inner and outer layer (lamina rara interna and externa, Yamada (21); inner and outer cement layer, Pease (13)). The middle layer in the mouse glomerulus is about 600 \AA thick (18, 21). The inner and outer layers are about 300 \AA thick (18). Hall (4) apparently called the entire basement membrane lamina densa and did not further comment upon the less osmiophilic layers. Policard *et al.* (16) conceived of the outer layer as an intermediate space. Hall (3) described pores in the basement membrane after fixation in buffered formalin and formalin-alcohol mixtures but could not find them after osmium fixation. Rhodin (18) found a lamellated, spongy structure of the osmiophilic middle layer, and Yamada (21) observed a dense feltwork of fine filaments about 30 \AA thick in the lamina densa. Piel *et al.* (15) noted a thickening of the basement membrane in the early stage of the Masugi nephritis of the rat.

The present work gives a preliminary report on the basement membrane of the mouse glomerulus in experimental amyloidosis.

Amyloidosis was produced by the method of Letterer (7) as modified by Latvalahti (6). White mice were given 20 injections of 0.5 cc Natrium-Casein (Merck) suspended in $n/10$ NaOH (pH 10.0) subcutaneously together with 0.5 IU ACTH (Hoechst) over a period of 4 weeks. The kidneys were exposed under light ether anaesthesia and pieces of the cortex of about 1 mm^3 were fixed for 4 hours in 1% osmium tetroxide buffered at pH 7.2 in the manner of Palade (10). The tissue was embedded in butyl-methylmethacrylate (95:5) and polymerized at 47° using 1% dichlorobenzoyl peroxide as a catalyst. A large area of the tissue was sectioned very superficially on the Sitté (19) ultramicrotome and controlled in a phase contrast microscope. When a glomerulus was cut the tissue block was trimmed to an area of about $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$ under a reflected light microscope in such a way that the glomerulus was located in the center of the cut surface. Thin sectioning was then done with glass knives. The sections were mounted on Athene specimen grids by a method developed by H. Sitté (20) under a phase contrast microscope. Using this method it was possible to move the glomerulus into one of the central meshes of the specimen grid. This was necessary because of the small mobility of the stage of the microscope used. Furthermore, the entire glomerulus could be observed without being partially covered by the bars of the grid. Sections were studied with a Siemens microscope (UM 29) without sublimation of the methacrylate at a low beam intensity. The objective aperture was approx. 50μ . Paraffin-embedded sections were stained for light microscopy with various methods suitable for the detection of amyloid.

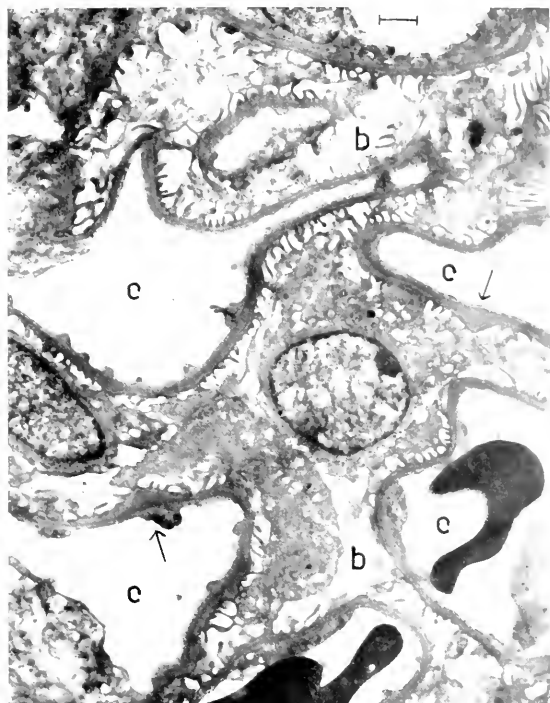


Fig. 1. Low power view of several glomerular capillaries in experimental amyloidosis. Arrows indicate nodular protrusions of the osmiophilic middle layer of the basement membrane. *c*, capillary lumen; *b*, cavity of Bowman's capsule. Magnification 5000.

Light microscopy showed an amyloidosis of almost all glomeruli. With the periodic acid-silver reaction the capillary wall stained black. The amyloid seemed to be deposited within the space enclosed by the capillary wall.

Electron microscopy revealed hitherto unknown changes of the basement membrane, in particular of the osmiophilic middle layer. Measurements of the basement membrane in normal mice confirm the findings of Rhodin (18) and Yamada (21). The total thickness of the basement membrane is $1200 \text{ \AA} \pm 117$. The osmiophilic middle layer is $632 \text{ \AA} \pm 73$ thick. The less osmiophilic inner and outer layers are $273 \text{ \AA} \pm 31$ thick. In mice with amyloidosis the basement membrane is thickened either continuously or in wavy form (fig. 1). The total thickness is $2200 \text{ \AA} \pm 116$. This increase in thickness is exclusively due to a broadening of the osmiophilic middle layer measuring $1557 \text{ \AA} \pm 107$. The inner and outer less osmiophilic layers are of the same thickness as in normal animals. The difference of the means of the osmiophilic middle layer in sick and normal mice is significant on the 99 % level (Student's *t*-test). The variance of the osmiophilic middle layer in mice with amyloidosis is so much greater than in normal

animals (95 % level; Fisher's *F*-test) that it cannot be explained as caused by chance alone.¹ This seems to indicate that the increase in thickness of the middle layer in mice with amyloidosis is caused by a pathological condition and therefore is varying within relatively broad limits.

Apart from the general increase in thickness local protrusions of the middle layer in the shape of knots or mushrooms were observed (fig. 2). These nodular, sometimes hernia-like protrusions have a height of $0.5-1.5 \mu$ and a width of $0.6-2.0 \mu$. They were detected later also with the light microscope on sections stained with the periodic acid silver reaction (9). All the protrusions are bulging exclusively towards the cavity of Bowman's capsule. This could be conceived of as a morphological expression of the decrease in pressure towards the cavity of Bowman's capsule and of the direction of the filtration gradient. Sometimes several protrusions were observed on the same capillary loop spaced closely together. The inner and outer less osmiophilic layers line the bulges of the middle layer and are of the same thickness as in normal mice. The foot processes are always in contact with the outer layer lining the

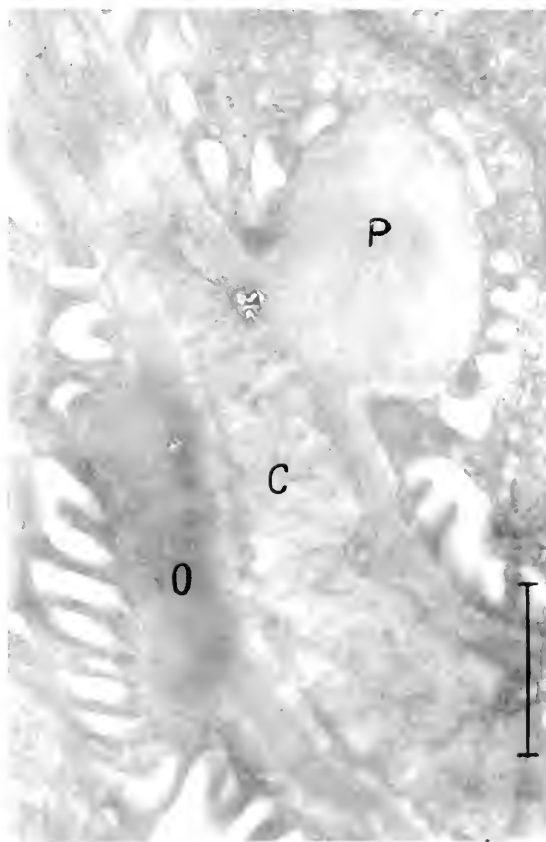


Fig. 2. Glomerular capillary wall in experimental amyloidosis. *C*, capillary lumen with fixed plasma protein particles; *P*, protrusion of the osmiophilic middle layer in the shape of a mushroom; *O*, oblique section through capillary wall. Magnification 26,000.

¹ For greatly appreciated help with the statistical evaluation of the material we are much obliged to Dr. E. Olbrich, Department of Histology and Embryology, Univ. of Innsbruck.

protrusions. Thus, no disruption between basement membrane and foot processes has taken place even in the vicinity of large protrusions of the middle layer, and the outer layer at least may indeed have a cementing function as suggested by Pease (13). Tangential or oblique sections through the capillary wall can be distinguished easily from the protrusions by the aspect of the endothelium and of the foot processes (fig. 2). Within the protrusions of the middle layer a finely spongy or felt-like structure with interwoven filaments of about 30–40 Å is observed. Pores, however, were not found. A disruption between endothelium and inner layer of the basement membrane by deposition of amyloid was not yet detected. Sometimes the endothelium seemed to be swollen.

The parietal basement membrane measuring 1200–1400 Å in normal mice is thickened in animals with amyloidosis. The mean width is 7400 Å. The membrane seems to be split into fine filaments but may also appear homogeneous.

The question arises whether the thickening and the local protrusions of the osmiophilic middle layer are due to the deposition of amyloid. Recent investigations (1, 2, 5) agree that amyloid is deposited between endothelium and basement membrane. On account of a comparative study with the light and electron microscope (9) it is felt that the thickening of the osmiophilic middle layer is not (or not exclusively) due to an infiltration with amyloid. Since the animals had a severe proteinuria it is probable that the passage of pathologic proteins through the basement membrane has resulted in a swelling of the osmiophilic middle layer. This view is confirmed by investigations of Mellors and Ortega (8). These authors found by use of a microfluorescence method that in human secondary amyloidosis globulins were localized in the thickened glomerular capillary walls before amyloid deposition was detected microscopically. Randerath (17) also observed a swelling of the glomerular capillary walls in human glomerulonephrosis probably consecutive to a passage of proteins.

The observations reported in this study seem to have some bearing, however, on the problem of

structure and function of the glomerular basement membrane. The basement membrane in mice with amyloidosis has the same triple-layered structure as in normal mice. The thickening of the osmiophilic middle layer seems to indicate that the definite ultrafilter is formed by this layer alone.

Pores were not observed in the lamina densa although it could be expected that they would become visible in the swollen or bulging middle layer of mice with amyloidosis rather than in the unaltered membrane of normal animals. That pores do not exist cannot be excluded with absolute certainty on the strength of present information. The observations of Hall (3), however, do not form a morphological basis for the thesis of Pappenheimer (11, 12).

REFERENCES

1. BOHLE, A. and KRECKE, H.-J., *Virchow's Arch.* **327**, 663 (1955).
2. CHURG, J. and GRISHMAN, E., *Am. J. Pathol.* **29**, 199 (1953).
3. HALL, B. V., Proc. V. Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, New York. The National Nephrosis Foundation, Inc., 1954, 1.
4. — Proc. VI. Ann. Conf. Nephrotic Syndrome, New York. The National Nephrosis Foundation, Inc., 1955, 1.
5. JONES, D. B., *Am. J. Pathol.* **27**, 991 (1951).
6. LAIVALAHTI, J., Experimental Studies on the Influence of Certain Hormones on the Development of Amyloidosis. Thesis. Helsinki, 1953.
7. LETTERER, E., *Beitr. pathol. Anat.* **75**, 486 (1926).
8. MELLORS, R. C. and ORTEGA, L. G., *Am. J. Pathol.* **32**, 455 (1956).
9. MILLER, F. and BOHLE, A., *Klin. Wochschr.* **34**, 1204 (1956).
10. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
11. PAPPENHEIMER, J. R., *Physiol. Reviews* **33**, 387 (1953).
12. — *Klin. Wochschr.* **32**, 362 (1955).
13. PEASE, D. C., *Anat. Rec.* **121**, 701 (1955).
14. — *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 295 (1955).
15. PIEL, C. F., DONG, L., MODERN, F. W. S., GOODMAN, J. R., and MOORE, R., *J. Exptl. Med.* **102**, 573 (1955).
16. POLICARD, A., COLLET, A., and GILTAIRE-RALYTE, L., *Arch. anat. microscop.* **44**, 1 (1955).
17. RANDERATH, E., *Klin. Wochschr.* **20**, 281, 305 (1941).
18. RHODIN, J., *Exptl. Cell Research* **8**, 572 (1955).
19. SITTE, H., *Mikroskopie* (Wien) **10**, 365 (1956).
20. — personal communication (1956).
21. YAMADA, E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 551 (1955).

Electron Microscope Investigation on Biopsy Material from Patients with Renal Diseases: A Case of Subacute Glomerulonephritis

A. BERGSTRAND and H. BUCHT

Pathological Department, Sabbatsbergs Hospital, Stockholm, and IIIrd Medical Service, St. Eriks Hospital, Stockholm

IN this paper a report is given on an electron microscope investigation of biopsy material from the kidneys of a patient suffering from mild subacute glomerulonephritis. The patient's clinical signs, al-

though clear (proteinuria and haematuria), were slight. Thus the morphological changes could be expected to be moderate and presumably easy to compare to normal structure.

Case Report.—A 32-year-old man. In March 1951 headache, proteinuria and haematuria. After a few days desquamation of the epidermis on hands and feet was observed. No rash. The blood pressure was normal. The diagnosis was scarlatina with acute, haemorrhagic glomerulonephritis. In January and June 1952 recurrent attacks of proteinuria and haematuria with slight elevation of the blood pressure in connection with inflammation of the throat. Endogenous creatinine clearance was 52–118 ml per minute. In January 1953 a new attack developed, associated with diarrhoea. Repeated controls afterwards have shown a constant but very slight proteinuria and an intermittent haematuria. The highest systolic blood pressure recorded was 145 mm Hg. Exogenous creatinine clearance was 136 ml per minute and PAH clearance was 560 ml per minute in April 1956.

Renal biopsy was performed in April and June 1956 by the method of Kark and Muerheke (2) with a modified Vim Silberman needle. The specimen was divided in half. One part was fixed in 10 per cent formalin, embedded in paraffin and sectioned and stained by the routine methods of this laboratory. The other half was fixed in 1 per cent osmium tetroxide solution, dehydrated and embedded in methacrylates according to the method described by Palade (4), Newman, Borysko and Swerdlow (3) and Rhodin (5). The blocks were sectioned on a Sjöstrand ultramicrotome and studied in a RCA electron microscope model 2d.

Results.—In the light microscope no changes could be observed in the renal glomeruli. This does not exclude the presence of changes in the glomeruli in other parts of the kidneys or that there are changes, which are so slight that they are not observable with this technique. In our opinion the clinical signs are so significant, however, that the diagnosis may anyhow be regarded as very probable.

The electron microscope investigation showed the presence of red blood cells in the space between the capillaries, which is most probably the source of the haematuria. Furthermore, changes were observed both in the endothelial and epithelial cells of the capillary walls.



Fig. 1. Part of a capillary lumen in a glomerulus with "spherical bodies" in the lumen. Biopsy material from patient suffering from mild subacute glomerulonephritis. Magnification $\times 19,000$.

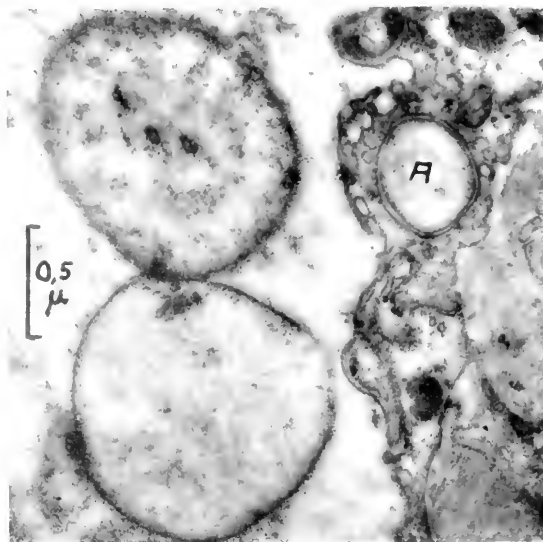


Fig. 2. Part of endothelial cell in a glomerulus. Same case as fig. 1. Large vesicle bordered by a double membrane at A. Magnification $\times 30,000$.

The endothelial cells: Fig. 1 shows part of a capillary lumen in a glomerulus. In the lumen a number of "spherical bodies" are observed. They have a diameter of about 1 micron and are bordered by a single membrane. Inside the bodies small rounded or elongated organelles may be discerned. They are bordered by a very delicate membrane and may be regarded as very small vesicles. Similar organelles may be observed in the cytoplasm of the endothelial cells and also in many other kinds of cells outside the renal glomeruli. The "spherical bodies" cannot be regarded as pathological phenomena. Similar bodies have been observed by the present authors in normal animals (rats, rabbits and dogs). The number and size of the "spherical bodies" is markedly increased in the glomeruli of this patient as compared to what has been observed in animals, however. In the laboratory animals the small organelles inside the bodies are very few or entirely lacking, whereas they are numerous and very distinct in our patient. Thus it is possible that the process of formation of "spherical bodies" is increased in the diseased kidney.

The function and the exact nature of these "spherical bodies" is not known. In our opinion they are formed inside the endothelial cells and are parts of the cell protoplasm, which are ejected into the blood stream. Some observations both from this patient and from animals support this assumption.

Fig. 2 shows a part of an endothelial cell in the glomeruli of our patient. Inside the cytoplasm a very large vesicle (A) is observed. It is bordered by a double membrane. There are no cell organelles inside it.

Fig. 3 shows a similar vesicle close to the nucleus of the endothelial cell. Here the small cell organelles

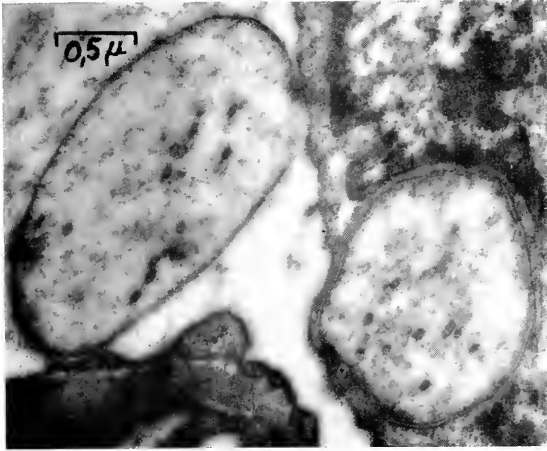


Fig. 3. Large vesicle in glomerular endothelial cell located close to the cell nucleus. Magnification $\times 20,000$.

are very distinct and the vesicle closely resembles a "spherical body". In both pictures "spherical bodies" are observed in the lumen.

In a previous paper (1) a large polypous protrusion from the surface of the endothelium in the efferent artery of a rat was described. There were no cell organelles inside it but the wall consisted of three distinct membranes. We believe this is a "spherical body" protruding from the endothelial cell. When the cell membrane bursts, the "spherical body" with its single membrane (the inner of the two membranes, bordering it in the cell) is ejected.

The epithelial cells: The nuclei of the epithelial cells were well preserved. There was no increase in the number or size of the epithelial cells and there were no adhesions between the epithelial cells of the capillary walls and those of Bowman's capsule as commonly seen in chronic glomerulonephritis. In the cytoplasm of the epithelial cells changes were observed, which may be regarded as degenerative.

A large number of vacuoles could be seen in most cells. Many cells were entirely vacuolised, in others only a few, irregular, were visible (Fig. 4). This can imply an increased uptake of fluid from the glomerular filtrate.

The mitochondria were markedly enlarged. The inner structure was irregular or completely destroyed

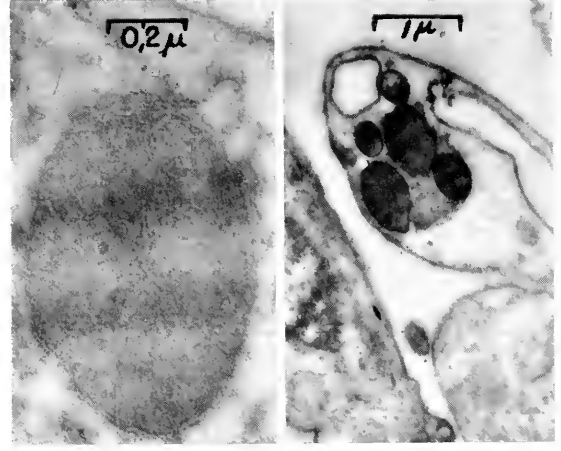


Fig. 4. *Left.* Mitochondrion in epithelial cell of a glomerulus with irregular abnormal inner structure. Magnification $\times 50,000$. *Right.* Part of epithelial cell of a glomerulus with a large vacuole. Magnification $\times 12,000$.

as described by Rhodin (5) in the tubular cells during resorption of proteins. It is probable that the glomerular filtrate in this patient contains an increased amount of protein, since there is proteinuria. Thus a resorption of protein from this fluid to the capillary epithelial cells may take place.

The capillary basement membrane: It has been pointed out in a previous paper (1) that the finest structures of this membrane cannot be demonstrated with this technique since they have very little affinity to osmium tetroxide. No certain changes of the basement membrane have been demonstrated in this material. It is possible, however, that it is thickened, and that there are structural changes in it, responsible for the increased permeability.

REFERENCES

1. BERGSTRAND, A., *Laboratory Invest.* (1957, in press).
2. KARK, R. M. and MUEHCKE, R. C.: *Lancet* **1**, 1047. (1954).
3. NEWMAN, S. B., BORYSKO, E., and SWERDLOW, M., *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **43**, 183 (1949).
4. PALADE, G. E., *J. Exptl. Med.* **95**, 285 (1952).
5. RHODIN, J., *Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convolted Tubule Cells of the Mouse Kidney.* Stockholm, 1954.

XI

MICROBIOLOGY

Some Observations on the Structure of Tobacco Mosaic Virus

H. E. HUXLEY

Medical Research Council, Department of Biophysics, University College, London

X-RAY diffraction studies of oriented preparations of tobacco mosaic virus have made it possible to elucidate the internal structure of the molecule with a very high degree of detail (1, 2, 3, 6). Electron microscope observations, on the other hand, have, until recently, revealed only that the molecules are rod shaped, about 150 Å in diameter and 3000 Å long, and have shown nothing of any internal structure in these molecules. During the initial period of operation of the Siemens Elmiskop I at University College, the question was considered of whether the very high resolution now available with that instrument would make it immediately possible to see structural regularities within the TMV molecules, and indeed, within other large biological molecules and filaments which previously had appeared structureless.

A very dilute solution of tobacco mosaic virus was placed on carbon-filmed electron-microscope grids, and stained with 40 % phosphotungstic acid in the manner described by Hall (4). The results at first seemed disappointing, for even when the resolution was better than 10 Å, no regular internal structure was visible in the particles. However, a curious effect came to light which did reveal one feature of the internal structure.

In some areas of the grids it was sometimes apparent that the excess stain had not been completely removed by washing before the preparation was allowed to dry. In these areas, the particles became outlined by stain in a very distinctive manner. A similar effect has previously been noted by Hall (4) with bushy stunt virus. In addition to the outline,

however, many of the particles now showed a dark line running along their long axes (fig. 1). In the longer particles, this line was frequently much better defined at the end of the particle than near the centre (fig. 1). The line was indistinct or invisible in particles which had not been outlined by the stain.

It was found that this outlining effect could be produced not only by phosphotungstic acid, but also by 0.1 *M* potassium chloride, or 0.1 *M* bicarbonate buffer; it seemed to be sufficient merely to have a little salt of some sort present when the preparation was allowed to dry. The extent of the effect was found to vary very considerably from area to area on the grids, and from one batch of grids to the next, and is presumably related to the wetting properties of the supporting film.

Preparations of virus degraded into short lengths in bicarbonate buffer at pH 10.3 (5) also showed particles with a dark line down their centre when treated by the above techniques. Very short rods, standing on end, are often observed in such preparations; these rods appear to be accurately cylindrical in section, and the central core is readily seen (figs. 2 and 3).

Preparations of virus which have been very thoroughly washed (fig. 4) do not appear "outlined" in this way and it seems that both the PTA or the salt is easily removable.

The most likely explanation of this effect is in terms of the structure, proposed by Franklin on the basis of x-ray studies, in which the virus rods have a hollow core. Thus, if a TMV particle is allowed to dry in a pool of dilute salt solution, the salt will tend

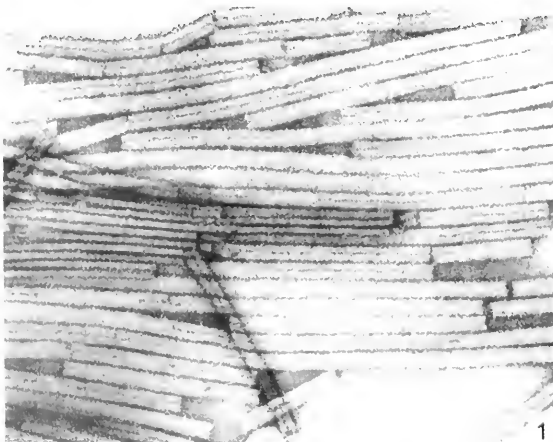


Fig. 1. Tobacco mosaic virus, outlined by drying in very dilute solution of potassium chloride (see text). Magnification 140,000.



Fig. 2. TMV degraded in alkaline solution and outlined in phosphotungstic acid. Magnification 140,000.

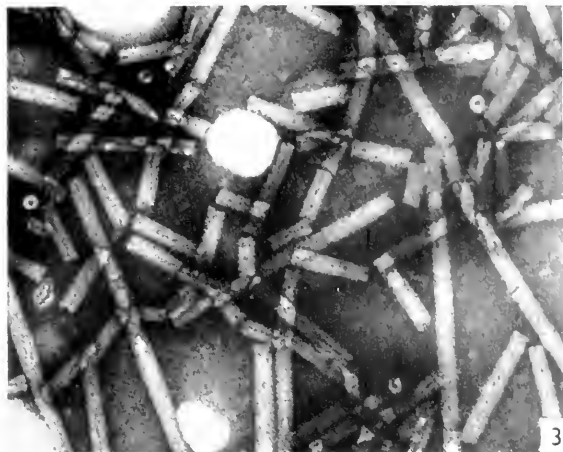


Fig. 3. TMV degraded in alkaline solution and outlined by same solution. Magnification $\times 140,000$.

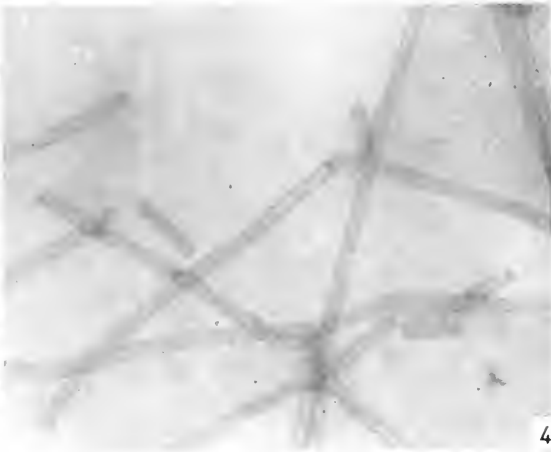


Fig. 4. TMV stained with 40% phosphotungstic acid, and thoroughly washed before allowed to dry. Magnification $\times 140,000$.

to be deposited around the surface of the particle, and if the particle has an inner surface which is accessible to salt, the salt will be deposited there too. The diameter of the core appears to be about 20–30 Å in the E M, which is in agreement with the x-ray values.

These outlined particles show one or two other features of interest, whose significance is unevaluated. They do not seem to show any obvious external grooving of the particle, and the short lengths of degraded virus do not seem to be showing any material protruding beyond the ends of the particle. Degradation always seems to take place by almost accurately transverse cleavage.

The "outlining" technique would appear to be

quite a useful one for this type of specimen, particularly as it is so simple and gives excellent contrast and resolution.

I am indebted to Dr. J. D. Watson and Dr. R. Franklin for interesting me in this material.

REFERENCES

1. BERNAL, J. D. and FANKUCHEN, I., *J. Gen. Physiol.* **25**, 111 (1941).
2. FRANKLIN, R. E., *Nature* **175**, 379 (1955).
3. FRANKLIN, R. E. and KLUG, A., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 403 (1956).
4. HALL, C. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 1 (1955).
5. SCHRAMM, G., SCHUMACHER, G., and ZILLIG, W., *Z. Naturforsch.* **10**, 481 (1955).
6. WATSON, J. D., *Biochim. Biophys. Acta.* **13**, 10 (1954).

Electron Microscope Studies on the Periodicity in Tobacco Mosaic Virus

R. E. F. MATTHEWS, R. W. HORNE and E. M. GREEN

Molteno Institute, Cambridge, and Cavendish Laboratory, Cambridge

INVESTIGATIONS by x-rays on the study of the subunit structure of tobacco mosaic virus (1, 3, 4, 5, 8) have suggested that such a structure is arranged in the form of a helix with a pitch of 23 Å and a repeat distance of 69 Å. This paper is concerned with an attempt to resolve such small surface detail on the surface of tobacco mosaic virus rods using a single stage carbon replica technique (2).

Pre shadowed replicas applied to the study of crystal virus structures (6) indicated that small biological structures could be resolved employing this technique. The work described here was carried out on purified suspensions of TMV dried down on carefully cleaned glass

surfaces and carbon evaporated onto the preparation at an angle of about 30° from the horizontal. The carbon replica is then stripped from the glass surface and placed in 2 N KOH at 60 C for approximately 20 minutes to remove any remaining rods attached to the replica. After a final washing the replicas were examined in the electron microscope at instrumental magnifications of $\times 40,000$ and $\times 80,000$.

Preshadowed replicas have proved to be of little value as much of the structure is obscured by the deposited metal tending to confuse rather than reveal much of the fine structure.

Three features have been resolved: (a) a structure repeating along the rod axis spaced at 46 Å in the

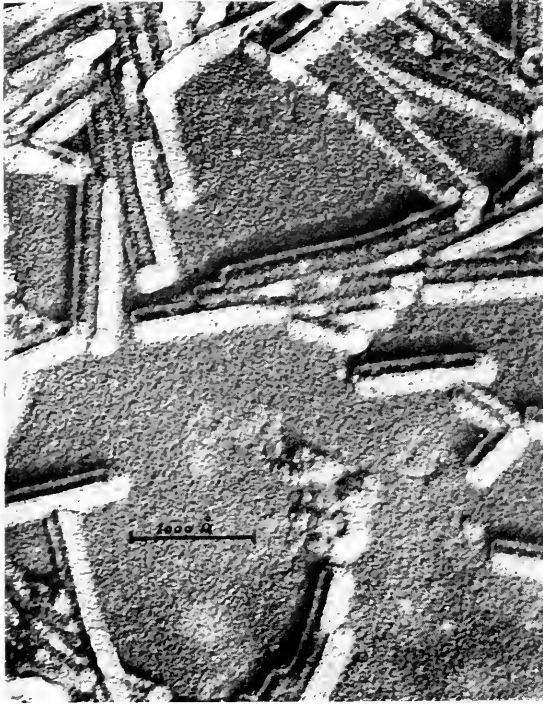


Fig. 1. Single-stage carbon replica of tobacco mosaic virus rods showing periodic structure along the rod axis, longitudinal structure and hexagonal cross-section. Instrumental magnification $\times 40,000$. Final magnification $\times 160,000$.

form of a "herring bone" arrangement, (b) a longitudinal structure running the full length of the rod, (c) evidence that the cross-section of the rod is angular. Many of the rods have been resolved having a definite hexagonal cross-section which fit into the arrangement of longitudinal structures. The periodic "herring bone" structures are possibly due to carbon piling up on one side of a helix when the rod is lying along the direction of incidence of the evaporated carbon. A striking feature is the regular angle

of the periodicity relative to the longitudinal structures. In certain instances some of the longitudinal features appear as hollow grooves at the corners of the hexagonal cross-section. A through focal series of electron micrographs have shown that these ridges and grooves are not due to fringe effects caused by focusing.

Preparations containing both tobacco mosaic virus and turnip yellow virus have been examined under identical conditions to confirm that the structures described are confined to the TMV. A serious limiting factor is the presence of very small material in the virus suspensions and considerable care must be taken in the preparation prior to replication in order to minimise these effects.

From the preliminary work carried out in this laboratory employing carbon replicas, there is some evidence that the structures in TMV predicted by x-ray methods may be observed in the electron microscope.

We are indebted to Dr. Roy Markham of the Molteno Institute for supplying the purified suspensions of the TMV, to Dr. V. E. Cosslett for many valuable discussions and also to the Agricultural Research Council for financial aid.

REFERENCES

1. BERNAL, J. D. and FANKUCHEN, I., *J. Gen. Physiol.* **25**, 111 (1941).
2. BRADLEY, D. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **5**, 96 (1954).
3. COCHRAN, W., and CRICK, F. H. C., *Nature* **169**, 234 (1952).
4. COCHRAN, W., CRICK, F. H. C., and VAND, V., *Acta Crystal.* **5**, 581 (1952).
5. FRANKLIN, R. E., *Nature* **175**, 379 (1955).
6. PRICE, W. C. and WYCKOFF, R. W. G., *Nature* **157**, 764 (1946).
7. SENNETT, R. S. and SCOTT, G. D., *J. Opt. Soc. Amer.* **40**, No. 4 (1950).
8. WATSON, J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 10 (1954).

Filamentous Forms of Influenza Viruses

A. FELTYNOWSKI

State Institute of Hygiene, Department of Virology, Warsaw

FILAMENTOUS forms of influenza viruses were first observed by Mosley & Wyckoff (8). Chu, Dawson & Elford (3) found that recently-isolated strains of the A-type frequently showed filamentous forms. They demonstrated that these forms were characterised by several properties of the elementary bodies of the influenza virus. Hoyle (7) found in the dark field of the light microscope protrusions in the infected allantois membrane and concluded that they contain virus material. It was Wyckoff (11) who first examined the membrane of the chicken embryo infected

by influenza virus on thin sections and found that the cells apparently excreted influenza virus filaments.

In a review of Angulo in 1951, the argument was presented that the filamentous forms were no viruses but breakdown products of the cell cytoplasm. In a previous paper (6) this argument was proven to be non-valid.

Most investigators concerned with the morphology of the influenza virus have described either the elementary round bodies or the elongated forms from

oval through short rods to filaments. It is only Archetti (2) and Draganow (5) who give a more complicated description of the influenza virus, called by Draganow N.W.-bodies.

In this paper we are concerned with the observations on the influenza virus strains isolated in Poland (in the Virology Department of the State Institute of Hygiene headed by Prof. F. Przesmycki) during the influenza epidemics in the years 1953, 1954 and 1955.

The virus strains were as follows:—

The 1953 epidemic: 23 strains were isolated, from which 14 were examined under the electron microscope. The isolated strains belonged to the A-type and only 2 were established as belonging to A-prime-type (see (9) where all methods are given).

The 1954 epidemic: 12 strains were isolated, all examined morphologically and found to belong to the A-prime-type.

The 1955 epidemic: 6 strains were isolated, all belonging to B-type. The laboratory characteristics of the last two epidemics are given in (10).

The preparation of the specimen for the electron microscope is described in the paper previously mentioned (6).

One strain isolated from the 1954 epidemic (so-called "LAK"), belonging to the A-prime type was examined morphologically in more detail. Twenty passages were performed and after each of them the strain was observed under the electron microscope. The optimal passages were 10^{-3} or 5×10^{-3} .

The main result was that the isolated strains were different morphologically. Some of them were filamentous, other had round forms.

The well-known strain PR8 (6) showed long and filamentous forms but it ought to be considered as a strain of round forms because the elementary round bodies are prevalent here. One of the strains isolated in 1953 showed exceptional concentration of long filaments. This strain was a mixed one (obtained from several washings), and it may be interesting to note that the individual strains did not show any or very little filamentous forms. The filaments have thus become prevalent in the mixed strain. Another strain of the same epidemic (so-called "Z.Z."), belonging to the A-prime type, can also be considered as "filamentous".

Most of the strains from this epidemic belonged to the A-type and they are of round forms. The long filamentous forms were not present, but the characteristic short beaded forms consisting of 3–4 beads were also observed (fig. 1).

All the 12 strains from the 1954 epidemic belonged to the A-prime type and all should be considered as filamentous. They showed a great variety of forms (fig. 2).

After several passages of the "LAK" strain the concentration of the filaments decreased.

All the strains isolated in the year 1955 belong to the B-type. They consisted of elementary round bodies only.

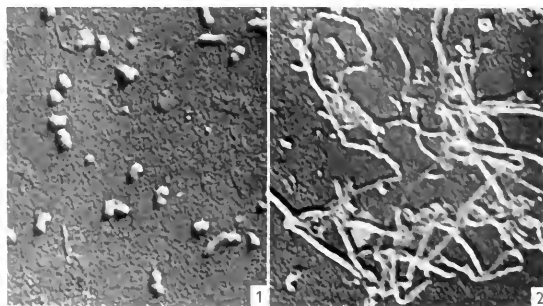


Fig. 1. Strain K.M. Type A-1953. Magnification 18,000.

Fig. 2. Strain TM 1, Type A'-1954. Magnification 11,000.

In the "filamentous" strains the hemagglutination titer of the infected allantois fluid was very low and amounted from 1:40 up to 1:160. Although the morphological pattern of the "LAK" strain after the 1st and 15th passages was different, no difference was established in the antigenic structure.

The "filamentous" strains of the virus show strong polymorphism. In addition to the round bodies, there are also "transitory" forms (from spheres to filaments) and complicated filamentous forms which were called by Draganow N.W.-forms. These polymorphic bodies are characteristic only for the recently-isolated strains and were observed on the A-prime-type. All the B-type strains turned out to be those of round forms.

In my view the filamentous forms present an earlier stage of the development of the virus which then pass into elementary round bodies.

The present work was carried out under the guidance of Professor Przesmycki to whom I express my thanks.

I should like to acknowledge the assistance of Mrs. K. Zgorzelska and Dr. B. Malezewski in the preparation of the virological samples.

REFERENCES

1. ANGULO, J. J., *Arch. Virusforsch.* **4**, 199 (1951).
2. ARCHETTI, L., *Arch. Virusforsch.* **6**, 29 (1955).
3. CHU, C. M., DAWSON, L., and ELFORD, W. J., *Lancet* **256**, 602 (1949).
4. DONALD, H. B., ISAACS, A., *J. Gen. Microbiol.* **11**, 325 (1954).
5. DRAGANOW, K. I., *J. Gen. Biol. (U.S.S.R.)* **17**, 13 (1956).
6. FELTYNOWSKI, A. and ZYCH, Z., *Med. Doświadczalna i Mikrobiol.* **5**, 423 (1953).
7. HOYLE, L., *J. Hyg. Camb.* **48**, 277 (1950).
8. MOSLEY, V. M. and WYCKOFF, R. W. G., *Nature* **157**, 263 (1946).
9. PRZESMYCKI, F. *et al.*, *Med. Doświadczalna i Mikrobiol.* **6**, 241 (1954).
10. PRZESMYCKI, F. *et al.*, *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **4**, 111 (1956).
11. WYCKOFF, R. W. G., *Nature* **168**, 651 (1951).
12. — *J. Immunol.* **70**, 187 (1953).

Fastening of Phage Particles to Bacterial Cell

A. S. TIKHONENKO and A. E. KRIS

Laboratory of Electron Microscopy, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow

RUSKA (5) was the first to communicate that bacteriophages of spermatozoon-like shape fasten themselves to the surface of bacterial cells by their tails. Later on a number of other investigators (1, 2, 3, 4) subscribed to this opinion.

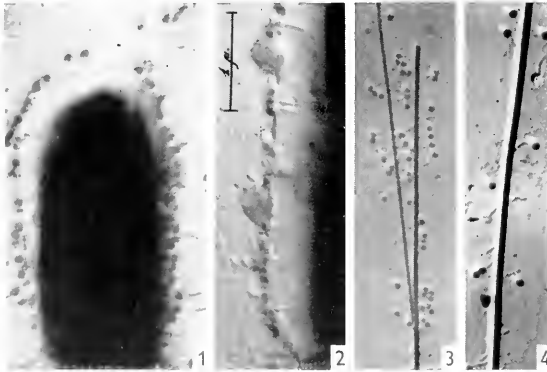
Anderson (1) considers that fastening of the phage particle to the cell by its tail is not random. In such position the internal content of the phage particle—desoxyribonucleic acid—passes directly to the bacterial cell. Different position of phage particles on the surface of bacteria—by their head or side part—is considered by Anderson as a result of drying effect.

However, drying itself cannot change the set distribution of phage particles, for the drop of liquid, which contains bacterial cells with a phage, is placed on the film after a period of time which is sufficient for adsorption.

In figs. 1 and 2, the phage particles are seen in different positions fitting closely to the surface of the bacterial cell.

When phagolysates are filtered through asbestos filters in Zeitz device, small particles of asbestos appear in the ultrafiltrate.

It appeared that on these asbestos filaments phage particles position themselves in the same manner as on bacteria. Phage particles of *Bact. lactis aerogenes* mostly fit to asbestos filament by their tails (figs. 3 and 4), and among particles with convex



Figs. 1 and 2. The phage particles of *Bac. mycoides* in different positions fitting close to the surface of the bacterial cell.

Fig. 3. The phage particles of *Bact. lactis aerogenes* fitting close to the asbestos filaments by their tails.

Fig. 4. The phage particle of *Bact. lactis aerogenes* with flattened and electron-transparent head fitting close to the asbestos filament by its tail (shown by pointer).

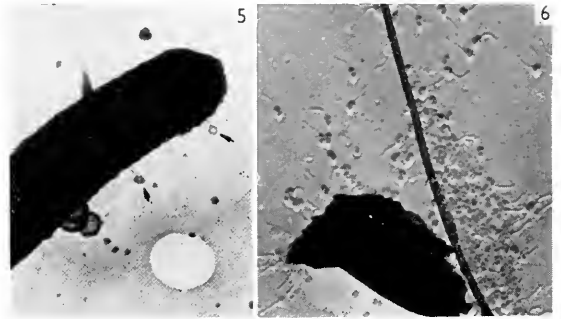


Fig. 5. The phage particle of *Bact. lactis aerogenes* with electron-transparent head that fits to the surface of the bacterial cell (shown by pointers). From ref. (1).

Fig. 6. The phage particles of *Act. globisporus* fitting to the asbestos filament by their heads.

solid heads, particles with a flattened and more transparent head are found (fig. 4). They remind of the phage particles mentioned by Anderson (fig. 5) as "ghosts".

In Fig. 3 it is clearly seen that it is the tails deprived of heads that fit to the asbestos filaments.

The phage particles of *Act. globisporus*, on the contrary, position themselves on the asbestos filaments mostly by their heads, often forming large accumulations (fig. 6). More seldom the phage particles of *Act. globisporus* fasten themselves by their tails.

These observations do not support the assumption that the tail serves for transmitting phage material into the bacterial cell. The character of positioning of phage particles on the surface of bacterial cells as well as on other bodies has no specific significance.

LITERATUR

1. ANDERSON, T., Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., **18**, 197 (1953).
2. MOVSESIAN, A., BIRIUZOVA, V., and ZOLKOVER, A., *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* N 4, 61 (1950).
3. OVCHAROVA, G., BIRIUZOVA, V., and ZOLKOVER, A., *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 9, 9 (1950).
4. PENSO, G., Proc. Symp. on the Interaction of Viruses and Cells, p. 58. 1953.
5. RUSKA, H., *Ergeb. Hyg. Bakteriол. Immunitätforsch. u. exptl. Therap.* **25**, 437 (1943).

Filamentous Form of Bacteriophage at the Earliest Stages of Their Formation in a Bacterial Cell

A. S. TIKHONENKO and A. E. KRISS

Laboratory of Electron Microscopy, U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow

OUR examinations (6) of the fine structure of particles of various phages led us to a conclusion that the typical spermatozoon-like figure of the bacteriophage is formed by a chain of roundish elements twisted in the shape of spiral or clew. The twisted part of this chain looks like the head of phages and the free end of the chain like the tail (fig. 1). In the literature a number of authors (1, 2, 3, 5, 10) have published electron micrographs confirming this idea.

It is interesting that in the bacteriophage of *Bacillus mycoides* we (7) succeeded, with the aid of hydrostatic pressure of several thousands of atmospheres, in untwisting the chain of globules forming a phage particle. In bacteriophage specimens which were subjected to high pressures from several hours to several days, filaments of different length appear (fig. 2), which proved to be linear chains of globular formations (fig. 3).

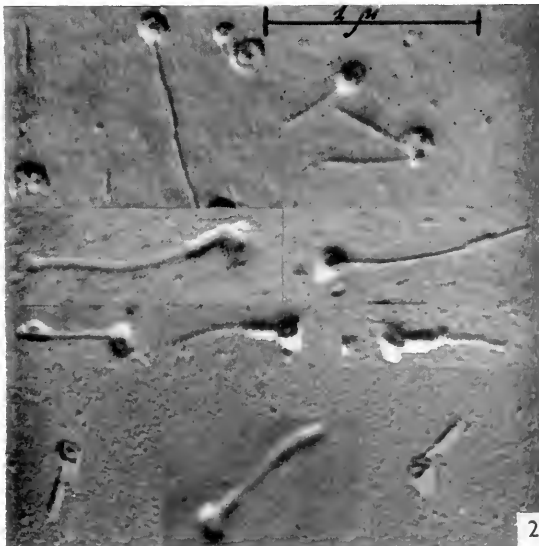
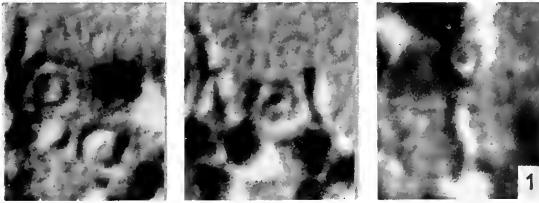


Fig. 1. Spiral shape of the heads of phage particles of *Bac. mycoides*.

Fig. 2. Different degree of untwisting of the filament that forms a phage particle of *Bac. mycoides* under the influence of hydrostatic pressure of 5000 atm. during 2½, 4, 20 and 48 hours.

These filamentous structures are found at the earliest stages of formation of phage particles (4, 8). This may be seen for instance when studying lysis directly on the grid covered with a parlodion film according to a method by Pocotinsky and others (9) and modified by us.

After lysis the phage particles frequently lie in accumulations whose dimensions and form remind of a bacterial cell. The whole field of vision is occupied by roundish particles which have a spiral, and more seldom ring shape, and sometimes by straight filamentous structures.

In fig. 4 besides particles of spiral shape it is possible to see fibrous structures which in one case are the continuation of the head spiral and in another cases position themselves between the heads of separate phage particles (shown by pointer). It is probable that in the latent period fibrous material is formed in the bacteria from which the phage particles develop.

As a confirmation of this assumption may serve the pictures observed in some specimens of lysed bacterial cells. Together with accumulations of phage particles in these specimens were found fields of vision completely filled with fibrous formations (fig. 5) which in some places were separated and in other places fitted closely to each other.

Probably, twisting the filamentous material in the lysed bacterial cell forms the heads of phage particles. In the cases when the filament is twisted freely, the heads of phage particles look like rings

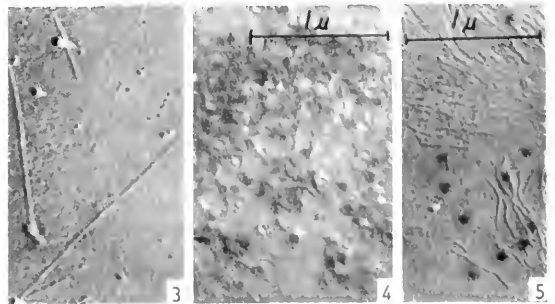


Fig. 3. The filamentous structures consisting of roundish elements in the phagolysate of *Bac. mycoides* after being influenced by hydrostatic pressure of 5000 atm. during 48 hours.

Fig. 4. The filamentous structures which are the continuation of the head spiral and freely lie between the phage particles of *Bac. mycoides* (shown by pointer).

Fig. 5. Accumulation of filamentous structures at the place of bacterial lysis of *Bac. mycoides*.

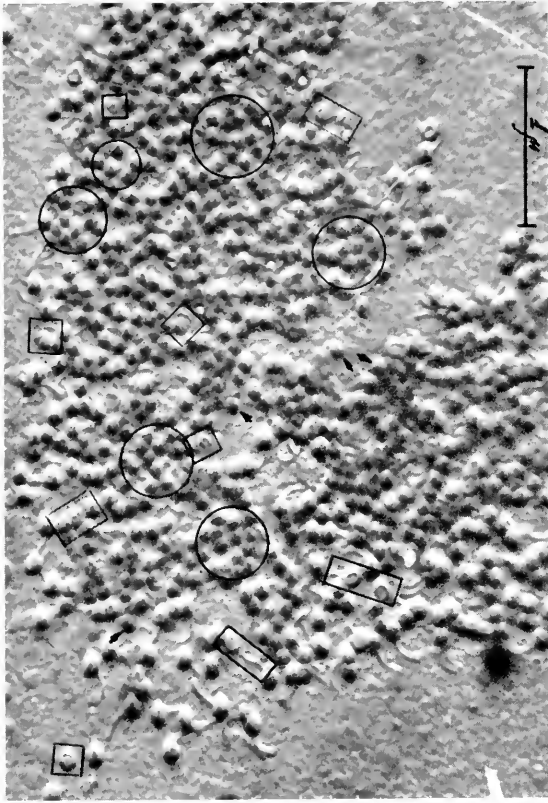


Fig. 6. The polymorphism of phage particles of *Bac. mycoloides* at the place of lysis of bacterial cell. The heads of phage particles with ring and spiral form (enclosed in squares), with solid granules (enclosed in rings) and formless (shown by pointers).

or spirals. The filament twisted more tightly forms the head of a phage particle with granules, which optically reflects the places of bending of the filament that forms the head. The filament twisted very tightly gives an impression of a homogeneous head of a phage particle (fig. 6).

More and more data are accumulated testifying to the fact that a phage particle is a spiral or clew twisted filamentous aggregate of protein macromolecules with a free end in the shape of a tail.

REFERENCES

1. CHAPMAN, G., HILLIER, J., and JOHNSON, F., *J. Bacteriol.* **61**, 261 (1951).
2. FREEMAN, V., *J. Bacteriol.* **61**, 675 (1951).
3. HERCIK, F., *Časopis Lékařů Českých* **89**, 91 (1950).
4. — *ibid.* **90**, 925 (1951).
5. JESAITIS, M. and GOEBEL, W., *J. Exptl. Med.* **102**, 733 (1955).
6. KRIS, A. E. and TIKHONENKO, A. S., *DAN* **86**, 421 (1952).
7. — *DAN* **93**, 353 (1953).
8. NODA, H. and WYCKOFF, R., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 381 (1952).
9. POCKOTINSKY, I. S., KRIVISKY, A. S., and LUZYANINA, T. J., *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* **5**, 19 (1951).
10. WILLIAMS, R. and FRASER, D., *J. Bacteriol.* **66**, 458 (1953).

Comparative Studies on Sections of Intact Cells, Protoplasts and "Ghosts" of a *Bacillus* species

C. WEIBULL and K. G. THORSSON

Central Bacteriological Laboratory of Stockholm City, Stockholm

IN 1952 it was shown (8, 12) that the effect of the enzyme lysozyme on gram-positive bacteria is due to a dissolution of the bacterial cell wall. Soon afterwards it was demonstrated (13) that if the lysozyme treatment is carried out in a medium containing a protective agent such as sucrose or polyethylene glycol, the cell wall can be digested away without ensuing lysis of the protoplasm. Free bacterial protoplasts are thus formed. This indicates that the far-reaching lysis ordinarily effected by the enzyme, resulting in the formation of membranous structures or "ghosts", is due to secondary phenomena, probably to a great extent of osmotic nature.

The protoplasts were prepared as usual by lysozyme treatment of the cells in a sucrose containing medium. "Ghosts" were obtained by suspending protoplasts in

dilute phosphate buffer. Fixation was effected by treating the structures with 1 per cent osmic tetroxide at 37°C for two hours. The fixed specimens were then dehydrated in alcohol, embedded in a mixture of 1 part of methyl and 9 parts of butyl methacrylate and sectioned.

The organism investigated was a *Bacillus* strain named *Bacillus* M by Tomcsik (12). It is closely related to *Bacillus megaterium* and has even been regarded as a variant of this species (11).

Electron micrographs of sections of *Bacillus* M cells reveal the same organisation as found in all other bacteria investigated so far with the same technique (fig. 1).

The protoplasts show essentially the same structural organisation as the intact cells, except for the absence of the cell wall in the former bodies (fig. 2).

The cytoplasmic areas and the nuclear equivalents are seen. Sometimes the outer border of the cytoplasm appears slightly darker than the rest of it, suggesting the presence of a cytoplasmic membrane. These findings are in accordance with the fact that the protoplasts very much show the same biochemical and physiological capabilities as the intact cells. The protoplasts thus respire at the same rate as the cells (13), they synthesize protein and nucleic acid from low molecular weight compounds (4) and they are able to produce adaptive enzymes (3, 5, 16). Moreover, bacteriophage particles and spores develop within them (1, 7, 9, 10). Under certain conditions protoplasts even exhibit growth and division phenomena (6).

The absence of the cell wall structure in protoplasts has earlier been indicated by analytical data (13), by light microscopical investigations (12, 14) and by the fact that they do not absorb phage particles (13).

The "ghosts" consists of shells enclosing some protoplasmic material more or less in the form of granules but otherwise empty, as may be apparent from figs. 3 and 4. Thus earlier observations by means of light microscopy (12, 15), strongly suggesting that the "ghosts" represent cytoplasmic membranes, are confirmed. On the other hand it should be emphasized that some protoplasmic material evidently remains enclosed within this membrane even after the osmotic lysis of the protoplasts.

Staining experiments performed on whole cells and "ghosts" using Sudan Black seem to indicate that the granules of *Bacillus M.* are not of lipid nature. In all events they should not be identified with the granules of polymerized β -hydroxy-butyric

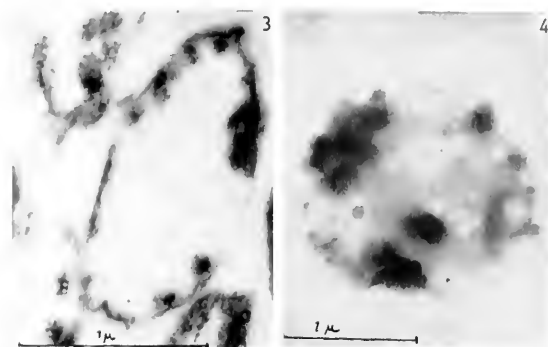


Fig. 3. Section of "ghosts" of *Bacillus M.* Magnification 25,000.

Fig. 4. Electron micrograph of drop preparation of "ghost" of *Bacillus M.*

acid found in genuine *B. megaterium* strains. They seem instead to have more in common with the non-lipid granules that have recently been isolated by Georgi, Miltzer and Decker (2) from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. These workers report that the granules contain desoxyribonucleic acid among other things and, from the enzymological point of view, cytochrome *c* and phosphatases.

It should, however, be borne in mind that the granules found in the bacterial "ghosts" may be artefacts. The osmotic lysis must be regarded as a rather violent disintegration process, readily causing rearrangements between the protoplasmic constituents of the bacterial cell. Such an interpretation is strengthened by the fact that no granules of the size and the electron density found in the "ghosts" of *Bacillus M.* are seen in sections of intact cells or protoplasts.

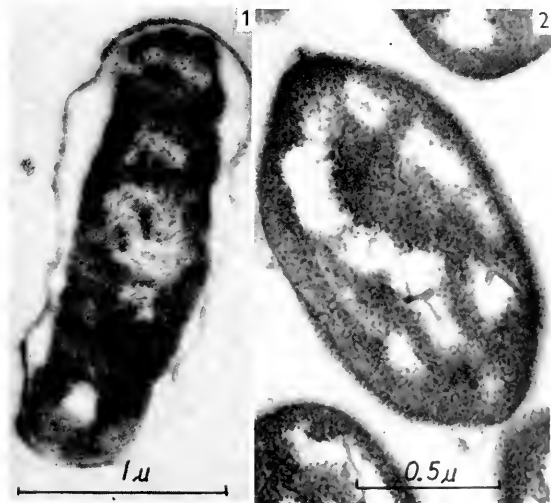


Fig. 1. Section of intact cells of *Bacillus M.* Magnification $\times 28,000$.

Fig. 2. Section of protoplasts of *Bacillus M.* Magnification $\times 38,000$.

REFERENCES

- BRENNER, S. and STENT, G., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 473 (1955).
- GEORGI, C. E., MILTZER, W. E., and DECKER, T. S., *J. Bacteriol.* **70**, 716 (1955).
- LANDMAN, O. E. and SPIEGELMAN, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* **41**, 698 (1955).
- MCQUILLEN, K., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 382 (1955).
- *J. Gen. Microbiol.* **13**, iv (1955).
- *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 458 (1955).
- MUISAARS, W., *Ann. Inst. Pasteur* **89**, 166 (1955).
- SALTON, M. R. J., *Nature* **170**, 746 (1952).
- *J. Gen. Microbiol.* **13**, iv (1955).
- SALTON, M. R. J. and MCQUILLEN, K., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 465 (1955).
- TOMCSIK, J., *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **6**, 53 (1955).
- TOMCSIK, J. and GUFEX-HOLZER, S., *Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriolog.* **15**, 517 (1952).
- WITBULL, C., *J. Bacteriol.* **66**, 688 (1953).
- *Exptl. Cell Research* **9**, 139 (1955).
- *ibid.* **10**, 214 (1956).
- WIAME, J. M., STORCK, R., and VANDERWINDEL, E., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 353 (1955).

A Study of the Division of *Saccharomyces cerevisiae* Using Carbon Replicas

D. E. BRADLEY

*Research Laboratory, Associated Electrical Industries Limited,
Aldermaston, Berkshire, England*

BECAUSE bacteria and similar organisms are dense to electrons, their surfaces cannot be satisfactorily studied by direct examination in the electron microscope. If the surface detail of the organisms is to be revealed, a replica technique must be employed. The most suitable method found so far uses evaporated carbon as a replicating material, (3), and is carried out as follows:

A clean aqueous suspension of yeast cells is first prepared. This is most satisfactorily obtained from a liquid rather than a solid nutrient medium. Cells grown in 6% malt extract solution were found to be free from contaminating matter. Cultures were incubated for varying periods up to 72 hours at 33°C, and fixed for 30 minutes in 4% formalin before being finally washed prior to replication.

A single-stage replica technique was used in which the cell is coated with a layer of carbon and then dissolved away. The yeast cells were first dried down onto a thick formvar film mounted on an electron microscope specimen support grid. It was found that a good dispersion could be obtained by spraying techniques, though there was a risk of damage to the yeast cells. The cells were next coated with a layer of carbon 150 to 200 Å thick. It was then necessary to wash away the formvar substrate so that the yeast cells could be dissolved from the carbon replica. This was carried out by flowing a few ml of chloroform over the grid from a burette at the rate of 1 ml per minute. After the chloroform had evaporated,

the grid was immersed in a solution of 3 g of a mixture of potassium permanganate and dichromate in concentrated sulphuric acid for fifteen minutes. After removal, it was washed in water, then in concentrated hydrochloric acid for a few seconds (this removed the manganese dioxide formed by the decomposition of the acid mixture), and finally in water. After drying, it was ready for shadowing and examination in the electron microscope.

Care must be exercised in the interpretation of electron micrographs of replicas produced by this technique, since a number of artifacts, which are easily recognisable, are liable to occur. The most obvious of these is distortion during the dehydration of the cell. This causes a very gross effect which can be clearly seen in figure 1. It is also likely that, in the case of large organisms such as yeast, the replica will become distorted and a similar effect produced. The rim at A in figure 2 is caused by cell dehydration and gives the appearance of the cell having been flattened against the formvar film. It was found that these artifacts were by no means a serious hindrance and undistorted cells could easily be found by systematic scanning of the grid.

Two kinds of budding scar, illustrated in figure 1, were found on yeast cells. The "birth" scar (marked C), which is the scar formed at the point where a cell was attached to its parent, and the "bud" scar (marked A and B), which is formed on the parent cell when the daughter becomes detached. These scars are quite different in form as can be seen from the figure. These observations are in agreement with those of Barton (2), who carried out his work optically. The morphology of these scars is of great importance in a study of the mechanism of division. Electron micrographs of cells prior to division help in proposing a sequence of events for the process.

Figure 2 shows the "neck" connecting two cells

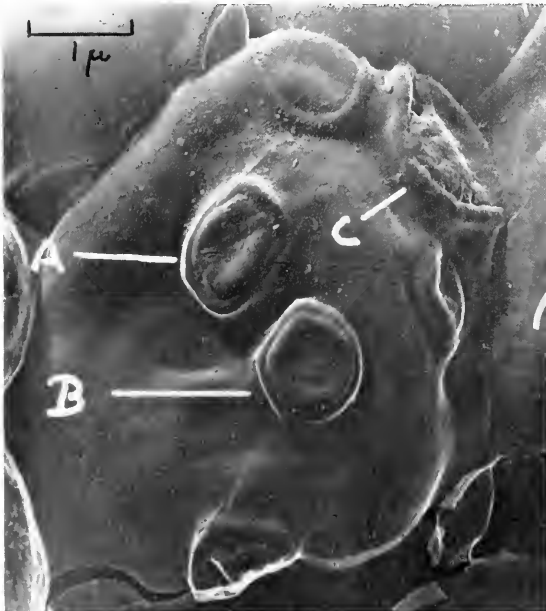


Fig. 1. Shadowed carbon replica of single yeast cell showing "bud" scars at A and B and "birth" scar at C. (By courtesy of Research.) Magnification 14,000.

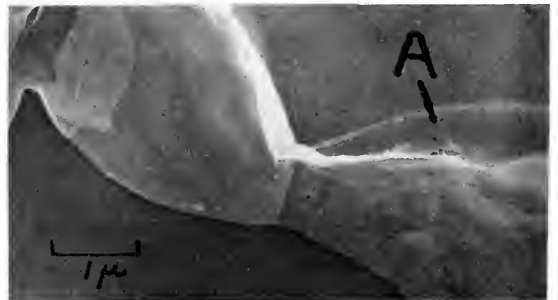


Fig. 2. Internal rims showing in the "neck" joining two cells before division. Shadowed carbon replica. (By courtesy of the *J. Roy. Microscop. Soc.*) Magnification $\times 11,000$.



Fig. 3. Two cells broken apart before ready to divide. Shadowed carbon replica. (By courtesy of the *J. Roy. Microscop. Soc.*) Magnification 14,000.

before division. Two lines can be seen crossing the "neck" indicating that a rim has formed within the cell wall. In figure 3, a cell has been mechanically broken away from its parent before it was ready to divide, and an internal rim can be clearly seen, together with the broken cytoplasmic connection. It is thus possible to say that in the division process, two internal rims form in the neck connecting the two cells before the formation of transverse membranes which must be present when the cells are ready to divide. Now if a hypothetical longitudinal section is drawn of a birth scar and a bud scar and these are inverted over each other, it will be found that they key together. Thus it is possible to propose the sequence of events shown in figure 4. (a) shows

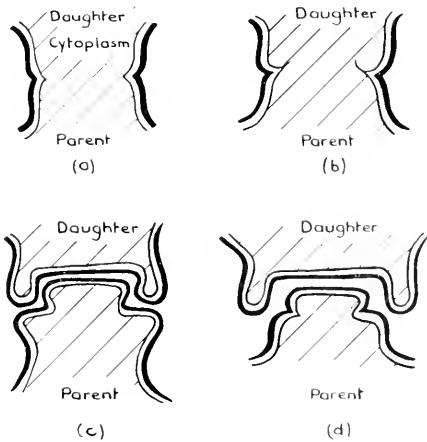


Fig. 4. Diagrams of hypothetical longitudinal sections through the "neck" joining two cells illustrating structural changes during the division process. (By courtesy of the *J. Roy. Microscop. Soc.*)

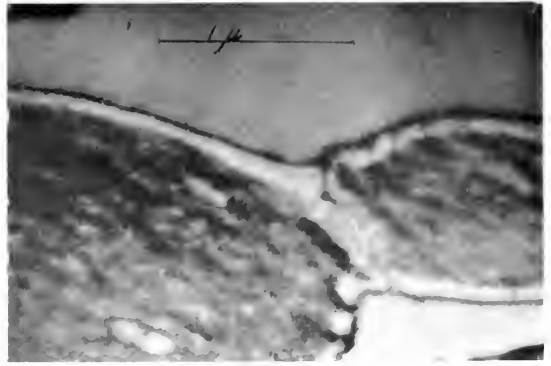


Fig. 5. Electron micrograph of thin section through the "neck" illustrating the key mechanism. (After Agar and Douglas, by courtesy of the *J. Bacteriol.*) Magnification 21,000.

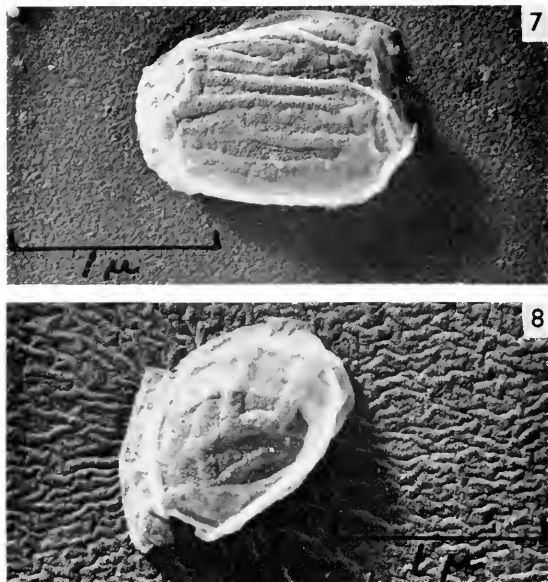
the first stage in the formation of the internal rim and in (b) the rims are nearly completely formed before the transverse membranes. In (c) the interlocking scars are shown in section. These sections are easily deduced by studying the electron micrograph in figure 1. (d) shows the last stage in the process as proposed by Barton (2) in which the birth scar on the daughter cell grows outwards, thus releasing the key mechanism.

An independant investigation by Agar and Douglas (1), who examined sections of yeast concurrently with the present work, showed that the above conclusions are in agreement with information provided by sections. The key mechanism is well illustrated in the micrograph of the section shown in figure 5. This work is more fully described elsewhere by Bradley (4).

In addition to the study of yeast cells, the carbon replica has been applied to the study of the surface structure of some bacillus spores. These are even



Fig. 6. Carbon replica of spores of *B. brevis*. Magnification 25,000.



Figs. 7-8. Carbon replicas of spores of *B. subtilis*. Magnification $\times 27,000$.

more dense to electrons than the bacteria themselves and only a silhouette is seen. In a preliminary examination, spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus brevis* were chosen and replicas prepared by the method outlined above.

Figure 6 shows some typical spores of *B. brevis*. The surface seems to be relatively smooth save

for a single rib which runs longitudinally down the cell. In the case of *B. subtilis* however, a larger number of ribs are present, and though these tend to run longitudinally down the cell (figure 7), they frequently intersect and form a network such as that shown in figure 8.

It seems extremely unlikely that the ribbing is due to shrinkage, if only because of its form. Furthermore, the water content of bacillus spores is very small and in addition, it is hardly possible that shrinkage would cause one rib running lengthwise down every cell as is the case with *B. brevis*. It therefore seems certain that the structure is genuine.

At this stage it is not possible to explain the ribs or their function, but it is hoped that a combined sectioning and replica study together with studies of spores after various treatments will provide much information on their structure.

The author is grateful to Prof. B. C. J. G. Knight of the Department of Microbiology, University of Reading, for his valuable advice on the study of yeast, and also to Mr. D. J. Williams of The National Institute for Research in Dairying, who is collaborating with the author in the study of bacterial spores. Dr. T. E. Allibone, F.R.S. Director of the A.E.I. Research Laboratory, has kindly given permission to publish this paper.

REFERENCES

1. AGAR, H. D. and DOUGLAS, H. C., *J. Bacteriol.* **70**, 427 (1955).
2. BARTON, A. A., *J. Gen. Microbiol.* **4**, 84 (1950).
3. BRADLEY, D. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **5**, 65 (1954).
4. — *J. Roy. Microscop. Soc.* **75**, 254 (1956).

XII

BOTANY

Die Ontogenese der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*

E. S. PERNER

Botanisches Institut der Universität Münster/Westf.

ÜBER die Ontogenese der Chloroplasten höherer Pflanzen liegen heute drei Hypothesen vor: die von Strugger (7, 8) auf lichtmikroskopischen, die von Mühlethaler (4) und Leyon (3) allein auf elektronenmikroskopischen Befunden aufbauend. Sie unterscheiden sich in bezug auf den Bau des Proplastids — dem primären Entwicklungsstadium des Chloroplasten — die Natur des Primärgranums und dessen Bedeutung für die Entstehung der Sekundärgrana und Trägerlamellensysteme im fertigen Chloroplasten. Die Analyse von *Chlorophytum comosum*, einer Liliiflore, die nach bisherigen licht- und elektronenmikroskopischen Erfahrungen gut geeignet erscheint, dürfte zur Klärung der bestehenden Widersprüche beitragen.

Auch im Urmeristem des Sproßvegetationskegels und in den jüngsten Blattanlagen lassen sich in Übereinstimmung zu lichtmikroskopischen Kontrollen Proplastiden nachweisen, die im Stroma einen stark elektronenstreuenden Komplex enthalten, der nach Lage und Größe dem stark färbaren Primärgranum lichtmikroskopischer Untersuchungen entspricht (Abb. 1). Bei ausreichender Vergleichsmöglichkeit ist eine Verwechslung der Proplastiden mit Chondriosomen oder Sphärosomen im elektronenmikroskopischen Bild auszuschließen. Die Form und Größe von Proplastid und Primärgranum bedingen aber im Zusammenhang mit der verschiedenen Lage des Proplastids innerhalb der Zelle, daß in einer großen Anzahl von Schnitten entweder nur das Stroma bzw. vorwiegend das Primärgranum getroffen wird. Im ersten Fall kommt man zu den granumfreien „dense bodies“ im Sinne von Leyon, im zweiten zum „osmiophilen Granulum“ nach Mühlethaler, die im Gegensatz zu Strugger als die primären Entwicklungsstadien von Chloroplasten angesehen werden.

Wenn Mühlethaler und Leyon erst in etwas älteren Blättchen Proplastiden typischer Ausbildung auffinden können, so liegt das an der größeren Wahrscheinlichkeit, hier Proplastiden in charakteristischer Schnittrichtung zu erfassen, denn es hat 1) eine lebhaftere Vermehrung der Proplastiden durch Teilung stattgefunden, und die Proplastiden sind 2) durch Wachstum von Stroma und Primärgranum größer geworden. Dies steht in absoluter Übereinstimmung zu lichtmikroskopischen Erfahrungen (vgl. 9).

Ebenso wie Mühlethaler und Leyon haben auch wir gefunden, daß das Primärgranum in den jüngsten Blattanlagen nicht die von Heitz (1) und Leyon (2) zuerst aufgefundene kristallartige Ordnung aufweist. Sie ist regelmäßig erst bei Blättchen von etwa 0,5 cm Länge ab zu finden. Dieser scheinbare Unterschied dürfte auf die schlechte Fixierbarkeit und die stärkere traumatische Schädigung des Sproßvegetationskegels im Vergleich zu den leicht isolierbaren und gut fixierten Blättchen zurückzuführen sein. Dafür spricht der schlechte Erhaltungszustand des Cytoplasmas im Urmeristem und der einwandfreie bei älteren Blättchen.

Nach Heitz soll das Primärgranum ein Chlorophyllkristall sein, der erst sekundär aus dem Stroma neu entsteht und der demnach kein persistierender Bestandteil des Proplastids sein kann. Daß Chlorophyll im Primärgranum vorhanden ist, haben fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen gezeigt. Daß aber auch Nucleinsäuren enthalten sind zeigen cytochemische Befunde von Spiekermann (6) und Ruch (5). Im elektronenmikroskopischen Bild ist die intensive Osmierung der entscheidende Faktor für die Darstellung des Primärgranums. Für die Reduktion von OsO_4 kommen aber verschiedene Stoffgruppen in Frage: ausser Fetten und Lipoiden auch Eiweiß-



Abb. 1. Proplastid aus dem Sproßvegetationskegel mit Primärgranum (17000 \times).

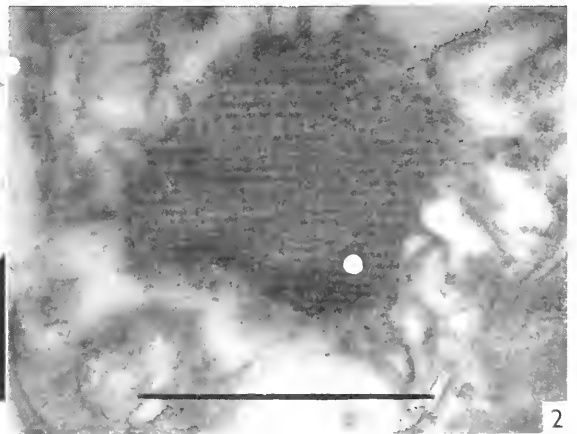
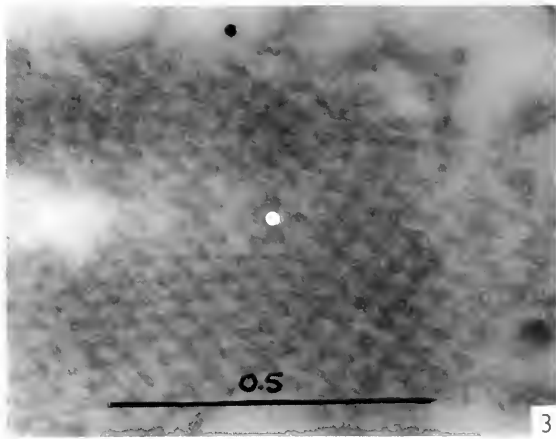
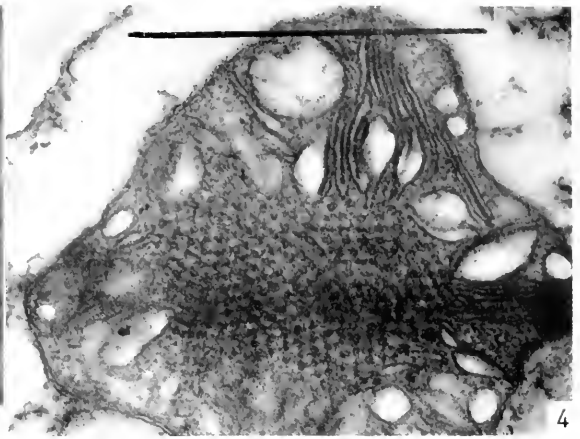


Abb. 2. Proplastid aus etwa 1 cm langem Blatt. Das Primärgranum zeigt einen Aufbau aus Lamellen (40000 \times).

Abb. 3. Ausschnitt aus dem Primärgranum (96000 \times).Abb. 4. Jungchloroplast mit beginnender Stromalamellierung (46000 \times).

körper, aber nicht Nucleinsäuren. Wie die braunschwarze Färbung des Mediums zeigt, führt eine 23 Tage lange Behandlung des osmiumsäurefixierten Materials zu einer Extraktion alkohollöslicher und zur Reduktion von Osmiumsäure befähigter Substanzen, in erster Linie Fette und Lipide. Die starke Elektronenstreuung des Primärgranums bleibt aber fast unverändert erhalten. Am Aufbau sind demnach auch alkoholunlösliche und zur Reduktion von Osmiumsäure befähigte Stoffe beteiligt, wahrscheinlich Eiweißkörper. Das Primärgranum ist daher stofflich heterogen und dürfte einen Chromo-Lipo-Nucleo-Proteid-Komplex darstellen.

Nach Heitz wird das Primärgranum weiterhin als ein einfacher bzw. zusammengesetzter Kristall betrachtet, wobei „kreisrunde, dunkle Flächen“ als Gitterpunkte des dreidimensionalen Systems angesehen werden. Bei geeigneter Schnittrichtung zeigt das Primärgranum aber parallele Lamellen und dürfte demnach eher ein komplexer Schichtenkörper sein (Abb. 2). An extrem dünnen Schnitten war die Anwendung einer stärkeren Primärvergrößerung (bis zu 44000) möglich und es gelang, die angeblichen Gitterpunkte weiter aufzulösen. Es sind in den Bildern etwa 170–190 Å große Gebilde zu erkennen, die trotz verschieden langer Fixation nur aussen osmiert sind, im Inneren aber hell erscheinen. Sie dürften demnach stofflich heterogen aufgebaut sein. Gegen die Kristallnatur spricht ferner, daß diese Elementareinheiten in spezifischer Weise miteinander verbunden sind, wobei der Abstand etwa 400–500 Å beträgt (Abb. 3).

Die große biologische Bedeutung des Primärgranums ergibt sich aus dem Verhalten bei der weiteren Ontogenese, was bereits seit Leyon und Mühlethaler bekannt ist. Die im Jungchloroplasten entstehenden Stromalamellen gehen von den Elementareinheiten des Primärgranums aus, die dabei anscheinend unter Mitwirkung des Stroma zu Lamellen werden (Abb. 4). Der Jungchloroplast wird schließlich vollkommen von Stromalamellen erfüllt, die in Richtung

der Lamellen des Primärgranums verlaufen, wenn in der richtigen Ebene geschnitten wurde. Die typische Struktur des Primärgranums verschwindet zugunsten dichter Lamellenlagen, wobei bereits die ersten Sekundärgrana sichtbar werden.

Mit der Persistenz des Primärgranums steht die Frage nach der bereits lichtmikroskopisch postulierten Teilungsfähigkeit im Zusammenhang mit der Teilung des Plastids zur Diskussion. Drei Schnitte durch einen noch amöboiden Jungchloroplasten im Stadium beginnender Stromalamellierung zeigen, daß hier ein bigranuläres Plastid vorliegt. Nachdem eine spontane Entstehung von Primärgrana niemals beobachtet worden ist, können sie nur durch Teilung entstanden sein. Die hantelförmige Einschnürung bei einem anderen Jungchloroplasten deutet auf ein Teilungsstadium hin. Jedes Tochterplastid wird je ein Primärgranum enthalten, die entweder direkt sichtbar sind oder an den bereits vorhandenen Stromalamellen erkannt werden können.

Diese Befunde bei *Chlorophytum comosum* fordern eine Revision des Entwicklungsschemas von Mühlethaler und Leyon in bezug auf den Bau des Proplastids und die Natur des Primärgranums im Sinne der Auffassung von Strugger. Das lichtmikroskopische Schema von Strugger muß — jedenfalls für dieses Objekt — den neueren submikroskopischen Befunden angepaßt werden. Das Primärgranum geht in ein System von Stromalamellen ein, aus denen sich die Sekundärgrana und Trägerlamellen differenzieren.

LITERATUR

1. HEITZ, E., *Exptl. Cell Research* 7, 606 (1954).
2. LEYON, H., *Exptl. Cell Research* 7, 609 (1954).
3. — *Svensk kem. tidskr.* 68, 70 (1956).
4. MÜHLEHALER, K., *Protopl.* 45, 264 (1955).
5. RUCH, P. D., Vortr. Deutsch. Bot. Ges. Tagung in Hann. Münden. (1956).
6. SPIEKERMANN, R., *Protopl.* (1957, im Druck).
7. STRUGGER, S., *Naturwiss.* 37, 166 (1950).
8. — *Ber. deut. botan. Ges.* 66, 439 (1953).
9. STRUGGER, S. und PERNER, E., *Protopl.* 46, 711 (1956).

Some Botanical Applications of the Carbon Replica Technique

D. E. BRADLEY

Research Laboratory, Associated Electrical Industries Ltd., Aldermaston, Berkshire

IT is likely that a knowledge of the sub-microstructure of the sporoderm would be of some value in a study of post-glacial flora.

The electron microscopy of the surface structure of pollen grains has been made possible by the use of carbon replicas: the technique was first applied in this field by Mühlethaler (4). In the present work, over sixty different species were studied in order to ascertain firstly, the reliability of the replica method developed for the purpose, and secondly, the range of structures which might be encountered in a wide study of pollen.

The replica method was identical with that described elsewhere (1), save for one modification. It was found more satisfactory to dust pollen onto the initial Formvar substrate and then disperse it with acetone or alcohol, rather than to suspend the grains in water and dry down a drop of the suspension. It was found that the efficiency of the technique depended on the size of the pollen grain. In the case of large grains, the method was only 10% efficient, i.e. only 10 out of 100 grains were replicated, the remainder breaking up and leaving a hole in the replica film. It is, of course, only necessary to take micrographs from a few grains so that this 10% efficiency was found to be quite adequate. In the case of small grains, the efficiency was at least 50%.

It was found that the use of acetone or alcohol to disperse the grains caused the absorption of sufficient moisture during the evaporation of the solvent to cause the expansion of some grains. Many pollen grains are deeply divided by grooves, and the swelling causes the grooves to be pushed outwards so that a grain in the form of an ovoid becomes a sphere. This is a well known phenomenon. It was found that the fine detail of the grain was not distorted and that it was possible to study the structure within the groove. An example is shown in figure 1, which is a micrograph of part of a grain of *Lamium album*. The wedge shape represents the groove.

Structures were found to vary very greatly. In some cases, there was much fine detail such as that shown in figure 2 which is the surface of a grain of

Rhododendron; most of this detail is of the order of a quarter of a micron in size, and not properly resolved by the optical microscope. In many cases, however, the structure was much coarser as in figure 3 (*Bryonia dioica*). Most of this detail which is two to three microns in size, could be easily resolved optically, but the electron microscope provides a different viewpoint, and of course, a very much clearer picture. It is certainly likely that electron micrographs such as these will be valuable in a study of pollen.

The examination of fungus spores.—Figure 4 shows a shadowed carbon replica of a spore of *Russula venosa*. This spore is believed to be covered with a thin surface film known as the amyloid layer. The evidence for its presence is that the spore gives a very marked iodine reaction, but this reaction does not occur if the spore is first treated with dilute sodium hydroxide. Some optical evidence of this film has also been described. The matter is still controversial. In the replica shown, there is certainly a surface film present as it has been broken at A and B. This film appears to be from 200 to 500 Å in thickness, according to the position on the spore. The film does not extend over the plage (the rather rough region immediately behind the apicle). This

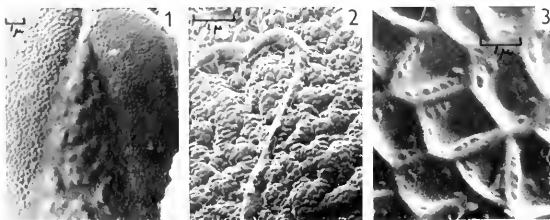


Fig. 1. Shadowed carbon replica of pollen grain of *Lamium album* showing detail within the groove. Fig. 2. Shadowed carbon replica of part of pollen grain of *Rhododendron*. Fig. 3. Shadowed carbon replica of part of pollen grain of *Bryonia dioica*.



Fig. 4. Carbon replica of a spore of *Russula venosa*. (A) and (B) mark places where the suspected amyloid layer has broken. Shadowed.



Fig. 5. Shadowed carbon replica of a scale of *Mallomonas leboimii*.

is a significant point since the plage does not show the iodine reaction. On the basis of this evidence, it seems likely that this surface film is, in fact, the amyloid layer detected by the iodine reaction.

The electron microscopy of the scales of Mallomonas and Synura.—One of the most interesting botanical applications of the carbon replica technique has been the study of the scales of *Mallomonas* and *Synura*. These organisms are classed in the Algae and lie on the borderline between plants and animals. They are unicellular and covered with a flexible armour of silica scales which are much used in the identification of species and exhibit elaborate characteristic ornamentation. *Mallomonas* has fairly large scales and frequently long bristles.

Electron micrographs of replicas provide an enhanced three-dimensional effect, differentiate between the inner and outer surfaces of the scales, and permit the examination of complete organisms.

The replica technique used was a single-stage method, the scales being covered with a film of carbon and then dissolved away with hydrofluoric acid. Figure 5 shows a replica of a scale of *M. leboimii*. The array of scales on the surface of an



Fig. 6. Shadowed carbon replica of part of a cell of *Mallomonas pumilio*. (By courtesy of the *J. Roy. Microscop. Soc.*)

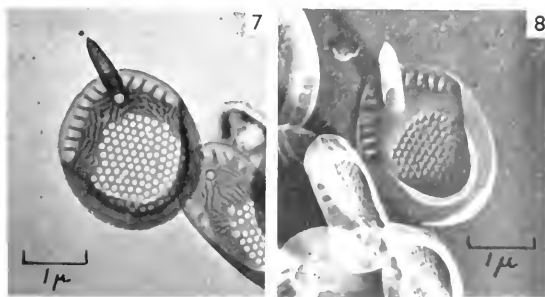


Fig. 7. Direct unshadowed electron micrograph of a scale of *Synura echinulata*. Fig. 8. Shadowed carbon replica of a scale of *S. echinulata*.

organism is shown by replicas of whole cells, as in figure 6 which shows one end of a cell of *M. pumilio*. This is a new species with scales differing only slightly from another closely allied species. The difference can only be seen in the electron microscope.

The scales of *Synura* are much smaller and more delicate than those of *Mallomonas*, and the case for using replicas is not quite so strong. However, it has been found that a complete picture of the structure of the scale can only be obtained both by examining scales directly and using replicas. For example, in figure 7, which shows a scale of *S. echinulata* photographed directly, the structure at the base of the spike is clearly shown. In the case of the replica shown in figure 8, this structure is absent, indicating that it is actually internal. This fact is not revealed by shadowing the scale itself. The inner surface of the scale of *S. echinulata* is not illustrated here; it is, in fact, the other side of the punctate region shown in both micrographs. The holes do not extend over the whole of the inner surface.

It is hoped that the electron microscope will clear up many of the difficulties encountered in identifying the species of these two genera. This work is described in greater detail elsewhere (2, 3).

The author is grateful to Prof. T. Harris of the Botany Department, University of Reading, for his help with the work on pollen, to Mrs. K. Harris with whom the work on *Mallomonas* and *Synura* has been carried out, and also to Dr. F. B. Hora of the same Department with whom the work on fungus spores is being carried out. Permission to publish was given by Dr. T. E. Allibone, F. R. S., Director of the A.E.I. Research Laboratory.

REFERENCES

1. BRADLEY, D. E., These Proceedings, p. 268.
2. HARRIS, K. and BRADLEY, D. E., *Discovery*, 17, 329 (1956).
3. — *J. Roy. Microscop. Soc.* (1957, in press).
4. MÜHLETHALER, K., *Planta* 46, 1 (1955).

On the Ultrastructure of a Fungus: The Gametes of *Allomyces*

G. TURIAN and E. KELLENBERGER

*Botanical Institute and Biophysical Laboratory, Institute of Physics,
University of Geneva*

MOTILE cells (gametes, zygotes, zoospores) of *Allomyces* sp. (aquatic Phycomycetes) exhibit a nuclear cap giving positive cytochemical tests for RNA (4). Ultrathin sections of the gametes of *Allomyces macrogynus* Emers. (OsO₄ fixation, methacrylate embedding medium, according to Turian and Kellenberger (6)) show that this basophilic cytoplasmic formation is surrounded with mitochondria. The lamellar structure of these fungal mitochondria is similar to that already described for animal mitochondria (1, 2, 3).

The nuclear cap is made of a granular substance, devoid of membranous structure and denser than that of the nucleus.

Peripheral, non-basophilic cytoplasm does not contain any granular constituent but seems to contain some membranous structures. In fact, no typical ergastoplasm is formed either in the basophilic nuclear cap or in the peripheral non basophilic cytoplasm.

The nuclear membrane is a double structure. Pores are visible in transverse sections as well as an alveolar

structure in tangential and oblique sections through this membrane.

In the germinated zygotes, the nuclear cap is dissociated and basophily extends to the whole cytoplasm of the seedling (5). Our latest results reveal that this extension of basophily corresponds, on an ultrastructural basis, to a generalized presence of the granular constituent in the cytoplasm of the seedling.

REFERENCES

1. PALADE, G. E., *Anat. Rec.* **114**, 427 (1952).
2. RHODIN, J., Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convolute Tubule Cells of the Mouse Kidney. Stockholm, 1954.
3. SJÖSTRAND, F. S., *Nature* **171**, 30 (1953).
4. TURIAN, G., *Compt. rend. acad. sci.*, Paris, **240**, 2343 (1955).
5. — *Experientia* **12**, 24 (1956).
6. TURIAN, G. and KELLENBERGER, E., *Exptl. Cell Research* **11**, 417 (1956).

Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Warzenstruktur bei den Koniferen

W. LIESE

*Forstbotanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
und Rheinisch-Westfälisches Institut für Übermikroskopie, Düsseldorf*

DER Einsatz des Elektronenmikroskopes auf dem Gebiet der Holzanatomie hat in zunehmendem Maße nicht nur die bisherigen Vorstellungen über den Feinbau der Zellwände weitgehend bestätigen können, sondern auch zu ganz neuen Erkenntnissen geführt.

So konnte für die Tertiärwand, die als innere Zellwandschicht das Lumen der Längstracheiden auskleidet, die teilweise recht unterschiedliche Anordnung der zelluloseischen Elementarfibrillen weiter aufgeklärt und ihre Einbettung in die akzessorischen Begleitsubstanzen sichtbar gemacht werden. Außerdem war es mit dem Elektronenmikroskop erstmals möglich, eine bis dahin noch unbekanntere Erscheinungsform der Tertiärwand, die sog. Warzenstruktur, festzustellen. Hierunter versteht man kleine, warzenähnliche Gebilde, die als zellwandeigene Bestandteile den Wänden der Tracheiden und der

Hoftüpfelkammern aufgelagert sind (Bild 1, 2). Je nach dem Grad der Inkrustierung sind zwischen den Warzen die Elementarfibrillen der Tertiärwand mehr oder weniger deutlich sichtbar. Beim partiellen Abreißen der Tertiärwand von der darunter liegenden Sekundärwand sind die Warzen stets nur auf jener Zellwandschicht vorhanden (Bild 3). Eine Verwechslung mit ähnlich aussehenden Präparationsartefakten kann daher ausgeschlossen werden. Harada (5) überprüfte ihre Originalität außerdem an Dünnschnitten von nativem Holz.

Nach der ersten Entdeckung dieser submikroskopischen Warzenstruktur (8, 9) wurden an zahlreichen Holzarten verschiedener Gattungen eingehende systematische Untersuchungen durchgeführt, um nähere Kenntnis über Vorkommen und Erscheinungsformen zu erlangen (1, 2, 4-6, 10-12). Hierbei ergab sich, daß nur bestimmte Holzarten eine War-

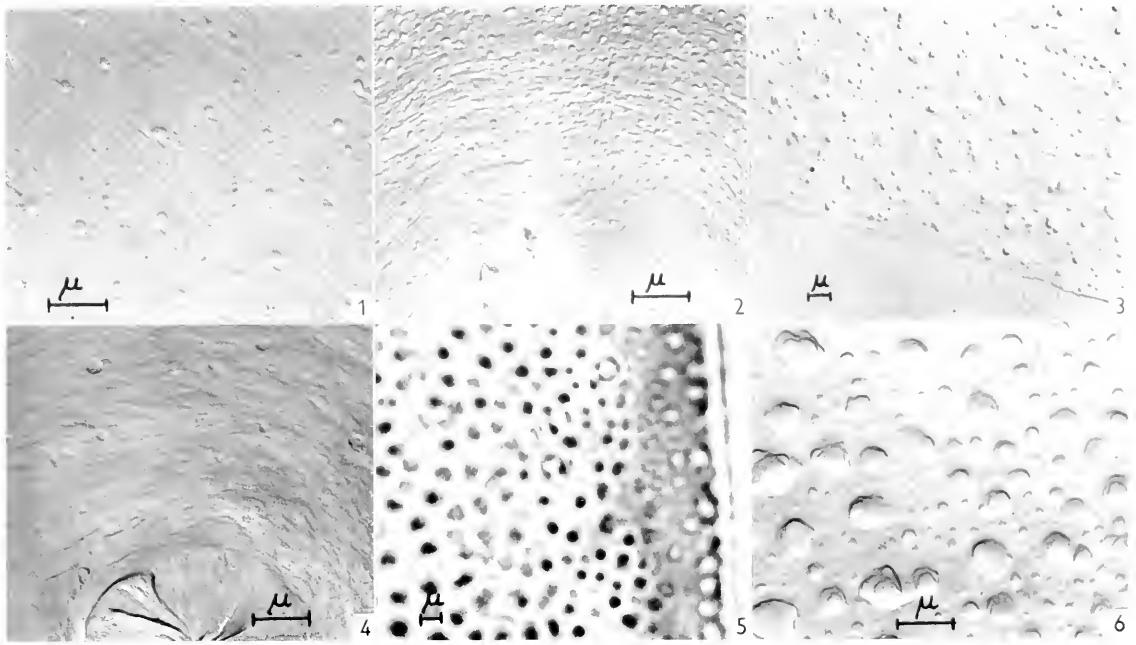


Abb. 1. Warzenstruktur auf der Tracheidenwand von *Pinus patula*; elektr.-opt. 7900

Abb. 2. Warzenstruktur auf der inneren Hoftüpfelwand von *Pinus silvestris*; elektr.-opt. 7900

Abb. 3. Tracheidenwand von *Pinus jeffreyi*; die Tertiärwand ist im unteren Bildteil abgerissen, so daß die Sekundärwand erscheint; elektr.-opt. 2600

Abb. 4. Innere Hoftüpfelwand von *Picea excelsa* mit vereinzelt Warzen; elektr.-opt. 7900

Abb. 5. Warzenstruktur auf der Tracheidenwand von *Widdringtonia dracomontana*; lichtopt. 2200

Abb. 6. Warzenstruktur auf der Tracheidenwand von *Widdringtonia dracomontana*; elektr.-opt. 7900

zenstruktur besitzen, andere hingegen stets glatte Tracheiden- und Tüpfelwände aufweisen. Unsere neuen Beobachtungen zeigen jedoch, daß auch bei dieser Gruppe vereinzelt Warzen besonders auf den Hoftüpfelwänden vorkommen können (Bild 4).

Die Größe dieser submikroskopischen Strukturelemente schwankt in einem recht weiten Rahmen und kann innerhalb einer Art, wie z. B. bei *Pinus silvestris*, von 20 bis 280 μ reichen. Die größeren Warzen befinden sich dabei schon im lichtoptischen Bereich; durch die Kontrastarmut wird jedoch ihre Sichtbarkeit sehr erschwert. Unsere Messungen an zahlreichen Koniferenarten ergaben einen arithmetischen Mittelwert, der meist zwischen 100 und 140 μ liegt. Der allgemein recht weite Streubereich macht es vorerst noch schwer, die vorhandenen Größenunterschiede statistisch abzusichern, um sie als artdiagnostisches Hilfsmittel verwerten zu können. Die Warzengröße ist auf den Tracheidenwänden im Durchschnitt stärkeren Schwankungen unterworfen als auf den Tüpfelhöfen; außerdem sind die Warzen auf den Tracheidenwänden vergleichsweise etwas größer. Die Höhe der Warzen beträgt durchschnittlich etwa 50–75 % des jeweiligen Durchmessers.

Ebenso wie die Größe variiert auch erheblich die Verteilungsdichte, d. h. die Anzahl Warzen je μ^2 . Obwohl die Verteilung selbst meist regelmäßig ist

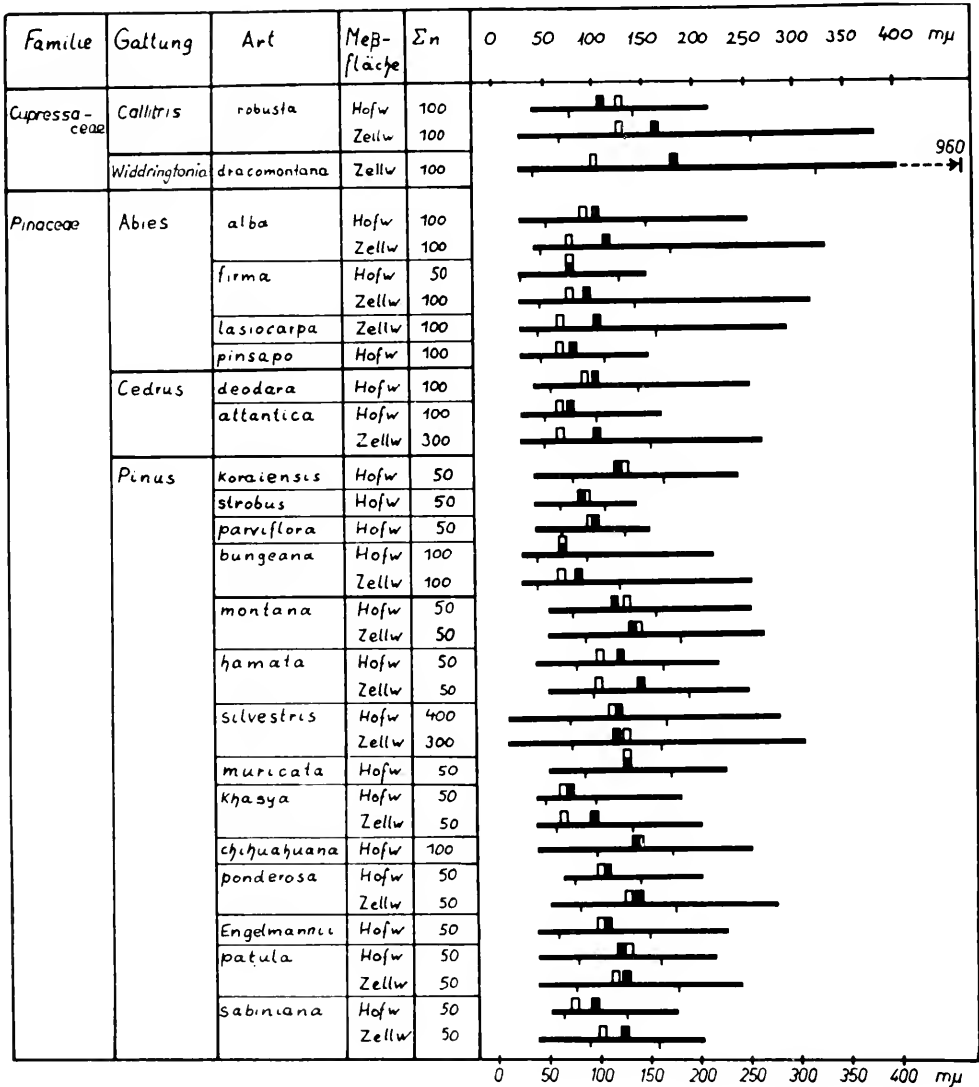
und nur der Abstand schwankt, können die Warzen mitunter auch auffallend gehäuft vorkommen (vgl. Bild 1 und 3). Die Warzen der Hoftüpfel zeigen in der Verteilungsdichte ebenfalls wieder geringere Unterschiede als diejenigen auf den Zellwänden. Wenn auch für die meisten Holzarten eine bestimmte Dichte charakteristisch ist, so sind doch gelegentlich, eng nebeneinander, alle Übergänge von warzenfreien bis zu dicht bewarzten Flächen aufzufinden. Größe und Verteilungsdichte korrespondieren nicht miteinander.

Die Untersuchungsergebnisse vom Vorhandensein oder Fehlen der Warzenstruktur sind bei den bislang untersuchten Arten jeweils für die übergeordnete Gattung einheitlich. Lediglich die Kiefern bilden eine deutliche Ausnahme (1, 2, 10). Klar lassen sich hier die beiden systematischen Untergattungen voneinander trennen; die Haploxyton-Kiefern mit fehlender oder nur spärlicher Warzenstruktur und die Diploxyton-Kiefern mit einer meist auffälligen, dichten Strukturierung. Die Befunde für die einzelnen Arten können stärker als bei anderen Gattungen von einem jeweiligen Normzustand der Größe und Verteilungsdichte abweichen. Innerhalb der Gattung *Pinus* ist die Warzenstruktur daher als sehr variabel anzusehen.

Während die Existenz dieser submikroskopischen Warzenstruktur erst durch die elektronenoptische

TABELLE I. Streuungsbreite der Warzenstruktur bei einigen der untersuchten Koniferenarten.

— Umfang des Kollektivs □ Maximum der Häufigkeit ▬ gewog. arithmetisches Mittel mit σ



Untersuchung festgestellt werden konnte, ist von einigen weniger verbreiteten Koniferen eine bereits lichtmikroskopisch sichtbare feinkörnige Strukturierung der Zellwände bekannt (Bild 5) (3, 7). Es war von besonderem Interesse, diese vereinzelt Beobachtungen durch eine elektronenmikroskopische Analyse zu ergänzen, um festzustellen, ob hier ein Zusammenhang mit der submikroskopischen Warzenstruktur vorliegt.

Die Untersuchung mehrerer Arten verschiedener Gattungen (*Callitris*, *Widdringtonia*, *Pilgerodendron*, *Pherosphaera*)¹ ergab auf den Zellwänden auffallend große und unterschiedlich geformte Gebilde, welche die Dimensionen der bisher beobachteten Warzen um ein Vielfaches übertreffen (Bild 6). Ihre

Ausmaße reichen weit in den lichtoptisch erfassbaren Bereich hinein und können vereinzelt fast bis zu 1000 $m\mu$ betragen. Es besteht wohl kein Zweifel, daß die beschriebene feine Körnung der Zellwände durch diese „Makro-Warzen“ hervorgerufen wird. Zwischen ihnen befinden sich in regelloser Verteilung zahlreiche kleinere und kleinste Warzen bis zu etwa 20 $m\mu$. Eingehende Messungen ergaben fast kontinuierlich alle Übergänge von den kleinsten bis zu den größten Formen.

Ähnlich wie bei der bereits bekannten, eingangs erörterten Warzenstruktur ist die Verteilungsdichte

¹ Für die Überlassung der Holzproben danken wir herzlich Herrn Prof. Dr. P. Greguss, Szeged, und der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Reinbek.

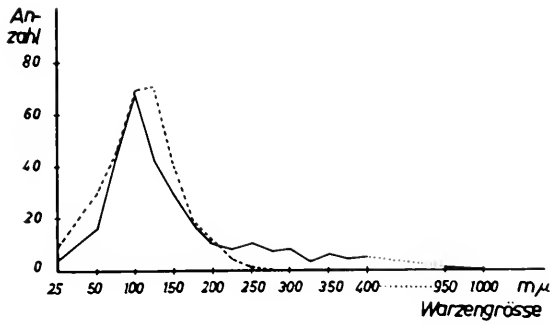


Abb. 7. Größenverteilung von je 300 Warzen auf den Tracheidenwänden von *Widdringtonia dracomontana* (—) und *Pinus silvestris* (-----).

hier ebenfalls recht unterschiedlich und reicht von größerer räumlicher Trennung bis zu einem schollenförmigen Muster. Mit der Größe wächst meist auch die Höhe der Warzen, die vereinzelt bis zu 1 μ betragen kann.

Ein ganz anderes Erscheinungsbild zeigt sich jedoch auf den inneren Hofdüpfelwänden. Hier sind meist nur kleine Warzen vorhanden, und die großen Formen fehlen. Während sich daher die Tracheidenwände z. B. von *Pinus silvestris* und *Widdringtonia dracomontana* elektronen- und sogar auch lichtoptisch eindeutig voneinander unterscheiden, besteht bei einem Vergleich der inneren Tüpfelwände kaum ein wesentlicher Unterschied. Es ergibt sich somit wieder, daß die Tüpfelwände geringere Schwankungen hinsichtlich Größe und Verteilungsdichte der Warzen zeigen, als die tracheidalen Zellwände.

Um weitere Kenntnisse über die Warzenstruktur dieser Holzarten zu erlangen, wurde die Größenverteilung der Zellwandwarzen näher untersucht. Bild 7 zeigt als graphische Darstellung die Ergebnisse von *Widdringtonia dracomontana*, wobei die große Anzahl von kleineren Warzen besonders auffällt. Zwischen 25 und 130 $m\mu$ liegen 53 % aller gemessenen Werte. Etwa ab 200 $m\mu$ bleibt ihre Anzahl trotz zunehmender Größe ziemlich konstant und sinkt erst bei 400 $m\mu$ stärker ab. In das Koordinatensystem wurde zum Vergleich auch eine entsprechende Kurve für *Pinus silvestris*, einer Holzart mit submikroskopischen Warzen, eingetragen. Es ergibt sich hierbei eine sehr deutliche Übereinstimmung des Kurvenverlaufes; die Zahlenwerte für den

Kurvenanstieg und sogar für die Lage des Häufigkeitsmaximums liegen dicht beisammen. Lediglich der rechte Kurvenast fällt bei *Widdringtonia* etwa von 200 $m\mu$ an infolge der „Makro-Warzen“ bedeutend flacher ab. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei einer Gegenüberstellung anderer Arten (Tab. 1).

Hieraus kann gefolgert werden, daß die so unterschiedlichen Warzenformen der verschiedenen Koniferen einer einzigen Elementarstruktur angehören, wobei lediglich Warzengröße und -form sowie die Verteilungsdichte von der Art beeinflusst sein können.

Als zusammenfassendes Ergebnis läßt sich aus den Untersuchungsbefunden von über 120 verschiedenen Nadelholzarten entnehmen, daß die Warzenstruktur der Tertiärwand aufgelagert ist und bei den Koniferen häufig vorkommt. Ihre Ausbildung kann jedoch sehr unterschiedlich sein. Während einige Arten und Gattungen nur recht selten Warzengebilde zeigen, sind sie bei anderen stets regelmäßig vorhanden. Ihre Größe reicht von submikroskopischen Dimensionen bis zu lichtoptischen Ausmaßen. Die Klärung der hiermit zusammenhängenden entwicklungsgeschichtlichen und chemischen Probleme steht noch aus.

Für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Beobachtungen danke ich Herrn W. Steinmetz, Düsseldorf, herzlich.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

LITERATUR

1. FREY-WYSSLING, A., MÜHLETHALER, K., und BOSSHARD, H. H., *Holz als Roh- u. Werkstoff* **13**, 245–249 (1955).
2. — *ibid.* **14**, 161–162 (1956).
3. GREGUSS, P., *Xylotomische Bestimmung der heute lebenden Gymnospermen*. Budapest, 1955.
4. HARADA, H., *J. Japan. Forestry Soc.* **35**, 393–396 (1953).
5. — *J. Japan. Wood Research Soc.* **1**, 85–89 (1955).
6. HARADA, H. und MIYAZAKI, Y., *J. Japan. Forestry Soc.* **34**, 350–352 (1952).
7. HUBER, B. und ROUSCHAL, CH., *Mikrophotographischer Atlas mediterraner Hölzer*. Verlag F. Haller, Berlin, 1954.
8. KOBAYASHI, K. und UTUSUMI, N., 1951, zit. bei H. HARADA (6).
9. LIESE, W.: *Ber. deut. botan. Ges.* **64**, 31–32 (1951).
10. — *Holz als Roh- u. Werkstoff* **14**, 417–424 (1956).
11. LIESE, W. und HARMANN FAHNENBROCK, M., *Biochim. et Biophys. Acta* **11**, 190–198 (1953).
12. LIESE, W. und JOHANN, J., *Planta* **44**, 269–285 (1954).

XIII

PAPER AND TEXTILE RESEARCH

X-Ray Microscopy of Paper

J. ISINGS, ONG SIN POEN, J. B. LE POOLE and G. VAN NEDERVEEN

Central Laboratory, TNO, Delft

THE examination of the structure of paper is on the whole a laborious and time-consuming work.

The normal light microscopical techniques are not suited for the investigation of intact papers as most types of paper do not transmit enough light of the visible range of the spectrum. Moreover most papers have a large thickness so that the depth of focus of the objectives will be a limiting factor. Without preliminary treatment it is only possible to investigate the surface of the paper with the aid of a microscope with vertical illumination.

If it is necessary to get an insight into the structure and the mutual connexion of the fibres in the paper, cross sections are required. In practice they are mostly made with a Hardy microtome, a little hand instrument of simple device. By this method sections having a thickness of 10–15 μ can readily be made and in some cases even thinner sections can be obtained. It is, however, very difficult to adjust the section thickness which in most cases is rather large. Hence these sections can only be used for investigations at a low magnification. Even in that case the section thickness is limiting the investigations to such an extent that little can be seen of the mutual connexion of the fibres in the three dimensional network.

For closer examination it is preferable to make sections with the aid of the freezing microtome. After embedding the paper in ice or frozen gelatin sections 3–5 μ thick can be made which can be studied in the phase contrast microscope (1). In order to reconstruct the three-dimensional network of the fibres in the paper a large number of successive sections must be examined.

We can, however, not prevent disturbance of the paper structure by a fault of the microtome knife or by the many manipulations required to fix the sections on the slides. Even very small deflections of the knife may have such a serious effect that it is not possible to get a clear insight into the inner structure of the paper in this way.

Although with these methods many good results have been obtained, it is clear that they are far from ideal. As in both techniques the cutting of the paper gives rise to disturbance of the structure, it is worth while to think of a method which makes possible to study the paper structure without any alteration of the initial situation.

Sometimes a suspension of fibres is dried on a microscopical slide and the fibre conglomeration is studied. With this method some results may be obtained. It remains, however, doubtful as to how far the pictures are representative for the original

structure of the paper. The connexion of the fibres in the suspension may differ from the structural connexion of the fibres in the paper. The method may be useful for the investigation of the fibrillation.

Some years ago Pelgroms (2) published an article on the microradiography of paper by the contact method. In this way it is possible to get some impressions of the paper but one needs a thin specimen to get a good picture. If the specimen is a thick one sectioning of the paper is still necessary.

In our laboratory we studied suspensions of beaten paper fibres in a permanent water containing mountant (aqua mount or glycerogel). Just as is the case with the previous method, only the fibrillation of each individual fibre can be studied, but it is impossible to get an impression as to how these fibres are linked in the original paper.

None of these methods giving satisfactory results for our purpose, we proceeded to use the X-ray projection microscope, and a large number of different papers was examined.

We got interesting data on the structure of various kinds of paper, viz. the felting of the fibres and fibrils, the place of the fillers in a paper and the structure of the upper layer of coated papers. In the course of the investigation it proved necessary, however, to make stereomicrographs in order to get the most valuable results. When using non stereoscopic micrographs it was very difficult to get a clear insight into the image, but by examining stereomicrographs of the same object the three-dimensional structure was clearly seen as well as the loading material in it.

If paper is studied in the X-ray microscope without any pretreatment, little absorption of the X-ray takes place. Consequently the cellulose fibres give a slight contrast with the environment. Fillers on the contrary, in particular calcium carbonate and titanium oxide, having more X-ray absorption, give a very good contrast. Hence it was possible to study very easily their position, size and shape in this way.

To increase the contrast of the cellulose fibres the paper was pretreated with an alcoholic iodine solution. The heavy iodine atom of this solution was adsorbed on the fibres and absorbed the X-rays to such an extent that the cellulose fibres were clearly visible in the pictures. The alcoholic iodine solution does not swell the cellulose fibres, consequently the structure of the paper is not influenced by this treatment.

It was, however, impossible to get a good impression of the fibrils brought about by the beating of the fibres, unless the fibrils were stuck together forming

a bundle with a diameter of at least half of the size of a fibre, but even then we could not clearly visualize the size and shape.

By shadowing the paper with metals such as gold it was possible to see the fibrils themselves and the membrane-like fibrils which have already been revealed by the phase contrast microscope in previous investigations.

With the aid of the X-ray microscope it is also possible to study coated papers and metal laminations. Coated papers, art papers and machine-coated papers are provided on one or both sides with a layer composed of a pigment, e.g. CaCO_3 or kaolin, and a binder, e.g. starch or casein. The filler of the layer can be distinguished very easily from the cellulose fibres and the place of the pigments in the layer is clearly seen.

In particular titanium oxide and clay gave contrasts better than those obtained with calcium carbonate. There is no possibility of removing fillers by cutting cross sections with the aid of a microtome knife. This is often the case with the techniques used so far. In the microscopical slides frequently much loading substance is present outside the sections.

In case of laminations the punctures in the layer appearing when the metal at that spot is too thin were seen as bright pits in a grey field.

The magnifications used in these investigations are low, mostly ranging from 17 to 20 times. Higher magnifications may be applied with success e.g. when the size, shape and distribution of fillers must be examined. In that case a high resolution of the microscope is necessary. When studying the network of the fibres a low magnification is sufficient.

On account of the results obtained in our investigations we consider the X-ray microscope a useful instrument for the study of the structural details of paper.

In comparison with the methods used up to now in this field the X-ray microscopical technique shows

some advantages which we can summarize as follows.

(i) The three-dimensional paper structure can be examined without any disturbance of the links between fibres and fillers.

(ii) The paper can be studied in its whole thickness without any refocusing of the microscope. It is possible to get an impression of the fibres and fillers situated in front as well as in the backside of the paper in one picture. The reconstruction of the structure of the paper from serial sections in the normal light microscopical techniques is not necessary.

(iii) Stereomicrographs can be obtained in a simple way. Consequently it is easy to study the whole depth of the paper. This results from the great depth of focus of this technique as compared with the focus of the normal microscope.

On account of these advantages it will be useful to improve this method.

In the first place the resolution of the microscope must be at least as high as the resolution of the normal light microscope.

In the second place it will be necessary to raise contrast in such a way that even the finer fibrillations are clearly visible in the image. It is recommendable to use for this purpose a chlorine zinc iodine solution instead of the alcoholic iodine solution used so far. It is possible that also some use of contrast may be obtained by using different targets and adopting the target to the chemical nature of substance under investigation. This will be valuable when examining the loading substances.

In the third place it is necessary that the exposure time is fairly low.

REFERENCES

1. VAN NEDERVEEN, G. and ISINGS, J., *Tappi* **37**, 103 (1954).
2. PELGROMS, J. D., *Paper Trade J.* **134**, No. 1, 25 (1952).

Partial Embedding Technique for Replication of Fibres

J. DLUGOSZ

British Rayon Research Association, Manchester

WHEN the surfaces of textile fibres are studied with the transmission electron microscope there is frequently a need for a routine method for their replication since the number of different fibres submitted for examination may be considerable.

As the thickness of a textile fibre is usually greater than 10μ it is difficult to make a replica which will retain, after the necessary manipulation, the geometrical shape of the fibre even supposing that the replica film can be freed from the fibre. For these

reasons it is convenient to restrict the surface of the fibre to be replicated to such an extent that the resulting replica will be fairly flat.

This can be achieved by the partial embedding of the fibre in some medium to a controllable depth. Less than half of the fibre should emerge from the medium.

A method designed to fulfil these two requirements i.e. the ability to control the depth of embedding and to embed in one preparation a large number of

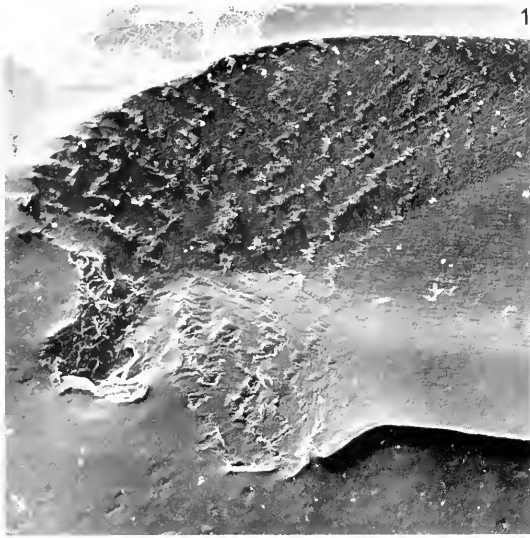


Fig. 1. Cellulose acetate fibre at the place where it was cut with scissors. Magnification 3000.

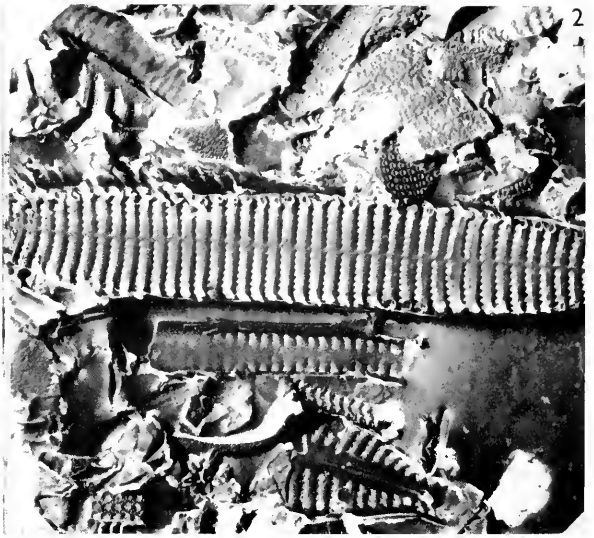


Fig. 2. Diatomaceous powder sprinkled on to swollen gelatin. Magnification 3000.

fibres with random orientation will be described. The method has been designed so that no skilful or patient manipulation of individual fibres is required.

Short pieces of the fibre are dropped on to the swollen gelatin of a fixed and washed photographic plate. This may be done most conveniently by cutting lengths from the fibre or yarn while this is held above the photographic plate and allowing the pieces to fall on the gelatin. Surface tension will cause the swollen gelatin to creep up the sides of the fibres. After the gelatin has dried the fibres will be partially embedded in it.

Marco Resin¹ to which a catalyst and an accelerator have been added, according to the makers' formula for cold curing, is spread on a microscope slide, which is then laid on the gelatin surface containing the fibres, so as to form a sandwich: glass-gelatin-fibres-Marco Resin-glass. This is then left until the resin sets. At room temperature the setting time varies from 40 minutes to 3 hours depending on the accelerator content. Roughening one side of the microscope slide by grinding promotes the adhesion of the resin to the glass. A photographic plate slightly larger than the microscope slide is used and the slide is placed so that part of it overlaps the edge of the photographic plate.

By pressing the photographic plate with thumbs and the projecting end of the slide with forefingers the assembly is mechanically separated along the interface gelatin-Marco Resin. A similar method of separating Marco Resin from gelatin has been used by Dew (1) in the production of optical replicas of diffraction gratings. It is now found that all

fibres have been transferred to the resin. The flat surface of the Marco Resin—the cast of the photographic gelatin—from which in numerous places fibres emerge is now replicated using a modification of the technique described earlier (2).

A layer of silver about 0.1μ thick is deposited by vacuum evaporation on the resin matrix and is subsequently freed by immersion of the whole for a few minutes in chloroform. This intermediate replica is then coated with the final replicating material again by vacuum evaporation.

The final replica may be of silicon monoxide or carbon but a better contrast in the image is obtained if the replica is made of gold-palladium alloy or one of the other metals used for shadow-casting which will not be attacked by nitric acid.

To prevent the replica film from being damaged during the succeeding operations it is backed, while still on silver, with a thin film of nitrocellulose. The silver is then dissolved in nitric acid and the backed replica film, after washing in distilled water, is eventually collected on specimen grids in the usual way. Finally the backing film is removed by immersion of the specimen grid in acetone for a minute or so.

REFERENCES

1. DEW, G. D., The Nat. Phys. Lab., private communication.
2. RAMANATHAN, N., SIKORSKI, J., and WOODS, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 323 (1955).

¹ Marco Resin SB.28C obtainable from Scott Bader & Co. Ltd.

A Method for the Carbon Replication of Extensive Areas of Very Irregular Surfaces, with Particular Application to the Study of Pulp Fibres, Wood, and Paper

D. H. PAGE

British Paper and Board Industry Research Association, St. Winifred's Laboratories, Kenley, Surrey

THE purpose of the research of which this work forms a part is the study of the effect on pulp fibres of the process known to the paper industry as beating. Fig. 1 shows diagrammatically a typical cross-section of a beaten fibre that has been dried down onto a glass slide. During the beating process, which is one of controlled mechanical disintegration, the outermost layers of the cell wall are teased out to give the so-called fibrillation seen spilling away from the fibre onto the substrate. Our research involves an investigation of the structure of this fibrillation and the surface of the fibre from which it originated. It follows that replicas are required that are intact over large areas. Hitherto this requirement has been difficult to satisfy because of the great irregularity of the fibre surface. The scale in fig. 1 gives some indication of the height of the upper surface of the fibre above the substrate. It commonly lies between 5 and 10 microns. The thickness of a conventional replica is much smaller than this, plastic replicas being about 800 Å and carbon replicas 100 Å thick. For this reason a replica of such a surface is extremely fragile and usually disrupts at some point in its production. This problem is common to all workers in the field of fibre replication and has been solved by some (2, 6, 7) who partially embed their fibres in a plastic. The protruding surface is then comparatively smooth and replicas are easily made. This technique is not permissible in our case however for much of the fine fibrillation, which may range in thickness from a few hundred to a few thousand Ångströms, would certainly be completely embedded and not subsequently replicated. It was decided therefore that a replica method was needed which, while accepting the fragility of a replica made without the aid of a partial embedding technique, would still give consistently replicas intact over large areas of the fibre and its associated fibrillation. This necessitated the development of a special technique for handling these very fragile replicas to ensure a satisfactory result. Other requirements of the

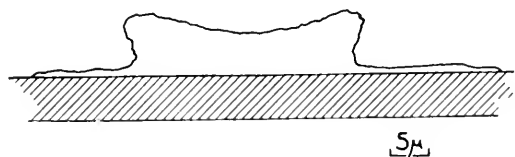


Fig. 1. Diagram of cross-section of beaten pulp fibre dried down onto glass slide.

method for our purposes were: (a) It should be capable of resolving cellulosic microfibrils (100–200 Å thick). (b) It should be a multistage method in which the first cast could be kept intact. This cast could then be used for light microscopy and for the production of metal solid replicas for reflection electron microscopy, a point that is considered in more detail elsewhere (3).

The stages of the method can be followed from the diagram in fig. 2. A few drops of a very dilute aqueous suspension of the fibres to be replicated are placed on a clean glass microscope slide and allowed to dry at about 60 C. During the drying process the fibres are pulled into close contact with the glass by surface tension forces (a). An initial cast of the fibres is made in polymethyl methacrylate. Two methods have been found effective. One uses methacrylate softened by chloroform, the other methacrylate softened by its monomer. The latter method, which has been suggested by Heidenreich (4) for the replication of metal surfaces, is the more practicable and will be described here.

A piece of commercial Perspex 1.5 mm thick and cut to the size of a microscope slide is allowed to stand in destabilised methacrylate monomer for one to two hours. The methacrylate sheet remains on the whole unaffected except for a thin surface layer that is softened by this treatment to a gelatinous consistency. The sheet is removed from the liquid and the surplus monomer is allowed to drain from it. It is then put down onto the microscope slide and fibres and held to them under light pressure, just sufficient to ease out any entrapped air bubbles (b). The residual catalyst in the commercial methacrylate polymerises the monomer rapidly at 70 C. On splitting away the microscope slide the fibres

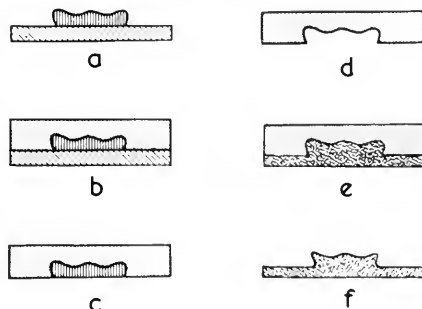


Fig. 2. Diagram showing stages of the method.



Fig. 3. Carbon replica, metal-shadowed, of a beaten spruce tracheid and its associated fibrillation. Magnification 1500, inset 13,000.

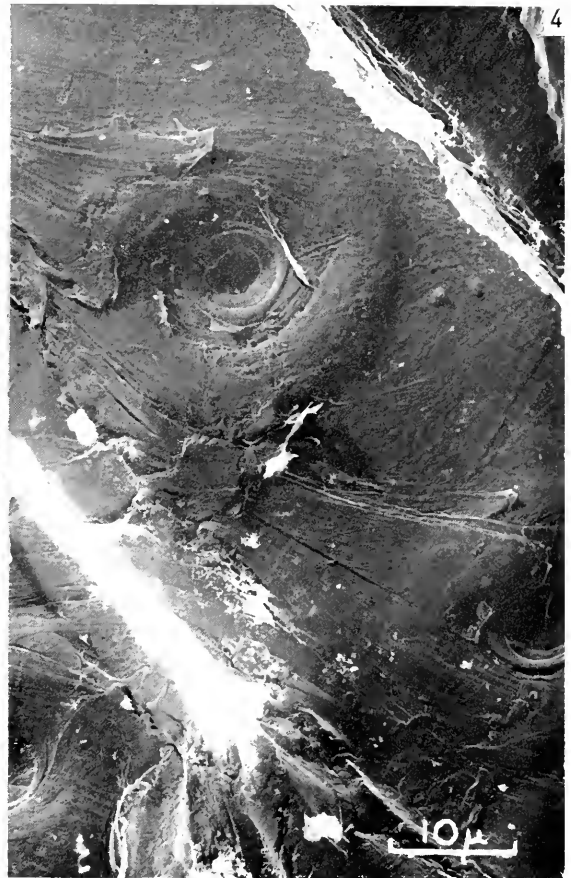


Fig. 4. Carbon replica, metal-shadowed, of a surface of wood tissue. The wood—Scots pine—was cut in a radial plane with a chisel prior to replication. Magnification 1700.

remain embedded in the methacrylate (*c*). The stripping of the fibres is sometimes difficult, cellulose tape being by no means always effective. A more successful method employs a 10% solution of polyvinyl alcohol (PVA) in water. This solution is poured onto the methacrylate cast and gradually sets to a hard film which when stripped, brings with it the embedded fibre (*d*). In particularly stubborn cases this process can be repeated.

From the negative cast so formed a robust positive replica is made in PVA. A 10% solution of PVA in water, sufficient to form a film about 0.5 mm thick, is poured onto the cast and allowed to set (*e*). This replica, which is a reproduction of the original fibre lying on its glass substrate, can be separated easily from the methacrylate (*f*). It is preshadowed with gold, palladium, and carbon is deposited on it in the usual manner.

At this point a handling technique is adopted (5) that ensures that the fragile carbon replica is mounted intact on its grid. Briefly this technique consists of embedding the carbon replica together with the support grid in thick plastic films which are washed away after the composite arrangement has been

inserted in the specimen cap and holder. Thus the delicate replica surface is at no time exposed during the manipulation of the grid and accidental damage to the replica is avoided. The only chance of damage is during the final flow-wash (a very gentle one) with chloroform. Very thin replicas of rough surfaces can be made and mounted on coarse mesh grids with confidence. For the replication of fibres, carbon films 70 Å thick (estimated by a method based on optical density measurement due to Agar (1)) have been used. "New 100" grids made by Smethurst Highlight Ltd., which have apertures about 200 microns square and whose grid bars obscure only about 13% of the total grid area, are suitable. Under such conditions replicas have invariably been intact over the whole area of the grid.

Some of the results obtained are shown in the micrographs of figs. 3 and 4. Fig. 3 shows at a low magnification part of a spruce sulphite tracheid that has been mechanically beaten. The ribbonlike piece of fibrillation coming away from it is of interest and the indicated region is shown inset at a higher magnification. The compactness and uniformity of direction of the microfibrils strongly suggest that

this fibrillation originated from the middle secondary wall of the tracheid. It is evident too from this micrograph that repeated replication from the methacrylate cast is possible without perceptible loss of resolution, for the carbon replica shown was deposited on the fifth PVA replica to be taken from it.

When the method is applied to rough surfaces in general, the procedure is exactly the same as that described for fibres. Fig. 4 shows the application of the method to the study of wood tissue. The wood—Scots pine—was cut in a radial plane with a very sharp chisel prior to replication. Parts of three cells are seen, the boundaries between which are apparent. The micrograph shows the way in which the layers of the cell wall around the bordered pits have been torn away by this rather crude cutting process exposing the underlying layers. Wholly intact replicas of surfaces of paper and of metal fractures have been obtained by this method but space does not permit the publication of the results here.

Carbon replicas prepared in this way can be examined with advantage by stereomicroscopy. There is always a tendency for the carbon replica of a rough surface to be pulled flat by surface tension forces during the final flow-wash with chloroform.

However, replicas 70–100 Å thick appear to retain approximately their overall form provided that height variations in them are no greater than 5 microns. (For height variations greater than this the replica collapses to some extent but without disrupting.) Stereomicrographs then are capable of yielding information on both the overall form and detailed structure of the surfaces.

To conclude, this method has been of value in the investigation of the structures of pulp fibres, wood and paper. It could be used with advantage for the reliable replication of large selected areas of rough surfaces in general.

REFERENCES

1. AGAR, A. W. (1957, in press).
2. DLUGOSZ, J., These Proceedings, page 283.
3. EMERTON, H. W., PAGE, D. H., and WATTS, J., These Proceedings, page 287.
4. HEDENRICH, R. D., *Rev. Sci. Instrum.* **23**, 583–594 (1952).
5. PAGE, D. H., *Research (Lond.)* **9** S, 10–11 (1956).
6. RAMANATHAN, N., SIKORSKI, J., and WOODS, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 323–340 (1955).
7. TAKAHASHI, N. and ASAEDA, T., *Bull. inst. textile France* **35**, 75–82 (1952).

Further Reflection Electron Microscopy of Pulp Fibres and Paper

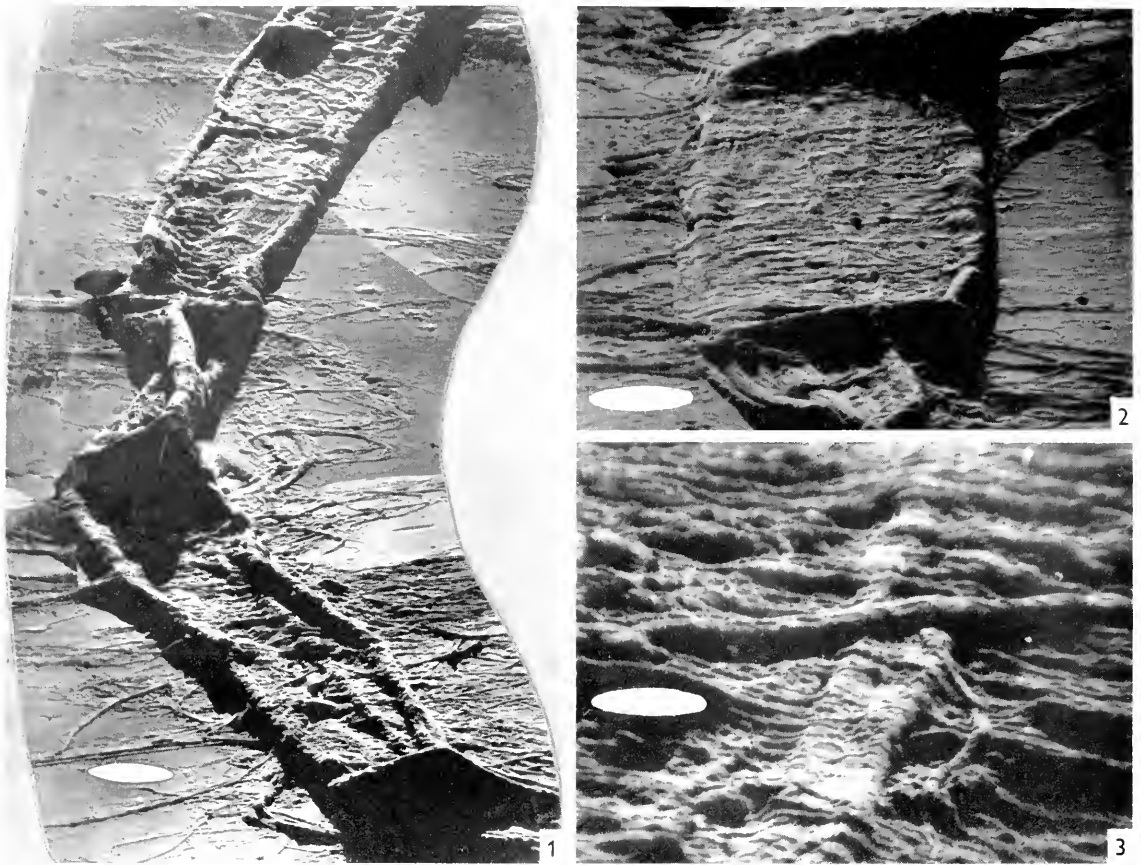
H. W. EMERTON, D. H. PAGE, and J. WATTS

British Paper and Board Industry Research Association, St. Winifred's Laboratories, Kenley, Surrey

FOLLOWING the revival of interest in the reflection electron microscope in the early years of this decade, Chapman and Menter (3) used it in the study of fibre surfaces. Shortly afterwards Emerton (4) at this laboratory proposed its use as a contribution to the study of the effect on pulp fibres of the paper-making process known as beating. The early work in this field has been reported by Amboss, Emerton & Watts (1). It will be recalled from this latter paper that the reflection electron microscope as used for the study of pulp fibres suffers from two main disadvantages. Firstly the specimen is viewed at glancing incidence giving rise to a severely foreshortened image. Secondly under the impact of the electron beam the fibre tends to decompose into gases which cause distension of the cell walls. This "bubble artefact" tended to mask the true structure of the fibre surface and was an undesirable feature of most of the early reflection electron microscopy of pulp fibres, in spite of all efforts to keep the beam intensity low during examination. It was in an attempt to overcome this difficulty for biological specimens in general that Bradley (2) devised a method of producing solid metal replicas of specimens. Such replicas will withstand high beam intensities without

damage. The present paper describes our experience of the application of this technique to the study of pulp fibres and paper.

Apart from the initial preparation of the fibres our technique follows basically that described by Bradley. The fibres are dried down from an aqueous suspension onto a glass slide and replicated in thick plastic from which the robust metal replica is made. Figs. 1 and 2 illustrate the application of the technique to spruce tracheids that have undergone a fairly heavy beating treatment. Both these micrographs, but more particularly fig. 1, which is a micrographic montage, have been reduced far below their useful magnification to be accommodated on the page. The striking three-dimensional appearance given by the reflection method is vividly brought out. It is this three-dimensional aspect, arising from the great depth of field, the oblique viewpoint and the shadows produced, that permits the form of the fibre surface to be inferred. Both tracheids have been subjected to strong surface tension forces while they were dried to equilibrium with room humidity and this has led to the collapse of the lumen and an almost complete flattening of the cell. This effect, which is common in fibres of this type (i.e. spruce sulphite tracheids),



All the micrographs are of solid replicas. The scale ellipses are 25 microns in diameter. The angles of illumination and viewing are 5° and 12° respectively.

Fig. 1. Reflection electron micrographic montage (considerably reduced) of a beaten spruce sulphite tracheid.

Fig. 2. Reflection electron micrograph of a thin-walled spruce sulphite tracheid, heavily beaten.

Fig. 3. Reflection electron micrograph of the surface of a tissue paper made from hemp and flax fibres.

is not directly apparent from examination in the light microscope which gives only a plan view. The form of the twist in the middle of the tracheid in fig. 1 would also be difficult to appreciate from examination in the light microscope.

In both micrographs there is evidence of prominent, more or less transverse, fibrils on the surface of the tracheids. Care is needed in interpreting these. In the first place the image is foreshortened. (An impression of this foreshortening is given by the scale ellipse (5) which must be thought of as a circle lying in the plane of the substrate.) A linear feature inclined to the plane containing the line of sight and the normal to the substrate is imaged at an angle exceeding the true value (8) and hence a fibril lying in this plane appears more nearly transverse. Furthermore, the width of the fibrils cannot be readily assessed for the contrast scheme does not permit measurements in this direction to be made with accuracy because of the foreshortening and loss of information in shadow. The apparently transverse fibrils in these micrographs are, however, thought to be part of the outer secondary wall that has been modified

by the sulphite digestion to which these cells have been subjected but further work is required to establish this.

The only common artefact arising from the use of solid replicas for the examination of pulp fibres is the incomplete replication, in some cases, of fibrils that come away taut from the upper surface of the fibre. Such fibrils, examples of which may be seen in fig. 1, are evidently completely embedded in the plastic matrix that constitutes the first stage of the replica process, break during the stripping of the fibre and are consequently not entirely replicated.

We have also investigated the possibility of applying reflection electron microscopy to the study of paper surfaces. Fig. 3 shows a replica of the surface of a tissue paper made for use as a dielectric in condensers. Notwithstanding the very heavy and prolonged beating to which the fibres are subjected to produce this type of paper—a treatment which is said to reduce the pulp to a gel—it is clear that some of the fibres have retained their general integrity.

This micrograph in particular brings out one of the

main disadvantages of reflection microscopy as used by us at present. Much of the image is lost either in shadow or in ground hidden from view, a situation that is aggravated when rougher surfaces are studied. This difficulty and the disadvantage of a severely foreshortened image could be overcome by the use of higher angles of illumination and viewing. Two factors however have limited our use of the reflection method to low angles. In the first place, the greater the angle of deviation of the beam the poorer the resolution. This appears to be due to the greater spread of velocities of electrons scattered at high angles. It has been shown (7) that this velocity spread is due to the effect of contamination and that provided that the contamination is suppressed by subjecting the specimen to ionic bombardment while the electron beam impinges on it, quite a high resolution can be obtained when metal specimens are examined using angles of deviation as high as 25° . Secondly we were restricted in our early work to relatively low angles of deviation by the rapid fall off of intensity of the scattered beam at high angles. The increased intensity of the incident beam required to meet this aggravated the problem of beam damage. The angle of deviation of 17° that we finally adopted (and which appreciably exceeds that generally used) was a compromise between the conflicting requirements of high resolution and minimum beam damage on the one hand and small shadow areas and a low foreshortening on the other. However, with the advent of inert solid replicas that are capable of withstanding high beam intensities, it appeared worthwhile investigating whether a useful image could be obtained at high angles even though we have no facilities at the moment for ion bombardment. With an angle of deviation of 28° the image obtained was rather poor. This may be due in part to the excessive chromatic aberration when the objective lens is operated at long focal length, a necessary condition for high angle reflection work with the Met-Vick EM3 microscope without modifying it considerably. Further work is needed to determine whether a resolution acceptable for our purpose can be obtained by modifying the microscope so that the focal length can be reduced or whether the resolution is severely limited by the effect of contamination. It remains to be seen whether the scanning electron microscope (9, 11) will give a satisfactory solution.

It is now possible to assess the advantages and disadvantages of the reflection method more clearly. We believe the method is of some value in this field if used as a method complementary to other techniques of microscopy. It has been shown that the

plastic matrix from which the metal solid replicas are made can be used indestructibly both for light microscopy (6), and for the production of carbon replicas for transmission electron microscopy (10). It is therefore possible to obtain micrographs of the *same region* of an individual fibre as follows:—

- (a) a light micrograph showing a large area of fibre but with limited resolution;
- (b) a reflection electron micrograph with its oblique viewpoint and remarkable three dimensional appearance; and
- (c) transmission electron micrographs of selected areas at a magnification sufficient to resolve cellulosic microfibrils ($100\text{--}200 \text{ \AA}$ thick).

When three such images are considered the complementary information from each should enable the finest structural detail to be related to the fibre as a whole in a way not previously possible.

The chief drawbacks of the reflection method as described here then are the severe foreshortening and the loss of information in shadow and "dead ground". The reflection method does not permit angular or linear measurements to be made accurately with the exception of heights which can sometimes be determined with a fair degree of precision. On the other hand when used in conjunction with complementary methods of microscopy the three-dimensional aspect of its image, its sensitivity to height, and its great depth of field which permits montages of considerable lengths of a fibre to be made economically are all of value in revealing the external form of the specimen.

REFERENCES

1. AMBOSS, K., EMERTON, H. W., and WATTS, J., Proceedings of the International Conference on Electron Microscopy, London 1954, Publ. by Roy. Microscop. Soc., London, 560-564 (1956).
2. BRADLEY, D. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **6**, 191-195 (1955).
3. CHAPMAN, J. A. and MENTER, J. W., *Proc. Roy. Soc. A* **226**, 400-407 (1954).
4. EMERTON, H. W., *J. Roy. Microscop. Soc.*, Ser. 3, **74**, 35-41 (1954).
5. — *Research (Lond.)*, **7**, S56 (1954).
6. EMERTON, H. W., PAGE, D. H., and WATTS, J., *Brit. Paper and Board Makers' Assoc. Proc. Tech. Sect.* **37**, 105-125 (1956).
7. FIRT, C., MARTY, B., and SAVORIE, R., *Compt. rend. acad. sci. (Paris)* **240**, 1975-1978 (1955).
8. MENTER, J. W., *J. Inst. Metals* **81**, 163-167 (1952).
9. McMULLEN, D., *Proc. Inst. Elec. Engrs II* **100**, 245-259 (1953).
10. PAGE, D. H., These Proceedings, page 285.
11. SMITH, K. C. A. and OATLEY, C. W., *Brit. J. Appl. Phys.* **6**, 391-399 (1955).

Application of Ultra-Microtomy to the Fine Structure Study of Rayon Viscose Fibre¹

P. KASSENBECK

Institut Textile de France, Paris

SEVERAL papers have already been delivered on the subject of electron microscopy studies of the fine structure of regenerated cellulose fibres (15, 17, 18).

All these papers were on the interpretation of E.M. obtained by replica methods. May we recall briefly that we have been able to show with this method, modifications of the surface of fibres according to the treatment they were subjected to and also the presence on the surface of rayon viscose fibres of an extremely thin layer. The structure characteristics of this layer differ greatly from the remaining mass of the fibre.

The application of ultra-microtomy to the study of the sub-microscopic architecture of these fibres confirms the results obtained by previous studies. Furthermore it shows details of internal structure which could not be seen by replica methods.

The problem of embedding textile fibres for ultra-microtomy applications can be summarized as follows:

1. It is necessary to obtain penetration and fixation of the embedding medium into the fibre without any change of micro-structure.

2. The cutting angle must be perfectly known if schematic reconstitution of the fibre structure is required. For this reason fibres must be oriented in the embedding medium.

Experience shows that simple immersion of dehydrated rayon viscose fibres in methacrylate monomer is not sufficient to obtain a proper embedding.

We overcame this difficulty by the use of an embedding method which we call "double cut technic".

Our starting material is about 0.5 cm³ of fibre sections which are cut on an ordinary microtome. The thickness of

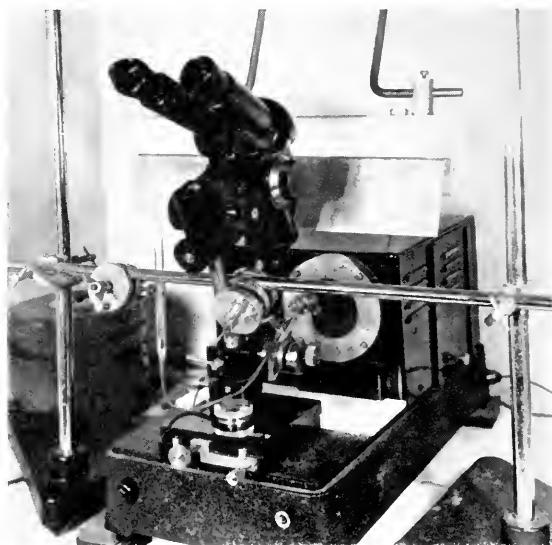


Fig. 2. Thermal advance microtome.

the cross-sections varies from 30 to 60 μ for fibres 20 μ in diameter. These cross-sections are swollen in water and swelling is fixed by the zinc chloriodine reagent. They are dehydrated in alcohol and immersed two days in a first mixture of destabilized methyl methacrylate and butyl methacrylate 50/50. Polymerization is carried out in a second mixture of the same composition in a special cell which allows the orientation of the cross-sections (3, 10, 11 12).

A perspex tube, 10 mm long, containing the monomer and the cross-sections is mounted between the two electrodes of the cell (fig. 1). A 50 cycles alternative current of 3 to 4 KV is applied between the electrodes. The whole cell is rocked one cycle per second with an 180° angle. There cannot be any decantation of the cross-sections towards the bottom of the perspex tube. Rocking insures good dispersion of these cross-sections into the embedding medium. Under the effect of the electric field, the fibre sections are oriented while the polymerization takes place at 40 C for 6 hours.

Cross sectioning on a thermal advance microtome.— After polymerization is completed, we have at our disposal a cylindrical perspex block in which all cross-sections are oriented parallel to the cylinder axis. This block is cut with a thermal advance microtome (fig. 2) (2, 5).

The cross-sections are cut again in a much thinner section (100 to 300 Å thick). A small brass container (7, 8) is fixed with the help of paraffin to a glass knife (13). The brass container is connected to a glass tube by rubber tubing. By these means the level of the liquid (water-acetone mixture) is adjusted correctly. The ribbon of sections is picked up on formvar film coated grids.

Fig. 3 shows a result obtained when the embedding medium has not been removed. Contrast in this micro-

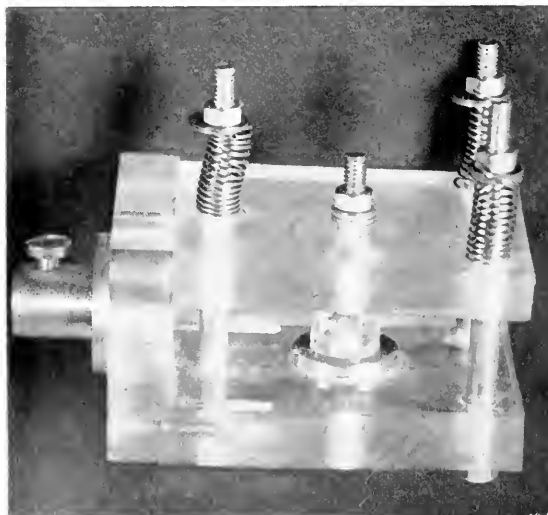


Fig. 1. Perspex cell for the embedding of sections of fibres under tension (scale 1:1).

¹ A more detailed report has appeared in *Bulletin Institut Textile de France* 61, 7-15 (1956).

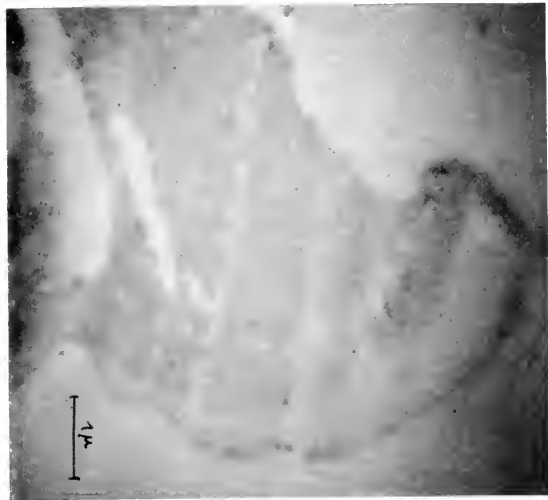


Fig. 3. Ultra-thin section of rayon viscose fibre without dissolution of the embedding medium. Part of a cross-section. Magnification 11,000.

graphs is poor but the micro-structure of the fibre is preserved unchanged. It is only the elements of structure which differs sensibly in density from the embedding medium which are visible.

The perspex which constitutes the embedding of the cross-sections is dissolved by chloroform in a distilling apparatus (1). The cross-sections are then shadowed with chromium by vacuum evaporation.

This method gives micrographs with better contrast, but the flow of the solvent, during dissolution, may dislocate the fine structure and modify certain morphological details which may disappear even completely.

It is good practice to use simultaneously both methods and to judge the results by comparison of these different micrographs.

Before any interpretation of the micrographs, we must have an idea of the scale at which the ultra-thin sections are examined under the electron microscope and also of the geometry of the sections.

Fig. 3 is the ultra-thin transversal section of a fragment of rayon viscose fibre. The separation between the "skin" and "core" is characterized by a crown of microvacuoles. Their mean diameter is between 2000 and 3000 Å. The skin of the fibre is made of several concentric successive layers of different densities. The first layer or cuticle which is located on the fibre surface possesses the highest density. Its thickness varies from 500 to 1000 Å. Then comes an apparently empty layer, its density does not seem different from the density of the embedding medium. For lack of contrast details of structure cannot therefore be distinguished in this layer. A third layer of higher density appears before the crown of vacuoles is reached. The total thickness of the skin is about 2 μ .

The core of the fibre shows a spongy structure. Its density is homogeneously distributed. Large vacuoles can be located in the core. It is these large vacuoles which give the well-known milky appearance of some types of rayon viscose fibres; they are several microns in diameter and can be seen under an optical microscope.

The longitudinal sections show a succession of 7 layers of different densities in the skin of this particular rayon viscose fibre.

In oblique sections of rayon viscose fibres concentric layers can be clearly distinguished. Elod (4) and Horio, Kobayashi and Kondo (9) have already mentioned the presence of such layers.

After dissolution of the embedding medium and shadowing, the spongy net-work composed of a very great number of microvacuoles becomes visible in the regions of the skin which appear empty before dissolution of the embedding medium.

The difference of density between skin and core is clearly visible in both phase contrast microscopy and in electron microscopy. It is therefore possible to get information on density gradient by simple examination in phase contrast microscopy without the use of electron microscopy. For this examination thick sections made by hand with a razor blade may be thin enough.

REFERENCES

1. BARNES, R. B., BORTON, C. J., and SCOTT, R. G., *J. Appl. Phys.* **16**, 730-739 (1945).
2. BERNHARD, W., *Compt. rend. du colloque du C.N.R.S. Toulouse*, 1955.
3. COTTON and MOUTON, *J. Chim. Phys.* **4**, 365 (1906).
4. ELOD, E. and RAUCH, H., *Melliand Textilber.* **1**, 1-11 (1953).
5. GAUTHIER, A., *Bull. microscop. appl.* (2) **5**, 1-2 (1955).
6. HERMANS, P. H., *Textile Research J.* **XX**, **8**, 553-569 (1950).
7. HILLIER, J. and GITTNER, M. E., *J. Appl. Phys.* **21**, 889-895 (1950).
8. — *Science* **112**, 520-523 (1950).
9. HORIO, M., KOBAYASHI, K., and KONDO, T., *Textile Research J.* **XVII**, **5**, 264-280 (1947).
10. ISARD, J. O., *Brit. J. Appl. Phys.* **6**, **5**, 176 (1955).
11. IWANOW, N. and SCHNEIDER, R., *Bull. I.T.F.* **56**, 45 (1955).
12. LAROSE, P., *J. Textile Inst.* **42**, 104 (1951).
13. LATTA, H. and HARTMANN, J. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **74**, 436-439 (1950).
14. MORFHEAD, F. F. and SISSON, W. A., *Textile Research J.* **15**, 443 (1945).
15. KASSINBECK, P., *Bull. I.T.F.* **43**, 43-52 (1953).
16. — *Teintex*, 531-540 (1955).
17. — *Ann. Scient. Text. Belges* **1**, 176-194 (1956).
18. — *Bull. I.T.F.* **59**, 7 (1956).

Structural Details of Natural Fibers as Observed with the Electron Microscope

C. MAERTENS, G. RAES, and G. VANDERMEERSSCHE

*Laboratoire de Technologie des Matières Textiles de l'Université de Gand
and Centre de Microscopie Electronique, Médical, Industriel et Agricole, Bruxelles-Uccle*

Most studies with the electron microscope on the fine structure of natural fibers have been limited to the suspension and to the replica techniques. This is mainly due to the fact that cellulose fibers are very hard to cut with the usual glass knives and that no quite appropriate staining techniques for cellulose have been found. At the Conference of Barcelona in 1954 (4) and at the Conference of Brussels in 1955 (2) we have mentioned already our first attempts of making ultra-thin sections of cotton fibers.

Several staining methods had been tried and three of those had given good results: osmic acid, ferri-alum and iodine zinc chloride.

A still better specific electron staining has been found by Saara Asunmaa (1) who has made ultra-thin sections of cellulose fibers after treatment with thallos ethylate. The contrast obtained by this method is excellent but unfortunately the method of staining is quite long and elaborate. We have been able to obtain equally well stained sections of cellulose fibers by a very simple treatment with silver nitrate.

The fibers under investigation were dipped into a 20% silver nitrate solution for a couple of hours and then washed, dehydrated and embedded in the usual way as described in our previous work (2). A mixture of 6/4 butyl-methyl-methacrylate has been found most suitable. The microtome used was the Porter-Blum model and the sections obtained were on the average about 250 Å thick. The electron microscope used was the Philips type EM 75.

Cotton fibers of different types and different origin

have been tried. Also flax fibers of different types and at different stages of its treatment in the hackling machine have been investigated.

The reason for trying these many types of cellulose fibers is to check in how far a particular structural aspect can be considered as a possible artefact or as a structure due to the drying out of the fresh fibers.

When our first cotton sections were shown (2) the question arose as to what extent certain structural details could have been considered as artefacts. Several of the cotton sections showed indeed a kind of "detachment" of some of the layers of which the secondary wall is built up. This "detachment" which had never been observed before, was called a "kind of secondary lumen" or "artificial lumen".

This particular aspect of certain cotton fibers is of the greatest importance because it might help in explaining certain discrepancies which exist in measurements done in different laboratories with the arealometer (of Dr. Hertel).

Fig. 1 shows such "detachments" in cotton fibers which have been fixed and embedded in the same way as described earlier (2). We have therefore made comparisons of a whole series of fixation and staining methods in order to improve our previous method.

From these tests we may conclude that almost all the fixatives used gave almost identical results in so far as the shape of the fibers is concerned. As regards the contrast, we have found that the treatment with a silver nitrate solution gave by far the best result.

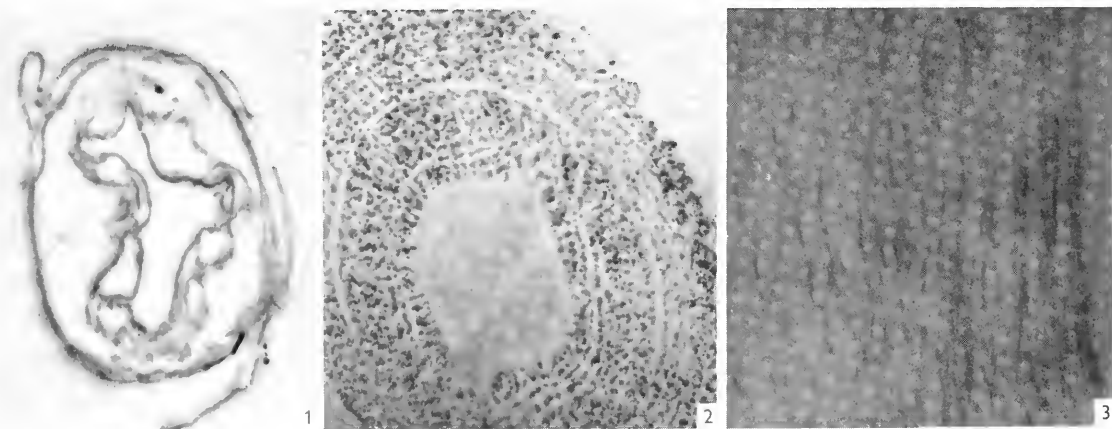


Fig. 1. Transverse section of cotton fibers, fixed in OsO_4 . Magnification 4000.

Fig. 2. Transverse section of flax-fiber. AgNO_3 fixation. Magnification 4000.

Fig. 3. Longitudinal section of flax fiber. AgNO_3 fixation. Magnification 12,000.

In some sections obtained from fibers which were fixed with iodine zinc chloride a swelling effect was observed and there the detachment could have been explained as being due to a compression by the glass-knife during sectioning.

A whole series of different cotton fibers and flax fibers has been examined and from our observations it seems that the above-mentioned detachment is not due to the preparation or sectioning techniques but corresponds to the actual state of the fibers before examination.

This kind of detachment described for cotton fibers can be found in some rare cases also in flax fibers.

Our new fixation methods have allowed us to make higher magnification micrographs. The hazy dots representing isolated cellulose fibrils have made

place for rather sharp and well-defined dots, as can be seen in fig. 2.

Fig. 3 is an example of higher magnification of a longitudinal section. It confirms our idea regarding the existence of a detachment of a certain number of layers in the secondary wall. This detachment is probably a result of the drying out of the natural fibers, long before the actual examination in the laboratory.

REFERENCES

1. ASUNMAA, SAARA, *Svensk Papperstidn.* **10**, 1 (1954).
2. CASHAUX, P., RAIS, G., and VANDERMEERSCHÉ, G., *Ann. Textiles* **2**, 29 (1956).
3. DE MEULMEESTER, D., RAIS, G., and FRANZEN, T., *Ann. Textiles* **3**, 260 (1955).
4. VANDERMEERSCHÉ, G. and RAIS, G., *Conf. Int. Tecn. Textil.* Barcelona, 1954.

Contact Region between Two Fibres

SAARA ASUNMAA

*Paper Technology Department, Swedish Forest Products Research Laboratory,
Stockholm*

SINCE new sectioning methods have been developed (9, 10) the fine structure of cellulose fibres has been investigated in ultrathin sections. Chemical reactions and a metal impregnation have been used as contrast treatments. Thallation of the fibre sample gives a sufficient contrast (3, 4, 5). The reaction of thallos ethylate with the fibre material furthermore only applies to the accessible hydroxyl groups of the cellulose fibres. In sections of fibres of holocellulose of Swedish spruce (*Picea excelsa*), for example, a parallel fibrillation was observed in the main secondary wall, but no parallel striation in the same direction in its outermost part. The fibrils observed have small dimensions, a width of down to 50 Å. They presumably correspond to the "fibril strings" observed in hydrolyzed materials (7, 8, 11). Another arrangement of similar "fibril strings" was observed in different kinds of cell walls (4, 5). These "fibril strings" are different from micro fibrils, which earlier were observed in swollen fibres and in many other botanical materials and which are several hundred Å wide.

Electron micrographs of thallated fibres depict the reacted thallos cellulose and the excess reagent as an impregnation medium, if present. The reactivity of the fibre material under the conditions of thallation therefore only describes one special kind of fibre reactions.

Of particular interest from the technical point of view is the fine structure of water swollen fibres. Therefore a method for impregnation of fibres in water-swollen state was developed (5, 6).

The water solution of a metal compound was made to penetrate the cell wall, it was reduced *in situ* and the metal was enclosed in the fibre structure by means of an effective drying. The metal content observed in the micrographs demonstrates an "original contrast", i.e. the contrast material is introduced without chemical reactions and before the preparation and embedding of the material for sectioning. This kind of contrast treatment is suitable for compact materials like cellulose fibres and wood cells. As a consequence of very high metal content in several parts of the fibre wall, the fine structure can be studied only in micrographs of the cellulose rich areas with a low metal content. Such a situation is observed in fibre walls of holocellulose of spruce after some processing procedures, for example, after a hot alkali treatment.

Electron micrographs of hot alkalized metal-impregnated fibre walls show morphological changes that appeared in the holocellulose during the treatment. Periods of broken, metal-filled canals are observed both in longitudinal and in cross sections. The number and shape of the metal-filled cavities in the fibre section before and after the chemical treatment show the distribution of the attacked parts and probably the distribution of some reactive parts in the original holocellulose fibre. The original holocellulose fibre does not usually show similar canals, or not to such an extent as the material after processing. In electron micrographs at good resolution a fibrillation is to be seen in the areas between the metal-rich canals (5). The fibrils observed presumably

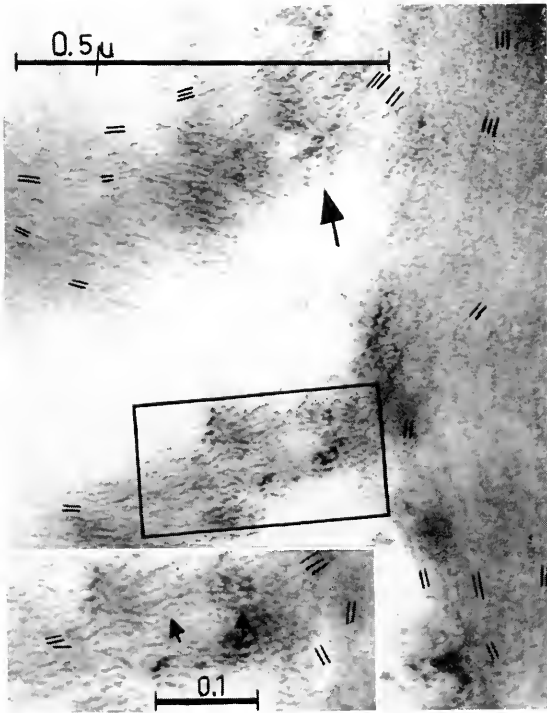


Fig. 1. Ultrathin section through a contact region between two perpendicularly arranged fibres in a sheet of Husum sulphate pulp of *Pinus silvestris*. Arrows point to the contact regions. Magnification 100,000. Inset, magnification 140,000.

correspond to the "cellulose strings" or "fibril strings" observed in suspensions of hydrolyzed fibres and in the thallated undamaged fibre walls.

The different layers of the fibre wall often show different impregnation qualities. In hot alkalinized fibres the main secondary wall is heavily impregnated, but its outermost part shows a very low photographic density (6). In beaten, metal-impregnated fibres of sulphate pulp of *Pinus silvestris* the outer secondary wall shows a higher metal content than the main fibre. The outer parts of the fibre wall are damaged during the mechanical treatment and are easily impregnated in water solutions (2). The metal impregnation consequently gives a morphological analysis of the layers of the fibre wall in electron micrographs of the ultrathin fibre sections. An unevenness of the fibre surface in beaten fibres, as clearly demonstrated in the electron micrographs taken by means of the reflection instrument (1), is to be seen as a transit area in the sections.

The contact region between two fibres in a fibre couple of a paper sheet can be studied in ultrathin sections of metal-impregnated samples.

The real contact area as observed in the individual ultrathin sections is often small and shows a length of the order of 0.1μ up to 1μ . According to serial sections there is often a contact line between the

bonded fibres, not only an arrangement of contact points.

The contact region shows a fine structure; structural components with a width of $50\text{--}100 \text{ \AA}$ ("fibril strings") run between two adjacent fibre bodies. Particularly in micrographs of a contact between two perpendicularly arranged fibres the origin of the "fibril strings" observed can be estimated.

Figure 1 shows detail magnifications of a contact region between two perpendicularly arranged fibres in a paper sheet of Husum sulphate pulp of *Pinus silvestris* with a degree of beating 62 SR, 16,000 turns PFI. The electron optical magnification 25,000 diameters was used, an RCA EMU 2c electron microscope was employed.

"Fibril strings" can be followed in the plane of the section, in the inset lengths of 2.5μ , i.e. about 0.1μ can be measured. Several "fibril strings" are marked with dark lines. The strings at the left belong to the fibre I with a direction of fibre axis \rightarrow , the strings at the right to the fibre II with a direction of fibre axis \uparrow . The strings are observed to run parallel for distances of several hundred Ångström.

Thus the concept of fibre-to-fibre bonding has been brought one step further, to bonding between structural components of the fibre, which are only $50\text{--}100 \text{ \AA}$ wide. Distances between such structural components are small enough to bring the concept of fibre-to-fibre bonding into the realm of chemical bonding.

The author wishes to thank Dr. O. Andersson and Prof. B. Steenberg for the criticism of the manuscript and for many valuable discussions. She is very indebted to Dr. F. S. Sjöstrand, Associate Professor of Anatomy, for facilities for using the electron microscope at the Laboratory for Biological Ultrastructure Research, Department of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm.

REFERENCES

1. AMBOSS, K., EMERTON, H. W., and WATTS, J., *Brit. Paper and Board Makers' Assoc., Proc. Tech. Sect.* **35**, 487 (1954).
2. ANDERSSON, O., ASUNMAA, S., and STEENBERG, B., *Svensk Papperstidn.* (1957, to be published).
3. ASUNMAA, S., *Svensk Papperstidn.* **57**, 367 (1954).
4. — *ibid.* **58**, 33 (1955).
5. — *ibid.* **59**, 527 (1956).
6. — Proc. Conference on Textile and other Industrial Fibres, Leeds. Electron Microscopy Group, Institute of Physics (1957, in press).
7. MUNKHERJEE, S. M., SIKORSKI, J., and WOODS, H. J., *J. Textile Inst.* **43**, T 196 (1952).
8. RÅNBY, B., *Fine Structure and Reactions of Native Cellulose*. Dissertation Uppsala, Stockholm, 1952.
9. SJÖSTRAND, F. S., *Experientia* **9**, 68, 114 (1953).
10. — in OSTER and POLLISTER, *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. III. Acad. Press Inc., New York, 1956.
11. VOGEL, A., *Makromolekulare Chemie* **11**, 111 (1953).

Die elektronenmikroskopische Darstellung großer Perioden in Cellulosefasern durch Einlagerung schwerer Atome

K. HESS

Laboratorium für Mehl- und Eiweißforschung, Hannover

FASERN aus Kunststoffen (Polyamide, Polyester, Polyurethane, Polyäthylene und Derivate) zeigen nach Hess und Kiessig (6) im Röntgenfaserdiagramm Kleinwinkelreflexe auf dem Meridian, die Perioden in der Faserlängsrichtung zwischen 80 und etwa 200 Å entsprechen (Abb. 1). Die Erscheinung fand ihre begründete Deutung in einer periodischen Wechselfolge gittergeordneter und gitterungeordneter Abschnitte in Faserlängsrichtung, wie sie schematisch in Abb. 2 dargestellt ist. Bei künstlichen Fäden aus Polyvinylalkohol gelang erstmalig die elektronenmikroskopische Darstellung der Periode mit H. Mahl (1953) nach Anfärbung mit Jod, wobei sich dieses nachweislich in die ungeordneten Faserabschnitte einlagert. Die Übereinstimmung der röntgenographisch und im Elektronenmikroskop ermittelten Werte war befriedigend (Röntgen 159 Å, EM im Durchschnitt 153 Å; vgl. Hess (5)).

Bei Cellulosefasern sind röntgenographische Perioden dieser Art nicht mit Sicherheit feststellbar¹.

Einlagerung von Jod in Cellulosefasern. Mit H. Mahl und E. Gütter² wurden auf Grund der günstigen Erfahrungen bei den PVA-Fäden versucht, auch bei Cellulose durch Jodeinlagerung eine wirkungsvolle Kontrastierung im EM zu erzielen. Für die Sicherstellung der nunmehr auch bei Cellulosefasern sehr deutlichen Effekte war eine eingehende analytische und röntgenographische Untersuchung der Jodeinlagerung bei den Cellulosefasern notwendig, die mit R. Steinmann, H. Kiessig und Frau Dr. Avisiers² durchgeführt wurde. Dabei sind drei wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche EM-Untersuchung erkannt worden:

1) *Beschränkung der Jodeinlagerung auf die gittergeordneten Bereiche.* Für eine wirkungsvolle Kontrastierung ist verständlicherweise eine gleichmäßige Bejodung ausschließlich nur von einem Typ der beiden Ordnungsbereiche notwendig. In Übereinstimmung mit der üblichen Auffassung (11) haben auch wir zunächst geglaubt, daß die Jodaufnahme wie bei den PVA-Fäden auf die gitterungeordneten Bereiche beschränkt ist. Das ist aber keineswegs der Fall. Nur bis zu einer Jodaufnahme von 11–12 % vom Gewicht der Ausgangsfaser tritt Jod in die gitterungeordneten Bereiche ein, wobei keine Änderung der Celluloseinterferenzen im Röntgendiagramm erfolgt. Oberhalb 12 % ändern sich die

Celluloseinterferenzen, um bei hohen Jodaufnahmen (bis über 100 %) zugunsten neuer Interferenzen zu verschwinden, die einer gittermässig geordneten Einlagerung von Jod in Cellulose zuzuordnen sind (Abb. 3). Für die EM-Untersuchung eignen sich daher nur Fasern, deren Jodgehalt unterhalb des kritischen Jodgehaltes von 12 % liegen.

2) *Aufschlagbedingungen für die Defibrillierung.* Bei der Präparierung der jodhaltigen Fasern für die EM-Aufnahme sind diese zwecks Aufspaltung in die Elementarfibrillen in einem flüssigen Medium aufzuschlagen, was gegebenenfalls unter Erneuerung der Suspensionsflüssigkeit zu wiederholen ist. Als Aufschlagflüssigkeit ist Wasser am geeignetsten, wobei wesentliche Mengen Jod rückgelöst werden. In diesem Zusammenhang war die Beobachtung wichtig, daß die Rücklösung des Jods stark herabgesetzt wird, wenn das Aufschlagmedium auf etwa pH 7 gepuffert ist. Bei der Jodierung der Cellulose mit J_3K -Lösungen werden Protonen frei (Jodlösung 5 % J, 10 % J_3K , pH = 5, 15; nach der Jodaufnahme durch Cellulose pH = 3,05), die die Rücklösung des Jods begünstigen.

Beim Behandeln der Fasern mit einem Jodgehalt unterhalb der kritischen Konzentration (11–12 %) mit gepufferter Waschflotte unter Aufschlagbedingungen lassen sich leicht Präparate erzielen, die noch 2–4 % Jod enthalten, was für die Kontrastierung im

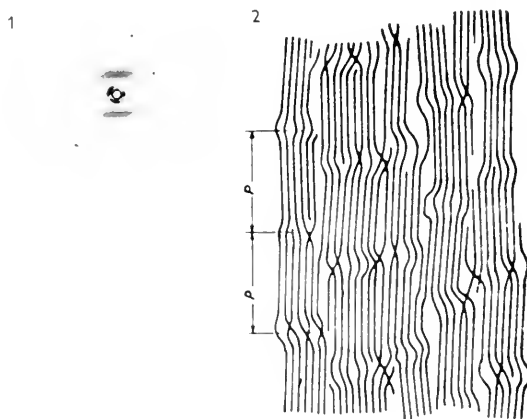


Abb. 1. Monochromatische Aufnahme der Längsperiodeninterferenz von Perlon U. I 73 Å, Filmabstand 200 mm, in der Reproduktion verkleinert (58 %). Cu $K\alpha$ -Strahlung an Steinsalz reflektiert, Faserrichtung senkrecht.

Abb. 2. Schema des micellaren Baues für vollsynthetische Fasern (Polyamid- und Polyesterfasern); P = Periodizität und Schema für die Übergangsstellen der gittergeordneten in die gitterungeordneten Bereiche.

¹ Eine Andeutung, die wir indessen zunächst nicht bestätigen konnten, ist von Clark und Parker (2) gefunden worden.

² Die ausführliche Veröffentlichung mit H. Mahl und E. Gütter erfolgt demnächst in der Zeitschrift für Kolloid-Chemie.

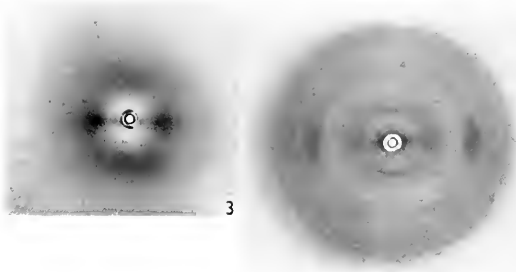


Abb. 3. Röntgenfaserdiagramm von Zellwolle mit 70,7 % Jod.

Abb. 4. Röntgenfaserdiagramm von Ramie (merc.) mit 50,1 % Thallium.

EM völlig ausreicht. Die Jodbewegung in der Faser spielt sich dann sowohl beim Aufjodieren als auch bei der Behandlung mit der Aufschlagflüssigkeit ausschließlich in den gitterungeordneten Faserbereichen ab.

3) *Härtung der Fasern.* Beim Aufschlagen der Jodierungsprodukte treten sowohl bei gefällten Cellulosefäden als auch bei natürlichen Fasern leicht Deformationen an den Grundfibrillen auf, wobei ihre Konturen unscharf werden und teilweise ganz verschwinden können. Man gewinnt den Eindruck, daß die Grundfibrillen vermutlich durch Quellung in einen difform-diffusen Zustand übergehen, bei dem im Elektronenmikroskop günstigstenfalls nur noch undeutliche Relikte von Perioden zu erkennen sind, während bei intakt gebliebenen Grundfibrillen deutliche Perioden in Form sehr regelmäßiger strichförmiger Schwärzungen auftreten. Man kann die Deformation durch schwaches Anformalisieren (Härten) zurückhalten.

Dichroismus. Sowohl das primär von den Fasern aufgenommene Jod als auch das nach der Behandlung in den Fasern verbliebene Restjod zeigen einen ausgeprägten Dichroismus, der in beiden Fällen verschieden ist: Die primär jodierten Fasern zeigen bei gekreuzter Stellung von Faserachse und Polarisationssebene je nach dem Jodgehalt eine gelbe bis dunkelbraune Färbung, bei Parallelstellung tiefgelb bis schwarz (Beobachtung unter Kanadabalsam). Die Farbtöne nach Behandlung in Wasser sind in Abhängigkeit vom Jodgehalt bei gekreuzter Stellung fast farblos bis hellblau, bei Parallelstellung leuchtend blau bis schwarz. Nur die blaue Form (Restjod) kommt für die EM-Beobachtung in Frage.

Durch West (12) ist bewiesen, daß die dichroitische blaue Jodfärbung bei orientierten hochpolymeren Stoffen wie PVA-Fasern auf einer in Richtung der Längsorientierung angeordneten Einlagerung des Jods in Form von dispersen polymeren Jodketten beruht, die den Charakter eines Linienmittlers mit einer Periode von 3.10 \AA besitzen (Abstand der geradlinig verknüpften Jodatome). In den Röntgenfaserdiagrammen der Jodierungsprodukte tritt übereinstimmend eine einzige strichförmig ver-

breitete Schichtlinieninterferenz mit $d = 3.10 \text{ \AA}$ auf, die den difform-diffusen Charakter der eingelagerten Jodketten überzeugend begründet.

Dampfdruckbestimmungen. Die Auffassung, daß das von der Faser aufgenommene Jod in der „blauen“ Form als polymere Ketten vorliegt, wird durch unsere Dampfdruckmessungen bestätigt. Der Dampfdruck über den jodierten Fasern ist zwei Größenordnungen niedriger als der des kristallinen Jods, wodurch verständlich wird, daß das Jod bei der EM-Beobachtung nicht durch Abdunsten verschwindet.

Einlagerung von Thallium in Cellulosefasern. Purves und Mitarbeiter (4) haben in der Umsetzung von Cellulose mit Thalliumäthylat in Benzollösung eine Möglichkeit zur Einführung von Thallium in Cellulose aufgefunden, die sich nach Auffassung der Autoren ebenfalls auf die „amorphen“ Faseranteile beschränkt. Aus der Reaktion mit Jodmethyl geht eine Methylcellulose hervor, deren Methylgruppen dementsprechend ebenfalls in dieser „Phase“ liegen, in der sich dann auch das dabei entstehende Thalliumjodid abscheidet. Wir haben die nur mit wechselnden Erfolgen durchführbare Reaktion erneut studiert und reproduzierbar gestaltet. Das in den Fasern abgelagerte Thalliumjodid ist in Wasser praktisch unlöslich, so daß in diesem Fall keine besonderen Maßnahmen notwendig sind.

Die an Fasern mit aufsteigendem Thalliumgehalt vor der Methylierung durchgeführte Röntgenuntersuchung zeigte, daß ähnlich wie bei der Jodierung eine Grenze für die Aufnahme an Thallium besteht, unterhalb der keine Änderung im Röntgendiagramm der Cellulose feststellbar ist. Oberhalb dieser Grenze treten Veränderungen auf, wobei die Celluloseinterferenzen allmählich verschwinden. Besonders auffallend ist ein Reflex auf dem Meridian, der ziemlich genau an der Stelle erscheint, an der im Faserdiagramm der Cellulose die erste Ordnung (010) liegen würde, die bei Cellulose aber „verboten“ ist (Abb. 4). Die kritische Konzentration für Thallium, bei der in Cellulosefasern eine Gitteränderung noch nicht erkannt wird, liegt bei 6–8 % Thallium vom Gewicht der Faser.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden diese Fasern in Wasser aufgeschlagen.

Ausgangsfasern. Als Cellulosefasern wurden für die EM-Untersuchung herangezogen verschiedene Muster von hochverstreckter Viskose-Zellwolle (Colvadur der Firma Glanzstoff-Courtaulds G.m.b.H./Köln), eine hochverstreckte Viskose-Rayon amerikanischer Herkunft (Supercordura), Baumwolle, Ramie, ein schwedischer Fichtenzellstoff (Modocord der Firma Mo och Domsjö); die vergleichsweise untersuchten Polyvinylalkoholfäden lagen in Form von Kuralon (der Kurashiki Rayon Co, Ltd./Osaka, Japan) vor.

Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung. Das benutzte EM war das elektrostatische Gerät von AEG-Zeiss bei 3000 und 5000facher Ver-

TABELLE 1. Lange EM- und Röntgenperioden in Längsrichtung bei Fasern.

Faserart	Atomeinlagerung		Beobachtete Längsperioden in Å				
	^o / _o Jod	^o / _o Thallium (angenähert)	EM	Nr. der Aufnahme	Röntgenkammer f. kleine Beugungswinkel	Nr. der Aufnahme	
Synthetische Fasern							
PVA Kuralon (Japan)	4		~ 153	700	M/53,435, 447	159	K 2097
Cellulosefasern							
<i>Viskose-Zellw.</i> (hochverstr.)							
„Colvadur“ (A) 1953	5		100	160 650 670	M/53,448, 455 464, 467	150	K 3835*
Colvadur (B) 1954	4,5		~ 100	~ 500	G/54,168, 171		
Colvadur (C) 1956	6		~ 130	550	G/56,075, 076		
Colvadur (C) 1956	1		160 u. 80	100	G/56,009, 013		
Colvadur (A)	5					≈ 200	K 4167
Colvadur (A)		25				164	K 4182
<i>Viskose-RT</i> (hochverstr.)							
„Supercordura“ (USA)	2		80-100	(700?)	G/54,185a, b, 186	137 (naß) ~ 110 (trocken)	K 4598 geschätzt
Reifencord (D)						142 (naß) 112 (trocken)	K 4496 K 4549
<i>Fichtenzellstoff</i>							
„Modocord X“ (Schw.)	4			~ 720	G/54,189, 190		
„Modocord X“ (Schw.)	11		153		G/54,136-139		
Ramie merc.		8,3	~ 150		G/55,086		
»	10		~ 100		G/55,089, 091		
Baumwolle merc.	10		~ 100		G/55,083, 092		
			(bis 200)				
Kollagen-Fasern							
Schwanzsehne (Känguruh)	1,5% P-WO ₃					629-665	Bolduan, Bear (1949)
Schwanzsehne (Katze)	P-WO ₃			640	C. Wolpers (1943)		
Schwanzsehne (Katze)	P-WO ₃		~ 60	640	W. Grasmann (1952)		
Kollagen (Schwanzsehne, Ratte) gefällt			~ 60	640	K. E. Wohlfarth- Bottermann (1954)		

größerung. Die nach den oben mitgeteilten Vorschriften mit Jod bzw. Thalliumjodid beschwerten Fasern wurden nach dem Aufschlagen in einem Homogenisator der Firma E. Bühler / Tübingen unmittelbar beobachtet.

Alle bisher untersuchten Cellulosefasern zeigen große Überperioden in Längsrichtung der Fasern ähnlich wie sie bei der synthetischen Kuralonfaser aus PVA beobachtet wurden. Die Perioden sind oft so gut ausgebildet, daß sie photometriert werden können (Abb. 5 und 6). Dabei beobachtet man im allgemeinen zwei Arten von Perioden: eine kleinere, die jeweils zwischen 80 und 200 Å liegt und eine größere zwischen 500 und 750 Å. Die Größe der Perioden schwankt mit der Faserart.

In Tabelle 1 sind die beobachteten Werte für einen Teil der bisher untersuchten Fasern vergleichend

zusammengestellt. Es ist bemerkenswert, daß die Periodizitäten nicht nur bei den gefällten (verstreckten) Cellulosefäden vom Viskose-Typ, sondern auch bei natürlichen Fasern wie Baumwolle, Ramie und Fichtenzellstoff beobachtet werden. Damit ist die Annahme nahegelegt, daß das von Hess und Kiessig zunächst bei synthetischen Fäden (Chemiefasern) erschlossene Modell der Abb. 1 das allgemeine Prinzip für den Faseraufbau ist.

Eine Komplikation besteht in dem Auftreten der größeren Periode, die bisher röntgenographisch noch nicht bestätigt ist.

Zum Schluß sei an die verblüffende Ähnlichkeit der Erscheinungen mit denen bei Eiweißfasern des Kollagen-Typus erinnert. Nach den Feststellungen von Wolpers (13) in Deutschland und Schmitt (10) in USA sowie Grasmann und Hofmann (3) treten

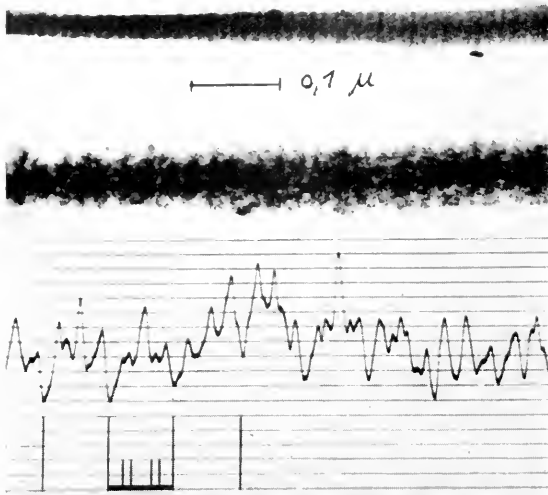


Abb. 5. EM-Aufnahme von jodierter Viskose-Zellwolle (Colvadur) mit Photometerkurve. Vergr. 120 000

im Elektronenmikroskop der mit Phosphorwolframsäure kontrastierten Kollagen-Fasern neben der bekannten großen Periode von 640 Å kleinere Perioden auf, die etwa um 50–100 Å liegen. Da bei den synthetischen Fasern, z. B. aus ϵ -Aminocapronsäure (Perlon) eine chemische Ursache für Längs-Periodizitäten ausgeschlossen erscheint, es sich vielmehr um den periodischen Wechsel von Ordnungszuständen handelt, dürfte wegen der erwähnten Analogie auch bei den Kollagenfasern die Ursache für die Überstruktur weniger in periodischen Anordnungen spezifischer Aminosäuregruppen liegen, wie man wohl allgemein angenommen hatte, sondern vielmehr ebenfalls in einer periodischen Wechselfolge von mehr oder weniger gittergeordneten und gitterungeordneten Faserabschnitten.

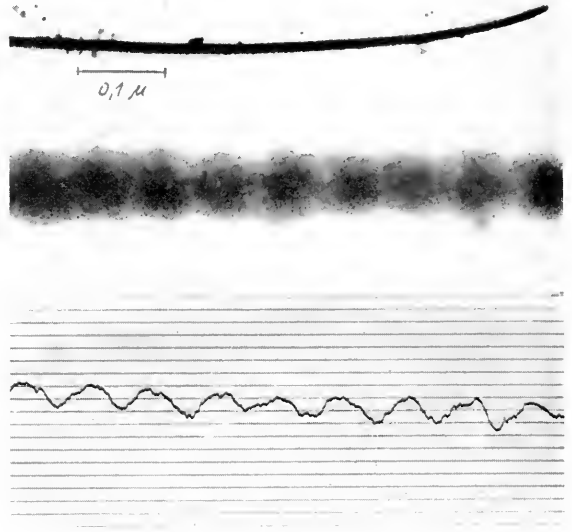


Abb. 6. EM-Aufnahme von jodiertem Fichtenzellstoff (Fasertracheide) mit Photometerkurve. Vergr. 120 000

LITERATUR

1. ASSAF, A. G., HAAS, R. A., und PURVES, C. B., *J. Am. Soc.* **66**, 59 (1944).
2. CLARK, G. L. und PARKER, E. A., *Science* **85**, 203 (1937).
3. GRASMANN, W., HOFMANN, U., und NEMETSCHKE, TH., *Z. Naturforsch.* **7 b**, 509 (1952).
4. HARRIS, H. A. und PURVES, C. B., *Paper Trade J.* **110**, 29 (1940).
5. HESS, K., *J. Colloid Sci. Suppl.* **1**, 143 (1954).
6. HESS, K. und KIESSIG, H., *Naturwiss.* **31**, 171 (1943).
7. — *Z. physik. Chem. (A)* **193**, 196 (1944).
8. — *Kolloid-Z.* **130**, 10 (1953).
9. HESSLER, L. E. und POWER, R. E., *Textile Research J.* **24**, 822 (1954).
10. SCHMITT, F. O., HALL, C. E., und JAKUS, M. A., *J. Cellular Comp. Physiol.* **20**, 11 (1942).
11. SCHWERTASSEK, K., *Faserforsch. u. Textiltech.* **7**, 251 (1952).
12. WEST, C. D., *J. Chem. Phys.* **15**, 689 (1947).
13. WOLPERS, C., *Klin. Wochschr.* **22**, 624 (1943).

On the Submicroscopic Structure of Mannans

H. MEIER

Swedish Forest Products Research Laboratory, Wood Chemistry Department, Stockholm

IN recent years the chemical structure of the hemicelluloses has been cleared up to a large extent, but some concrete knowledge of their submicroscopic morphology is still lacking. The older literature states mostly that they are embedded together with the lignin as an amorphous cement between the cellulosic microfibrils of the cell walls. A more modern view of the matter distinguishes hemicelluloses which are resistant and those which are

nonresistant to acid hydrolysis, bearing in mind that the first are crystalline whilst the latter are amorphous.

The difficulty in clearing up the submicroscopic morphology of the hemicelluloses resides in the fact that they are always combined with cellulose in the cell walls; there exists no method of separating them from each other without destroying the native biological state of the hemicelluloses. However, in the

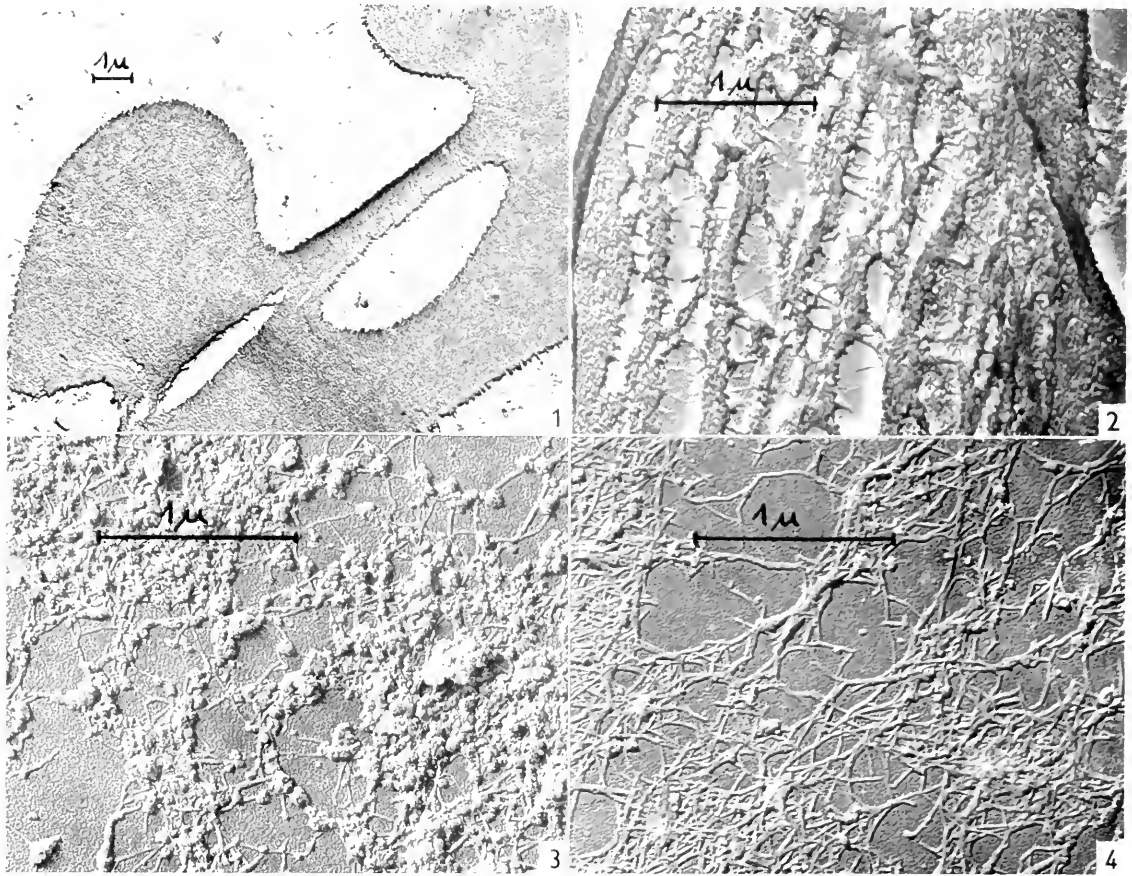


Fig. 1. Section through a cell wall of date endosperm in its natural state. Magnification 5000.

Fig. 2. Section through a swollen cell wall of date endosperm. Note the microfibrils between the swollen layers. Magnification 20,000.

Fig. 3. Date endosperm after Turmix and ultrasonic treatment before extraction of mannan A. Magnification 25,000.

Fig. 4. Date endosperm after Turmix and ultrasonic treatment after extraction of mannan A. Magnification 25,000.

endosperm of palm seeds there is available a material which contains mannan, one of the most important hemicelluloses, in a more or less pure form. An attempt has therefore been made to gain some knowledge of the submicroscopic structure of mannans by studying the endosperm of date seeds (*Phoenix dactylifera* L.) and ivory nuts (*Phytelephas macrocarpa* Ruiz et Pav.).

Lüdtke (4) has shown that there are two different mannans in the cell walls of ivory nut, i.e. mannans A and B which differ from each other by their solubility in dilute alkali. The chemical structure of the two mannans has been studied by Klages (2, 3) and recently by Aspinall, Hirst and coworkers (1). According to them these mannans are both composed of two types of molecules, one having a mannopyranose residue as non-reducing end group, the other a galactopyranose residue. The two mannans should, according to Aspinall, differ from each other *only* in their molecular size. By determination of the end groups Aspinall has calculated a degree of polymerization of 10-13 for mannan A and of

39-40 for mannan B. It might however seem doubtful that the difference between the two mannans should lie in their molecular size only. In that case it would be very difficult to understand why there should not exist between the mannans A and B a series of molecules with a degree of polymerization *between* 10 and 40. Moreover, this small difference in chain length alone can hardly explain the very distinct difference in the alkali solubility of the two mannans.

In polarized light the cell walls of date and ivory nut endosperm are highly birefringent. It does not seem probable that this birefringence is caused only by the 6% cellulose (total carbohydrate content 100%) that is found in the walls. Therefore the mannan forming about 90% of the cell walls must be at least partly crystalline. With the aid of the polarizing microscope the direction of the crystallites in the thick central layer of the walls can be easily determined. In the date cells they run more or less perpendicularly to the cell axis and surround the pits circularly.

In an ultrathin section through a cell wall of date endosperm the whole wall appears to be built up of small grains (fig. 1). However, if by chance a section through a swollen cell wall is obtained, microfibrils are visible between the swollen layers of the wall (fig. 2). It does not seem likely that they are of a cellulosic nature, since, as Reiss (5) has found, the whole thick central layer of the wall disappears when the seeds germinate.

To obtain an answer to the question whether there exists a morphological difference between the mannans A and B, the finely ground endosperm of date seeds was extracted with acetone and ether, macerated with acetic acid/hydrogen peroxide (1:1) and treated with a defibrator of the Turmix type and/or with ultrasonic waves. This material was found under the electron microscope to consist of two morphologically different components. There are small grains visible which are often aggregated to greater particles and there is also about the same quantity of microfibrils (fig. 3). However, the microfibrils are mostly covered by the grains and therefore appear to be present in a smaller quantity. Chemical analysis of the sample yielded, after hydrolysis, 15% glucose with traces of galactose and 85% mannose. The mannan A was extracted from this sample with 7% potassium hydroxide at room temperature. This specimen free of mannan A appeared in the electron microscope to consist of microfibrils only. The small grains and their aggregates had disappeared almost completely (fig. 4). It follows that the grains visible in fig. 3 are identical with the low molecular weight mannan A. If the latter is precipitated again from the extract it forms nearly cubic particles with a diameter of about 1μ . An ultrathin section through such a particle shows that it is built up of small grains very similar to those of the mannan A in its native state.

The specimen that is shown in fig. 4 gave on paperchromatographic analysis 39% glucose and 61% mannose. Results analogous to those from date

cells have been obtained with ivory nuts. After extraction with 7% potassium hydroxide an ivory nut sample yielded on chemical analysis 20% cellulose and 80% mannan and also appeared in the electron microscope to consist only of microfibrils. This provides evidence that the high molecular weight mannan B is built up of microfibrils analogous to those of cellulose. Their width also seems to be of the same size. At present it is difficult to say whether there are pure mannan or only mixed mannan/cellulose microfibrils. However, the latter might be less probable because the mannan B can, after prehydrolysis of the material with 1% hydrochloric acid, be completely extracted with 24% potassium hydroxide, whilst the cellulose is resistant to this treatment. This would hardly be possible if there were mixed crystallites of 80% mannan and 20% cellulose.

It might be noted that without prehydrolysis mannan B cannot be extracted with 24% potassium hydroxide at room temperature. A sample that was first extracted with 7%, then with 14%, 18% and finally during three days with 24% potassium hydroxide still yielded 77% mannan.

The conclusion of all these observations can only be that the mannan B builds up the framework of the cell walls of palm seeds in the form of microfibrils quite analogous to the cellulose in other plant cell walls. The mannan A on the contrary lies incrustated within the framework of the mannan B. This might possibly be an indication that the resistant hemicelluloses of woody fibers also form microfibrils.

REFERENCES

1. ASPINALL, G. O., HIRST, E. L., PERCIVAL, E. G. V., and WILLIAMSON, I. R., *J. Chem. Soc.* 3184 (1953).
2. KLAGES, F., *Liebigs Ann. Chem.* 509, 159 (1934).
3. — *ibid.* 512, 185 (1934).
4. LÜDTKE, M., *Liebigs Ann. Chem.* 456, 201 (1927).
5. REISS, R., *Ber.* 22, 609 (1889).

A Contribution to the Structure of Keratin

M. W. ANDREWS and J. SIKORSKI

*Textile Physics Laboratory, Department of Textile Industries,
University of Leeds*

IN spite of great advances in the study of keratin structure, during the last quarter of a century or so, it is, nevertheless, evident that the information available is still very incomplete.

Thus, at the molecular level the difficulties to establish a convincing relation between the results of chemical analyses and x-ray diffraction data, are as many as they are formidable (1, 2, 9, 11) and

there can be little doubt that the ambiguity (except in the case of cortical cells: Woods (15)) about the individual effect of various histological components of keratin fibres, on the x-ray diffraction pattern, could be considered as, at least, a contributory factor in this respect. Recent discoveries of the bilateral structure in crimped wool fibres (8, 10) call, among other questions, for the consideration of

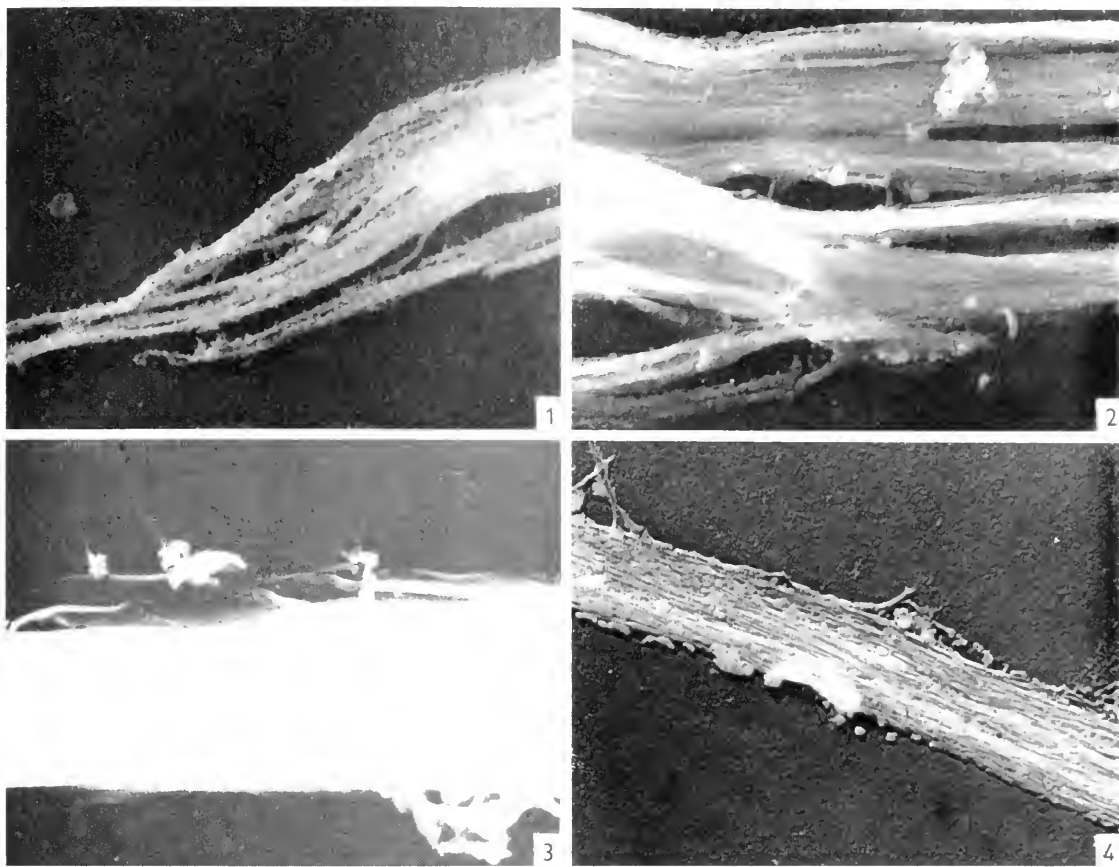


Fig. 1. Cortical cell isolated from Australian merino wool and exposed to ultrasonic vibrations, in water, for 12 hours. Magnification 10,000.

Fig. 2. Cortical cell isolated from Lincoln wool and exposed to ultrasonic vibrations, in water, for 12 hours. Magnification 29,000.

Fig. 3. Cortical cell isolated from Lincoln wool and exposed to ultrasonic vibrations, in lithium bromide solution, for 4 hours. Magnification 21,000.

Fig. 4. Fragment of cortical cell isolated from Lincoln wool and exposed to ultrasonic vibrations, in lithium bromide solution, for 4 hours. Magnification 32,000.

differences in the type of packing of the microfibrils in cortical cells of the two regions: ortho- and para-cortex. The type of lateral packing of the microfibrils must influence many properties of keratin fibres. We have discussed this problem in some detail in connection with our proposed mechanism of supercontraction in keratin (7) and have further suggested (14) that keratinization involves the stabilization of microfibrillar texture leading to the uniplanar cross-linking together of the microfibrils to form sheets.

However, Fraser (4) and, independently, Rogers (private communication) suggested that the width (1 to 3 microns) of the sheets of microfibrils obtained by us (6, 7) may be rather due to the mode of biosynthesis of microfibrils; namely some "early" microfibrils aggregating laterally, and their continuing to be synthesized in scroll-like fashion to form macro-fibrils. They, in fact, suggested that the chemical treatment of Jeffrey *et al.* (6, 7) was capable

of reversing this underlying organization in the fully hardened keratin.

This divergence of views may be accounted for by the differences in chemical reactivity between the cortical cells from crimped and straight animal fibres; a view confirmed recently by Satlow and Sikorski (13) who found that more resistant cortical cells show a more complex structure. This lends support to the observation of Rogers (12) that the intact cortical cells were apparent in the para-cortex of crimped fully hardened and oxidized keratin fibres, whereas macrofibrils were evident in the ortho-cortex.

It must be admitted that the thickness of microfibrillar sheets observed in our experiments (6) can account only for a relatively small fraction of the diameter of cortical cells. We have, therefore, decided to re-examine this question in some detail and, in our experiments, used cortical cells which have been separated with the minimum of damage. How-

ever, the cortical cells isolated from untreated keratin by mild digestion in trypsin (3) appeared to be little affected by the prolonged action of ultrasonic vibrations (25 Kc/s and 15 Watt/cm², actual output) in water or various swelling agents: the separated fragments showed very little internal structure (6). It was thus advisable to increase the time of treatment in trypsin to obtain better retting effects.

The experiments were carried out with non-medullated root-ends of Australian merino and Lincoln wool fibres. These were cleaned by extraction in petroleum ether at room temperature for about a week, followed by Soxhlet extraction first in benzene and then in ethyl alcohol for 24 hours. The fibres were washed in repeated changes of distilled water to remove water-soluble impurities and then dried at room temperature.

Fibres were then treated in a mixture, containing equal proportions of 0.5% w/v aqueous solution of trypsin and a buffer solution of pH 8.6, at 40°C, using a wool to solution ratio of 1:100. After three months both samples of wool retained their fibrous form, but on pressing gently between a microscope slide and a cover slip, they yielded cortical and cuticular cells; the latter were separated using Woods' technique (15). The purified cortical cells were kept (in a stoppered flask) in distilled water to which a drop of toluol had been added to prevent bacterial growth.

Small samples of cortical cells were suspended in distilled water, or lithium bromide solutions¹, in a cell of an ultrasonic apparatus (5) and were irradiated for periods up to 12 hours.

The cortical cells isolated from Australian merino wool and irradiated by ultrasonic vibrations in water suspensions, appeared to break into large aggregates of the parallel macrofibrils, in agreement with the view that a macrofibrillar type of structure is characteristic in this type of keratin (see fig. 1). When, however, similar experiments were made with the cortical cells separated from Lincoln wool, their breakdown in water suspensions started with the separation of many superimposed layers (up to eight) of the sheets of microfibrils (see fig. 2). Some seemingly structureless material was found to be situated between these sheets (7); such films could often be seen over the cracks in the sheets of microfibrils (see fig. 2).

In agreement, however, with our previous experience with the chemically untreated keratin (6), we found it impossible to separate the very thin sheets of microfibrils from their thicker aggregates.

The discrete steps of breakdown could, however, be obtained when the cortical cells, isolated from Lincoln wool, were subsequently exposed to the action of ultrasonic vibrations in lithium bromide solutions (fig. 3). During these experiments we have obtained evidence of the separation of many thin sheets of the microfibrils "peeling off" from the outside surfaces of the cortical cells, even after relatively short time of treatment (four hours). We have also observed that some less resistant cells were disintegrating into the thin sheets of microfibrils and the residues of some globular material could be seen scattered over their surfaces (see fig. 4).

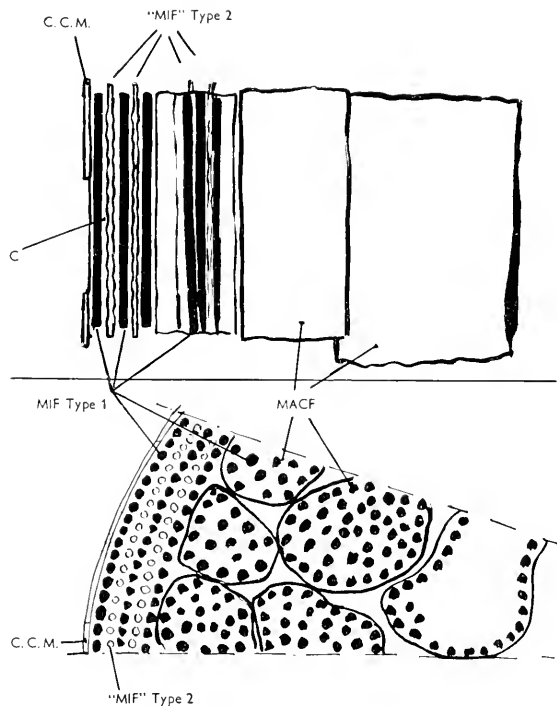


Fig. 5. Diagram illustrating cortical cell. MIF, microfibril; MACF, macrofibril; C.C.M., cortical cell membrane.

The results of our experiments indicate that the differences in stability of the cortical cells to the action of ultrasonic vibrations are not confined to crimped wools only.

The most resistant cortical cells isolated from the other (uncrimped) wool remain unaffected by the action of ultrasonic vibrations for considerable periods of time. The less resistant cells show the separation of thin sheets of microfibrils, followed by the appearance of aggregates of the microfibrils. The presence of small debris (other than that of the intercellular origin) in the early stages of treatment of cortical cells suggests that there are also some cells of very low stability.

Thus, there is no doubt that a considerable differentiation does exist in the organization of cortical cells, and we suggest that the following model (see fig. 5) could account for the available evidence. We suggest that the cortical cells are surrounded by a relatively high number of thin sheets of microfibrils and that there is also some less orderly arrangement of the aggregates of microfibrils inside the cortical cells; consequently we agree that the idea of the existence of the macrofibrillar structure in the interior of cortical cells should be regarded as consistent with the experimental evidence.

The idea of the extensive sheets of microfibrils has been very recently supported by some x-ray evidence kindly placed at our disposal by Mr. Woods and

¹ The lithium bromide solutions used in experiments described in this paper, were made by dissolving 100 g of salt in 100 ml of distilled water.

Mr. Skerthly. They found that all equatorial x-ray reflections, obtained from Lincoln wool, appear, within narrow limits, to be either orders of, or related to, the reflections near 250 Å. They traced many orders up to the 57th and regard this as an indication of a considerable degree of unidirectional order, consistent with a sheet-like structure. The same workers have also suggested the possibility of the existence of a hexagonal close-packing of the microfibrils. This point, however, can be resolved only by the direct examination of cross-sections of fully hardened keratin fibres.

We wish to thank Messrs. H. J. Woods and A. B. Skerthly for placing at our disposal their unpublished results. One of us (M. W. A.) is indebted to the C.S.I.R.O. (Australia) for an overseas studentship which enabled this work to be carried out.

REFERENCES

1. ASTBURY, W. T., *Proc. Roy. Soc. (London) B* **141**, 1 (1953).

2. Intern. Wool Text. Res. Conf., Australia, 1955 (in press).
3. BURGESS, R., *J. Textile Inst.* **25**, T 391 (1934).
4. FRASER, R. D. B., Intern. Wool Text. Res. Conf., Australia, 1955; during discussion (in press).
5. JEFFERY, G. M. and SIKORSKI, J., Ann. Conf. of the Electr. Microsc. Group of the Inst. of Phys., 1956; *Brit. J. Appl. Phys.* (summary in press).
6. JEFFERY, G. M., SIKORSKI, J., and WOODS, H. J., Intern. Wool Text. Res. Conf., Australia, 1955 (in press).
7. *Textile Research J.* **25**, 714 (1955).
8. KONDO, T. and HORIO, M., *Textile Research J.* **23**, 373 (1953).
9. McARTHUR, I., *Proc. Roy. Soc. (London) B* **141**, 33 (1953).
10. MERCER, E. H., *Textile Research J.* **23**, 380 (1953).
11. PAULING, L. and CORRY, R. B., *Nature* **171**, 59 (1953).
12. ROGERS, G. E., Conf. on Electr. Microsc. of Text. and other Industrial Fibres, Inst. of Phys., Leeds, 1956; summary by CHALFIC, C. E. and SIKORSKI, J., *Brit. J. Appl. Phys.* (in press).
13. SALLOW, G. and SIKORSKI, J., *Melliand Textilber.* (in press).
14. SIKORSKI, J. and WOODS, H. J., Conf. on Electr. Microsc. of Text. and other Industrial Fibres, Inst. of Phys., Leeds, 1956; summary by CHALFIC, C. E. and SIKORSKI, J., *Brit. J. Appl. Phys.* (in press).
15. WOODS, H. J., *Proc. Roy. Soc. (London) A* **166**, 76 (1938).

The Electron Microscopy of Pigmented Keratinous Materials

J. HOPE, J. SIKORSKI, and C. S. WHEWELL

*Textile Chemistry¹ and Textile Physics² Laboratories,
Department of Textile Industries, University of Leeds*

THE study of colouring matters found in keratinous materials has an important bearing on many problems encountered in biology, genetics, medicine and industry. During recent years it has been possible to make accurate determination, for the first time, of the size and shape of the pigment-containing granules (4, 8, 11). In more recent studies valuable information has been obtained on the size and shape (1, 6 and Bohren and Buss, private communication) and the disposition (1, 2, 6, 9) of pigment-containing granules in the keratin matrix.

The examination of ultra-thin sections of pigmented follicles (1, 2, 9) and of isolated melanin granules (2) has revealed that the latter are aggregates of dense particles. In some granules the melanin could be considered as deposited in parallel lamellae (1, 2, 9 and Charles, private communication) which may form a succession of cylindrical or ellipsoidal shells.

One of the main problems in investigating keratin pigment is to devise a method for isolating pigment-

containing granules free from contamination by residual keratin without adverse modification of their morphological and crystal structure (6). The following methods have been used for isolating pigment-containing granules from feathers and mammalian hairs: (i) enzymatic digestion (2); (ii) treatment in urea solutions, containing papain and sodium metabisulphite (2); (iii) boiling in 1*N* potassium hydroxide (1, 2); (iv) boiling or refluxing in 3*N* (2), 6*N* (6, 1 and Bohren and Buss, private communication) or concentrated hydrochloric acid (11); (v) refluxing in an iron-free solution containing 94 g of phenol, 9.0 g of distilled water and 8.2 ml of thioglycolic acid-PHT reagent (6).

It is evident that granules isolated by most of the above methods are modified to some extent. If the method is modified so that the isolated granules appear to be intact, there is generally a great degree of contamination by residual keratin. This emphasized the desirability of electron microscopic examination as control technique for indicating the efficacy of any process for separating granules from keratinous materials (6). The PHT (phenol hydrate and thioglycolic acid) method, however, was found to satisfy both criteria discussed above, but it does involve certain experimental difficulties of separating out the granules from viscous solutions.³

An examination of various methods of isolating pigment-containing granules in keratinous materials. All the methods examined of isolating pigment-

¹ J. Hope and C. S. Whewell.

² J. Sikorski.

³ Three hours were required to isolate the pigment-containing granules, by centrifuging the PHT suspension (10 ml) at 10,000 *g* (instead of 10 hours at 2000 *g*, in 50 ml tubes; Laxer *et al.* (6)).

TABLE 1. *The examination of potential methods for isolating pigment-containing granules in keratinous materials.*

Reagent	Details of treatment	pH	Material ¹
Sodium hydroxide			
2.5 <i>N</i>	Boiling for 5 min.	> 12	Ch., BWM.
3.0 <i>N</i>	At 98°C for 3 hr.		C/R
5.0 <i>N</i>	"		"
Sodium carbonate (15%)	Boiling for 24 hr.		Ch., BWM.
Sodium sulphide (0.5 <i>M</i>)	Boiling for 45 min.		Ch., BWM.
Sodium bisulphite (0.1 <i>N</i>) in 50/50 <i>n</i> -propyl alcohol/water	Refluxing for 24 hr. Refluxing for 48 hr.	6.5	G BWM.
Monothioglycol (0.2 <i>M</i>) in 50/50 <i>n</i> -propyl alcohol/water	Refluxing for 24 hr.	5.0	G, BWM.
Thioglycollic acid (0.2 <i>M</i>) in 50/50 <i>n</i> -propyl alcohol/water	Refluxing for 24 hr.	5.0	G, BWM.
Sodium thio-glycollate (0.5 <i>M</i>) with sodium hydroxide	Refluxing 3 to 24 hr. Refluxing 3½ hr. ² Refluxing for 4½ hr.	≥ 12	G BWM. BWM.
Monothioglycol (0.5 <i>M</i>) with sodium hydroxide	Refluxing for 24 hr.	> 12	G
Sodium bisulphite (0.3 <i>M</i>) and urea (10.0 <i>M</i>)	Refluxing for 24 hr.	7	Ch., BWM.
Monothioglycol (0.5 <i>M</i>) and ammonium thiocyanate (9 <i>M</i>)	Refluxing for 24 hr.	7	G
Hydrochloric acid (6 <i>N</i>)	Boiling for 48 hr.		BWM.
PHT reagent (see text)	Refluxing for 24 hr.		

¹ C/R—Crow or Rook; Ch.—Chicken; G—Grouse; BWM.—Black Welsh Mountain Wool.

² Washed 3 times in boiling 2 *N* hydrochloric acid for few minutes.

containing granules involved treatment with keratinolytic reagents. In the present investigation the suitability of several reagents to isolate pigment-containing granules, from black feathers and dark brown Welsh Mountain Wool, was examined.

These not only provided data on the effectiveness of the reagents as a means of isolating granules but also yielded information on the relative resistance of the materials under different courses of treatment. The reagents used and other relevant data are summarized in Table 1.

The experimental procedure was as follows: the feathers were washed in warm tap water and soap solution, and after being dried were purified by successive refluxing, for 24 hours, in diethyl ether and ethyl alcohol; finally they were washed in ten changes of distilled water. The quill and rachis were cut off and discarded, so that only web was used in the subsequent work.

One tenth gram of purified feathers, or hairs, were treated in 10 ml of reagent. After extraction (see Table 1) suspensions were filtered through sintered glass filter and centrifuged. Washing was carried out by centrifuging in: (i) three changes of extracting liquor, (ii) three changes of distilled water, (iii) three changes of acetone and, finally, (iv) two changes of diethyl ether. Residues were then stored under vacuum over phosphorus pentoxide.

For electron microscopy, residues were re-suspended by gentle grinding in a drop of distilled water on a microscope slide, using a glass stirring rod. A drop of the suspension was deposited on a supporting nitrocellulose, or carbon, film on the electron microscope grids and dried over phosphorus pentoxide.

From the above experiments the following main conclusions can be drawn. The residues obtained from all treatments, except that involving the PHT reagent, were either contaminated by keratinous material (see fig. 1) or showed varying degrees of attack on the pigment-containing granules. Generally the amounts of keratinous contaminants varied only slightly from one reagent to another with perhaps one exception of treatment (for longer periods) in sodium thioglycollate, which was capable of yielding relatively clean pigment-containing granules. Further improvement in this respect was obtained, by additional washing for a few minutes in 2 *N* hydrochloric acid. However, in view of the very high pH values involved in the original reagent, more detailed investigations are necessary before an answer can be given about the applicability of this method, particularly since greater electron transparency was

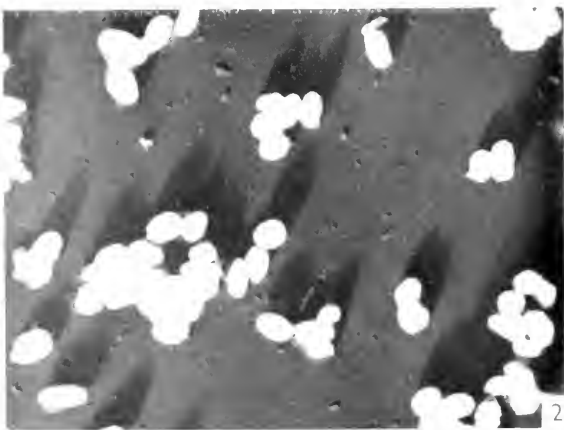


Fig. 1. Residue from black feather of Red Grouse, after treatment in 0.5 *M* sodium thioglycollate, at pH 12, 3 hours reflux. Note keratin contamination in the background. Magnification 10,000.

Fig. 2. Pigment-containing granules from black tail hair of cow. Magnification 10,000.

Fig. 3. Pigment-containing granules from light-brown feather of Mallard. Magnification 10,000.

Fig. 4. Pigment-containing granules from black feather of pigeon. Two populations of granules. Magnification 10,000.

observed of the pigment-containing granules isolated from black chicken feathers by boiling in 2.5 *N* sodium hydroxide; the removal of some material was evident along the major axes of the granules. The pigment-containing granules, free from keratin impurities, could be isolated if, in addition to the milder reagents listed in Table 1, use was made of enzymic digestion (2) to remove such histological components, of hairs or feathers, which may resist the action of keratinolytic media (5, 7, 10). However, this is an additional complication which is not necessary in the case of PHT method; consequently, this latter method was adopted in all experiments described below.

Electron microscopy of the pigment-containing granules isolated by the PHT method. The pigment-containing granules were isolated from five mammalian materials and twenty samples of feathers, and relevant data are collected in Table 2.

The shapes of granules from mammalian hair are similar to those described before (6) and their dimensions generally fall within the same range. However,

the pigment-containing granules isolated from the skin of grey Fin Whale and the black tail hair of Cow (see fig. 2) show higher width length ratios, 0.7 and 0.67, respectively. Two populations of granules were isolated from black hairs of Cat. The data on the granules isolated from Hedgehog quill are of some significance in the x-ray diffraction studies of keratin (6). The granules separated from feather show generally lower width length ratios (0.27 to 0.10, for Helmeted Guinea Fowl and Mallard (see fig. 3), respectively) except for the black feather of Pigeon (see fig. 4) which yielded two populations of granules. Generally, the lengths of the major axes of pigment-containing granules vary from 1.76 μ to 0.76 μ (for Dipper and Crowned Crane, respectively), and those of the minor axes from 0.36 μ to 0.12 μ (for Dipper and Mallard, respectively).

No simple relation was found between the shape and the dimensions of pigment-containing granules and the apparent colour of hairs or feathers, from which they were isolated; this is in agreement with the previous work of Laxer *et al.* (6).

TABLE 2. Dimensions of PHT-isolated pigment-containing granules.

Source		Length			Width			Width/length ratio		
Fibre/Feather	Co'our	μ	No. measured	C.V. %	μ	No. measured	C.V. %	W/L	No. measured	C.V. %
Cat	Black	0.85	50	33.3	0.23	50	9.6	0.27	50	34.3
		0.84	28	29.9	0.17	28	10.6	0.20	28	31.9
Hedgehog quill	Dark brown	0.74	243	20.3	0.26	312	16.9	0.35	204	20.8
Dog	Black	0.65	75	17.6	0.25	75	17.3	0.38	75	19.9
Finwhale (skin)	Grey	0.64	79	19.6	0.45	79	16.9	0.70	79	23.5
Cow (tail)	Black	0.45	73	15.0	0.30	73	17.1	0.67	73	21.6
Dipper	Dark brown	1.76	17	22.5	0.36	17	24.6	0.20	17	26.1
Red grouse	Black	1.52	16	17.9	0.28	16	13.5	0.18	16	21.0
Budgerigar	Black	1.38	30	21.2	0.20	30	19.1	0.14	30	22.9
Black grouse	Dark brown	1.37	24	23.8	0.20	24	10.6	0.15	24	29.5
Red grouse II	Mottled black/brown	1.33	33	27.0	0.27	33	16.9	0.20	33	39.1
Amazon parrot	Black	1.33	60	15.9	0.31	60	14.0	0.23	60	20.9
Lapwing II	Brown	1.31	61	15.6	0.16	61	23.6	0.12	61	31.2
Golden pheasant	Mottled black/brown	1.28	23	14.4	0.30	23	16.7	0.23	23	16.3
Delamere whydah	Black	1.28	120	16.0	0.24	120	13.1	0.19	120	17.7
Arctic skua	Brown	1.22	47	19.3	0.22	47	16.6	0.18	47	32.8
Oyster catcher	Dark brown	1.20	81	16.8	0.27	81	12.8	0.22	81	19.9
Glossy ibis	Dark brown	1.14	28	14.7	0.30	28	19.0	0.26	28	19.7
Mallard	Light brown	1.13	55	18.3	0.12	55	12.3	0.10	55	22.6
Chicken	Black	1.08	51	24.6	0.27	51	14.7	0.25	51	30.3
Sparrow-hawk	Brown	1.04	50	17.0	0.16	50	17.6	0.15	50	26.2
Jay	Black	0.93	69	23.6	0.18	69	23.5	0.19	69	20.4
Helmeted Guinea fowl	Black	0.93	67	21.2	0.25	67	17.0	0.27	67	32.0
Pigeon	Black	0.87	64	20.7	0.27	64	32.9	0.31	64	18.1
		0.57	67	16.6	0.39	67	19.0	0.68	62	28.4
Pea fowl	Black	0.86	64	17.3	0.17	64	31.5	0.20	64	32.2
Crowned crane	Black	0.76	55	21.2	0.16	55	19.5	0.21	55	28.1

The authors wish to thank Professor B. B. Bohren and Mr. A. O. T. Charles for making it possible to examine the results of their unpublished work.

REFERENCES

- BARNICOT, N. A., BIRBECK, M. S. C., and CUCKOW, F. W., *Ann. Human Genetics* **19**, 231 (1955).
- BIRBECK, M. S. C., MERCIER, E. H., and BARNICOT, N. A., *Exptl. Cell Research* **10**, 505 (1956).
- BUSS, E. G., Thesis, Purdue University, U.S.A. 1949.
- DALTON, A. J. and FELIX, M. D., *Pigment Cell Growth*, p. 267, Ed. by M. GORDON, Academic Press Inc., New York 1953.
- GRALÉN, N., *Biochim. et Biophys. Acta* **6**, 497 (1951).
- LAXER, G., SIKORSKI, J., WHEWELL, C. S., and WOODS, H. J., *Biochim. et Biophys. Acta* **15**, 174 (1954).
- LINDBERG, J., PHILIP, B., and GRALÉN, N., *Nature* **162**, 458 (1948).
- MASON, H. S., KAHLER, H., and MACCARDLE, R. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **66**, 421 (1947).
- ROGERS, G. E. and HORNE, R. W., *Ann. Conf. of the Electr. Microsc. Group of the Inst. of Phys.*, summary by CHALLICE, C. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **7**, 89 (1956).
- SCHURINGA, G. J. and ALGERA, L., *Biochim. et Biophys. Acta* **6**, 497 (1950).
- SHACKLEFORD, R. M., *Genetics* **33**, 311 (1948).

Über den Feinbau der Spinnenfäden

R. LEHMENSICK und E. KULLMANN

Zoologisches Institut der Universität Bonn, Parasitologische Abteilung

Das Netz der Spinnen besteht aus feinsten Fäden unterschiedlicher Qualität. Die fädigen Elemente des Grundbaues (Radial- und Rahmenfäden) sind glatt. Über dieses Gerüst ist der Fangfaden meist in Form einer Spirale aufgezogen. Dieser Faden ist so beschaffen, daß die Beutetiere, sobald sie mit ihm in Berührung kommen, hängen bleiben und dadurch von dem räuberischen Hersteller überwältigt und ausgesaugt werden können.

Wir unterscheiden 2 Gruppen der *Araneae*: die *Ecribellata* und die *Cribellata*. Während die ersteren zur Erzeugung des Spinnfadens am Abdomen lediglich Spinnwarzen besitzen, die in 3 Paaren zu einem Spinnfeld vereinigt sind, haben die Cribellaten zusätzlich ein Feld mit vielen feinen Spinn-Düsen, das *Cribellum* (s. Abb. 1a) und am Metatarsus einen aus Borsten gebildeten Kamm, das *Calamistrum* (Abb. 1b). — Die Fangfäden dieser beiden Spinnenarten unterscheiden sich im Aufbau erheblich. — Der Fangfaden der Ecribellaten besteht aus einem Achsenfaden als Grundelement, auf dem eine Klebsubstanz in Form feinsten Tröpfchen aufgetragen ist.

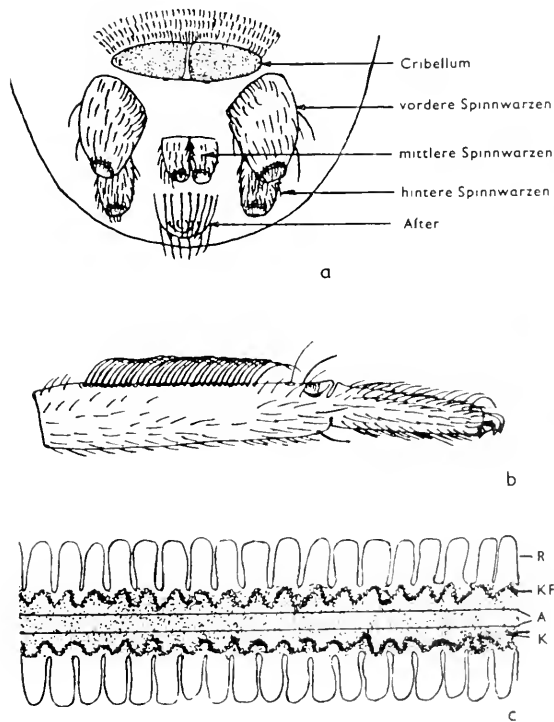


Abb. 1. Spinnwerkzeuge und Fadenschema der Cribellaten. a) Spinnfeld mit Cribellum; b) Tarsus und Metatarsus des 4. Beines mit Calamistrum (a und b von *Dictyna viridissima* aus Kükenthals Handbuch der Zoologie); c) Fangfaden von *Meneus* (nach Akermann).

Der Fangfaden der Cribellaten hingegen hat eine viel kompliziertere Struktur. Die lichtmikroskopische Analyse seines Feinbaus stößt auf so große Schwierigkeiten, daß es bis jetzt noch nicht gelungen war, eine eindeutige, klare Vorstellung davon zu entwickeln. Das heute am meisten anerkannte Bau-Schema stammt von Akermann (s. Abb. 1c); auf 2 Achsenfäden (A) ist eine Klebmasse in Bandform aufgetragen (K), die beidseitig von je einem feinen Kräuselfaden (KF) begrenzt wird. Den seitlichen Abschluß bildet jederseits ein regelmäßig gewellter Randfaden (R). Die Natur des Klebbandes mit seinen paarigen Kräuselfäden war aber bis heute sehr umstritten, und es schien mir daher lohnend, mit Hilfe des Elektronenmikroskopes eine Klärung zu suchen. Zusammen mit meinem Schüler und Mitarbeiter Herrn E. Kullmann habe ich begonnen, dieses Problem einer Lösung zuzuführen und möchte Ihnen hier unsere gemeinsamen Ergebnisse mitteilen.



Abb. 2. Fangwolle von *Hyptiotes paradoxus*. Vergrößerung: El.-opt. 11300, total 56000.

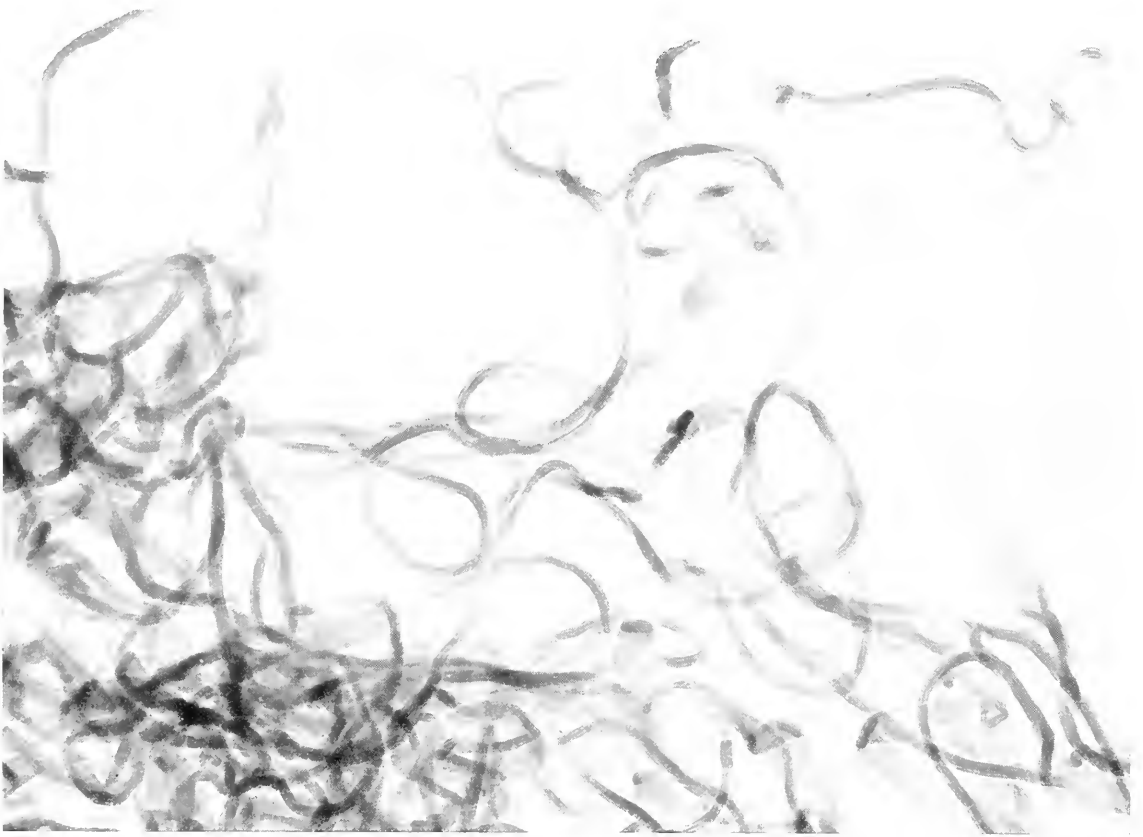


Abb. 3. Fangwolle von *Filistata insidiatrix*. Vergrößerung: El.-opt. 11300 \times , total 31000 \times .

Für die Untersuchung wurden die Netze auf einer siebartig durchlöchernten Plexiglasplatte aufgefangen. Die einzelnen Fäden, soweit sie die Löcher des Siebes frei überspannen, können dann unter dem Binokular leicht auf unbefilmte Netzblenden aufgetragen und ohne weitere Präparation eingeschleust werden. Durch diese höchst einfache Technik bleibt die natürliche Struktur des Objektes (von einigen gelegentlichen Zerrungen abgesehen) unverändert.

Die Fäden der cribellaten Spinnen ergaben zunächst keine sehr ermutigenden Bilder, weil sie sich als undurchstrahlbar erwiesen. Wenn man aber ein Netz über Wochen unberührt in möglichst staubfreier Umgebung hängen läßt, beginnen sich die Fäden aufzuspalten. Hierbei zeigt sich dann, daß sie aus einer großen Zahl von Elementarfäden bestehen, die fest miteinander verklebt sind.

Sehr viel interessanter gestaltete sich die Analyse der Fangfäden cribellater Spinnen. Das elektronenoptische Bild der Klebmasse (K) des Schemas (Abb. 1c) bot eine besondere Überraschung. Die „Klebmasse“ erwies sich als eine aus feinsten Fäden gebildete „Fangwolle“ (Abb. 2). In diesem Filz verstricken sich die Opfer mit ihren Borsten und bleiben darin wie an einem Leim hängen. — Damit bestätigt sich eine alte Vermutung Bertkaus, der bereits Ende des

vorigen Jahrhunderts auf Grund logischer Überlegungen zu der Überzeugung gekommen war, daß die Klebmasse der Cribellaten eine feinfädige Struktur haben müsse. Er konnte sich mit dieser Vermutung aber nicht durchsetzen. — Betrachtet man die Elementarfäden dieser Wolle genauer, so erkennt man deutlich, daß sie eine perlschnurartige Eigenstruktur besitzen. — Die weiteren Untersuchungen ergaben, daß, wie zu erwarten war, alle von uns daraufhin angesehenen Spinnen dieser Artengruppe als „Klebmasse“ eine „Fangwolle“ produzieren, die im Prinzip stets den gleichen Grundaufbau hat. Es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß sie im wesentlichen das Produkt des *Cribellums* ist, welche mit Hilfe des *Calamistrums* in der eigenartigen Form auf die Achsenfäden aufgetragen wird.

Bei *Uloborus spec.* und *Dictyna latens* sind die Elementarfäden fast genau so gebaut wie bei *Hyptiotes*. Auch ihre Maße liegen in gleicher Größenordnung (0,01–0,02 μ). — Es kommt zuweilen vor, daß die Elementarfäden teilweise zu Bändern und kleinen Platten verklebt sind, ein Phänomen, das interessante Rückschlüsse auf die Bildungsweise der Wolle zuläßt. Die aus einer Düse austretende Faden substanz bleibt offenbar nur dann als distinkter Faden erhalten, wenn sie sofort erhärtet. Verzögert sich



Abb. 4. Bandförmiger Fangfaden von *Loxosceles rufescens*. Vergrößerung: El.-opt. 5700 , total 25500 .

dieser Härtungs-Prozeß, dann verkleben diese Fäden mehr oder minder fest miteinander, so daß eventuell richtige Schleier entstehen. Vielleicht ist aber auch eine zusätzliche dünnflüssigere Substanz im Spiel. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Spinnen einen gewissen Einfluß auf diese Prozesse nehmen und dadurch „willkürlich“ den Fäden einen unterschiedlichen Charakter verleihen können. — Besonders interessant sind die Elementarfäden von *Filistata insidiatrix* (Abb. 3). Sie sind nicht rund und perlschnurartig, sondern haben die Form schmaler Bänder. Irgendwelche Strukturen, die den Knötchen der Elementarfäden vorgenannter Spinnen entsprechen, kann man nicht an ihnen entdecken. Es ist anzunehmen, daß die Struktur der Elementarfäden u. a. abhängig ist von den Dimensionen der Austrittsöffnung und der Viskosität der die Fäden bildenden Drüsensubstanz. — Die Elementarfäden scheinen bei aller Zartheit auch noch eine gewisse innere Eigenstruktur zu besitzen: einige haben nämlich eine wellige Grundform, andere sind ausgesprochen gradlinig gebaut. Das Farbenspiel bei Betrachtung mit gekreuzten Nicols im Polarisationsmikroskop verrät, daß sie alle geladen sind mit inneren Spannungen. Diese Verhältnisse ermöglichen es wahrscheinlich, daß die zarten „Wollhaufen“ über viele Tage selbst im wechselvollsten Mikroklima ihre lockere Struktur beibehalten und funktionstüchtig bleiben.

Die in den Mittelmeerländern heimische cribellate Spinne *Loxosceles rufescens* lebt am Boden und fertigt ein eigentümliches Fanggewebe an, dessen Elemente mit ihrem bläulichen Schimmer schon mit

bloßem Auge mehr an die Fäden cribellater Spinnen erinnern. Es ist Herrn Kullmann gelungen, diese Spinne in Sardinien zu finden und lebend mit nach Bonn zu bringen, so daß wir auch ihre Fäden untersuchen konnten. Wie Abb. 4 zeigt, besteht dieses Fanggewebe aus breiten Bändern, die sehr den Elementarfäden von *Filistata* ähneln. Diese Bänder sind freilich um vieles breiter, aber ihre Dicke beträgt ebenfalls 0.02μ . Sie weisen eine sehr interessante Längsstruktur auf, die vielleicht mit der Entstehungsweise aus Einzelfäden zusammenhängt. — Damit rückt *Loxosceles* auch von dieser Seite her in nahe Beziehungen zu den Cribellaten.

Diese unsere ersten, naturgemäß noch sehr lückenhaften Ergebnisse zeigen, daß eine solche elektronenoptische Analyse imstande ist, Beiträge zu allgemeinen biologischen und systematischen Problemen zu liefern. Die Ergebnisse können andererseits aber eines Tages auch wertvolle Erkenntnisse für die Praxis der Herstellung feinsten Kunstfäden bringen.

Die elektronenoptischen Aufnahmen stammen aus dem Labor für angewandte Übermikroskopie in Bonn. Wir sprechen seinem Leiter, Herrn Dr. Wohlfarth-Boettermann und seinen Mitarbeitern für die Anfertigung der Aufnahmen unseren herzlichsten Dank aus.

LITERATUR

1. AKERMANN, *Ann. Natal Muscum* 5 (1926).
2. BERKEAU, *Wiegmann Arch. Naturgeschichte* 48 (1882).
3. COMSTOCK, *The Spider Book*, New York, 1912.
4. KÄSTNER, *Küntenhals Handbuch der Zoologie* 3 (1941).
5. NIELSEN, *The Biology of Spiders*, Copenhagen, 1932.
6. PEETERS, *Z. Naturforsch.* 10 b (1955).

XIV

METALLOGRAPHY AND OTHER INDUSTRIAL
APPLICATIONS

Direct Observation of Dislocations and Their Movement in Metal Foils

P. B. HIRSCH, R. W. HORNE, and M. J. WHELAN

Cavendish Laboratory, Cambridge

IN order to explain the low values of the shear stress required to start plastic flow in metal crystals, it is necessary to postulate the existence of a lattice imperfection, known as a dislocation. There is a considerable amount of indirect evidence from etching and precipitation experiments (9, 13) that such imperfections exist in metal crystal, whilst for inorganic crystals such as AgBr and NaCl (1, 5) the dislocation networks may be decorated by various techniques and made visible under the optical microscope. However no similar direct observations have been made on metals, simply because it is not possible to examine interior structures with optical techniques. It occurred to the authors that much useful information on the arrangement and movement of dislocations in metals might possibly be obtained by examining thin foils directly in the electron microscope. Electron optical transmission experiments with gold foils had shown that the contrast was essentially due to Bragg scattering which is structure sensitive. It was therefore thought that dislocations might be made visible by virtue of their strain fields. This paper is a short account of some observations on dislocation distributions and movement in aluminium foils. A fuller account is published elsewhere (8).

Aluminium was used in this work on account of its transparency to electrons, and also because much is already known about the substructures formed by deformation in this metal. Beaten foils $\frac{1}{2} \mu$ thick, either cold worked or annealed at 350 C *in vacuo*, were etched in

dilute hydrofluoric acid. The foils were examined directly in the Siemens and Halske "Elmiskop 1" operating at 80 KV at an instrumental magnification of 40,000 \times .

Evidence for the visibility of dislocation lines.— Figs. 1–5 show some typical micrographs obtained. The following facts leave little doubt that individual dislocation lines are being observed.

(a) Fig. 1 shows that the specimens contain a substructure of subgrain diameter about 1μ . The misorientations across the boundaries have been determined by diffraction experiments and are found to be about 1° or 2° . Fig. 2 shows a typical boundary under higher magnification, showing that it is possible to resolve individual dislocations in the boundaries. An interpretation in this case is that this is a simple (110) tilt boundary consisting of edge dislocations traversing the foil. Microdiffraction patterns show that the foil has a strong preferred orientation with a [100] cube axis normal to its surface. This orientation is favourable for the formation of (110) tilt boundaries normal to the foil. Examples are observed of subgrain boundaries traversing the foil at an angle, in which the three dimensional character of the dislocation networks is evident.

(b) The dislocation density estimated from several micrographs similar to fig. 2 is about 10^{10} per sq.cm. This is in good agreement with previous estimates from x-ray evidence (4, 7), and with the average misorientation angles 1° or 2° observed from diffraction patterns.

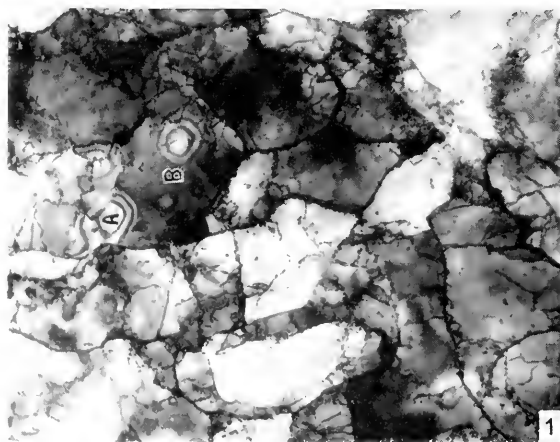


Fig. 1. Subgrains in cold beaten Al. The average subgrain size is about 1μ , the average angular misorientation about $1\frac{1}{2}^\circ$. The dislocation density is 10^{10} per sq.cm. Extinction contours due to large range strains are shown at A and B. Magnification 12,000.



Fig. 2. A sub-boundary consisting of uniformly spaced dislocations. The average spacing of the dislocations is about 175 Å. Magnification 120,000.

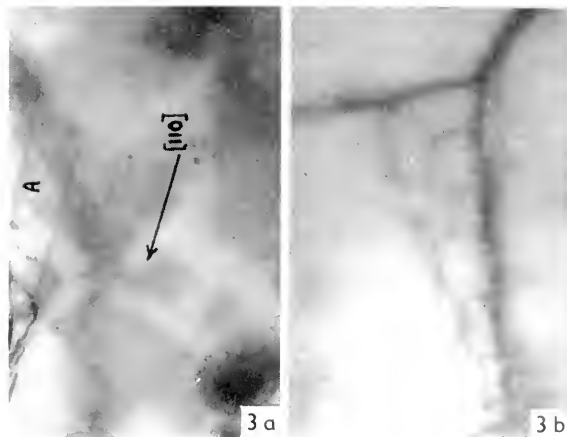


Fig. 3(a). An example of a square cross-grid of screw dislocations forming a twist boundary on (100). Dislocations come to an end on the surface at A. Magnification 100,000.

Fig. 3(b). A hexagonal network of dislocations. Magnification 200,000.

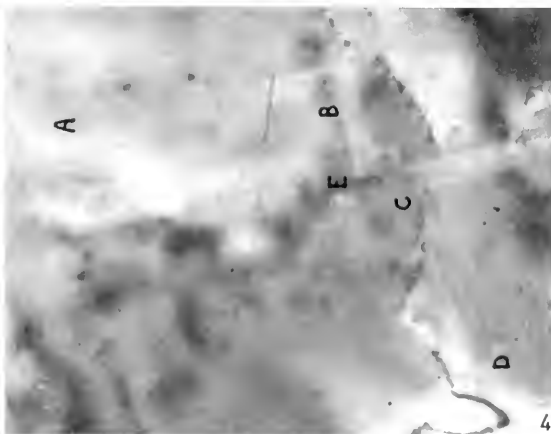


Fig. 4. Fast dislocation slip trace showing cross-slip. The dislocation penetrated the boundary at C. CD is another slip trace with the dislocation held up at D. Magnification 60,000.

(c) Some of the arrangements of lines can be explained readily on dislocation theory (see below), but not on any other basis known to the authors.

(d) On tilting the illumination or the specimen through small angles, the lines remain fixed in position, although the contrast changes. This shows that the lines are a definite property of the specimen.

(e) When working with large beam current densities the lines are observed to move; the movement occurs along straight lines parallel to the traces of (111) slip planes, fig. 4.

Contrast mechanism.—The differences in contrast between one subgrain and another are due to differences in intensities of Bragg reflections caused by the small misorientation angles. This is easily demonstrated by tilting the object in a stereo holder through an angle of 1° or 2° , when it is possible to illuminate grains which were originally dark and vice versa. The thickness of the foil is sufficient (about 500 \AA) for the scattering of electrons to be dynamical, and depending on the orientation much intensity may be abstracted from the direct beam and the

low angle scattering by intense Bragg reflections. Owing to the physical objective aperture (30μ in these experiments) these Bragg reflections do not contribute to the image and such a subgrain appears dark, see fig. 5 (a) and (b).

It will also be noticed that the boundaries and the dislocation lines are darker than the surrounding regions. The dislocation line contrast was at first thought to be due to impurities, but similar observations on high purity foils eliminate this effect. It is now thought that the contrast is again due to increased Bragg reflection from the strained region around a dislocation line. It is known that the introduction of a simple dislocation into an otherwise perfect lattice can produce diffuseness of the reciprocal lattice points (14). The dark appearance of the dislocation lines in bright field is therefore due to an increased probability of reflection into several Bragg reflections from the strained region around the dislocation. This is shown schematically in fig. 6.

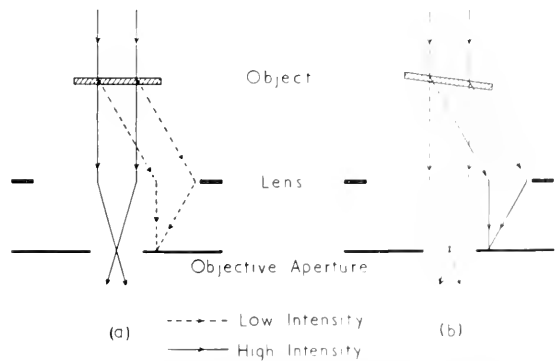


Fig. 5(a) and (b). Illustrating Bragg contrast between subgrains. (a) Grain appears light. (b) Grain appears dark.

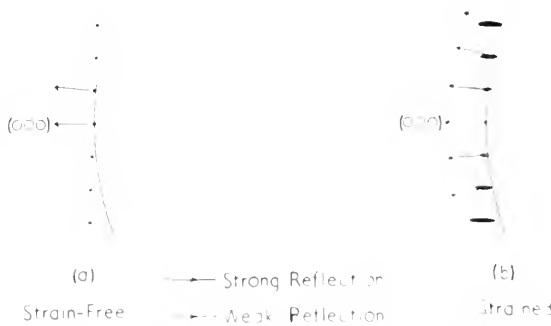


Fig. 6(a) and (b). Schematic diagram of the reciprocal lattice and reflecting sphere, showing how the strain field of a dislocation may produce increased Bragg scattering. (a) A strain-free region may only give rise to one or two strong Bragg reflections. (b) A strained region may give rise to several strong reflections.

TABLE 1. *Summary of results of boundary misorientation measurements in three cases.*

Plate numbers	Normal to foil	Type of boundary assumed	Rotation axis	Component angle of rotation	Calculated dislocation spacing	Observed approximate spacing of dislocations	Resolution
94, 95	[001]	(110) Simple tilt	$[\bar{1}12]$	2.1°	80 Å	130 Å	Poor
293, 294, 296	[001]	(211) Mixed tilt	$[0\bar{1}1]$	1.36°	94 Å	100 Å	Good in places
299, 300, 302	[001]	Hexagonal network near (111). Twist boundary	[111]	0.35°	270 Å	300 Å	Fair

Dark field experiments, in which the $30\ \mu$ objective aperture is moved to accept several Bragg reflections in turn, have shown that the contrast is reversed, and that the dislocations and boundaries are illuminated usually in several Bragg reflections, whereas strain free areas show up in only one or two reflections. The contours visible at A and B in fig. 1 are extinction contours first studied by Heidenreich (6). It is thought that these may be due to bending in the foil produced by large range strains in otherwise perfect grains.

Arrangement of dislocations.—The direct observations of dislocations in the subgrain boundaries enable dislocation theory to be checked quantitatively. For a complete discussion of networks and boundaries in face-centred cubic crystals references should be made to Frank (3), Ball and Hirsch (2), and Amelinckx (1). Dislocation theory predicts that simple boundaries may be considered as surface arrays of dislocations. A probable example of a simple (110) tilt boundary has already been given in fig. 2. This type of boundary contains dislocations of one of the twelve cubic slip systems only. More complicated boundaries may contain dislocations from two or more slip systems. Fig. 3 (a) shows an example of a simple twist boundary on (100), consisting of a crossed grid of screw dislocations. The crystallographic orientation of this field of view was determined by diffraction. The normal to the foil was close to [100] and the lines run parallel to [110] directions. The network therefore makes a shallow angle with the surface. It can be seen at A that dislocation lines end on the surface.

Another network, predicted theoretically (3) and observed extensively in AgBr and NaCl crystals (1, 5), is a hexagonal network of screw dislocations lying in a (111) plane, forming a twist boundary. Fig. 3 (b) shows a small piece of hexagonal network in aluminium. Large hexagonal networks are not observed, presumably because the foil is thin and areas of [111] orientation are rare because of the preferred orientation.

Experiments have been performed to check the theory quantitatively by microdiffraction by selecting a small area across a subgrain boundary. From the splitting of the diffraction spots it is possible to obtain the component misorientation angle about the axis of the instrument. A high resolution micrograph often enables the type of boundary to be determined. This is possible when the resolution is particularly good and when interference effects produced by the overlap of crystals at the boundary are absent. These interference effects produce fringes at the boundary, which tend to mask partially or completely the dislocation network. Table 1 contains a summary of the results obtained in three cases. The dislocation spacing, calculated from the observed misorientation angle and the assumed network, is compared with the approximate observed spacing. In these three cases the type of boundary present is only tentatively proposed. In the first two cases the boundaries were inferred from the trace of the boundary plane. In the third poorly resolved hexagons could be seen. It is seen that there is agreement to a factor of 1.5. This is evidence in favour of dislocation theory, and shows that the boundaries do contain dislocations of unit Burgers vector.

Movement of dislocations.—When working under fine focus illumination conditions with the double condenser lens, dislocations are observed to move. The reason for the movement is not at present clear, but it is thought that it may be due to a combined effect of heating and straining due to thermal gradients in the specimen. The temperature rise in the object is not known. The first indication of movement is that certain lines bow out. This is presumably direct confirmation of the mechanism suggested for the decrease in elastic modulus due to dislocations (11). Two types of movement can be observed. The first is slow and jerky, probably requiring considerable cross-slip and climb, which possibly corresponds to creep.

The second type of movement is very fast and usually it is only possible to observe the appearance

of the band of contrast left after the dislocation has passed. Ciné film measurements have shown that these bands appear in less than $\frac{1}{30}$ second. Fig. 4 is a typical example of fast movement. Here a dislocation has approached a boundary along AB, cross-slipped several times, and eventually penetrated the boundary at C. Another fast dislocation has left the boundary at C and can be seen held up at the end of the slip-trace CD. The interpretation of the bands is that the dislocation leaves evidence of its passage on the slip plane, and that the width of the band is due to the finite thickness of the foil. In most areas, such as in fig. 4, the normal to the foil is [100] so that the thickness of the foil is roughly equal to the width of the slip-trace. Measurements of the slip traces gives a thickness of roughly 500 Å in an average area of the foil. The directions of the slip traces have been determined by diffraction, and are known to be parallel to the traces of the (111) slip planes in aluminium. At points such as E the dislocation is observed to transfer from one slip plane to another. This is direct evidence of the correctness of the Mott-Frank mechanism of cross slip of a screw dislocation (10).

Slip trace contrast.—The band of contrast left by a moving dislocation slowly fades, and in about 10 seconds has completely disappeared. The disappearance rate is higher at the larger illumination intensities obtained under fine-focus illumination conditions. The contrast may be either lighter or darker than that of the surrounding region, and is more intense near the edges of the slip trace, i.e. at the surface of the foil (fig. 4). This contrast is tentatively interpreted in terms of the generation of point defects by moving dislocations (12). A dislocation line containing jogs may generate vacant lattice sites and interstitial atoms by non-conservative motion of these jogs. It is thought that the short range strain fields associated with a distribution of vacancies or interstitials on the slip plane may give rise to Bragg contrast in a manner similar to the strain field of a dislocation. Some preliminary observations indicate that the contrast is also reversed in dark field illumination. The disappearance of the slip trace contrast would then be due to the diffusion of the defects away from the slip plane. A calculation shows that the right order of magnitude for the persistence time is obtained for vacancies if the temperature is of the order of 100 to 200 C. The more intense contrast at the edges of the band may be due

to the larger number of defects generated near the oxide film, or due to the stresses set up by the interaction of the oxide film with a dislocation trying to penetrate the surface. (*Note in proof.*—Recent observations have shown that the slip trace contrast is due to this latter mechanism, and not to point defects.)

Conclusion.—There is little doubt that it is possible to examine the dislocation structure of metals directly by transmission electron microscopy. This study of aluminium foils has shown that the ideas of dislocation theory applied to networks and surface arrays are essentially correct. Moreover it has shown in the case of aluminium, typical of a well polygonised metal, that most of the dislocations are in the boundaries even in the cold worked state, and very few dislocations remain inside the subgrains. It should be possible to extend these observations to other metals. Some preliminary observations on Pd, Au and Ag foils show that similar dislocations are visible, and it is also possible to see their movement.

Many of the effects observed during movement of dislocations are complicated and not completely understood. It has not yet been possible to locate dislocation sources, although expanding loops are often observed. It is however clear that dislocations come out of the boundaries. Some slip traces are observed to terminate at the boundaries while others penetrate them. The detailed movement of the dislocations in aluminium has been recorded on 16 mm ciné film.

REFERENCES

1. AMELINCKX S., *Phil. Mag.* **1**, 269 (1956).
2. BALL, C. J. and HIRSCH, P. B., *Phil. Mag.* **46**, 1343 (1955).
3. FRANK, F. C., Report of Bristol Conference, 1954, 159. *Proc. Phys. Soc.* (1955).
4. GAY, P., HIRSCH, P. B., and KELLY, A., *Acta Met.* **1**, 315 (1953).
5. HEDGES, J. M. and MITCHELL, J. W., *Phil. Mag.* **44**, 223 (1953).
6. HEIDENREICH, R. D., *J. Appl. Phys.* **20**, 993 (1949).
7. HIRSCH, P. B., *Acta Cryst.* **5**, 172 (1952).
8. HIRSCH, HORNI and WIELAN, *Phil. Mag.* **1**, 677 (1956).
9. LACOMBE, P. and BLAUJARD, L., *Rev. mét.* **45**, 317 (1948).
10. MOTT, N. F., *Proc. Phys. Soc. B* **64**, 729 (1951).
11. — *Phil. Mag.* **43**, 1151 (1952).
12. SEITZ, F., *Advances in Physics* **1**, 43 (1952).
13. WILSDORF, H. and KUEHMANN-WILSDORF, D., Report of Bristol Conference, 1954, 175. *Proc. Phys. Soc.* (1955).
14. WILSON, A. J. C., *Research* **2**, 541 (1949).

Dislocations in Stainless Steel

W. BOLLMANN

Battelle Memorial Institute, Geneva

THE first experiments on the study of metals by electron microscopy in transmission were undertaken by Heidenreich (5) on aluminium- and aluminium-4 % copper alloy; he mainly investigated cold working and the formation of precipitates using an electropolishing technique for the preparation of the specimen. In the same paper, this author gives a theory on some diffraction effects occurring in the electron microscopy of thin crystal foils.

Castaing (3) used, in addition to the electropolishing, an ion bombardment for the preparation of transparent specimens of the same metals as studied by Heidenreich.

The present work was undertaken with the aim of studying creep in certain austenitic temperature-resistant steels. To develop the preparation technique, (18 %) chrome- (8 %) nickel-steel was chosen.

The raw specimen, a circular disc (2 cm diameter, 0.2 mm thick) insulated around the edge with varnish was attacked electrolytically from both sides. The cathodes consisted of pointed electrodes which were insulated except for the points. At the start the electrodes were placed at a distance of 1–2 mm from the disc and the attack was continued up to the moment when a central hole appeared. Then the cathodes were placed at about 1 cm from the specimen. Under these conditions, the

specimen was preferentially attacked near the insulated edge and there a second hole opened. The attack was continued until the space between the two holes was about 1 mm. Then the current was applied in pulses up to the moment when the two holes joined. In that region the specimen showed fairly large areas which could be observed by transmission.

The electrolytic solution consisted of 40 % sulfuric and 60 % orthophosphoric acid. The current applied was about 3 amp.

Much attention had to be paid to the cleaning of the specimen; it was rinsed as soon as possible, first in hot running water, then in a hot sequestrol solution in order to dissolve all the salts and finally in hot distilled water.

Experiments with ion bombardment.—Some experiments were undertaken to apply the method of Castaing (3) on stainless-steel specimens. In the first trials the ion bombardment was applied through a small ion gun (ca. 1 μ A 1500 Volt). The ions of air and of pure nitrogen produced a strong corrosion of the specimen; so the experiments were continued with argon. Here, the specimen was directly placed as cathode into a gas-discharge. The current in this gas discharge proved to be practically independent of the gas pressure in a wide range (1–0.05 mm Hg). As the current density is the product of the ion density multiplied by the mean velocity of the ions, this ve-

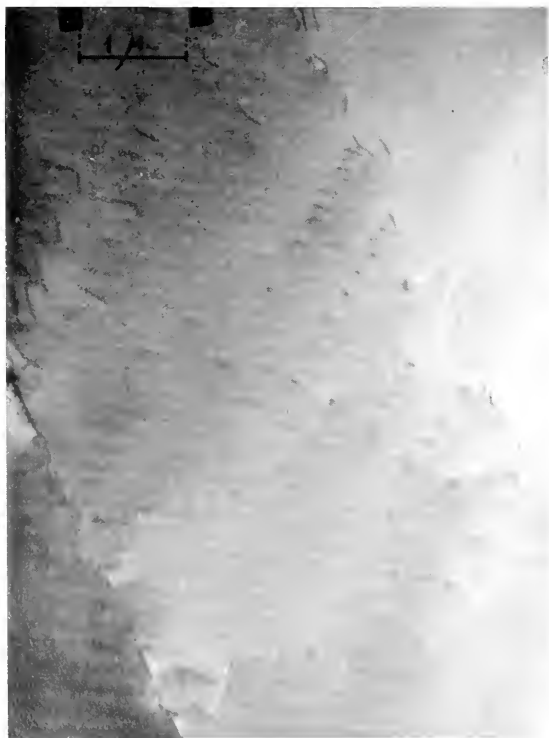


Fig. 1. Rows of dislocation lines crossing a steel foil (piled up against obstacles).



Fig. 2. Network of dislocation lines in lightly rolled steel.

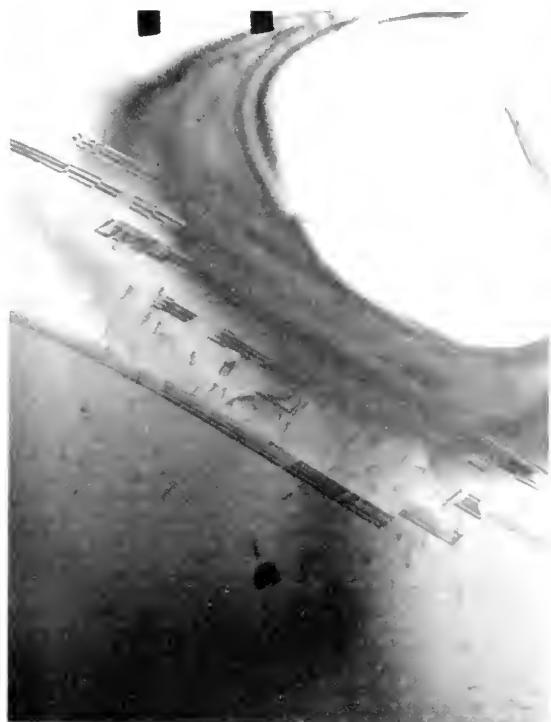


Fig. 3. Stacking faults.



Fig. 4. Steel reduced 25 % by rolling.

locity increases with decreasing gas pressure (because the ions suffer a smaller number of collisions with gas atoms). With increasing mean velocity the mean energy of the ions impinging the surface also increases. High energetic ions strike out of the specimen a large number of atoms per ion, producing in this way small holes. Therefore, the lower the gas pressure, the rougher will the treated surface become. Thus the strength of the attack can be regulated by varying the gas pressure.

For our purposes, the ion bombardment did not present an advantage. The smoothest surface was obtained directly by electropolishing. The importance of ion bombardment for the work of Castaing on Al-4% Cu alloy seems to lie, at least partially, in the fact that the Al is preferentially electropolished (as pictures of Castaing show), but that the ion bombardment released the copper preferentially from the surface. It is known that it is relatively simple to sputter (release by ion-bombardment) heavy metals such as copper, but that it is difficult to sputter aluminium because of the oxide layer (7).

Micrographic appearance of dislocations in crystal foils.—Much theoretical work has been done on dislocations in crystals to explain the behaviour of metals during plastic deformation (see 4, 6). In a plastically deformed metal, the strongly distorted regions are concentrated on definite lines, the so-called "dislocation lines". The material around these lines is more or less elastically deformed. The theory shows that the dislocation lines have to be closed

loops or have to end at the surface of the grains; they can be branched into extensive networks (figs. 1, 2).

Until recently, experimental evidence on dislocations in metals was given by etching the surface, but here only the end-points of dislocation lines appear as etchpits (2). In salts it was possible to make dislocations visible by metal precipitations (1).

The reason why dislocations can be seen directly by electron microscopy inside the material is due to the fact that diffraction effects contribute markedly to the image contrast in the electron microscopy of transparent crystal foils. As electron diffraction (Bragg condition) depends among other things on the lattice constant, a local distortion of the lattice becomes visible in suitable orientations.

Sometimes, dislocation lines appear as dotted lines. Using the dynamic theory of diffraction, Heidenreich showed that when a Bragg angle is nearly attained by the incident electrons, the brightness of the picture of a crystal foil varies periodically with growing thickness. Thus, a foil with varying thickness shows interference fringes. It can be shown from different pictures that the dotted dislocation lines might be related to these fringes. In fig. 3 interference fringes are visible both at the grain boundary and within the grains; at the same time the dislocation lines in the upper part are dotted. If the angle between the object plane and the electron beam is changed, the fringes disappear and the corresponding dislocation lines become smooth.

A stacking fault in a cubic face centered crystal is a 111-plane which is in a false position with respect to its neighbouring planes. In the case of a stacking fault, the periodicity of the crystal lattice is disturbed across an extended surface. Fig. 3 probably shows such faults. When this type of plane ends inside the crystal, its edge is a so-called "partial dislocation".

In the present work, the steel was rolled in order to produce dislocations uniformly throughout the whole specimen. The pictures show qualitatively the general effects of cold working. A detailed evaluation in terms of the theory of dislocations has yet to be made.

Fig. 1 shows how in a slightly rolled specimen (1-2% reduction in thickness) dislocation lines begin to spread out from the grain boundary along slip-planes into the interior of the grains. With heavier rolling the density of dislocation increases very fast (fig. 2). In a 25% reduced specimen the slip-planes become curved (fig. 4).

For a study on dislocations, stainless steel is convenient especially for the observation of static configurations, because the annealing temperature, where the dislocations move, is too high to be attained by heating the object by the electron beam. The situation is different with aluminium, however,

as it is possible with this metal to study dislocation movements as shown by Whelan, Horne, Hirsch (8). So, for this type of research these two materials are in some ways complementary.

The present work has been sponsored by the Union Minière du Haut Katanga and the Battelle Memorial Institute. I wish to thank Dr. W. Siegfried for having suggested the research. Our work has been undertaken and the main results have been obtained independently from the group Whelan, Horne, Hirsch. I thank Dr. P. B. Hirsch for useful discussion on the interpretation of some special points, and Dr. J. W. Menter for his criticism of the manuscript.

REFERENCES

1. AMFLINCKX, S., *Phil. Mag.* **1** (8th Series) 269 (1956).
2. BILLIG, E., Internationales Kolloquium über Halbleiter und Phosphore, Garmisch-Partenkirchen, August 1956.
3. CASTAING, R., *Rev. mét.* **52**, 669 (1955).
4. COTTRELL, A. H., *Dislocations and Plastic Flow in Crystals*. Oxford, 1953.
5. HUIDENREICH, R. D., *J. Appl. Phys.* **20**, 993 (1949).
6. READ, W. T. JR., *Dislocations in Crystals*. New York, 1953.
7. WEHNER, G. K., *Phys. Rev.* **102**, 690 (1956).
8. WHELAN, M. J., HORNE, R. W., and HIRSCH, P. B., Annual Conference of the Electron Microscopy Group of the Institute of Physics, Reading (England), July 1956.

Migrations of Grain Boundaries Studied with the Emission Electron Microscope

R. ARNAL and M. SOREL

Laboratoire d'Electronique et de Radioélectrique de la Faculté des Sciences de Paris

SINCE the growth of metallic crystals can be observed continuously with the help of cinematographic recording, it is possible to get quantitative information on the cinetics of grain boundaries.

It was noticed, some time ago, that there was a geometrical analogy between crystal boundaries and two-dimensional soap froth; in this latter case, the mechanism is well known; the equilibrium of interfaces is due to the presence of surface tensions.

To show the analogy in a better way, we have tried to observe bidimensional crystals in order to have the same conditions as for soap froth. On the other hand, when the mean diameter of crystals is smaller than the sample thickness, the growth or the disappearance of an internal crystal carries a change in topography and one can only observe secondary effects, the internal cause of which is unknown.

The emission electron microscope has been used with a small magnification (30 times for a screen distance of 70 cm) and the sample heated by electronic bombardment is about 0.2-0.3 mm thick.

On a screen (8 × 8 cm), it is possible to see several crystals the diameter of which is greater than the sample thickness. As soon as the diameter of the image of a crystal becomes greater than $\frac{1}{10}$ of the side of the screen, one can say that it is the bidimensional case.

The fluorescent screen is filmed at the rigorously constant rate of two frames per second. During the projection, the crystal growth is therefore shown ten times the speed. The luminous intensity is measured with a photomultiplier, large range variations of luminosity are balanced by a hand-regulated diaphragm.

The sample is heated by electronic bombardment and the temperature is measured by a chromel-alumel thermocouple, directly soldered on to the sample.

After testing many metals, titanium, produced by Pechiney, has proved to be the material for which the crystal growth after the phase transformation (at about 1100 C) is the quickest and the more interesting.

To sum up, in this work the emission electron microscope is not used as a magnification tool, but as a tool permitting the study of the migrations of crystal boundaries in a continuous way at a high temperature.

It has been possible to observe three kinds of recrystallisation: primary recrystallisation, secondary recrystallisation and strain-induced growth.

In about five seconds, the temperature is raised to 1100, then maintained constant during the growth. The primary recrystallisation of the β phase takes place very rapidly in these conditions (about 30 seconds). It is known that the energy necessary for this kind of recrystallisation comes first from the strain existing in the metal; then, when the grains tilt each other, the equilibrium of the boundaries is reached as a result of surface tension and the disappearance of some instable grains occurs as in a soap froth.

Then the preferential growth of a crystalline plane can be observed. This technique of filming evidently shows that the superficial energy is not the driving force of this growth; in fact, one observes "buddings" at the boundary of the growing grain. However, this migration is slow enough to allow the intercrystalline boundaries to reach equilibrium under the influence

of surface tension; therefore, grain boundaries migrate toward their centers of curvature and the shapes of metal grains are identical to shapes of cells in foams.

When this growth has stopped, the sample is cooled below the transformation temperature, then is heated again to 1100 C. The shape of the β crystals is the same as before, but the crystals are strained. So a new kind of migration appears; the boundary moves in an irregular front consisting of curved sections. The same "buddings" as those of the secondary recrystallisation are observed on the film. It does not seem to us that there is a fundamental difference between secondary recrystallisation and that kind of growth, both being induced by strain; but in the former case, the secondary recrystallisation grows among a structure of small crystals; the growth speed, induced by the residual strain, is smaller than that restoring the equilibrium of grain boundaries, and for this reason the grain boundaries move toward their centers of curvature. In the latter case, the migration, with the same characteristic buddings, does not take place in a structure of small crystals, which accounts for the boundaries migrating away from their centers of curvature.

Perlit- und Bainitgefüge in drei Kohlenstoffstählen mit 0,18 %, 0,50 % und 0,86 % C

S. MODIN

Metallografiska Institutet, Stockholm

IM Metallografischen Institut, Stockholm, werden Mikrostrukturen in Kohlenstoffstählen nach verschiedenen Wärmebehandlungen untersucht. Der vorliegende vorläufige Bericht behandelt die Strukturen in zwei untereutektoiden Stählen nach isothermer Austenitumwandlung im Vergleich mit den entsprechenden Strukturen in einem eutektoiden Stahl. In einem vorhergehenden Bericht sind die in einem eutektoiden Stahl auftretenden Strukturen schon beschrieben worden (3). Die bei der Wärmebehandlung erhaltenen Strukturen sind auf zwei verschiedene Arten untersucht worden. Einerseits wurden polierte und geätzte Schliffe im Metallmikroskop und nach Herstellung von Lackabdrücken auch im Elektronenmikroskop untersucht, andererseits wurden chemisch isolierte Karbidkörner direkt im Elektronenmikroskop abgebildet.

Präparierung.—Die Proben hatten Scheibenform mit einer Dicke von nur 0,8 mm, um eine Umwandlung bei der gewünschten Temperatur zu gewährleisten. Die Austenittemperatur war 1100 C und die Haltezeit 10 Min. Die isotherme Umwandlung erfolgte in einem Metallbad. Sie wurde durch Abschreckung in 5 %

Natronlauge abgebrochen. Nach Schleifen und mechanischem Polieren wurden die Proben geätzt: für metallmikroskopische Beobachtungen in 4 % Pikrinsäure in Ethylalkohol, für elektronenmikroskopische Untersuchungen in 2 % Lösung von Salpetersäure in Amylalkohol. Die Lackhäutchen wurden aus einer Lösung von Formvar oder Mowital, gelöst in neu destilliertem Chloroform, hergestellt. Die Konzentration der Lösung war 0,7 g Lack auf 100 ml Lösungsmittel. Vor dem Abziehen wurden diese Häutchen mit einer Kollodiumschicht verstärkt. Das Kollodium war in Amylacetat gelöst und die Konzentration war 4 %. Die Doppelhäutchen wurden in üblicher Weise unter Wasser abgezogen. Es hat sich herausgestellt, daß man bei diesem Abziehen oft auch eine Menge Zementitkörner vom Schliff mitbekommt. Man kann die Abdrücke von diesen anhaftenden Körnern durch Baden in einer verdünnten Säure befreien, z. B. in Schwefelsäure 1:20 (2).

Die Lackabdrücke wurden ohne vorhergehende Beschattung in das Elektronenmikroskop eingesetzt. Um guten Kontrast zu erhalten, ist es vorteilhaft, mit nicht zu großer Apertur im Objektiv zu arbeiten.

Die Karbidkörner wurden aus ganz umgewandelten Proben folgendermaßen chemisch isoliert: sie wurden in Salpetersäure 1:1 während ungefähr 20 Sek. getaucht. An der Oberfläche geht der Ferrit dabei in Lösung. Die Probe wurde schnell in Wasser, Alkohol und zuletzt in Amylacetat getaucht. Die an der Oberfläche der Probe



Fig. 1. Isolierter Perlitzementit. C 0,18 %. 650 C, 5 Min. Vergr. 18000

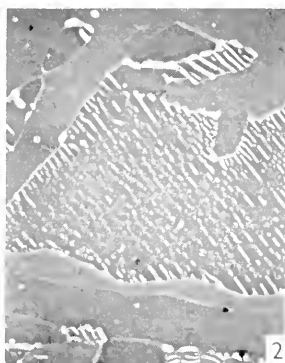


Fig. 2. Perlit und Ferrit. C 0,18 %. 650 C, 2 Min. Lackabdruck. Vergr. 3700

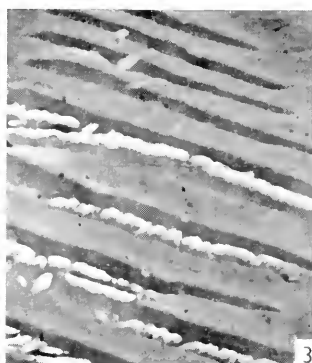


Fig. 3. Beginnende Bainitbildung. C 0,86 %. 500 C, 6 Sek. Lackabdruck. Vergr. 6000

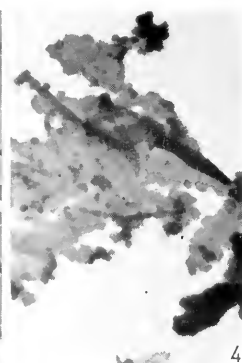


Fig. 4. Isolierter Bainitzementit. C 0,18 %. 450 C, 16 Sek. Vergr. 28000

anhaftenden Karbidkörner wurden in Amylacetat mittels Ultraschall abgeschleudert (1). Die in beschriebener Weise isolierten Karbidkörner wurden im Elektronenmikroskop untersucht.

Perlit.—Wenn Austenit sich in Perlit umwandelt, bilden sich an verschiedenen Stellen im Austenit, vorzugsweise an den Korngrenzen, Perlitgruppen (englisch „nodules“) bestehend aus mehreren Perlit-einheiten (englisch „colonies“) mit einheitlicher Lamellrichtung. Wahrscheinlich besteht jede Perliteinheit aus einem Ferritkorn. Die Lamellrichtung der Perlit-einheiten scheint meistens unabhängig von dem radialen Zuwachs der Perlitgruppe zu sein, d. h. sie bildet einen beliebigen Winkel mit ihm.

Bei sinkender Umwandlungstemperatur geht die Umwandlung schneller. Eine größere Anzahl von neuen Perlitgruppen entstehen pro Zeiteinheit, auch die Zuwachsgeschwindigkeit der Perlitgruppe steigt.

Man nimmt allgemein an, daß der Zuwachs einer Perliteinheit einerseits dadurch erfolgt, daß schon vorhandene Lamellen an der Kante in der eigenen Ebene wachsen, andererseits dadurch, daß sich neue Lamellen von Ferrit und Zementit neben den schon vorhandenen bilden.

Die isolierten Zementitkörner haben Scheibenform. Diese Scheiben sind stark zerfetzt und haben Löcher (Fig. 1). Bei sinkender Umwandlungstemperatur werden die Scheiben dünner, kleiner, werden mehr zerfetzt und bekommen mehr Löcher.

Der Perlit, der sich in untereutektoiden Stählen bildet, unterscheidet sich von dem in einem eutektoiden Kohlenstoffstahl. In solchen Stählen fängt die Umwandlung mit proeutektoidem Ferrit an. Dieser Ferrit verhindert den kugelförmigen Zuwachs von Perlit und dürfte auch hauptsächlich die äußere Form des Perlites bestimmen (Fig. 2).

Bei der Perlitumwandlung in einem eutektoiden Kohlenstoffstahl geschieht wahrscheinlich keine Veränderung in der chemischen Zusammensetzung des Austenits. Der gebildete Perlit übernimmt dessen Kohlenstoffgehalt. Bei der Umwandlung in untereutektoiden Stählen geht eine Ferritbildung der Perlit-

bildung voraus. Bei dieser Ferritbildung wird der Kohlenstoff in dem noch vorhandenen Austenit angereichert. Dieser Austenit dürfte dabei aber keinen gleichmäßig verteilten Kohlenstoffgehalt bekommen. Der Gehalt ist wahrscheinlich am höchsten an der Grenze zum Ferrit und am tiefsten in weit vom Ferrit entfernten Gebieten. Dieses Verhältnis ist auch deutlich merkbar im Perlit, der sich aus solchem Austenit bildet.

Die Struktur des Perlites ist stark abhängig von der Bildungstemperatur. Wenn Perlit sich in einem untereutektoiden Stahl unmittelbar unter A_1 bildet unterscheidet er sich nicht nennenswert in seiner Lamellenstruktur von dem, der sich in einem eutektoiden Stahl bei gleicher Temperatur bildet. Mit sinkender Umwandlungstemperatur vergrößert sich der Unterschied.

Bei untereutektoiden Stählen vermindert sich bei sinkender Umwandlungstemperatur der Zementitanteil im Perlit und damit der Kohlenstoffgehalt. Demzufolge vermindert sich auch die Menge von proeutektoidem Ferrit, während die Perlitmenge zunimmt.

Wenn der Perlit auf diese Weise mit Ferrit verdünnt wird, nimmt die Lamellenstruktur mehr und mehr ab. Statt dessen sieht man auf der Schlißfläche einen körnigen Zementit in ferritischer Grundmasse.

Die Zementitlamellen im Perlit sind deutlich dicker in der Nähe des proeutektoiden Ferrites. Oft haben sie auch einen Zementitklumpen an dem Ende, mit dem sie gegen den Ferrit stoßen (Fig. 2). Manchmal liegen mehrere solche Klumpen von Zementit so nahe aneinander, daß der proeutektoiden Ferrit und der Perlit durch eine Borte von solchem Zementit getrennt sind. Weiter weg vom Ferrit werden die Zementitscheiben dünner, da der Austenit hier geringeren Kohlenstoffgehalt gehabt hat.

Im Metallmikroskop wie auch auf den Lackabdrücken im Elektronenmikroskop sieht es aus, als ob solche dünnen Zementitscheiben in eine Reihe kleinerer Bruchstücke übergehen. Zwischen den Bruchstücken hat man Ferritbrücken (Fig. 2).

Die von einem untereutektoiden Stahl isolierten

Zementitscheiben sind oft viel dicker an dem einen Ende als am anderen. Außerdem sind die Scheiben zerfetzt und voll Löcher. Die isolierten Karbidkörner bestätigen das Zementitaussehen im Schlißbild. Ein Perlit, der im Mikroskop keinen besonders lamellaren Charakter hat, dürfte aus unvollkommenen Zementitlamellen, mit Fetzen und Löchern, in Ferrit bestehen.

Die Frage wie die Perlitumwandlung beginnt, d. h. ob der Ferrit oder der Zementit keimbildend wirkt, ist besonders untersucht worden. In eutektoidem Kohlenstoffstahl konnte sie nicht entschieden werden. Die kleinsten Perlitgruppen bestanden immer aus mehreren Ferrit- und Zementitlamellen. Die Ferrit- und Zementitlamellen scheinen gleich schnell zu wachsen.

In den beiden untereutektoiden Stählen konnte dagegen folgende Beobachtung gemacht werden. Bei der höchsten Umwandlungstemperatur 700 C sieht man im Metallmikroskop bei höchster Vergrößerung, daß der proeutektoiden Ferrit in ca 30 % der Fälle ohne sichtbare Korngrenze in Perlitferrit übergeht. Bei niedrigeren Umwandlungstemperaturen reicht das Auflösungsvermögen im Metallmikroskop nicht mehr aus, um Beobachtungen zu machen. Aus den elektronenmikroskopischen Lackabdrücken geht es doch deutlich hervor, daß der proeutektoiden Ferrit ohne sichtbare Korngrenze in 20 bis 30 % der Fälle in Perlitferrit übergeht.

In Perlitgruppen, bei denen man in der Schlißfläche keinen solchen korngrenzenfreien Übergang sehen kann, hätte doch möglicherweise ein solcher festgestellt werden können, wenn man die Schlißfläche anders gewählt hätte. Korngrenzenfreie Übergänge dürften darum sehr gewöhnlich sein.

Es liegt verlockend nahe, aus den gemachten Beobachtungen die Schlußfolgerung zu ziehen, daß der Ferrit keimbildend auf die Perlitumwandlung in untereutektoiden Stählen wirkt.

In allen den Fällen, in denen korngrenzenfreie Übergänge zwischen einer Perlitgruppe und dem umgebenden proeutektoiden Ferrit beobachtet worden sind, geht nur *ein* Ferritkorn ohne sichtbare Grenze in Perlitferrit über.

Bainit.—Der Bainit scheint sich in gewissen Kristallebenen im Austenit auszuscheiden und zu wachsen. Das ist nicht der Fall im Perlit, wo die Perlitgruppen radial wachsen, d. h. unabhängig von der Orientierung des Austenits. Die Ferritlamellen im Bainit auf beiden Seiten einer Austenitkorngrenze bilden immer Winkel miteinander.

Bei hoher Umwandlungstemperatur im Bainitbereich bildet sich in allen drei untersuchten Stählen Bainit in Federform an den Austenitkorngrenzen. Bei allmählich sinkender Umwandlungstemperatur bildet sich Bainit auch im Inneren der Austenitkörner, dann in Stäbchenform und später in Lanzettenform.

Eine Bainiteinheit scheint nie über eine Austenitkorngrenze zu wachsen. Auf beiden Seiten einer Austenitkorngrenze haben die Bainiteinheiten immer verschiedene Richtungen.

Der Bainit, der sich in untereutektoiden Stählen bildet, unterscheidet sich von dem in einem eutektoiden Stahl. Dieser Unterschied vergrößert sich bei Verminderung des Kohlenstoffgehaltes. Die Bainitstruktur wird bei sinkendem Kohlenstoffgehalt größer, wenn die Bildungsbedingungen im übrigen dieselben sind.

Die Bainitumwandlung wird in allen drei untersuchten Stählen bei allen Temperaturen mit einer Ferritbildung eingeleitet. Im eutektoiden Kohlenstoffstahl scheiden sich zuerst mehrere parallele Scheiben von Ferrit aus. Etwas später wandelt sich der an Kohlenstoff angereicherte Austenit in Ferrit und Zementit um (Fig. 3).

In untereutektoiden Stählen mit geringem Kohlenstoffgehalt ist die einleitende Ausscheidung von Ferrit sehr reichlich. Diese Ausscheidung geschieht in Widmannstättenanordnung. Zwischen diesen Ferritscheiben befinden sich Austenitgebiete, die an Kohlenstoff angereichert sind. Diese Austenitgebiete haben oft auch Scheibenform. Proben, die bei diesem Umwandlungsgrad abgeschreckt werden, haben eine lamellare Struktur, die der des Perlits ähnlich ist. Die Scheiben bestehen aber aus Ferrit und durch Abschrecken gebildetem Martensit. Wenn die Umwandlung bei konstanter Temperatur weitergehen kann, bildet sich aus dem Austenit Ferrit und Zementit. Der Ferrit scheidet sich dann ohne Korngrenze an dem schon vorhandenen Ferrit aus.

Bei sinkender Umwandlungstemperatur werden die Ferritscheiben dünner. Die Bildung von Zementit folgt schneller auf die Ferritausscheidung, d. h. der Ferritvorsprung wird kleiner. Eine ähnliche Wirkung erhält man, wenn der Kohlenstoffgehalt im Stahl zunimmt.

Die Untersuchung zeigt, daß der Ferrit keimbildend auf die Bainitumwandlung wirkt und daß der Ferrit die führende Phase ist. Der Ferrit, der sich aus dem Austenit ausscheidet, dürfte nur einen geringen Kohlenstoffgehalt haben und der Austenit reichert sich bei dieser Ferritausscheidung an Kohlenstoff an.

Die isolierten Karbidkörner sind dreidimensionale Gebilde. Von einer Scheibe mit Fetzen und Löchern wachsen in den Raum Stäbchen und Vorsprünge aus (Fig. 4).

LITERATUR

1. MODIN, HELFRID, *Jernkontorets Annaler* 139, 516 (1955).
2. — *ibid.* 139, 521 (1955).
3. MODIN, HELFRID und MODIN, STEN, *Jernkontorets Annaler* 139, 481 (1955).

Selective Oxidation due to the Heating of the Evaporated Film of α -Brass

N. TAKAHASHI and K. MIHAMA

Yamanashi University, Kofu, and Japan Electron Optics Laboratory Co., Ltd., Tokyo

It is well known that, when an alloy is heated in the air, one of the constituent metals is oxidized selectively [6]: these conditions are determined by the temperature and the pressure [3]. On α -brass, it has been known that Cu_2O is formed at a low temperature and ZnO is developed at a high temperature [6].

We have prepared the single crystal film of α -brass by evaporation *in vacuo* and we have performed the experiment on the selective oxidation by heating in the electron microscope when observing the electron microscopic and the electron diffraction images continuously. (At the place of the specimen chamber of the JEM-5 electron microscope with a four-lens system, the specimen heating or cooling adaptors can be introduced. These adaptors make it possible to study continuously the thermal change of the specimen in the ranges from room temperature to about 1000 C or from about +200 C to the liquid nitrogen temperature respectively.)

A single crystal of α -brass has been prepared by successive evaporation of copper and zinc *in vacuo* onto the cleavage surface of rock salt which was kept at about 400 C. To obtain a single crystal of α -brass, copper must be evaporated prior to zinc without breaking the vacuum.

Single crystal of α -brass.—According to the equilibrium diagram of Cu-Zn alloy, the α -phase, which is the solid solution in substitution type, exists between 0 and 40 % in weights of zinc.

Electron diffraction image of the above α -brass film at room temperature is shown in fig. 1: the plane (100) is always parallel to the cleavage surface of rock salt. Appearances of irrational spots have been observed and discussed by Brück [1], Menzer [5], Laue [4], Göttsche [2], etc. and have been recognized in the present case also. The corresponding electron micrograph is shown in fig. 2. The regions of black and white are due to the interferences of equal inclination of the illuminated electron beam for the specimen and the directions seem to correspond to [100] direction or α -brass.

Formation of Cu_2O .— Cu_2O can frequently be seen even at room temperature. The composite film of copper and zinc may be oxidized on account of the water action at the time of dissolution of rock salt.

Heating the specimen at a temperature below 300 C, Cu_2O appears as shown in fig. 3. Three relative orientations between Cu_2O and α -brass are observed, that is,

$$(001)_{\text{Cu}_2\text{O}} // (001)_{\alpha\text{-brass}} \text{ and } [010]_{\text{Cu}_2\text{O}} // [010]_{\alpha\text{-brass}}, \quad (1)$$

$$(111)_{\text{Cu}_2\text{O}} // (001)_{\alpha\text{-brass}} \text{ and } [1\bar{1}0]_{\text{Cu}_2\text{O}} // [1\bar{1}0]_{\alpha\text{-brass}} \quad (2)$$

and

$$(111)_{\text{Cu}_2\text{O}} // (001)_{\alpha\text{-brass}} \text{ and } [1\bar{1}0]_{\text{Cu}_2\text{O}} // [110]_{\alpha\text{-brass}}. \quad (3)$$

These three relative orientations are shown schematically in fig. 4. The effect of secondary scattering can be observed and it results in the appearances of irrational electron diffraction spots. The corresponding electron micrograph is shown in fig. 5. The interference fringes disappear only due to the heating,

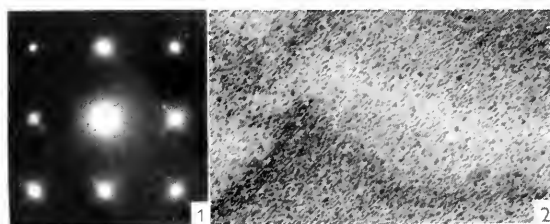


Fig. 1. Electron diffraction pattern of α -brass.

Fig. 2. Corresponding electron micrograph of fig. 1.

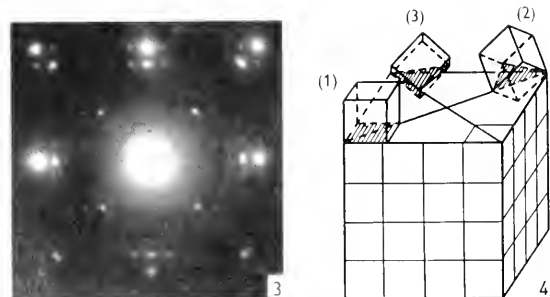


Fig. 3. Electron diffraction pattern of α -brass with Cu_2O .

Fig. 4. Three relative orientations between α -brass and Cu_2O .

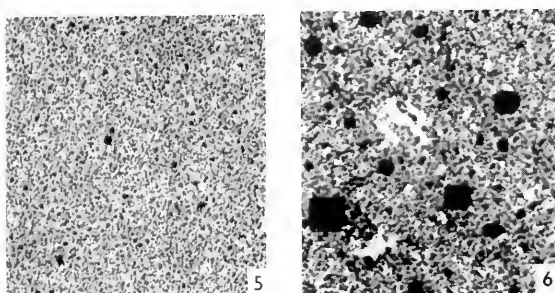


Fig. 5. Corresponding electron micrograph of Fig. 3.

Fig. 6. Electron micrograph of Cu_2O formation in lower vacuum.

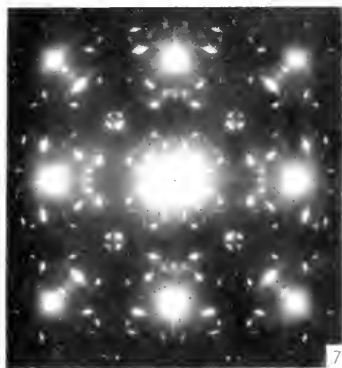


Fig. 7. Electron diffraction pattern of α -brass with ZnO.

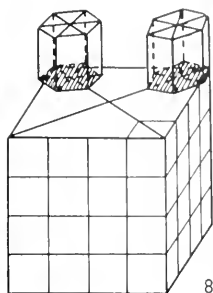


Fig. 8. Two relative orientations between α -brass and ZnO.

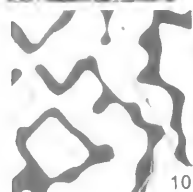
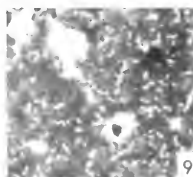


Fig. 9. Corresponding electron micrograph of Fig. 7.

Fig. 10. Electron micrograph for final stage of oxidation for α -brass.



Fig. 11. Secondary diffraction effect for Cu_2O .

and the small black points are distributed uniformly on the surface of α -brass.

Furthermore, when α -brass is heated in some bad vacuum, one may see the agglomerations with the definite external shape as shown in fig. 6, which can be considered as Cu_2O .

Formation of ZnO.—When heating the α -brass over 450 C in the electron microscope, ZnO appears in the state of single crystals. Fig. 7 shows the electron diffraction image of ZnO which was obtained by heating α -brass at 450 C during 30 min. The larger spots correspond to α -brass and the other spots are due to ZnO. The arrangement shows that ZnO develops as a hexagonal prism which has the situation of perpendicularity to the cubic face of α -brass. The diagonal of (0001) of ZnO is parallel to the direction of [100] of α -brass. Fig. 8 shows schematically the two relative orientations between ZnO and α -brass, that is,

$$(0001)_{\text{ZnO}} // (001)_{\alpha\text{-brass}} \text{ and } [11\bar{2}0]_{\text{ZnO}} // [1\bar{1}0]_{\alpha\text{-brass}} \quad (4)$$

and

$$(0001)_{\text{ZnO}} // (001)_{\alpha\text{-brass}} \text{ and } [11\bar{2}0]_{\text{ZnO}} // [110]_{\alpha\text{-brass}} \quad (5)$$

The diffraction spots around the direct electron beam in fig. 7 show the above two orientations.

Discussion.—(1) *Relative orientations between the oxides and α -brass.* The appearance of the orientation (1) can be understood easily by the fact that oxygen atoms enter in the lattice of α -brass to form Cu_2O . The orientations (2) and (3) seem to develop after the formation of the orientation (1): copper atoms traverse into the layer of oxide already produced and at the surface of the oxide layer copper atoms combine with oxygen atoms.

One of the authors has earlier shown that the oxidation of brass starts in the direction of the most dense atomic plane, that is (100) plane for α -brass and (111) plane of β -brass [7].

As in the case of Cu_2O , the direction $[11\bar{2}0]$ of ZnO appears parallel to the direction of the most dense atomic plane (110) of α -brass, and the plane (0001) of ZnO appears for the same reason parallel to the plane of (111) for Cu_2O as the result of the replacement of copper atoms by zinc atoms at the superficial layer.

The development of the orientations (4) and (5) can be explained in the same manner for the case of Cu_2O . It is also explained by the hypothesis of "rotational slip" which was proposed by Wilman [8].

The important role of the direction $[110]$ of α -brass is also explained and its evidence can be observed in the electron microscope as shown in fig. 10, in which ZnO appears with some unknown substance at the final stage of the oxidation of α -brass at

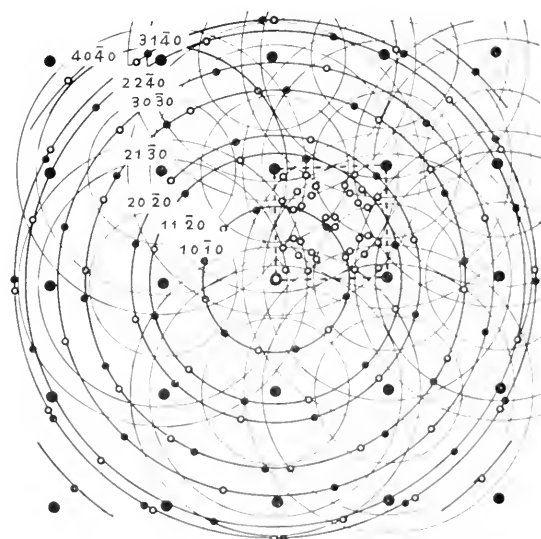


Fig. 12. Schematic representation of secondary diffraction effect due to ZnO. The small black and white circles correspond to the orientations (4) and (5) respectively. (Cf. fig. 7.)

600 C. By means of microdiffraction, the two restricted directions can be determined to correspond to the direction of [110] of α -brass.

(2) *Secondary scattering effect.* The secondary scattering effect for Cu_2O is shown in fig. 11. For ZnO , the irrational diffraction spots due to this effect are distributed more densely than those of Cu_2O . Fig. 12 shows schematically this effect for only the first quarter of the electron diffraction image of α -brass.

(3) *Selective oxidation.* For low pressure of oxygen and the temperature under the melting point of zinc, the surface of α -brass becomes rich in copper atoms, because the vapour pressure of zinc is greater than that of copper and the mobility of the copper atom is greater than that of zinc. Accordingly, it results in the formation of Cu_2O at an initial stage.

At the high temperature over the melting point of zinc, 419 C, the zinc atom will easily combine with the oxygen atom, because the zinc atom becomes easily displaceable in the specimen. Furthermore, Cu_2O has some tendency of reduction by the above high diffusion of zinc or the dissociation itself *in vacuo*.

REFERENCES

1. BRÜCK, L., *Ann. Physik* **26**, 233 (1936).
2. GÖTTSCHE, H., *Z. Physik* **134**, 517 (1953).
3. HONJO, G., *Proc. Phys. Soc. Jap.* **8**, 113 (1953).
4. VON LAUE, M., *Ann. Physik* **26**, 55 (1936).
5. MENZER, G., *Z. Krist. A* **99**, 410 (1938).
6. MIYAKE, S., *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Research* **29**, 167 (1936).
7. TAKAHASHI, N., *Rikagakukenyujo-iho* **27**, 536 (1939). (In Japanese.)
8. WILMAN, H., *Proc. Roy. Soc. A* **64**, 329 (1951).

The Electropolishing of Aluminium

A. W. AGAR and R. S. M. REVELL

Research Laboratory, Associated Electrical Industries Limited, Aldermaston, Berks., and Metropolitan-Vickers Electrical Co. Ltd., Trafford Park, Manchester, 17

WHEN aluminium or its alloys are polished electrolytically, they are frequently found to exhibit a fine structure when examined by replicas in the electron microscope. Various forms of these structures have been described (1, 2, 3, 6). Typical forms are shown in fig. 1 which may be described as furrows, dots and whorls respectively. A whole range of struc-

ture intermediate between these has also been observed.

The above authors all employed aluminium oxide replicas obtained by anodisation of the specimen after polishing. It seemed possible that the structure could have been produced as well by the anodising as by the polishing process; consequently, the polished surfaces were examined by plastic replicas in the present investigation to avoid any possible confusion. Since the structures still appeared, it was clear that they arose during the electropolishing process.

The structure types may all appear on one specimen, and it is not possible to predict which type may appear after the electropolishing. It seems likely (3, 6) that the type of structure is determined by the underlying crystal orientation. Sharp boundaries observed between one type of structure and another lend support to this supposition (fig. 1).

When the size of the structure, as opposed to its type, is considered, however, it is found to be related in some way to the polishing conditions. Since, in a few cases, structureless surfaces were obtained, it was decided to attempt to define the conditions for obtaining structureless surfaces at will.

The electrolyte used in this investigation was the perchloric acid/alcohol mixture (4). This was preferred as being safer than the electrolyte containing acetic anhydride and used by Jacquet. The specimens were super purity aluminium (99.992%) so as to avoid any metallographic structures which might have confused the results.

It was at first found very difficult to obtain reproducible results from the electropolishing process, and it was found

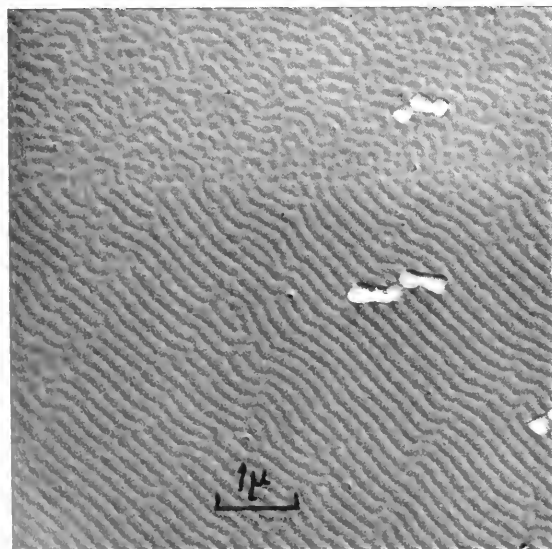


Fig. 1. Electropolished aluminium showing "whorl" structure, and a boundary between this and one of the intermediate forms with "furrow" and "dotty" structures. Shadow-cast formvar replica. Magnification 10,000.

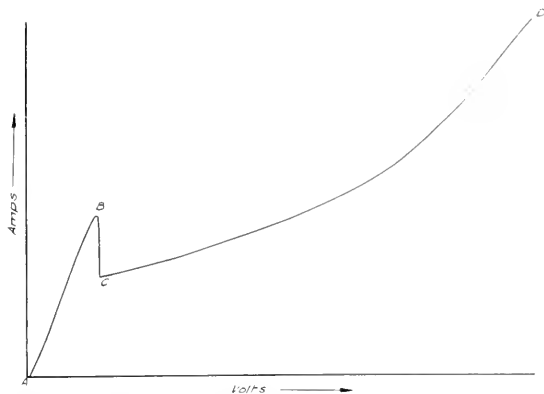


Fig. 2. Typical curve showing the relationship between current and voltage in the polishing bath.

necessary to control the conditions with great care. The factors affecting the polish were investigated in considerable detail, and this work is being published elsewhere. One or two of the more important results will be mentioned here.

It is found that the progress of the polishing process can be followed very well by plotting the voltage applied to the bath against the current flowing through it. A typical polishing curve is shown in fig. 2. In the region *AB*, the current increases more or less linearly with voltage, and no polishing action takes place. At *B*, an unstable condition sets in, associated with the formation of a high resistance layer at the anode. When stability is again established at *C*, relatively large increases in voltage are required to increase the current through the bath, and, in this region *CD*, the aluminium forming the anode of the bath is polished.

The effect of temperature change, with other parameters constant, is shown in fig. 3. It was found that, even though the obvious variables such as temperature, stirring of the electrolyte, and specimen area polished were kept constant, the polishing curves were not always reproducible. The principal reason for this was found to be in the approach to the point of instability *B*. If the voltage was increased too quickly in the region *AB*, the voltage sometimes increased above the minimum at which the instability would start. If this occurred, the whole of the subsequent curve was modified. When the

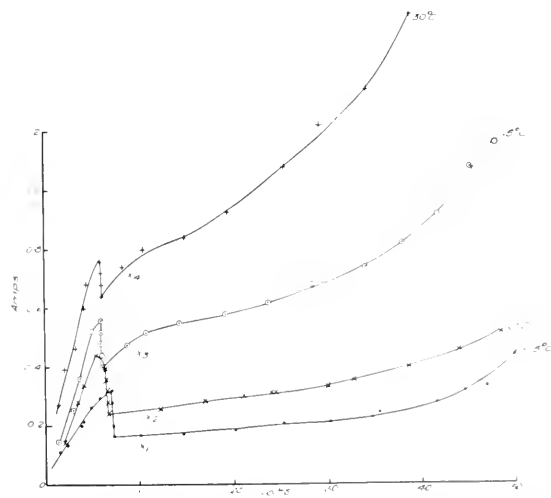


Fig. 3. Effects of temperature on polishing curves at constant stirring speed (3000 r.p.m.).

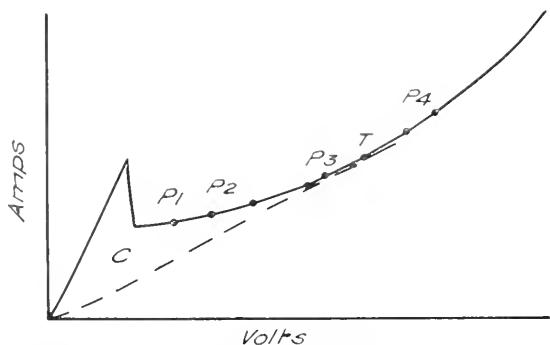


Fig. 4. Controlled polishing at points on the characteristic curve.

voltage increments in the region *AB* were made small, and with adequate time intervals between them, the polishing curves were found to be reproducible.

Experimental Procedure. In order to relate the structure resulting from a polish to the polishing conditions, a polishing curve was first established for a given size of specimen and for fixed temperature and stirring speed. Following the procedure described above, a series of similar aluminium specimens were polished under conditions defined by the points *P*₁, *P*₂, *P*₃... on the portion *CD* of the curve (Fig. 4). After five minutes polishing at such a point, the specimen was removed from the bath with voltage still applied, washed in water and alcohol, and dried in warm air.

It was found that thin unbacked films of formvar could be water stripped from the aluminium without difficulty, provided that the process was completed within about half an hour of the preparation of the specimen. With greater delays than this, stripping became progressively more difficult, and, in some cases, a thick backing film had to be used. The replicas were subsequently shadow-cast. Several portions of each replica film were examined in the electron microscope, and a number of photographs taken at random on each; this ensured a representative selection of available structures.

When structure appeared on a specimen, the dimensions (i.e. the separation of the furrows, the spacing of the dots, and the width of the elements of the whorls) were measured. It was found that these dimensions were substantially constant for a given aluminium specimen. Each specimen produced at the points *P*₁, *P*₂, etc. on the polishing curve was found to have its own characteristic structure spacing.

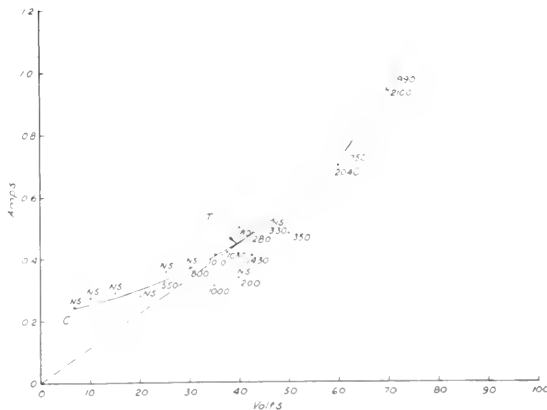


Fig. 5. Controlled polishes at 0°C, 3000 r.p.m.

Each figure is the mean of a very large number of measurements for a given specimen. This spacing in \AA was recorded against the appropriate point on the polishing curve, as shown in fig. 5. It will be seen that, beyond the point T , the structure size increases regularly along the curve, and, in fact, appears to follow the voltage dependence demonstrated by Welsh.

Nearly all the replicas examined in the range CT of the curve revealed no structure which could be resolved by the replicas used. (The point T is the point where the tangent from the origin meets the curve, and represents the point of maximum resistance of the electrolyte.) As a further check, pre-shadowed replicas (using chromium metal) were removed from some such surfaces, which still appeared structureless.

In view of the effect of temperature on the polishing curve, the experiment was repeated at different temperatures. The results were of the same general form as those quoted for 15 C, the voltage for the point T varying only slightly with change in temperature. The magnitude of the structures measured for given polishing voltages agrees very well with the figures given by Welsh. However, Welsh did not observe the region of no structure.

It was found that a small proportion of the replica films examined from specimens polished in the no-structure region of the curve did exhibit fine structure, usually of a size 200–500 \AA . No structure finer than 200 \AA was detected, though this was not a limitation due to the replica method used. It may

represent some lower threshold value of structure spacing.

Using the electrolyte described by De Sy and Haemers, it has been found possible to prepare electrolytically polished aluminium surfaces which are free of self-structure, at least down to about 25 \AA . These are obtained by using the portion of the polishing curve between the point marking the end of the unstable portion and the point of maximum resistance of the electrolyte.

The spacing of the structures observed when the polishing is carried out beyond this region is found to be voltage dependent and agrees with the figures quoted by Welsh.

It should be mentioned that there was a limited number of exceptions to the general rules here formulated. In three or four micrographs out of a total of over a thousand, structure was observed on one side of a grain boundary while the other side was structureless. There also remains unexplained the small number of specimens showing fine structure when polished under conditions under which no structure would be expected.

REFERENCES

1. BROWN, A. F., *Nature* **163**, 961 (1949).
2. BUCKNELL, G. L. and GEACH, G. A., *Nature* **163**, 231 (1949).
3. BUSSY, P. and CHAUDRON, G., *Compt. rend.* **236** (24), 2323 (1953).
4. DE SY and HAEMERS, *Stahl u. Eisen* **61**, 185 (1941).
5. JACQUET, P. A., *The Electrolytic Polishing of Metal Surfaces and Its Applications*. Editions Metaux. 1948.
6. WELSH, N. C., *Research Correspondence* **8**, A1 (1955).

Zur Anwendung eines neuartigen elektrolytischen Poliergerätes

R. ZETZSCHE, E. GUYENOT und H. J. PRÖGER

V.E.B. Carl Zeiss, Jena

UM die Vorbereitung von Metallschliffen zur Beobachtung im Licht- oder Elektronenmikroskop wesentlich abzukürzen, wurde im Jenaer Zeißwerk eine elektrolytische Poliereinrichtung mit einem Lichtmikroskop vereinigt. Damit kann der Vorgang des Polierens und Ätzens direkt mit etwa 200facher Vergrößerung beobachtet werden. Oftmals genügt die Aussage mit dem Lichtmikroskop, die natürlich auch photographisch festgehalten werden kann. Soll höher vergrößert werden, so wird der Ätzvorgang in einem geeigneten Stadium abgebrochen. Die Probe wird dann entnommen und in der üblichen Weise im Lichtmikroskop direkt oder im Abdruckverfahren im Elektronenmikroskop untersucht.

Das Poliergerät enthält den Vorratsbehälter für den Elektrolyten und eine kleine Pumpe mit Motor. Die Probe soll eine ebene Fläche von etwa 1 cm^2 besitzen und wird durch einen Halter dicht ange-

preßt. Sie darf bis 100 mm \varnothing und 100 mm Höhe haben. Der Elektrolyt läuft mit einstellbarer Geschwindigkeit in einer Schichtdicke von etwa 1 mm vorbei; ein Kreis von 6 mm \varnothing wird gespült. Der Raum ist durch ein Deckglas abgeschlossen; die Beobachtung erfolgt über ein normales Auflichtmikroskop „Epignost“. Die 200fache Vergrößerung reicht aus, um das günstigste Ätzstadium zu finden. Der Flüssigkeitskreis ist korrosionsfest aufgebaut. Das zugehörige Regelgerät liefert eine von 0 bis 60 Volt kontinuierlich einstellbare Gleichspannung und ist bis 1 Amp belastbar.

Es sei gestattet, auf einen wesentlichen Unterschied des elektrolytischen Polierens und Ätzens gegenüber der herkömmlichen Bearbeitung hinzuweisen. Beim mechanischen Polieren wird die Oberfläche mehr oder weniger deformiert, beim elektrolytischen Polieren nicht. Bei dem mit kleinerer

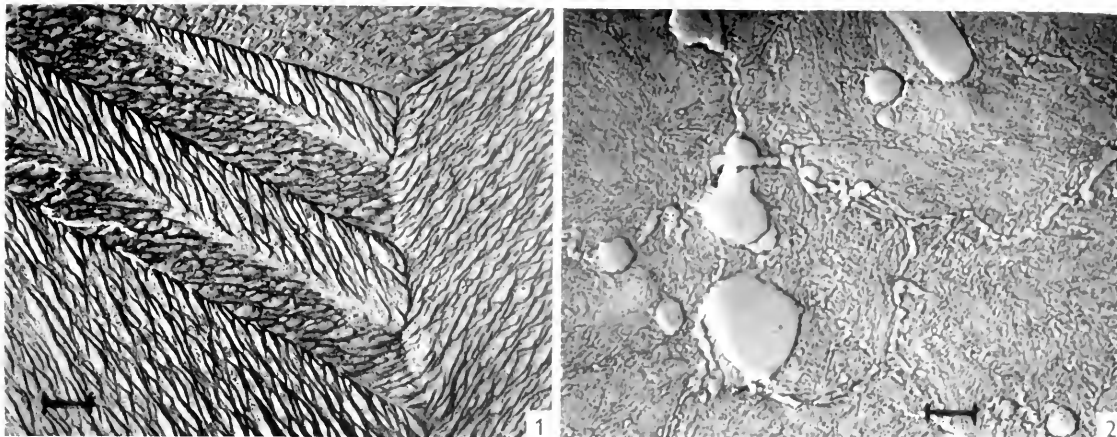


Abb. 1. Messing, stark geätzt, Vergr. 6000 . — Abb. 2. Schnellstahl, schwach geätzt, Vergr. 6000 .

Spannung durchgeführten Ätzen wird die Substanz abhängig von Orientierung und chemischer Zusammensetzung abgebaut, so daß das Gefüge sichtbar wird. Weiterhin bilden sich aus Verbindungen zwischen Grundsubstanz und Elektrolyten dünne Schichten, die sich orientiert anlagern. Bei Fortsetzung der Elektrolyse wachsen die Schichtabschnitte zusammen und können je nach Charakteristik des betreffenden Metalls bei einer bestimmten Spannung abgelöst werden. Es kann erneut poliert und geätzt werden.

Einige Beispiele mögen die Anwendung zeigen. Ein α -Messing mit 63 % Cu wurde mit Phosphorsäure (45 %) behandelt. Im Lichtmikroskop zeigt das Stadium „poliert“ keine Einzelheiten, das Stadium „schwach geätzt“ die Korngrenzen, das Stadium „stark geätzt“ Unterschiede der Orientierung. Im Elektronenmikroskop sind bereits im „polierten“ Zustand oft die Korngrenzen auf Grund des verschiedenen Verhaltens der einzelnen Kornflächen zu sehen; an der Stelle von Einschlüssen findet der Angriff bevorzugt statt. Bei schwacher Ätzung lagern sich die Ätzprodukte in Form kurzer „Nadeln“ verschiedener Länge, jedoch einheitlicher Richtung für jede Kornfläche an. Bei Fortsetzung der Ätzung wird die Schicht dicker und schließt sich. (Abb. 1.)

Zur Ätzung eines perlitischen Stahls wurde Perchlorsäure mit Äthanol und Äther als Elektrolyt ver-

wendet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zweier Ätzstufen zeigen praktisch keine Lamellen, die Karbide treten hervor. Im Elektronenmikroskop sind beim gleichen Ätzzustand „schwach“ Lamellen und Karbide gut ausgebildet. Bei „starker“ Ätzung liegt die körnig ausgebildete Ätzhaut auf den Lamellen. Die Struktur wird vergrößert und teilweise verdeckt. Der Zustand „schwache Ätzung“ ist vorzuziehen.

Als dritte Probe wird ein gehärteter und angelassener wolframlegierter Schnellstahl gezeigt. Im Lichtmikroskop erscheint im Stadium „poliert“ nur die in Walzrichtung liegenden Zeilen von Karbiden. Bei „schwacher Ätzung“ werden die Korngrenzen sichtbar, bei „starker Ätzung“ überwiegen deren Kontraste gegen die Karbide. Im Elektronenmikroskop erkennt man bereits bei schwacher Ätzung die Anlaßstruktur und nach starker Ätzung den durch das Abschrecken entstandenen feinkristallinen Martensit. Die bevorzugt an den Korngrenzen ausgeschiedenen Karbide bleiben fast unbeeinflusst. (Abb. 2.)

Mit dem hier beschriebenen Gerät lassen sich Polieren und Ätzen von Metallen auf wenige Minuten abkürzen und bequem steuern.

LITERATUR

1. ZATZSCH, R., *Feingerätetechnik* 5, 389 (1956).
2. — *Jenaer Jahrbuch* (demnächst).

Elektronenoptische Untersuchungen an metallurgischen Stäuben, insbesondere deren Präparation und physikalische Differenzierung

A. M. D'ANS und L. VON BOGDANDY

*Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem
und Hüttenwerk Oberhausen AG., Versuchsanstalt, Oberhausen, Rheinland*

IN den letzten Jahren hat der Sauerstoff breite Anwendung in der Stahlerzeugung gefunden. Der Sauerstoff wird entweder von oben in oder auf das Roheisenbad geblasen oder aber im klassischen Thomaskonverter der normalen Blasluft zugesetzt, wobei Gemische mit bis zu 40 % Sauerstoff für den Erfolg ausreichen. Die Sauerstoffanwendung hat neben ihren technischen und wirtschaftlichen Vorteilen als unangenehme Begleiterscheinung ein verstärktes Auftreten von braunem Rauch gebracht.

In Bild 1 und 2 sind elektronenoptische Bilder des braunen Rauches beim Sauerstoffeinblasverfahren (Pfannenvorfrischen, Bild 1) und beim Betrieb des Thomaskonverters mit sauerstoffangereicherter Luft (Bild 2) wiedergegeben. Ähnliche Aufnahmen wurden auf anderen Werken gewonnen (2, 4, 7, 10, 11).

Die chemische Analyse zeigt, daß der Staub hauptsächlich aus Fe_2O_3 besteht; die Korngröße liegt zwischen 10 und 100 μ ; über die emittierte Menge gibt es nur grobe Schätzungen und erst recht keine klaren Vorstellungen über die wirksamen Einflußgrößen.

Mit solchen Feststellungen ist aber das Problem der Niederschlagung des Staubes oder sogar die Vermeidung seiner Entstehung nicht gelöst. Als Vorstufe für eine Klärung der Entstehungsbedingungen war zu untersuchen, in welcher physikalisch-chemischen Beschaffenheit der Staub das Frischgefäß verläßt, und zwar in Abhängigkeit von der Folge der Teilphasen des Prozesses.

Untersuchung von Staubproben.—Aus experimentellen Gründen wurde für die Untersuchung zunächst der Thomaskonverter mit Sauerstoffan-

reicherung gewählt. Die Blaszeit beträgt etwa 12 Minuten; die Emission von braunem Rauch findet hauptsächlich von der 10. Minute an statt (nach dem sog. „Übergang“). Die nachstehende Untersuchung beschränkt sich deshalb auf die Zeit von der 9. Blasminute bis zum Blasende.

Mit einem wassergekühlten Proberohr wurde unterhalb der Konvertermündung, also bevor das unter geringem Überdruck austretende Abgas sich mit Luft vermischen konnte, alle 20 sec eine Staubprobe gezogen. Es wurde darauf geachtet, daß die lineare Gasgeschwindigkeit in der Probezone mit der im umgebenden Gasraum übereinstimmte.

Die angesaugte Gasmenge wurde mit einer Gasuhr gemessen, die Staubprobe gewogen und hieraus die Staubkonzentration pro Volumeneinheit Abgas ermittelt.

Die chemische Analyse im Durchschnitt der 9.–12. Blasminute gibt Gehalte von durchschnittlich 54 % Fe, 0,8 % P, 7,1 % Mn, 1,0 % Na und 2,1 % K. Nach Analysenbefund traten in den Proben stark wechselnde Gehalte von metallischem Eisen auf. Es bestand deshalb Grund zu der Vermutung, daß der Staub innerhalb des Konverters vollkommen metallisch vorlag und erst nach der Probenahme bei Berührung mit der Luft oxydierte. Diese Annahme bestätigte sich bei den weiteren Untersuchungen.

Präparierung der Staubproben und elektronenoptische Aufnahmen.—Um die Korngrößenverteilung der Staubproben zu erhalten, müssen die Körner gut ausmeßbar sein. Ziel der Präparation ist es deshalb, die Körner einzeln auf der Objektträgerfolie verteilt liegen zu haben (Bild 3). Die Aggregation von Eisen- bzw. Eisenoxydstäuben hängt von ihren physikalisch-chemischen Entstehungsbedingungen ab. Da aber von den vielen Faktoren, die die Aggregation bewirken, elektronenmikroskopisch nur die Größe und die Form der Einzelteilchen, eventuell deren Oberflächenbeschaffenheit und ihre Verschmutzung, feststellbar sind, mußte jede Staubprobe gesondert ausgetestet werden, damit eine optimale Dispergierung erreicht wurde. Bei der Präparation kann nur das Zusammenspiel der Oberflächenenergien von Korn, Suspensionsflüssigkeit und Objektträgerfolie durch Variation der Folie und der Flüssigkeit verändert werden.

Mittels Ultraschall (1) kann man mit Suspensionsflüssigkeiten nicht zu hoher Viskosität Teilchen bis maximal 1 μ Durchmesser quantitativ verne-

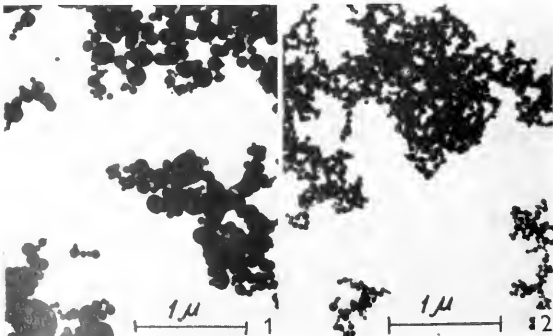


Bild 1. Staub aus der Vorfrischenanlage.

Bild 2. Staub aus dem Thomas-Konverter.

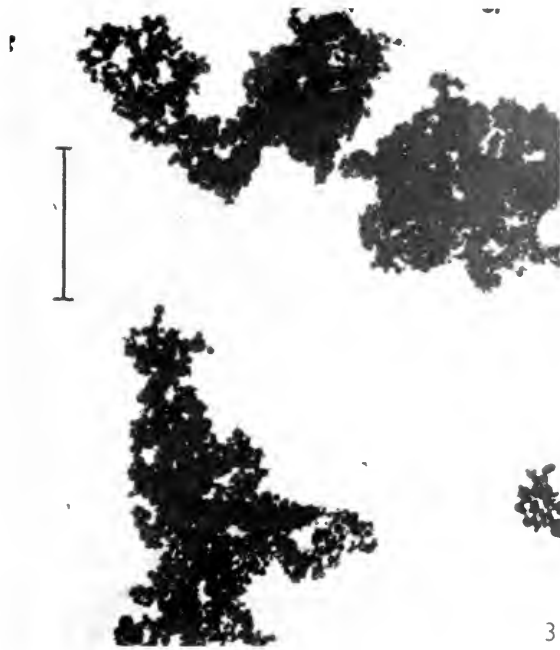


Bild 3. Konverterstaub vom Filter abgepinselt.

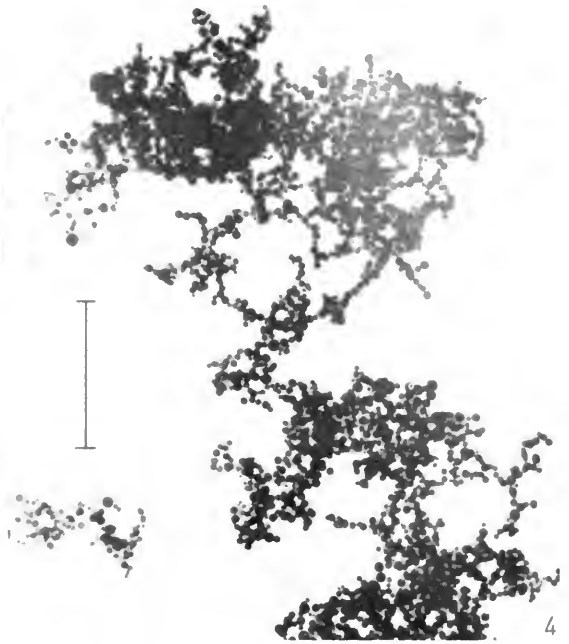


Bild 4. Konverterstaub mit Ultraschall präpariert.

beln. Mit 1 MHz wurden die Suspensionen hergestellt; dann wurde ein Tropfen davon bei 3 MHz vernebelt und auf eine Objektträgerfolie sedimentiert. Als Suspensionsflüssigkeit wurde Wasser, Azeton oder Alkohol verwendet; andere organische Lösungsmittel zeigten sich weniger geeignet. Die Objekttragerfolien waren aus reinem Kollodium, zum Teil graphitiert, oder aus Formvar. (Bild 4.)

Falls Filterfasern in der Suspension vorhanden waren, mußten diese durch Zentrifugieren abgetrennt werden.

Zur Ermittlung der Korngrosenverteilung wurde wie folgt vorgegangen¹: Das elektronenoptische Negativ (weiße Kornbilder auf schwarzem Untergrund) wurde zusammen mit einer Strichplatte in einen Vergrößerungsapparat eingespannt und auf einen weißen Bogen projiziert. Elektronenoptische Vergrößerung und Strichabstand waren so aufeinander abgestimmt, daß ein Teilstrichabstand je nach den Korngrosen 10 bis 50 $m\mu$ entsprach. Auf dem projizierten Bild erschienen die weißen Körner von Schwarzen Strichen durchzogen (Bild 5). Es wurde nun ausgezählt, wieviel Körner von je 1, 2, 3 usw. Strichen geschnitten wurden und auf einem Summenzahlwerk registriert. Zur Vermeidung von Doppelzählungen wurde das projizierte Bild jedes gezählten Teilchens mit einem Bleistift markiert. Es ergaben sich somit die Häufigkeiten pro Korn-

grosenklasse und damit die gesuchten Korngrosenverteilungskurven. Es wurden je Probe etwa 1000 Teilchen ausgezählt; die sich ergebenden Verteilungsfunktionen waren eindeutig lognormal (vgl. Bild 6).

Extinktionsmessungen in der Flamme.— Die Messung der Lichtschwächung aus einer definierten Lichtquelle durch den nach dem beschriebenen Verfahren quantitativ bestimmten Staub wurde innerhalb der Abgasflamme auf einer etwa 8 cm langen Meßstrecke mit monochromatischem Licht vorgenommen (grüne Hg-Linie, $\lambda = 546 m\mu$). Aus der gemessenen Lichtschwächung wurde gemäß dem Beerschen Gesetz $I/I_0 = e^{-kcd}$ die Extinktionskonstante errechnet. (Die Konzentration c des Staubes war aus den Absaugungsuntersuchungen bekannt; die Meßstrecke d betrug 8 cm und die Lichtschwächung I/I_0 wurde

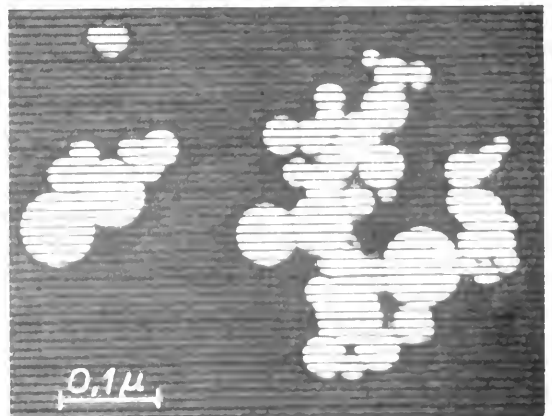


Bild 5. Konverterstaub mit Zahlplatte.

¹ Die eigene Versuchsanordnung war in der Notwendigkeit begründet, auf der Basis der in einem Laboratorium normalerweise vorhandenen Geräte ohne großen Aufwand zu einem Ergebnis zu kommen. Darüber hinaus gibt es im Handel bereits Geräte, die — auf anderen Prinzipien fuend — den gleichen Zweck erfüllen (vgl. (9)).

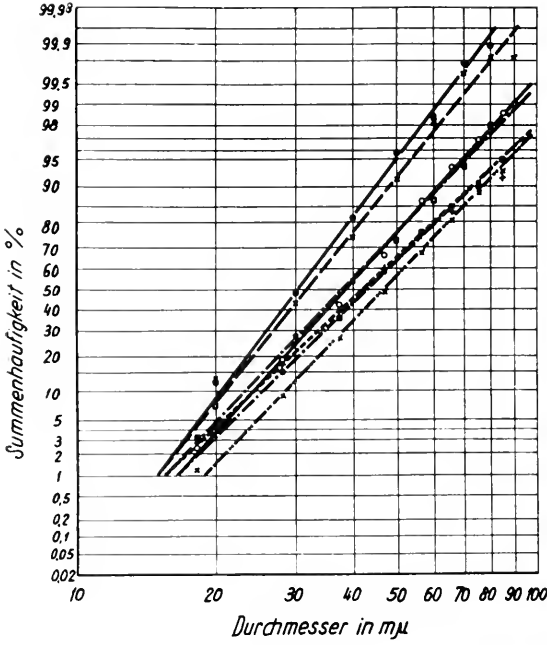


Bild 6. Körnungskennlinien im Wahrscheinlichkeitsnetz bei Konverterstaub.

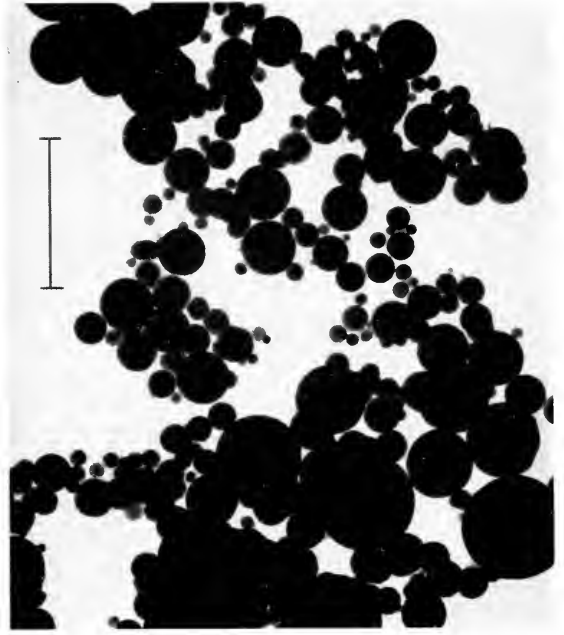


Bild 8. Staub aus dem Graef-Rotor.

gemessen, so daß als Unbekannte nur noch die Extinktionskonstante k verbleibt.)

Die Miesche Theorie (5) beschreibt die Phänomene der Lichtbeugung und Absorption an metallischen und nichtmetallischen Kugeln und ist damit auf den industriellen Staubauswurf anwendbar, worauf zuerst Pepperhoff (6, 7) hingewiesen hat (vgl. auch (8)). Nach ihr kann die Extinktionskonstante aus einigen konvergenten Reihenentwicklungen errechnet werden. (Nullte Näherung für den Grenzfall Teilchendurchmesser: Lichtwellenlänge $\ll 1$ ist das Raleighsche Gesetz.) Die Raleighsche Näherung war jedoch wegen der vorliegenden Teilchengrößen nicht anwendbar; die Reihen mußten bis zum 8. Glied ausgewertet werden. In die Berechnung gehen als Stoffkonstanten der Brechungs expo-

nent und der Absorptionskoeffizient ein. Da die Vermutung bestand, daß der Staub beim Austritt aus dem Konverter noch metallisch sein würde, wurden für die genannten Konstanten die Landolt-Börnstein-Werte für metallisches Fe für $\lambda = 546 \mu\mu$ wie folgt eingesetzt:

$$\begin{aligned} \text{Brechungs exponent} &= 1,436 \\ \text{Absorptionskoeffizient} &= 1,553. \end{aligned}$$

Die hieraus berechnete Extinktionskonstante zeigt Bild 7 in Abhängigkeit von der Korngröße des absorbierenden Staubes.

Ergebnisse.—In Bild 7 sind neben der theoretisch errechneten Kurve für die Extinktionskonstante auch die experimentell gewonnenen Werte eingetragen. Theorie und Experiment stimmen innerhalb der Meß-

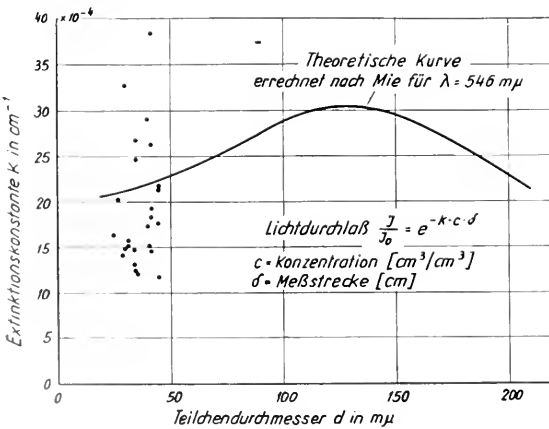


Bild 7. Extinktion von Fe-Staub im Konverterabgas Vergleich zwischen Theorie und Experiment.

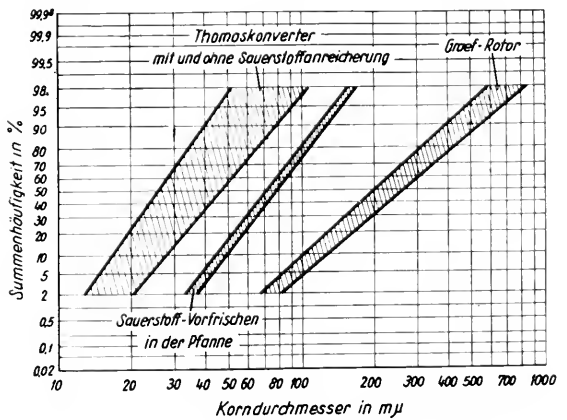


Bild 9. Körnungskennlinien im Wahrscheinlichkeitsnetz.

fehlergrenzen überein. Damit wird die Annahme, daß der Staub den Konverter im metallischen Zustand verläßt, stark gestützt.

Die genannte Beweisführung ermöglicht es, die Staubemission bei Stahlfrischprozessen in einfachster Weise durch Extinktionsmessungen trägheitslos zu verfolgen. Voraussetzung dafür ist die Bestimmung der Korngrößenverteilungen des Staubauswurfs mit der eingangs geschilderten Zählmethodik.

Außerdem ist die nunmehr mögliche schnelle Ermittlung der Korngrößenverteilung von Interesse bei der Neuentwicklung von Frischverfahren.

Bild 8 zeigt den Staub eines neuen Frischverfahrens (des Graef-Rotor-Prozesses), bei dem es gelungen ist, entstaubungstechnisch günstig grobe Körner zu züchten. Aus Bild 9 gehen die in der Hüttenwerk Oberhausen AG. ermittelten Grenzen der Korngrößenverteilungskurven für verschiedene Prozesse, einschließlich des Graef-Rotor-Prozesses, hervor.

Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit basiert auf Untersuchungen, die im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn H. D. Pantke ausgeführt wurden, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei. Der Werksleitung der Hüttenwerk Oberhausen AG. und Herrn Professor E. Ruska gebührt unser Dank für die Erlaubnis zur Durch-

führung und Publikation der Untersuchung. Weiterhin danken wir Herrn Dipl. Math. K. Schnick für wertvolle Hilfe bei der langwierigen Errechnung der Extinktionskonstanten.

LITERATUR

1. KEHLER, H., KOCH, A., und TESSER, K., *Z. wiss. Mikroskop.*, **62**, 521 (1956).
2. KOSMIDER, H., NEUBAUS, H., und KRAEZENSTEIN, H., *Stahl u. Eisen* **74**, 1045 (1954).
3. LANDOLT BÖRNSTEIN, *Phys.-chem. Tabellen*, 5. Aufl. Hauptwerk, II, Teil, 907.
4. MELDNER, R. und LAUTHÜTTI, D., *Arch. Eisenhüttenw.*, **27**, 149 (1956).
5. MIH, G., *Ann. Physik IV*, **25**, 377 (1908).
6. PIPPERHOFF, W., *Optik*, **8**, 354 (1951).
7. PIPPERHOFF, W. und ZIRM, F., *Arch. Eisenhüttenw.*, **22**, 295 (1951).
8. RÖSSLER, F., *Optik*, **10**, 531 ff (1953).
9. SCHLUGEL, H., Vortrag aus der Elektronenoptikertagung 1955, Münster.
10. STEINKOPF, A., Untersuchungen über Konverterrauch im Hinblick auf die spektrale Überwachung des Thomasprozesses. Dissertation der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, 1954.
11. WEVER, F., KOCH, W., HÖHRMANN, H., STEINKOPF, B. A., KNÜPPEL, H., MAYER, K. E., und WILTHOFF, G., *Stahl u. Eisen* **75**, 549 (1955).

The Electron Microscope in the Study of Wear

D. SCOTT and H. M. SCOTT

Mechanical Engineering Research Laboratory, Lubrication and Wear Division, Thorntonhall, Glasgow

WEAR may be defined as the undesired displacement or removal of solid material from rubbing surfaces, and since the initiation of damage can be expected to occur over a sub-microscopic area the electron microscope is a useful tool in this field.

There is a considerable diversity of electron-optical techniques of value in surface examination and the choice of method depends very much on the nature of the problem to be solved. Direct surface examination as shown by Halliday (4) and Menter (5) can be of great use but is limited to the examination of specimens capable of being accommodated in the specimen holder of the microscope and thus involves the construction of special wear machines using suitably sized specimens. To examine specimens from wear tests carried out with large specimens in already established machines involves sectioning of the specimen for direct observation or the use of replica techniques.

A replica to be suitable for electron microscopy of metal surfaces should be a faithful reproduction of the surface contour, possess sufficient contrast to permit ready interpretation of the surface features and be structureless so that any structure seen will be that of the specimen surface from which the replica was taken.

Metal surfaces from wear experiments were examined

with a transmission type Metropolitan-Vickers E.M.3 electron microscope using formvar replicas made from a 1% solution of formvar in chloroform. When backed with a thick collodion film it is possible to remove thin formvar films of high contrast from metal surfaces without tearing or without any evidence of strain in the formvar. The replicas were shadowed with gold palladium at an angle of 45° to improve the contrast and to render visible a great deal of fine detail without confusing the interpretation of the main structure.

Various two-stage replica techniques have been described and used to produce a positive replica of a surface and in this respect the high resolution carbon replica technique developed by Bradley (3) has been found to be particularly effective. However, most of the two-stage replica techniques are somewhat time absorbing and electron micrographs of single stage formvar replicas can be photographically reverse printed in order to facilitate interpretation of the correct perspective of the original specimen. Reverse prints are made from a positive plate, contact printed from the negative.

Replicas from the worn surfaces of specimens, taken from a wear machine in which upper and lower annular specimens are rubbed together under controlled conditions of speed, load and lubrication, showed clearly the abrasions of the original surface together with deformation, scoring, and build up of material caused by the rubbing action.

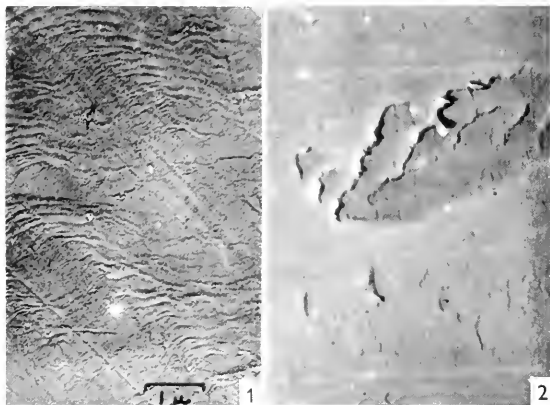


Fig. 1. Initiation of Wear Damage on Soft Steel. An area of running track near the start of a test run. The material of the cylinder is E.N.8 steel of hardness approximately 200 V.P.N. Plastic deformation of this fairly ductile material is evident, also small areas of surface damage produced by the displacement of material. Magnification 7500.

Fig. 2. Initiation of Wear Damage on Hard Steel. Initial damage to the surface of a case hardened E. N.36 steel cylinder of hardness over 800 V.P.N. There is little plastic deformation of this hard material of low ductility and initial damage appears to be by displacement of material and cracking following overstressing of the surface. Magnification 6000.

Visual damage by optical microscopic examination after only one revolution of the wear machine appeared to be confined to circumferential scratches, but from the electron micrograph it appeared that, within each individual scratch, plastic flow had occurred over a narrow track and a step-wise structure had been formed suggesting a stick-slip method of formation.

It is not to be expected that the complex mechanism of wear should be easily elucidated for the very process itself eliminates its own initial stages as cumulative action develops towards catastrophic failure. For the study of factors initiating such a failure it is desirable that a *single traverse* be made of a surface so that the development of surface failure may be followed. For this purpose a special crossed-cylinder machine (1) has been developed at the Mechanical Engineering Research Laboratory in which one cylinder is rotated and a mating cylinder, at right angles, so traversed that the zone of contact moves along the surface of both cylinders and fresh contact surfaces are continually being presented. The helical track round the cylinder reveals how the damage to the surface builds up with increase of load. Using this machine and cylinders with a fine surface finish of average roughness 1μ inch C.L.A. some interesting electron micrographs have been obtained of the initial stages of the wear process when using a conventional lubricant. The electron micrographs 1-3 are reversed prints of shadowed single-stage formvar replicas.

Another important wear problem is fretting corrosion, the term given to the surface damage that

results when there is slight relative *oscillatory motion* between solid surfaces in contact. The damage manifests itself by severe pitting of the surfaces and the generation of considerable amounts of oxidised debris. In conjunction with the research on fretting (8) the electron microscope has been used to study the initial stages of surface damage (fig. 4).

Formvar replicas have been taken from taper sections (7) prepared for metallographic investigation of rubbing surfaces. E.M. examination of these shadowed replicas has helped considerably in elucidating the metallographic *changes in the immediate sub-surface areas of contact*. Interesting electron micrographs have also been obtained of the deformation of crystals in the sub-surface area of contacting points of rubbing surfaces.

The electron microscope has been used for the *examination of debris* from fretting corrosion and wear tests, since test conditions giving reasonably low rates of wear require the high magnification of the electron microscope for satisfactory examination.

When debris particles are available in the dry state they can be brushed directly on to a prepared formvar film supported on a copper microscope grid and examined in the microscope. Shadowing improves definition and enables a better interpretation to be made of the shape of the particles.

When a lubricant is used in a test it is necessary to separate the debris from the lubricant. This is done by first centrifuging the sample with a solvent for the lubricant. The solvent is replaced during

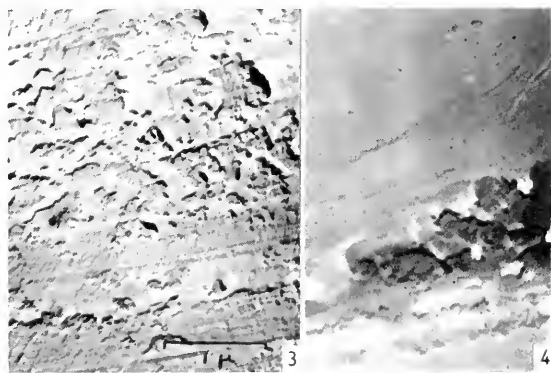


Fig. 3. Effect of E.P. Lubricant on the Initiation of Wear Damage. The build up of a surface film when using extreme pressure additives in the lubricant which seem to form a contaminated surface film in the area of contact. This film may be expected to be of low shear strength and may prevent metallic contact and seizure. The material of the cylinder is again case-hardened E.N.36 steel. Magnification 15,000.

Fig. 4. Initial Stages of Fretting Corrosion. The surface of a highly polished tool steel specimen after 15 seconds fretting (750 oscillations under a load of 10 kg and amplitude of slip 10^{-3} inches). Overstressing of the surface has manifested itself by plastic deformation and displacement of surface material; the mechanism being similar to that observed during the initial stages of wear of hard steel cylinders. Magnification 7000.

further centrifuging operations by ether until finally a dispersion of the debris in ether is obtained. One drop of this dispersion is then used for examination.

For a statistical determination of particle size in wear debris the debris from short duration tests was centrifuged on to a formvar film supported on a microscope grid which in turn, supported by a plug, formed the end of the centrifuge tube. By this method all debris from the test was collected on the formvar covered grid.

The debris taken from a steel surface although generally irregular in shape, often contains rod like particles the presence of which is believed to indicate that some of the debris may be produced by fragmentation of the pearlite structure.

Discussion and conclusions.—The micrographs obtained show that the electron microscope can, with the use of a formvar replica technique, reveal small scale features of interest in the study of wear and can yield experimental evidence for postulated theories of the mechanism of wear.

With very hard steel there is little plastic deformation, and overstressing of the surface appears to initiate damage by fine cracks and the displacement of material by microscopic adhesion of the contacting asperities (fig. 2), possibly in the manner suggested by Bowden and Tabor (2). With carbon steel in the annealed or softened state considerable plastic roughening of the contacting surface is evident (fig. 1), resulting in a pattern of ridges and grooves with mating surfaces probably conforming exactly, as suggested by Ming-Feng (6).

Although named fretting corrosion, presumably owing to the accumulation of oxidised debris, the initiation of surface damage appears to be similar to the onset of wear of rubbing surfaces, fine debris produced by the initial damage being the start of cumulative abrasive action.

The authors wish to acknowledge the assistance they have received from their colleagues in the Mechanical Engineering Research Laboratory in providing, for electron microscope study, specimens which have been subjected to various forms of wear test. In particular, Mr. A. A. Milne has provided guidance regarding the test conditions and the bearing of the results on current knowledge of friction and wear. The work described has been carried out as part of the programme of the Lubrication and Wear Division of the Mechanical Engineering Research Laboratory and the paper is published by permission of the Director.

REFERENCES

1. BARWELL, F. T. *et al.*, Proceedings Fourth World Petroleum Congress, Sect. VEC Preprint 3, 1955, Brit. Patent No. 732447.
2. BOWDEN, F. P. and TABOR, D., *The Friction of Lubrication and Solids*, University Press, 1950.
3. BRADLEY, D. E., *J. Inst. Metals* **83**, 35 (1955).
4. HALLIDAY, J. S., *Proc. Inst. Mech. Engrs.* **169**, No. 38 (1955).
5. MINTER, J. W., *J. Inst. Metals* **81**, 163 (1952).
6. MING-FENG, L., *J. Appl. Phys.* **23**, 1011 (1952).
7. MOORE, A. J. W., *Metallurgia* **38**, No. 224 (1948).
8. WRIGHT, K. H. R., *Proc. Inst. Mech. Engrs. (B)* **11B**, No. 11, 566–574 (1952–53).

Anwendungen der Mikrotomschnitt-Technik auf elektronenmikroskopische Mineraluntersuchungen

G. PFEFFERKORN, H. THEMANN und H. URBAN

Medizinische Elektronenmikroskopie, Universität Münster, Westf.

BISHER führte man elektronenmikroskopische Mineraluntersuchungen an kleinen Einkristallen bzw. Aggregaten im Durchstrahlungsverfahren durch, während Kristalloberflächen mit verschiedenen Abdruckverfahren studiert wurden. Es fehlte bislang die Möglichkeit, Mineralaggregate in Querschnitten zur Feststellung der dreidimensionalen Textur zu untersuchen.

Aus diesem Grunde haben wir versucht, das bei biologischen Objekten gebräuchliche Verfahren der Einbettung und Schnitt-Technik auf kristalline Körper anzuwenden.

Es zeigte sich, daß poröse Aggregate, in deren Hohlräume das Einbettungsmedium eindringen kann, nach der Polymerisation schon mit Glasmessern schneidbar sind. Noch günstigere Erfolge erziel-

ten wir mit dem Diamantmesser eines Ultra-Mikrotoms nach Morán der Firma Leitz. Die Kristallaggregate wurden vor der Einbettung zur Beseitigung von Feuchtigkeitsspuren im Vakuumtrockenschrank erwärmt oder mit absolutem Alkohol vorbehandelt.

Die bisherigen Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

Glaukonit, ein charakteristisch grünes kalium- und magnesiumführendes Eisenaluminiumsilikat mit Glimmerstruktur, liegt in der Natur in gerundeten, häufig eiförmigen Körnern vor, die, wie die lichtmikroskopische Untersuchung im Gesteinsdünn-schliff zeigt, aus polykristallinen Aggregaten bestehen. Mit der Schnitt-Technik kann man jetzt den Aufbau einzelner Körner genauer studieren. Schon lichtmikroskopisch zeigen die Schnitte in verschie-

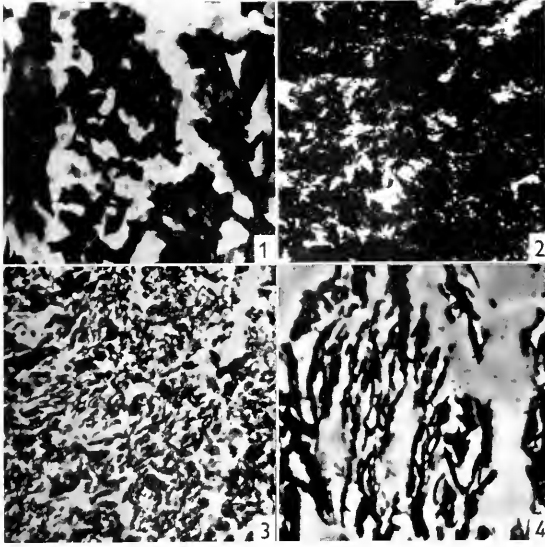


Bild 1. Glaukonit.

Bild 2. Knochen.

Bild 3. Kaolin (Zettlitz) aus 5 mm Höhe sedimentiert.

Bild 4. Kaolin (Zettlitz) aus 10 cm Höhe sedimentiert.

denen Bereichen eine gewisse Orientierung. Elektronenmikroskopisch dagegen ist man auch in der Lage, die Form und Aneinanderlagerung der einzelnen Blättchen genauer zu untersuchen. So findet man verschiedene Formen und Aggregatbildungen. Überwiegend lagern sich die Einzelteilchen zu bäumchenförmigen Aggregaten zusammen. Hierbei ist es noch fraglich, ob dies eine zufällige Aneinanderlagerung oder ein dendritisches Wachstum ist. Die Aggregate bilden ein verfilztes Netzwerk (Bild 1). Um Hohlräume finden sich sowohl konzentrische wie auch radialstrahlige Anordnungen der einzelnen Aggre-

gate. In großen Bereichen ist eine annähernd parallele Anordnung der Glaukonitteilchen zu beobachten.

Neben diesen natürlichen Mineralaggregaten können wir künstliche Aggregatbildungen, z. B. die Sedimentation von Tonmineralien verfolgen. Wir haben einen derartigen Versuch mit Zettlitzer Kaolin durchgeführt. Sedimentation aus geringer Höhe von einigen mm ergibt eine fast regellose Lagerung der einzelnen Kaolinitplättchen (Bild 3), während eine Sedimentation aus größerer Höhe (über 10 cm) eine Paralleltextur nach sich zieht (Bild 4).

Als poröses kristallines Haufwerk sind auch die Knochen aufzufassen, deren anorganischer Anteil aus Hydroxylapatitkriställchen besteht. Dieser wurde durch Behandlung der Knochen mit H_2O_2 und Extraktion in organischen Lösungsmitteln isoliert. Danach wurde eingebettet und geschnitten. Aus früheren Untersuchungen mit Durchstrahlung kleinster Körnchen oder deren Kohleabdrücken sowie von Oberflächenuntersuchungen kennt man die Anordnung der einzelnen Kriställchen. Mittels Dünnschnitten läßt sich der lockere Bau der anorganischen Substanz mit verschiedener sich kreuzender Textur in benachbarten Bereichen bestätigen (Bild 2). In den jetzt von Einbettungsmaterial erfüllten Hohlräumen lag früher der organische Knochenbestandteil. So läßt sich die Raumbeanspruchung von organischem und anorganischem Anteil leicht feststellen. An diesen Schnittbildern erkennt man deutlich, wie eng der organische und anorganische Anteil in kleinsten Bereichen miteinander verflochten sind. Durch orientierte Schnitte in verschiedenen Richtungen läßt sich so ein dreidimensionales Bild des Knochenaufbaus gewinnen.

Es steht zu erwarten, daß sich die Anwendung von Schnittuntersuchungen auf kristalline Objekte zu einem wesentlichen neuen Hilfsmittel für Mineralogie und Technik entwickeln wird.

The Use of a Freeze-drying Technique in the Investigation of Sodium-Montmorillonite by Electron Microscopy

H. C. CORBET and J. WOLFFES

*Koninklijke Shell-Laboratorium, Amsterdam
(N.V. De Bataafsche Petroleum Maatschappij)*

THE electron microscope has proved to be a valuable tool for investigations into the properties of systems consisting of montmorillonite and water. Notably the particle form and size as well as the cohesion of the particles have been studied by electron microscopy.

At first, however, the nature of the clay mineral under investigation, montmorillonite, caused some difficulties, for this mineral consists of articles

which have a large extent in two directions (several thousand Å), whereas the dimension in the third direction is very small (some tens of Å).

In the examination of such clay-water systems the technique of preparation normally followed consists in placing a drop of the suspension on a supporting film and allowing the water to evaporate in air. This method has several consequences that exert an unfavourable influence on the investigation.

In the first place it is impossible under these circumstances to maintain the proper dispersion and concentration of the montmorillonite particles. The latter are frequently present in the suspension in the form of very thin sheets. When the drop dries, these sheets tend to be flattened or distorted.

Further, the actual distribution of the particles tends to be obscured. In air-dried preparations the particles are sometimes observed as separate units, but sometimes also as sheets of considerable dimensions. The latter might have been composed of a number of smaller particles, but it is impossible to distinguish these clearly.

If, moreover, we are interested in the structure of the clay skeleton in the suspension, the investigation by electron microscopy becomes extremely difficult.

The above considerations induced us to try and find a new technique of preparation that would obviate these objections.

Application of the principle of freeze-drying has turned out to lead to good results. In this technique the specimen is rapidly frozen, after which the water is removed by evaporation of the ice formed.

Any change in the cohesion of the clay particles is minimized by freezing as quickly as possible. By pumping the water vapour from the solid phase a slow and even removal is ensured. Consequently, here again a good retention of the cohesion of the clay particles may be expected.

For the application of this technique there are several possibilities. For instance, the drop of suspension may be either placed on a specimen carrier covered with a supporting film or dried on a narrow slit, without supporting film. The cohesion of the particles has proved to be such that a $200\ \mu$ slit can be bridged by the clay skeleton, if the concentration is not too low. Freezing, too, can be effected in different ways provided it is done quickly. In our experiments the sample was immersed in liquid nitrogen.

The ice is evaporated *in vacuo*, for instance in the shadowcast installation. Usually this can be done without any special low-temperature provision. The solid phase is then maintained by withdrawing heat of evaporation of the ice from the specimen. If required, mounting on a refrigerated metal block may assist in maintaining the solid phase for a longer time.

The specimen thus freed of water cannot be submitted to any mechanical treatment, but can be investigated directly in the electron microscope.

A number of suspensions of montmorillonites have been investigated by this method. The con-



Fig. 1. Montmorillonite, prepared by freeze-drying.

centrations varied within the range of 1–0.005 % clay mineral in water.

Concentrations of 1 % and higher make specimens opaque to the electron beam. At the lowest concentrations the supporting film cannot be dispensed with because there is not enough material to span the slit in the carrier.

The results obtained with this method can be seen in fig. 1.

To obtain maximum information the stereotechnique has been employed. From these stereophotographs the spatial structure of the montmorillonite skeleton can be clearly visualized. The conclusion to be drawn from these photomicrographs is that the clay particles form a three-dimensional network of sheets and ribbons. This conclusion is in agreement with the impression previously obtained on the basis of the macroscopic behaviour of these suspensions.

Furthermore, we can conclude from these photographs that different types of bonds between the particles occur and that an edge-sheet bonding as was postulated by other investigators is certainly not very conspicuous.

The authors thank the management of the Koninklijke Shell-Laboratorium, Amsterdam, for permission to publish the above results.

Zur Kenntnis der Glasoberfläche

E. BRÜCHE und H. POPPA

Physikalisches Laboratorium, Mosbach

IN den letzten Jahren hat sich unser Laboratorium u. a. mit der Oberfläche und Oberflächenschicht des Glases sowie den sich daran knüpfenden wissenschaftlichen und technischen Problemen beschäftigt. Dazu erwies sich das Elektronenmikroskop als sehr nützlich, besonders wenn man es bei kleinen Vergrößerungen und großem Gesichtsfeld benutzt.

Wir haben nach Ausbildung eines besonderen Abdruckverfahrens mit Abdruckfolien bis zu $\frac{1}{2}$ mm Durchmesser teils in weniger als 100facher Vergrößerung gearbeitet, wobei die große Schärfentiefe des Elektronenmikroskops mehr Aussagen als das Lichtmikroskop erlaubt. Vergrößerungen über 10000fach wurden kaum benutzt. Zur Kontrolle und quantitativen Ergänzung wurde neben dem Lichtmikroskop das Interferenzmikroskop herangezogen.

Die Ergebnisse, die von uns (zum Teil auch von G. Schimmel) erzielt wurden, sind in einer Reihe von Veröffentlichungen niedergelegt (4-9); weitere Arbeiten sind in Vorbereitung. Die Untersuchungen betreffen die Fragen der Plastizität des Glases (10), der Erweichung bei hohen Drucken (3), der Sprünge und ihrer Bedeutung für den Schleifprozeß (11). Es wurde untersucht: die Härte des Glases im Kernmaterial und an der verwitterten Oberfläche, der Polierprozeß mit seinen teils chemischen Vorgängen sowie manche andere Frage. Es seien hier einige Punkte herausgegriffen und nach dem Gesichtspunkt

der Kraftwirkung und des Verhaltens des Glases kurz dargestellt.

Vorgänge bei großen Kräften.—Glas kann im Gegensatz zu Metallen keine großen Spannungen aufnehmen. Unmittelbar im Anschluß an den linearen Teil im Spannungs-Dehnungs-Diagramm tritt nach einem nur sehr schmalen Übergangsbereich Bruch ein. Besonders klein ist die Zugfestigkeit, während die zulässige Druckfestigkeit mit ~ 9000 kg/cm² mehr als zehnmal so groß ist.

Wenn z. B. eine Glasfläche durch einen aufgesetzten und unter Druck fortgeschobenen Glasstab kräftig beansprucht wird, so reißt das Glas hinter dem sich bewegenden Stab infolge der hohen Zugspannung auf und es bilden sich Risse quer zur Bewegungsrichtung (Abb. 1).

Führt man dagegen eine Diamantspitze leicht über eine Glasfläche, so dringt sie ein und zieht einen Graben. Dabei drückt sie das Glas nach beiden Seiten auseinander. So entsteht an der Grundlinie des Grabens der für das Glasschneiden wichtige Sprung ins Innere senkrecht zur Oberfläche. Bei stärkerer Beanspruchung treten in den Seitenbezirken schollenartige Ausbrüche durch die Wirkung von Sprüngen auf, die unter der Glasoberfläche fortlaufen und mehr oder minder entfernt von dem Graben die Oberfläche erreichen (Abb. 2).

Eine ähnliche Beanspruchung wie bei dem Ziehen

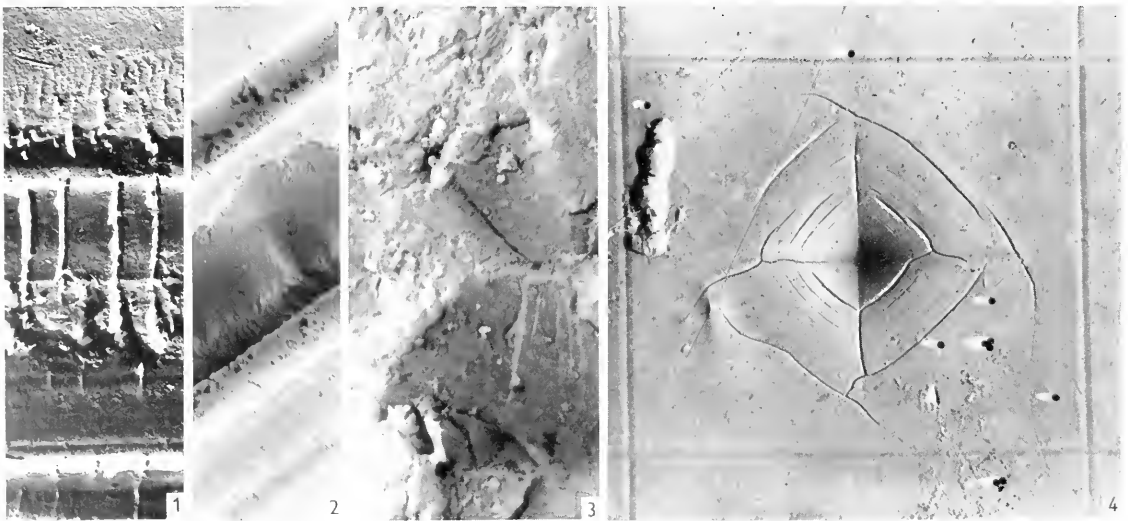


Abb. 1. Querrisse in einer Spur bei kräftiger Oberflächenbeanspruchung. Vergr. 6200 . .

Abb. 2. Aussprünge am Rande einer tiefen Ritzspur. Vergr. 5700 . .

Abb. 3. Geschliffene Oberfläche. Vergr. 8100 . .

Abb. 4. Eindruck eines Vickers-Diamanten mit Sprüngen (Präp. R. Schulze). Vergr. 1600 . .



Abb. 5. Glasbruch mit Lanzettsprüngen.

Abb. 6. Ritzspur mit herausgedrücktem Glas.

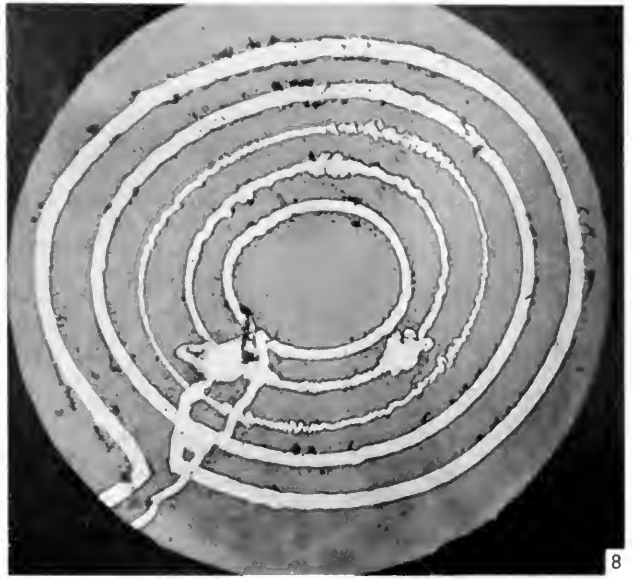


Abb. 8. Kreissysteme mit Diamantspitze bei verschiedener Kraft auf bedampfte Glasfläche geschrieben.

eines harten Gegenstandes über die Glasfläche tritt bei dem Abrollen kugelförmiger harter Gebilde auf der Glasoberfläche auf, wie sie beim Schleifprozess stattfindet. Es bilden sich Risse im Glas, die die Oberflächenschicht zerrufen und zu Ausbrüchen führen, so daß ein ausgeprägtes Gebirge die Folge ist (Abb. 3).

Sehr deutlich zeigt sich die Empfindlichkeit des Glases gegenüber Eindrücken auch bei der Härtemessung nach Vickers. Selbst bei kleinen Kräften können leicht Überbeanspruchungen eintreten, die zu Rissebildungen führen, so daß die Meßergebnisse von zweifelhaftem Wert sind (Abb. 4). Smekal hat daher auch gegenüber den neueren Messungen von Ainsworth (1) Bedenken erhoben.

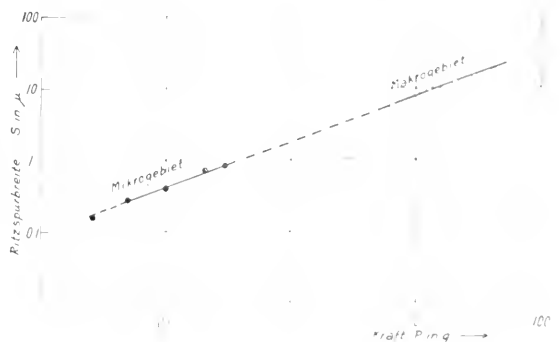
Schließlich seien noch die interessanten Lanzettsprünge erwähnt, die beim Bruch von Glas auftreten und ein Studienobjekt für die Kraftwirkungen und Spannungsverhältnisse im Glas sind (Abb. 5). Es zeigen sich außer den ausgeprägten Lanzettsprüngen noch vielerlei andere aufschlußreiche Formen.

Vorgänge bei kleinen Kräften.—Achtet man darauf, daß keine Überbeanspruchung des Glases auftritt, d.h. daß Risse vermieden werden, so tritt die Plastizität des Glases in den Vordergrund. Diese plastische Deformation bildet die Voraussetzung von einwandfreien Härtemessungen nach Vickers wie von Ritzhärtemessungen.

Fährt man mit einer Diamantspitze oder mit Diamantstaub mit kleiner Kraft über eine Glasoberfläche, so treten unter der Diamantspitze nur Drucke auf, die das plastisch werdende Glas fortdrängen, ohne außerhalb dieses Erweichungsgebietes zu hohe, d. h. sprungerzeugende Spannungen hervorzurufen. Das Glas wird seitwärts aus den Spuren gedrückt

(Abb. 6). Bei sich kreuzenden Spuren zeigen sich Durchdringungsfiguren der Ritzgräben, die die Querschnittsformen zu beurteilen erlauben.

Die Glasplastizität und das besondere Verhalten bei Ritzbeanspruchung erlaubt, Ritzhärtemessungen relativ weit in das Makrogebiet bis zu Kräften von einigen 10 g durchzuführen, ohne daß die Gefahr des Springens besteht. Man erhält charakteristische parabelförmige Kurven bei Auftragung der Ritzspurbreite als Funktion der Kraft, die auf den Diamanten wirkt. Trägt man die Ritzspurbreite im doppelt logarithmischen Diagramm über der Kraft auf, so erhält man eine Gerade (Abb. 7 rechts). Besonders aufschlußreich werden solche Messungen, wenn man zu sehr feinen Kräften von 50–500 mg übergeht. Die erforderlichen feinen Ritzspuren lassen sich mit einem Mikroschreiber durchführen (Abb. 8) und schließen sich den Messungen im Makrogebiet an (Abb. 7 links). Ihre genaue Analyse erlaubt Schlüsse

Abb. 7. Spurbreite v in Abhängigkeit von der Ritzkraft P für Fenster- bzw. Tafelglas. Sprungfreie Ritzspuren links im Mikrogebiet, rechts im Makrogebiet.

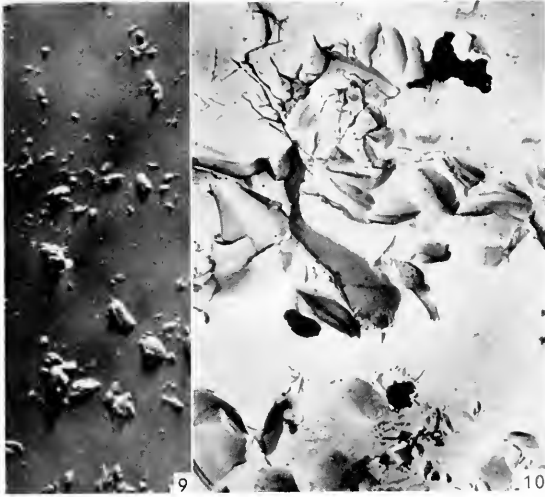


Abb. 9. Weitgehend poliertes Glas mit restlichen Schleifgrübchen. Vergr. 600

Abb. 10. Sprungsystem bei anpoliertem grobgeschliffenem Glas. Vergr. 450 \times .

über die Härte in verschiedenen Tiefen unter der Oberfläche. So wurde bei einem mehr als 10 Jahre alten Glas gefunden, daß die Härte bei 60 μ Tiefe unter der Oberfläche sprunghaft in den doppelten Wert übergang. Es bedeutet das, daß die oberste Schicht infolge der atmosphärischen Einflüsse erweicht war.

Bei noch kleineren Kräften spielen elastische Erscheinungen eine Rolle, wie sie auch zu der Deutung von gewissen Unstimmigkeiten bei Vickers-Messungen schon herangezogen worden sind (Schulze).

Der Einfluß von Feuchtigkeit und chemischen Einflüssen wird besonders deutlich bei der Behandlung des Glases mit Flußsäure. Auch hier wurden Untersuchungen angestellt, die die Grübchenbildung und ihre Unterschiede bei verschiedenen Glassorten (Libbey-Owens-Glas, Fourcault-Glas) zeigten.

Chemische Einflüsse an der Oberfläche sind auch für den technisch wichtigen Prozeß des Glaspolierens von großer Bedeutung. Hier wurden zunächst eingehende Untersuchungen über den Polierprozeß an Proben aus der optischen und Spiegelglas-Industrie durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß das Glas laufend während des Polierprozesses abgetragen wird (Abb. 9). Sind die untersten Tiefen der Schleifgrübchen erreicht, so wird trotzdem in der Praxis

die Abtragung darüber hinaus fortgesetzt, bis auch die unter diesen Tälern herunter reichenden Sprünge, die von der hohen Beanspruchung des Schleifprozesses zurückgeblieben sind, beseitigt sind (Abb. 10).

Es wurde auch nach der besondersartigen Oberflächenschicht gesucht, die eine bewegliche Oberflächenhaut darstellen soll (2). Unter der Annahme, daß das Glas nach der Druckentlastung eine Zeit von 10^{-1} Sekunden zur Erstarrung braucht, kann man sich eine solche bewegliche Schicht plausibel machen (7). Ob sie in dieser Art wirklich vorhanden ist, konnte nicht entschieden werden. Dagegen ist aus vielen Einzelbeobachtungen sichergestellt, daß sich an der Oberfläche eine besonders geartete Schicht befindet, die vermutlich mit chemischen Vorgängen zwischen Glas, Poliermittel und Wasser in Zusammenhang steht.

In einer neuen Untersuchung, die noch nicht abgeschlossen ist (Poppa), werden einzelne Schleifgrübchen während des Polierprozesses mit dem Elektronen- und Interferenzmikroskop in ihrer Gestaltsänderung verfolgt. Es gelingt so, die allmähliche Abtragung quantitativ zu erfassen.

Die verschiedenen Untersuchungen haben gezeigt, daß das Elektronenmikroskop — in seiner Aussage durch das Interferenzmikroskop ergänzt — ein wertvolles Instrument zum Studium der Eigenschaften und Prozesse ist, die bei Glas zu beobachten sind. Sie führen damit zu einem tieferen Verständnis des stofflichen Verhaltens sehr harter, spröder Körper und geben nützliche Hinweise zu technisch wichtigen Prozessen.

LITERATUR

1. AINSWORTH, L., *Trans. Soc. Glass Technol.* **38**, part I 479–500, part II 501–535, part III 536–547 (1954).
2. BELBY, G. T., *Proc. Roy. Soc.* **72**, 218–225 (1903).
3. BRIDGMAN, P. W. und SIMON, I., *J. Appl. Phys.* **405–413**, **24** (1953).
4. BRÜCHE, E. und POPPA, H., *Glastech. Ber.* **28**, 232–242 (1955).
5. — *ibid.* **29**, 183–192 (1956).
6. — *Silikattechnik* **6**, 378–384 (1955).
7. — *Z. angew. Physik* **8**, 486–492 (1956).
8. BRÜCHE, E. und SCHIMMEL, G., *Glastech. Ber.* **27**, 239–247 (1954).
9. — *Z. angew. Physik* **7**, 378–385 (1955).
10. KLEMM, W. und SMEKAL, A., *Naturwiss.* **29**, 688–690 (1941).
11. PRESTON, F. W.: *Trans. Opt. Soc. London* **23**, 141–164 (1922).

Elektronenoptische Untersuchung natürlicher Opale in Verbindung mit differentialthermischen und röntgenographischen Studien über die Polytypie des SiO_2 *

A. MAAS

*Mineralogisch-Petrologisches Institut der Universität Bonn und
Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn*

GEGENSTAND der Untersuchung sind die in der Natur vorkommenden in verschiedenem Maße in Eintrocknung und Kristallisation befindlichen Gele der Kieselsäure bis hin zum Chalcedon. Der strukturelle Ordnungszustand der eigentlichen Opale ergab sich nach den älteren lichtmikroskopischen Untersuchungen als überwiegend amorph, der des Chalcedons und Achats als überwiegend kristallin (1, 10).

In neuerer Zeit konnte dann mit Hilfe röntgenographischer Methoden, erstmals von Levin und Ott (12), in einer größeren Anzahl Opalvarietäten das Vorliegen verschiedener kristallisierter SiO_2 -Modifikationen neben einem offenbar großen amorphen Anteil nachgewiesen werden (4, 11, 14). Die erhaltenen Röntgen-Diagramme ließen jedoch weder beim normalen Debye-Scherrer-Verfahren noch bei den bedeutend höher auflösenden und empfindlicheren Methoden nach Guinier und Bragg-Brentano (mit Zählrohrregistrierung) eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen SiO_2 -Modifikationen zu. Ungeklärt blieb auch der Umwandlungsmechanismus der SiO_2 -Modifikationen in den natürlichen Opalen.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen (20) bestand darin, die Natur der in den verschiedenen Opalvarietäten vorliegenden SiO_2 -Modifikationen und ihren Bildungs- und Umwandlungsmechanismus mittels neuerer, leistungsfähigerer Verfahren zu untersuchen.

Das Zustandsdiagramm des SiO_2 .—Nach dem idealen Zustandsdiagramm von Fenner (2, 3, 4, 5) für das System SiO_2 (5), wonach 8 verschiedene Modifikationen auftreten, und zwar α - und β -Quarz, α -, β - und γ -Tridymit, α - und β -Cristobalit, Schmelze. Die Umwandlungstemperaturen im System SiO_2 , die in neuerer Zeit insbesondere für die keramische Industrie ein großes Interesse erlangt haben, wurden von Fenner durch Messung der beim Erhitzen auftretenden Wärmetönungen nach der kurze Zeit vorher von W. C. Roberts-Austen (17) eingeführten differentialthermischen Methode bestimmt. In zahlreichen späteren Veröffentlichungen anderer Autoren (15, 21) konnten die Ergebnisse Fenners zwar im wesentlichen bestätigt werden, jedoch ergaben sich oftmals bei den natürlich vorkommenden SiO_2 -

Modifikationen erhebliche Abweichungen von den erwähnten Umwandlungstemperaturen, insbesondere beim Tridymit und Cristobalit. Auf das anomal breite Intervall der α - β -Umwandlung des Cristobalits (180–270 C) hatte bereits Fenner hingewiesen (4). In neuesten Arbeiten hat O. W. Flörke (7, 8, 9) nachgewiesen, daß Tridymit und im allgemeinen auch Cristobalit fehlgeordnete Strukturen sind und daß die bei den SiO_2 -Modifikationen auftretenden Anomalien hierauf zurückzuführen sind. Tridymit ist wahrscheinlich nur beim Vorhandensein von Fremdionen realisierbar (6).

Während man bei den vorstehend nur kurz skizzierten Untersuchungen zur Überprüfung des SiO_2 -Zustandsdiagramms möglichst *reine* amorphe oder kristallisierte Phasen des SiO_2 zu Grunde legte, sind die Verhältnisse bei den natürlichen Opalen wesentlich komplexerer Natur. Es konnte erwartet und durch eigene Voruntersuchungen bestätigt werden, daß der Kristallinitätszustand und der Anteil der einzelnen SiO_2 -Modifikationen in Opalen von ihrer Vorgeschichte abhängig sind und daß für ihren differenzierten Nachweis die Empfindlichkeit der bisher benutzten Untersuchungsverfahren gesteigert werden muß.

Differentialthermo-Analyse.—Die Wärmetönungen sind bei den Umwandlungen der SiO_2 -Modifikationen von außerordentlicher Kleinheit (maximal einige cal g). Es mußte also eine apparative Anordnung gefunden werden, welche die thermischen Effekte genügend empfindlich registriert. Die dazu entwickelte DTA-Anlage besteht aus einem elektrisch beheizten vertikal stehenden Ofen, in dessen Temperaturfeld in radialsymmetrischer Verteilung 13 sehr dünnwandige Pt-Zylinder als Probenbehälter angeordnet sind. Es können so unter völlig gleichartigen Verhältnissen bis zu 10 Proben gleichzeitig untersucht werden. Eine Regelanlage nach dem Transduktor-Prinzip (vormagnetisierte Drosselspule, Sättigungswinkelsteuerung) mit eingebauter getrennter Spannungs- und Stromstabilisierung ermöglicht einen stetigen und streng reproduzierbaren Temperaturanstieg des Ofens. Die Registrierung der mit Thermo-Elementen gemessenen Wärmetönungen der Probe erfolgt nach Verstärkung der Thermospannungen mittels Photozellenkompensator durch einen Punktschreiber, der in zweisekündlicher Punktfolge die Kurven von 6 Meßstellen gleichzeitig aufzeichnet. Die Empfindlichkeit der Registrierung beträgt $0,04 \text{ C} \cdot 0,01 \text{ C pro mm Skalenlänge}$ (13).

Röntgeneinstruktur-Untersuchungen.—Hierzu wurde ein Bragg-Brentano-Goniometer nach Prof. Berthold mit Zählrohrregistrierung der Interferenzen benutzt. Durch Verwendung einer Feinfokusröhre in Verbindung mit einem hochspannungs- und heizspannungsseitig stabilisiertem Netzgerät und durch spezielle apparative Maß-

* Teilergebnis einer Dissertationsarbeit, Mineralog. Petrolog. Institut der Universität Bonn (1956). — Herrn Professor Dr. A. Neuhaus sei für die Überlassung des Themas sowie wertvolle Anregungen und Diskussionen gedankt.

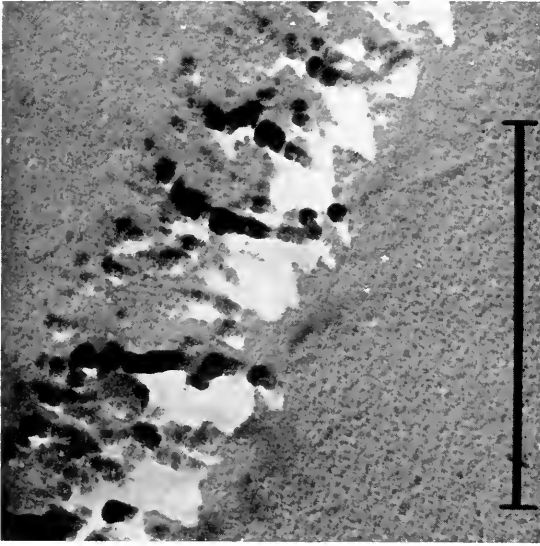


Abb. 1. Holzopal (Rosenau/Siebengebirge). Kollodiumabdruck, Bedampfung SiO₂, Vergrößerung elektronenoptisch 11300, Gesamtvergrößerung 50000.

nahmen konnte die Empfindlichkeit der Anordnung so weit gesteigert werden, daß die sehr intensitätsschwachen Interferenzen der Opale auch bei großen Glanzwinkeln noch registriert werden.

Es wurden folgende Opalvarietäten untersucht: Holzopal — Stenzelberg/Siebengebirge und Rosenau/Siebengebirge; Feueropal — Zimapan/Mexiko; Milchopal — Baldiastro/Piemont; ferner Chalcedon — Island.

Die differentialthermischen Untersuchungen ergaben, daß bei den genannten Opalen stets mehrere SiO₂-Modifikationen nebeneinander vorliegen, und zwar mit verschiedenem Kristallisationszustand (Korngröße, Fehlordnung) und unterschiedlichem Anteil der Modifikationen. Kristallisationsgrad und Art der vorliegenden Phasen lassen sich durch geeignete thermische Behandlung verändern. — Ausführliche Veröffentlichung erfolgt in Kürze (2).

Die röntgenographischen Ergebnisse konnten die differentialthermischen Befunde bestätigen. Bezeichnend ist die starke „Verbreiterung“ der Interferenzen und die ungewöhnliche Höhe der Untergrund-Kurve, die auf den erwarteten hohen Dispersitätsgrad hinweist und den Einsatz elektronenoptischer Methoden nahelegt.

Die elektronenoptischen Untersuchungen wurden mit dem elektromagnetischen Siemens-Übermikroskop 100 d durchgeführt. Feueropal und Milchopal, die unter gleichen Bedingungen im Edelstahlmörser zerkleinert wurden, lassen in elektronendurchlässigen Randzonen großer Bruchstücke kleine Partikel erkennen, die in eine strukturlos erscheinende Masse eingebettet sind. Um diese Strukturen *in situ* ohne vorangegangene mechanische Beanspruchung zu erfassen, wurden von sehr gut polierten ebenen Oberflächen verschiedener Opale, die zuvor mit Hilfe der DTA und der Röntgenfeinstruktur-Analyse untersucht worden waren, Kollodiumabdrücke herge-

stellt, deren Negativ-Seiten kombiniert senkrecht und unter einem Winkel von 30° mit SiO₂ bedampft wurden. Durch die Senkrechtbedampfung konnten Artefakte vermieden werden, die auftraten, wenn die Abdrücke nur schräg bedampft wurden.

Die Oberflächen des untersuchten Feueropals, Milchopals, Chalcedons und Holzopals erwiesen sich im allgemeinen elektronenoptisch, abgesehen von vereinzelt Schleifspuren sowie beim Schleifen angeschnittenen Hohlräumen, als weitgehend strukturlos, wobei der Chalcedon ein Extrem an Feinheit darstellt. Nur bei dem stellenweise bereits lichtmikroskopisch inhomogen erscheinenden Holzopal konnten vereinzelt hexagonal ausgebildete Partikel von ca. 250–max. 1000 Å Größe festgestellt werden. Bedingt durch die im Vergleich zu den übrigen Opalen geringe Härte des Holzopals treten ausgeprägte Schleifspuren auf, in denen Partikel der gleichen Größenordnung sichtbar werden (Abb. 1). Da die differentialthermischen und röntgenographischen Untersuchungen der Opale ergeben hatten, daß in ihnen verschiedene SiO₂-Modifikationen nebeneinander vorliegen, wurde versucht, diese durch differentielle Ätzung sichtbar zu machen.

An Einkristallen wurden solche Ätzversuche von Pfefferkorn (16) beim Kalkspat vorgenommen. Seine Untersuchungen über den Realbau dieser Kristalle zeigen, daß bei geeigneter Anätzung in den Ätzgruben von Kalkspat, die durch Störstellen des Kristallgitters hervorgerufen werden, scharfkantig idiomorph ausgebildete Rhomboeder-Blöcke von ca. 300 Å Größe als kleinste Bausteine des Realbaues sichtbar werden.

In Voruntersuchungen wurde eine geeignete Konzentration und Einwirkungsdauer der als Ätzmittel verwandten Flußsäure HF ermittelt. (Über die Löslichkeit von SiO₂-Modifikationen in HF siehe (19).) Sie ergaben 0,5 % HF bei 30 sec. Ätzdauer.

Die hochglanzpolierten, mittels Kollodiumabdrücken gereinigten und anschließend mit 0,5%iger HF geätzten Anschliffe von Feueropal, Milchopal und Holzopal zeigen übereinstimmend Partikel mit mehr oder weniger morphologisch ausgebildetem Habitus, die in eine mikroskopisch strukturlos erscheinende Substanz eingebettet erscheinen und oftmals zu Nestern gruppiert auftreten. Die in den Aufnahmen schwarz erscheinenden Partikel wurden durch den Ätzvorgang aus der Oberfläche herausgelöst und mit der Abdruckfolie abgehoben. Eine gleichartige Erscheinung wurde von A. Schrader (18) bei angeätzten Stahlschliffen beobachtet. Die Größe dieser herausgelösten Partikel beträgt in Übereinstimmung mit der Größe der in der Oberfläche verbliebenen Partikel zwischen ca. 300 und 500 Å.

Der untersuchte Chalcedon wurde bei dieser schwachen Ätzung kaum angegriffen und ließ lediglich vereinzelt große ovale Ätzstellen von einigen μ Größe erkennen, ähnlich den elektronenoptischen Bildern von mit HF angeätzten Gläsern. Dieser

Befund steht in Übereinstimmung mit den röntgenographischen Ergebnissen, wonach der untersuchte Chaledon wesentlich aus α -Quarz besteht.

Beim Erhitzen der Opale treten, wie bereits erwähnt, Strukturveränderungen auf, die differentialthermoanalytisch und röntgenographisch verfolgt wurden. Es wurde nun versucht, auch elektronenoptisch einen Einblick in die sich hierbei vermutlich vollziehenden mikroskopischen Veränderungen zu erhalten. Hierzu wurden die Anschliffe unter gleichartigen thermischen Bedingungen wie die DTA-Pulverpräparate im DTA-Ofen erhitzt und abgekühlt. Beim Vergleich der elektronenoptischen Aufnahmen der thermisch vorbehandelten Feuer-, Milch- und Holzopale mit den Aufnahmen der entsprechenden unbehandelten Proben sind deutliche Habitus- und Größenveränderungen der Partikel zu erkennen. Die Untersuchungen über diese Strukturveränderungen von Opalen nach thermischer Behandlung sind noch im Gange.

Auf Grund des elektronenoptischen Befundes dürften sich die Anomalien des Röntgendiagramms in der Weise erklären lassen, daß die Verbreiterung der Interferenzen durch die extreme Kleinheit der kristallisierten Partikel bedingt und die anomale Höhe der Untergrund-Kurve auf einen großen Anteil amorpher bzw. stark fehlgeordneter Substanz zurückzuführen ist.

Dem Leiter des Zentral-Laboratoriums, Herrn Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann danke ich für die Betreuung und stete Unterstützung der elektronenoptischen Unter-

suchungen. — Herrn Prof. Dr. H. Ginsberg und Herrn Dr. Hüttig bin ich für ihr Entgegenkommen bzgl. der Benutzung einer neuen Röntgenfeinstruktur-Apparatur der Vereinigten Aluminiumwerke AG, Bonn, zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. BÜSCHLI, O., *Verh. naturh. med. Ver. Heidelberg*, N. F. 6, 287–348 (1899). Mit 3 Tafeln.
2. FENNER, C. N., *J. Wash. Acad. Sci.* 2, 471 (1912).
3. — *Amer. J. Sci.* 36, 331 (1913).
4. — *Z. anorg. Chem.* 85, No. 1/2, 133 (1914).
5. — Diagramm entnommen aus FEHL, E., *Physik, Chemie der Silikate*, Aufl. 1941.
6. FLÖRKE, O. W., *Fortschr. Mineral.* 32, 33 (1953).
7. — *Naturwiss.* 41, 371 (1954).
8. — *Neues Jahrb. Mineral., Monatsh.* 217 (1955).
9. — *Ber. deut. keram. Ges.* 11, 12, 369 (1955).
10. HEIN, H., *Neues Jahrb. Mineral., Monatsh. Beilageband XXV*, 182–231 (1908).
11. HOLMANN, U., WILM, D., und ENDILL, K., *Z. angew. Chem.* 47, 539 (1934).
12. LYNIS, J. und OIT, E., *Z. Krist.* 85, 305 (1933).
13. MAAS, A., *Fortschr. Mineral.* 34, 54 (1956).
14. MARCHI, A., *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 1, 562 ff. (1939).
15. VAN NIEUWENBURG, C. J., *Ber. deut. keram. Ges.* 9, 228 (1928); *Rec. trav. chim. Pays-Bas* 47, 627 (1928); *ibid.* 48, 402 (1929).
16. PIFFERKORN, G., *Umschau* 18, 557 (1951).
17. ROBERTS-AUSTEN, W. C., *Proc. Roy. Soc.* 49, 347 (1891).
18. SCHRADIR, A., *Z. wiss. Mikroskop.* 60, H. 6/7 (1952).
19. SCHWARZ, R., *Z. anorg. Chemie* 76, 422 (1912).
20. Teilergebnis aus einer Dissertationarbeit, Mineralogisch-Petrologisches Institut der Universität Bonn (1956).
21. TOOL, A. Q., *Phys. Rev.* 53, 945 (1938).

A Reflection Electron Microscope Study of Diamond Cleavage Surfaces

M. SEAL

*Research Laboratory for the Physics and Chemistry of Surfaces,
Department of Physical Chemistry, University of Cambridge*

THE existence of two types of diamond, which differ in a number of physical properties, was first reported by Robertson, Fox, and Martin (7). These workers classified diamonds as type I or type II on the basis of their ultra violet and infra red absorptions, photoconductivity, and birefringence. Type I diamonds have an absorption at 8μ in the infra red, absorb strongly below about 2900 \AA in the ultra violet, show but little photoconductivity, and are birefringent. Type II diamonds have no 8μ absorption, are transparent down to about 2200 \AA , have good photoconductivity, and are optically isotropic. The problem of the two types of diamond has been studied extensively in the last twenty years, and the two types have been sub-divided into further classes. The present position of this work is described

in articles by Sutherland, Blackwell, and Simeral (8), and by Champion (3).

It has also been found, using optical multiple beam interferometry, that there are differences in the nature of the cleavage surfaces of diamonds of the two types (9, 10). The cleavage surfaces of type I diamonds are, on a micro-scale, rough and almost conchoidal in nature; those of type II diamonds are very much smoother.

In this paper an account will be given of results obtained from a reflection electron microscope examination of cleavage surfaces of diamonds of both types. Diamond cleaves along octahedron $\{111\}$ planes: it was checked by electron diffraction that the planes studied had this orientation. The classification of the diamonds was made on the basis of their

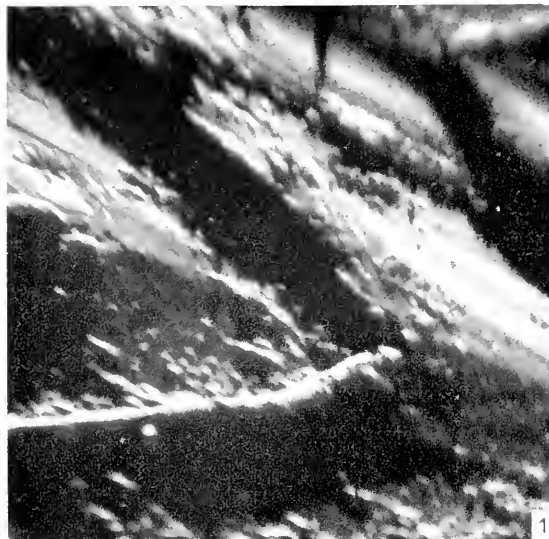


Fig. 1. Reflection electron micrographs of a type I diamond cleavage surface. $m_1 \sim 2000$; $m_{11} \sim 250$.

ultra violet absorption. The diamonds were cleaned in nitric acid, followed by distilled water. A layer of silver about 500 \AA thick was evaporated onto the surface to prevent charging of the specimen in the electron beam. The examination was carried out using the Metropolitan Vickers EM3 electron microscope modified for use in reflection (4).

Reflection electron micrographs typical of diamonds of the two types are shown in figures 1 and 2. The conchoidal nature of the type I cleavage and the much smoother nature of the type II cleavage are apparent. The surface roughnesses may be estimated from measurements on the micrographs. The type I cleavage surfaces are so rough, however, that it is difficult to give an accurate value of the change in height which corresponds to a particular shadow, since the local slope of the surface on which the shadow falls is not known. Certainly, there are fairly abrupt changes in height of a micron or more on the part of the surface shown in figure 1. Other parts of the surface of this diamond were considerably rougher and were too rough for examination by reflection electron microscopy. The type II surface shown in figure 2 is considerably smoother. The steps seen here are probably all less than 1500 \AA in height, and many of the regions between the larger steps are flat to within 300 \AA . Other regions of type II diamond cleavage surfaces are similar in appearance, but there are occasional large steps of perhaps a micron in height. These large steps differ from those on type I diamonds in that they separate relatively smooth regions.

The lines running in the direction A on figure 2 are of interest. It is believed that they correspond to lamellae in the diamond. Type II diamonds are known to have a lamellar structure. Robertson, Fox, and Martin (7) reported the existence of fine

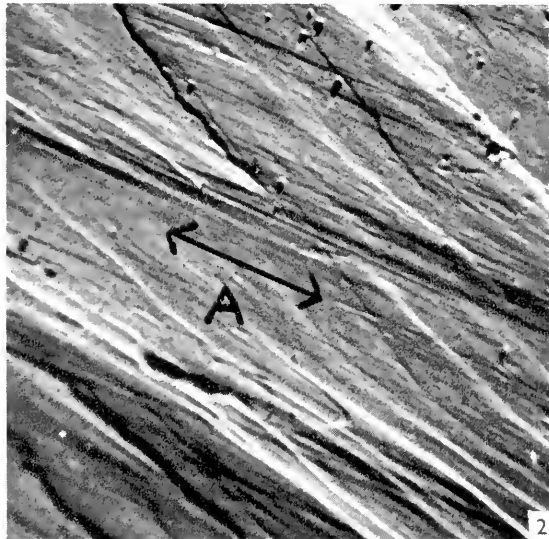


Fig. 2. Reflection electron micrograph of a type II diamond cleavage surface. $m_1 \sim 3000$; $m_{11} \sim 400$.

laminations parallel to $\{111\}$ planes on type II cleavage surfaces. These laminations were about 10μ apart, but some may have been as narrow as 1μ . Such laminations have since been observed by Ramachandran (6) (thicknesses 10 to 100μ) and by Custers (5) (thicknesses of the order of 5μ). The lines A on figure 2 are also spaced about 5μ apart. Similar lines are visible on most of the other micrographs of type II diamonds.

Type I diamonds do not, however, always have an appearance similar to that of fig. 1. Regions of a type I cleavage surface have been found which appear in the reflection electron microscope indistinguishable from a type II cleavage. Micrographs have also been obtained showing regions where the two types of cleavage join along quite a sharp and well defined boundary. It is suggested that, in these cases, the type I diamond has regions of type II material within it. It is probable (2) that type I diamonds have a mosaic structure and are for the most part highly dislocated, whereas type II diamonds consist of lamellae of relatively perfect material. It would then be quite reasonable for there to be inhomogeneity in the perfection of individual diamond crystals. Indeed, Ahearn (1) has shown that there may be inhomogeneities in the ultra violet (2550 \AA) transmission and alpha particle bombardment conduction of individual diamonds and suggests that some diamonds may contain regions of both type I and type II material. Furthermore, inhomogeneity in the ultra violet transmission (at 2850 \AA) of a diamond has recently been observed by the author. The observations on diamond cleavage surfaces thus support Ahearn's views.

Conclusion.—Cleavage surfaces of diamonds of types I and II appear different in character and roughness when examined in the reflection electron

microscope. Type I diamonds show a conchoidal type of cleavage surface with local changes in height of several microns: type II diamonds show much smoother cleavage surfaces which do, however, have a considerable amount of fine structure ranging up to perhaps 1500 Å in depth, with a few larger steps of a micron or more crossing the surface. Regions similar in appearance to type II cleavage surfaces have been found on a type I diamond. It is believed that this is due to real inhomogeneity in the diamond. The results are in agreement with those obtained by other workers and, in particular, with those obtained by Wilks (11) in a recent interferometric study of diamond surfaces.¹

¹ The above results are in agreement with some observations made by Custers (unpublished) on the inhomogeneity in the optical properties of diamonds. He observed that, under ultra violet irradiation, some diamonds fluoresced strongly in parts and were non-fluorescent in others. These diamonds showed local differences in transparency below 3000 Å. One diamond in particular showed inhomogeneity in the visible part of the spectrum, being partly blue and partly white with a clear boundary between the two regions.

The author thanks Dr. F. P. Bowden, C.B.E., F.R.S., for his advice and encouragement, and Messrs. Industrial Distributors (1946) Ltd. for a research grant and for the loan of the diamonds.

REFERENCES

1. AHEARN, A. J., *Phys. Rev.* **96**, 828 (1954).
2. CHAMPION, F. C., *Proc. Roy. Soc. A* **220**, 485 (1953).
3. — *ibid.* **234**, 541 (1956).
4. COURINNY-PRAIT, J. S., MENTIR, J. W., and SIAL, M., *Proc. 3rd Intern. Conf. Elect. Microsc.* London 1954.
5. CUSTERS, J. F. H., *Research* **4**, 131 (1951).
6. RAMACHANDRAN, G. N., *Proc. Indian Acad. Sci. A* **24**, 65 (1946).
7. ROBERTSON, R., FOX, J. J., and MARTIN, A. E., *Phil. Trans. A* **232**, 463 (1934).
8. SUTHERLAND, G. B. B. M., BLACKWELL, D. E., and SIMERAL, W. G., *Nature, Lond.* **174**, 901 (1954).
9. TOLANSKY, S., *Microstructures of Diamond Surfaces*. N.A.G. Press, London, 1955.
10. WILKS, E. M., *Dissertation*, University of London, 1952.
11. — Private communication (1956).

The Direct Observation in the Scanning Microscope of Chemical Reactions

J. H. L. MCAUSLAN and K. C. A. SMITH

P.C.S. Laboratory, Department of Physical Chemistry, and Engineering Laboratories, University of Cambridge

THIS paper contains an account of the application of the scanning electron microscope (2) to an exploratory study of the slow chemical decomposition of single crystals of explosive materials.

The materials so far investigated in this way have been the metallic azides and lead styphnate. Although normally considered explosive these materials will decompose slowly if the temperature is kept below about 200 C. Their explosive properties have been extensively studied and it is known that reaction starts from small centres of 10^{-3} – 10^{-5} cm, termed hot-spots, and grows to burning and detonation by a self-heating mechanism.

It was considered that an electron-microscopical study of the slow thermal decomposition would give information on reaction mechanisms possible in the hot-spot size range. Study in the light microscope had already shown large scale break-up effects but until Bowden and Singh (1), with a standard replica method, and Sawkill (3), with direct viewing of very thin crystals, there was little work done in this field.

The problem of specimen heating in an electron beam is a well known one to electron microscopists and Sawkill in fact used this effect to decompose crystals during direct observation. This was not entirely satisfactory as he suspected from his results

that the primary action of bombardment by high-energy electrons was responsible for some of the change. Attempts have been made to observe explosive crystals in the conventional reflexion instrument without success, the high intensity of bombardment resulting in premature and uncontrolled decomposition.

Because of the low intensity obtaining in the scanning instrument the above difficulties may be largely overcome and it has been found possible to observe the genuine effects of thermal treatment

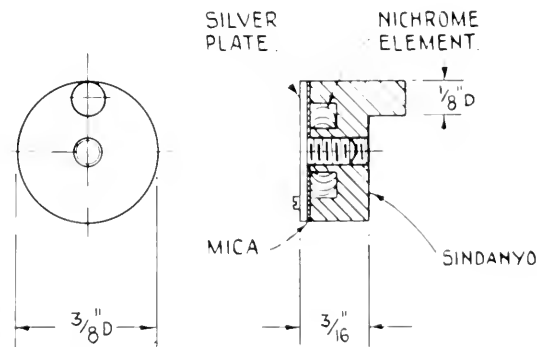


Fig. 1. Hotplate for scanning electron microscope.



Fig. 2 a. Needle crystal of silver azide—partly decomposed by heat.



Fig. 2 b. End of needle crystal of lead styphnate. Note crystallographic break-up due to dehydration.

directly in the microscope by means of a hot stage (fig. 1).

Bombardment of the specimen in the conventional and scanning microscopes.—In order to extract a given amount of information from the image in the electron microscope a certain minimum number of electrons, as determined by quantum and fluctuation considerations, must interact with the specimen. This minimum number will be determined, among other factors, by the quantum efficiency of the transmission process between the specimen and the brain of the observer; the quantum efficiency being defined as the ratio of the number of electrons or quanta associated with the point of minimum quanta transfer to the number falling upon the specimen. The bombardment of the specimen is smaller in the scanning instrument mainly because of its superior quantum efficiency.

The conventional instrument operating in transmission will have a quantum efficiency, during recording of the image, not far short of unity since virtually all of the electrons passing through an element of the specimen will fall on the corresponding element of the plate and be recorded. However, when observing the image directly the quantum level falls because of the low efficiency of the fluorescent

screen and the small angle subtended at the screen by the eye. It may be estimated that under these conditions the quantum efficiency is about $4 \cdot 10^{-3}$ (4), that is, for every single visual stimulus which the observer receives, about 250 electrons must pass through the specimen.

The quantum efficiency of the conventional instrument operated in reflexion is very much worse because, under the usual conditions of operation, only about 1 in 10^3 of the electrons hitting the specimen will pass through the objective aperture. This factor will, of course, vary widely according to the nature of the specimen, the observation angle and the objective aperture, but for the purposes of this paper will be assumed constant at 10^{-3} . Thus the quantum efficiency will be of the order of 10^{-3} when recording and 10^{-5} – 10^{-6} when viewing directly.

In the scanning instrument an electron multiplier is used to collect the electrons passing from the specimen and the input of the multiplier may be arranged to collect electrons of all energies over a very large solid angle. Since the total emission ratio may, under certain conditions, exceed unity the transfer efficiency at this stage of the process may well approach unity. The high gain of the electron multiplier ensures that the quantum level is

maintained at all subsequent stages so that the quantum efficiency in the scanning instrument may approach unity for all modes of operation.

For reflexion operation, therefore, the total number of electrons which the specimen must receive will be greater in the conventional instrument by roughly a factor of 10^3 for recording and 10^5 – 10^6 for direct observation at equal integration times of observation. In the conventional instrument the integration time is usually that of the eye (0.2 second) whereas in the scanning instrument a long persistence screen is used. This gives an additional factor of 10 or so in favour of the scanning instrument which means that the total current passing to the specimen during direct viewing in reflexion may well be higher in the conventional instrument by a factor of 10^7 .

So far, only the total dosage of specimen and the current passing to the specimen have been considered; the current density incident on the specimen is also of importance. The maximum current density which can be brought to bear on the specimen is limited by the electron gun and will be the same in both instruments. Other things being equal, therefore, the rate of transfer of information in the scanning instrument in which the elements are imaged sequentially, will be much lower. However, for reflexion operation, the improved quantum efficiency and longer integration time of the scanning instrument offsets the reduced time efficiency, and the information content in the directly observed pictures will therefore be much the same.

An additional factor which reduces the heating effect is that in the scanning instrument only the area actually observed is irradiated by the electron beam whereas in the conventional instrument the irradiated area will be appreciably larger than the field of view, even with a specimen screening aperture. Also, in the scanning instrument, the primary effects of electron bombardment are reduced by the use of a comparatively low accelerating voltage (~ 15 kV).

Results.—Silver azide melts at 230°C and detonates at 350°C but at temperatures between 120°C and 230°C it decomposes slowly, giving off nitrogen and leaving metallic silver. It is soluble in ammonium hydroxide and specimens were prepared by recrystallisation from this solution on to silver discs which screw into the hot stage.

Fig. 2a shows a needle shaped crystal of silver azide which has decomposed from one end, because of the better contact with the hot plate at that end.

Decomposition is not considered to be complete at this stage, but it can be seen that the crystal is breaking up into pebbles of approximately 0.3μ in size. Complete decomposition would reduce this size to about 0.2μ which is the size most common in other larger crystals heated in this way.

It is not clear yet whether these small pebbles are formed by aggregation of silver by a diffusion process into preferred sizes, as found by Sawkill, or whether the initial size is determined by a fine structure of dislocations and decomposition to pure silver then follows. It is evident, however, from later work that free surfaces assist in the mechanism of decomposition. This is shown by the fact that the top and side faces of a larger crystal decompose more rapidly than does the bulk, when heated from the underside.

A break-up of larger dimensions $1 \rightarrow 2 \mu$ has been observed which is attributed to a polymorphic phase change known to take place at 180°C (Sawkill and Duke, independently, private communications). The pieces produced in this way are angular in shape and very different from those in Fig. 2a. When this has occurred it is difficult to decompose the crystal further because of the poor thermal conductivity through the porous mass, and high radiation losses from the large surface area.

The second material, lead styphnate monohydrate, was examined to determine the effects of dehydration which takes place above 120°C. Chemical decomposition at this temperature is very slow and the major effects can be attributed to the loss of water which is tightly bound in the material. Fig. 2b shows one stage of the dehydration process, the crystallographic nature of break-up is very apparent.

Break-up in this way by polymorphic change or dehydration, which can be considered a physical rather than a chemical change, has some bearing on the study of reaction kinetics by pressure-time curves. Since the rate of reaction normally depends on surface area any mechanism not initially related to the chemical change but which causes an increase in surface area will assist in the later stages of the reaction, and must be considered in the final analysis.

REFERENCES

1. BOWDEN, F. P. and SINGH, K., *Proc. Roy. Soc. A* **227**, 22 (1954).
2. McMULLAN, D., *Proc. Inst. Elec. Engrs.* **100** (11), 245 (1953).
3. SAWKILL, J., *Proc. Roy. Soc. A* **229**, 135 (1955).
4. SMITH, K. C. A. and OATLEY, C. W., *Brit. J. Appl. Phys.* **6**, 391–399 (1955).

Über das Teilchenwachstum sublimierbarer Stoffe, dargestellt am Beispiel des Zinksulfids

W. MÜLLER und W. JAENICKE

Laboratorium für Elektronenmikroskopie
und Institut für physikalische und Elektrochemie, Technische Hochschule, Karlsruhe

CHEMISCH gefälltes ZnS besitzt für industrielle Verwendung (z. B. für Leuchtschirme) im allgemeinen eine zu kleine mittlere Korngröße (Leverenz, 1949). Die Keimbildungsgeschwindigkeit für die Entstehung des ZnS aus der chemischen Fällung ist nämlich sehr groß, so daß relativ kleine Primärkristallite entstehen. Für verschiedene Fällungen ergaben sich 21, 25 und 16 $m\mu$ als mittlerer Korndurchmesser. Sie wurden aus Zinksulfatlösung mit Natriumsulfid-lösung gefällt. Die Bedingungen für ein Kornwachstum wurden untersucht und auch versucht, den Wachstumsmechanismus aufzudecken.

Prinzipiell läßt sich ein Wachstum durch eine Wärmebehandlung erreichen. Reines Zinksulfid (erhalten durch mehrtägige Dialyse) wächst beim Glühen bei 600 C nach 30 Minuten von 20 auf 47 $m\mu$ mittlerer Korngröße an. Verlängerung der Glühdauer bringt kein wesentliches Wachstum mehr.

Versetzt man das dialysierte Zinksulfid mit NaCl, so wachsen die Kristallite unter genau den gleichen Bedingungen beträchtlich stärker an. Die mittlere Korngröße beträgt nun etwa 200 $m\mu$, also etwa das 4,5fache wie beim reinen ZnS. Nach dem Glühen wurde der Fremdsalzgehalt wieder herausgewaschen. Geglüht wurde immer in Stickstoffatmosphäre, um Oxydbildung zu verhindern.

Im einzelnen hängt das Teilchenwachstum und auch die Teilchenform von einer Reihe von Parametern ab wie z. B. von den Ausgangssubstanzen für die Fällung, den Fällungsbedingungen, der Art und Konzentration des Fremdsalzes und von der Temperatur und Dauer der Glühbehandlung. Diese Parameter wurden variiert. Es wird im folgenden auf einige Teilergebnisse näher eingegangen.

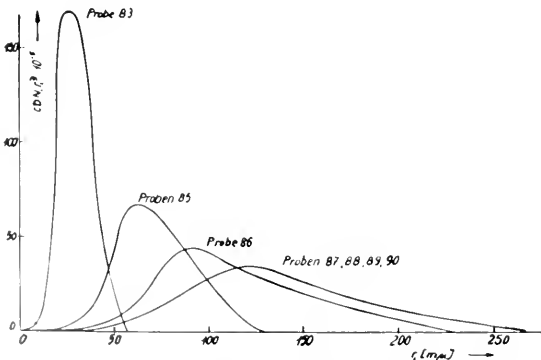


Abb. 1. Verteilungskurven, auf gleiche Massen normiert, für die Glühzeiten 3, 10, 15, 20, 30, 40, 60 Minuten.

Abb. 1 zeigt einige Verteilungskurven über die Korngrößen der ZnS-Kristalle in Abhängigkeit von der Glühzeit. Die ZnS-Proben wurden hierzu aus $ZnSO_4$ mit Na_2S gefällt, dialysiert und dann mit NaCl versetzt. Zur Ermittlung der Verteilungskurven wurden jeweils einige Hundert bis Tausend Teilchen vermessen. Die Kurven sind auf gleiche Massen normiert. Als Glühzeiten wurden 3, 10, 15, 20, 30, 40 und 60 Minuten gewählt. Die Glühzeit ab 20 Minuten Glühzeit ab bleibt bei dieser Temperatur die Verteilungskurve praktisch die gleiche.

Abb. 2 zeigt die mittleren Korndurchmesser, welche aus diesen Verteilungskurven gewonnen wurden. Zum Vergleich sind die Werte für reines Zinksulfid mit eingetragen.

ZnS existiert in 2 Modifikationen, der kubischen Zinkblende und dem hexagonalen Wurtzit. Die Umwandlungstemperatur für den Übergang der Blende in Wurtzit liegt oberhalb 1000 C. Wie die geringen Unterschiede in den Madelungskonstanten (1,6381 und 1,641) zeigen, liegen jedoch die Gitterenergien beider Modifikationen nahe beieinander. So erscheint es möglich, daß Fremdsalzzusatz wie z. B. NaCl bewirken kann, daß die Kristallite während ihres Wachstums bei wesentlich tieferer Temperatur zum Teil Wurtzitstruktur annehmen. Dies gilt jedoch nicht allgemein. So wird bei LiCl oder Na_2SO_4

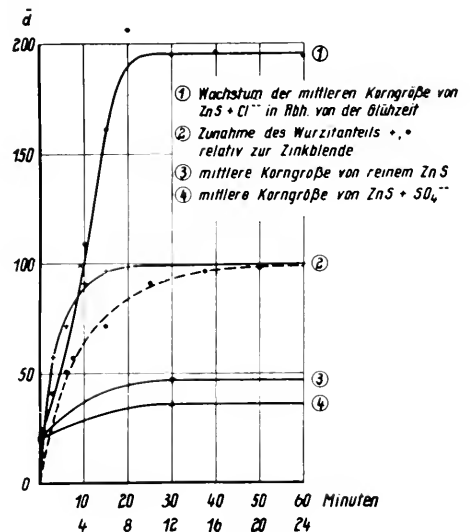


Abb. 2. Mittlere Korndurchmesser in Abhängigkeit von der Glühzeit und Wurtzanteil in Abh. von der Glühzeit. (Gestrichelte Kurve gilt für untere Zeitskala.)

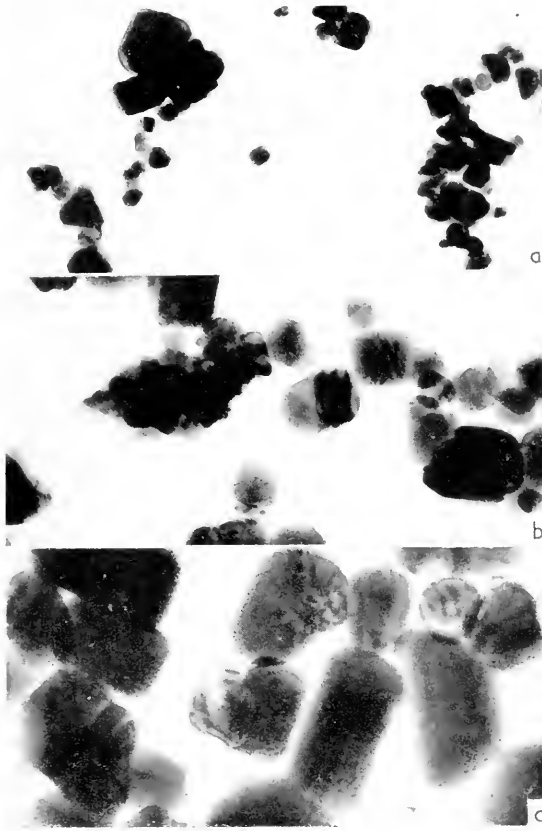


Abb. 3. ZnS in Gemisch aus 30 % LiCl + 70 % NaCl gegläht. a) 5 Minuten, b) 10 Minuten, c) 22 Minuten. Vergr. 60000

als Fremdsalz oder bei einem Gemisch aus NaCl und LiCl in weit geringerem Masse Wurtzit gebildet als bei NaCl-Zusatz allein. Bei reinem ZnS macht sich erst oberhalb 900 C ein Übergang von der kubisch dichtesten zur hexagonal dichtesten Kugelpackung bemerkbar.

Für die Deutung des Mechanismus der Wurtzitbildung ist es wichtig, daß der Wurtzitanteil (neben der Blende) nur solange zunimmt, als noch die mittlere Korngröße wächst.

Das bevorzugte Wachstum in kubischer oder hexagonaler Form drückt sich auch in der Morphologie der Kristalle aus. Blende entsteht bei im

wesentlichen zweidimensionalen Wachstum (Zusatz von LiCl oder einer Mischung von 30 % LiCl + 70 % NaCl oder Na_2SO_4 -Zusatz). Wurtzit tritt neben Blende bei dreidimensionalem Wachstum auf. Das Stereobild zeigt deutlich die kugelige Gestalt der Kristallite zum Teil mit ebenen Begrenzungen. Um zu klären, ob das Wachstum durch Sublimation erfolgt, wurde mit NaCl versetztes ZnS direkt auf den Objektträgerblenden bei 600 C mehrere Male hintereinander gegläht. Zwischendurch wurden jeweils elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt. In einer Parallelversuchsreihe wurden für die gleichen Gesamtglühzeiten von 0, 5, 10 und 22 Minuten jeweils frisch präparierte Proben verwendet. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen sind identisch und lassen praktisch kein Wachstum erkennen. Man kann daraus schließen, daß das Wachstum nicht über die Dampfphase geht.

Bettet man dieselbe Substanz in eine Schmelze aus NaCl + LiCl ein, deren Schmelzpunkt bei 580 C liegt und glüht wie vorher, so vergrößern sich die Kristalle erheblich (Abb. 3).

Es ist demnach anzunehmen, daß das Wachstum mit einer Diffusion des ZnS oder der beiden Ionen durch die Fremdsalzschiicht verknüpft ist. Dafür spricht auch der Befund, daß erst bei mindestens monomolekularer Bedeckung der ZnS-Kristallite mit Fremdsalz das Wachstum für eine gegebene Glüh-temperatur optimal wird.

Die Schmelztemperatur des NaCl liegt mit 800 C beträchtlich über der Glüh-temperatur von 600 C. Man kann jedoch annehmen, daß in einer Schicht von wenigen Molekülen Dicke bei 600 C das Kristallgitter bereits bis zu einem quasiflüssigen Zustand gestört ist. Unter Umständen liegt auch eine Schmelzschicht aus einem Gemisch von NaCl und ZnCl_2 vor.

Es kann wohl auch hier angenommen werden, daß das Wachstum durch Diffusion der Partikel durch eine geschmolzene oder doch stark gittergestörte Fremdsalzschiicht erfolgt.

Ausführliche Ergebnisse sollen später veröffentlicht werden.

LITERATUR

LIVRENTZ, H. W., *Science* **109**, 183 (1949).

Electron-microscopical Investigations of Calcium Hydroxide and Calcium Carbonate

G. SCHIMMEL

Battelle Institut, Frankfurt a. M.

THE BATTELLE-INSTITUT, Frankfurt/Main, has been requested to examine the structure of calcium hydroxide and calcium carbonate by means of the electron microscope. There are only two older publi-

cations regarding this field by O. E. Radezewski, H. O. Müller, and W. Eitel (1939) which belong to the earliest papers on electron-microscopical investigations. The authors stated that calcium hy-

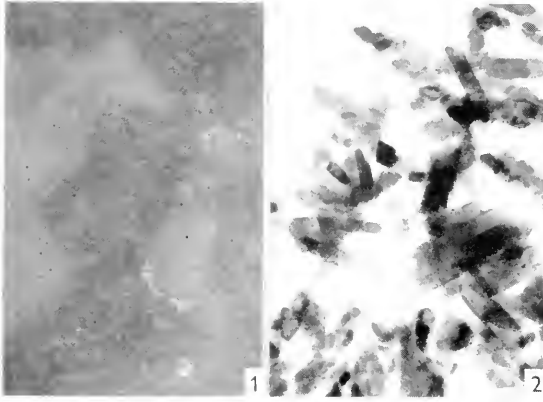


Fig. 1. Monocrystalline calcium carbonate. Magnification $\times 90,000$.

Fig. 2. Calcium hydroxide obtained from aqueous suspension. Magnification $\times 80,000$.

droxide precipitates from clear calcinated water in the form of smooth, compact spherulites (hemispheres). During the test they permitted the calcinated water to dry in the air on collodion films. Since then, these results have become the general scientific property of the lime industry; they are discussed, for instance, in the third volume of the book *Zement-Chemie* by Dr. Hans Kuehl. We repeated the investigations and obtained, at first, exactly the same photographs. When heating their preparations by an intensive irradiation, the above-mentioned authors observed a change in the spherulites, which they interpreted to be a transformation to calcium oxide. It has to be borne in mind, however, that it was not possible with the equipment used at that time to make electron diffraction diagrams. We, too, have observed corresponding changes, which we have analyzed by means of diffraction. Hardly any differences are detectable if the same spot is examined prior to and following an intensive irradiation. The proper diffraction patterns demonstrate, however, that the precipitations prior to the irradiation were of an amorphous nature and following the irradiation of a crystalline one. Surprisingly, however, an evaluation of the diffraction pattern revealed calcium carbonate in a calcite structure to be present, rather than oxide. Fig. 1 shows a monocrystalline section at which the hexagonal symmetry of the calcite is clearly noticeable in the diffraction pattern.

Radczewski, Müller, and Eitel (1939) obtained spherulitic calcium carbonate as a residuum from dried calcium-bicarbonate solutions; however, they did not recognize the identity with the precipitations

of calcinated water formed during drying in air. A light-microscopical investigation of spherulites up to a diameter of 4μ , which had been skimmed off from the surface of a calcium-hydroxide solution, shows that the amorphous modification of the carbonate is stable even if it is present in a larger particle size in contrast with the above publication. I have to thank Dr. Ney of the Technische Hochschule München for informing me of the existence of such large spherulites on the surface of liquids.

When solutions still containing undissolved hydroxide in suspension were dried, crystalline calcium carbonate, exhibiting characteristic growth phenomena, always formed during air drying.

To avoid the hydroxide to transform into the carbonate during the drying process, the specimen grid was placed into the vacuum immediately after it was covered with the calcium-hydroxide solution. During this process, the hydroxide precipitated while drying to very small crystals of different shapes, but it was always crystalline. An amorphous modification of the hydroxide has never been found. Of industrial importance is mainly the question in which form the hydroxide is present in the commercial dry hydrate and the lime paste. The amount of lime contained in the mortar is determined by the plasticity of the latter, rather than by the desired strength of the solidified material. This plasticity, however, will depend on the shape and size of the crystals. The dry hydrate prepared from fog obtained by means of ultrasonics contains numerous hexagonal scales and fragments thereof. Almost without any exception, these crystals in their commercial form are strongly agglomerated.

A photograph of crystals of lime paste dried *in vacuo* is shown in fig. 2. The same oblong crystals are found if the water of the lime paste is substituted by alcohol and the alcohol suspension is dried. The following preparation technique proved to be very advantageous: The lime paste spread out in a thin manner is frozen rapidly by means of liquid nitrogen; subsequently it is dried *in vacuo* in which a carbon replica is prepared immediately after drying. This method is particularly suited for precipitation processes aiming at a carbonation.

All photographs were taken at the Battelle-Institut, Frankfurt/Main, with the Elmiskop I of the firm Siemens, using a voltage of 80 kV.

I am very grateful to the "Bundesverband der Deutschen Kalkindustrie" (Federal Association of the German Lime Industry) for suggesting these studies, for supplying the lime samples, and for the permission to publish the photographs made in the course of these investigations for the "Bundesverband".

Further Investigations of Photographic Development by Means of the Electron Microscope

E. KLEIN

*Wissenschaftlich Photographisches Laboratorium,
Agfa Aktiengesellschaft für Photofabrikation, Leverkusen*

THE object of the present paper is a study of the fine structure of silver halide crystals in photographic emulsions and of developed silver visible by examinations with an electron microscope.

It is impossible to do this by making direct electron micrographs of silver halide or silver, for the following two reasons:

(1) Scattering of the electrons on the crystals (silver halide or silver) is so great that, in the crystal thicknesses d encountered in practice ($100 \text{ \AA} < d < 20,000 \text{ \AA}$) no electrons are able to penetrate the specimen in unscattered form and thus it is impossible to determine surface quality or condition. The entire object is reproduced in uniform high opacity compared to the surrounding area and no deviations in contrast are apparent within the object.

(2) The risk of change in the objects during their exposure to the electron beam is especially great with *direct* observation of silver halide or silver. For one thing the silver halide undergoes severe photolysis, i.e. decomposition into silver and free halide, and for another the mobility of the lattice units in the silver halide and silver is extremely high in an intense beam of electrons, leading to a process similar to melting and frequently to partial evaporation as well. Very intense radiation and the marked rise in temperature associated with it can force the reactions to the point where the crystals are completely evaporated (and partial condensation on cold parts in the environment of the crystals ensues).

The phenomena mentioned under point 2 have already been discussed in detail in an earlier report, with references to the literature already available in this respect (5).

For the purpose of the present investigations, it was absolutely necessary to employ a replica method since the actual object is not then exposed to the electron beam. Our experience has shown that the best method is that of direct carbon evaporation on to the objects devised by Bradley (1, 6).

Exposure of the silver halide crystals during the brief period of evaporation with carbon (a few seconds) causes no recognizable change in the structure of the crystal, as has been established by comparison with much greater exposures (contrary to our earlier assumptions (5)).

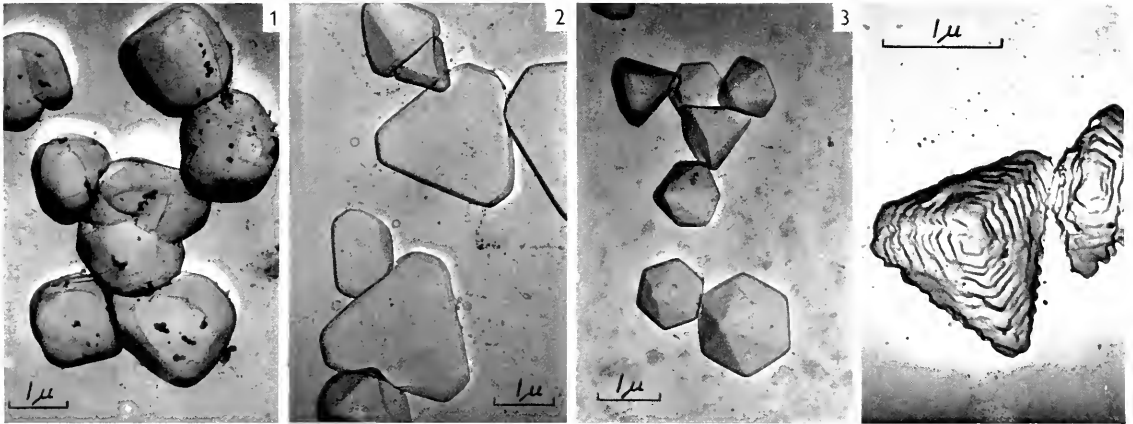
In most cases carbon evaporation is carried out at an angle of 45° with a rotating object which, admittedly, results in loss of shadow effect but the carbon replicas are more uniform and stable, i.e. they can also be kept thinner (6). Previous tests by König and

Helwig's (7) carbon replica process and that of König and Knoch (8) also produced good results. However, if it is desired to use this process (in which the carbon replica is formed by glow discharge in a hydrocarbon atmosphere) to obtain a carbon replica which is stable without being hardened by electron bombardment, the replica must be kept relatively thick. On the other hand, hardening by the electron beam would produce just the effects mentioned above in the case of silver halide and silver. Thus the Bradley process would appear to be more suitable for examination of photographic grains.

Fig. 1 illustrates a carbon replica of undeveloped silver bromide crystals. In this case evaluation of the stereo photographs reveals mainly a rounded cube shape of the grains. In fig. 2 the form is that of plate-shaped triangles, hexagons and isolated tetrahedrons. The latter shapes in particular can only be detected by the replica method. Generally speaking, silver chloride crystals are mainly cube-shaped. On the other hand the silver iodide has a quite different appearance and crystallizes in a hexagonal lattice as β -AgI. In general hexagonal pyramids are found (fig. 3). It is not possible to detect any characteristic surface structure or other sub-structures in the crystals—a point mainly of importance with the silver bromide and chloride crystals. It is true that steps are found on individual crystals but in the main the crystals possess a well-formed, smooth surface and any large clefts or fissures are not to be seen. If the angle of evaporation is very flat it is possible for so-called "dune effects" to occur when the object is not rotated. A fine structure can be seen, which, however, only occurs on the outside of the replica, as could be established from evaluation of the stereo micrographs. This is, therefore, only an apparent structure.

In order to determine varying quality of crystal structure within a crystal, different kinds of etching were carried out, of which only one with sulphite solution will be mentioned. In this case a terrace-like structure of the pyramid-shaped crystal (fig. 4) is revealed.

Thus, by means of etching, it is possible to establish those zones of a crystal which tend to be of better solubility due to their disturbed lattice structure, although no sub-crystallites could be found. Due to the high resolving power obtained by the carbon replica process (approx. 50 \AA) it must be concluded that the sub-structure discovered by Hed-



Figs. 1-3. Carbon replicas of silver halide grains. Fig. 1, ammonia emulsion, silver bromide (carbon replica). Fig. 2, boiling emulsion (non-ammonia), silver bromide (carbon replica). Fig. 3, silver iodide emulsion (carbon replica). Fig. 4. Slightly etched silver bromide grains.

ges and Mitchell (4) with a light microscope on large silver bromide single crystals is quite definitely brought about by clefs of less than 50 \AA in size; in other words, that the inner surfaces making their appearance in this respect are less widely spaced. It would appear, therefore, that the sub-structure is only the result of displacements and spaces in the magnitude of one or a few lattice intervals.¹ Of course it is possible for sub-structure also to be present in the silver bromide crystals of normal photographic emulsions.

Usually it is assumed (3) that inner surfaces in the crystal could arise from crystal growth due to grain conglomeration. However, examination of various types of emulsion precipitations with an electron microscope have confirmed that conglomeration is of importance only in the first stage of the precipitation, i.e. with the extremely fine grains. The growth of grain is due entirely to accumulation of the newly forming silver halide on grains already present and to Oswald ripening.²

Figs. 5-6 show a comparison of developed grains from the same silver bromide emulsion. Fig. 5:

normal metolquinone developer; fig. 6: *p*-phenylenediamine developer. The fine structure of the developed silver is considerably coarser in the case of the *p*-phenylenediamine development.³

Experiments on initial development show the formation of a single silver filament from a silver bromide crystal and also three etching pits alongside each other at angles of 120° to the centre of the crystal (2, 6) (fig. 7). This phenomenon has already been investigated by Evans and Mitchell (2) with a light microscope.

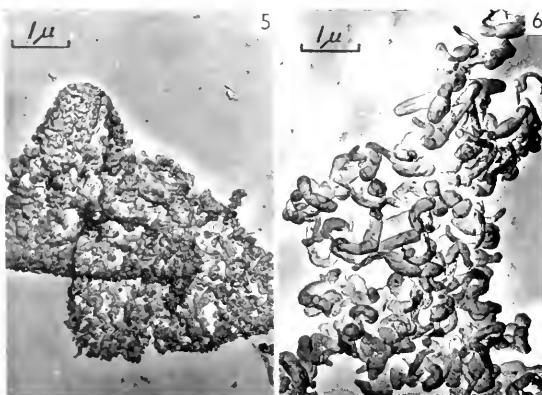
The silver filament forming on the developing nucleus probably arises from silver ions which move from the etching pits over the surface or possibly right through the crystal to the growing filament.

When developing pure silver iodide crystals (Fig.

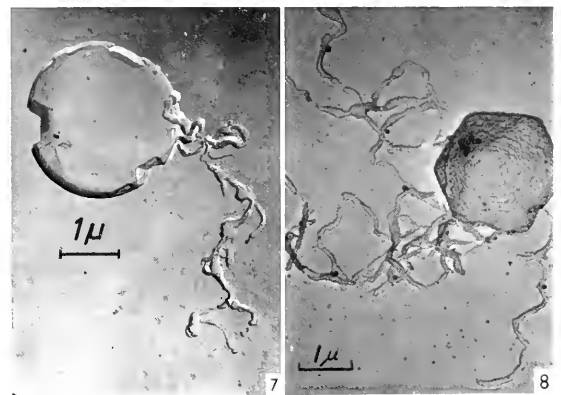
¹ Mr. Mitchell confirmed this view during a discussion held with him.

² From a combined report with Dr. Saleck, Agfa AG, Leverkusen.

³ The effect upon the "graininess" of a photographic emulsion (medium variation in density) will have to be discussed on another occasion.



Figs. 5-6. Differently developed silver bromide grains. Fig. 5, metolquinone developer (carbon replica). Fig. 6, *p*-phenylenediamine developer (carbon replica).



Figs. 7-8. Initial development results. Fig. 7, flat silver bromide crystals. Fig. 8, silver iodide crystals.

8), very long and thin silver filaments occur and at the same time pronounced surface structures appear on the crystal.

The results show that it is possible by the carbon replica method to render fine structures of undeveloped and developed silver halide crystals visible which were previously inaccessible to investigation.

I should like to thank Prof. Frieser for the detailed discussions he held with me upon the subject in question. The electron micrographs were made by Dr. Kircher in the inorganic analytical laboratory of the Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, and I should also like to express my thanks to him.

In addition, I am indebted to Miss Ina Lehnert and Mr. Hans-Jörg Metz for valuable assistance during the experiments.

Prof. von Borries always devoted his special attention to these problems and generously assisted us in dealing with them.

REFERENCES

1. BRADLEY, D. F., *Brit. J. Appl. Phys.* **5**, No. 2, 62 (1954).
2. EVANS, T. and MITCHELL, J. W., Report of Bristol Conference 1954 (409). Defects in Crystalline Solids.
3. FRIESER, H. and KLEIN, L., *Mitt. Agfa* **1**, 1. Springer Verlag, Berlin, 1955.
4. HEDGES, J. M. and MITCHELL, J. W., *Phil. Mag.* (7), **44**, 223, 357 (1953).
5. KLEIN, L., *Mitt. Agfa* **1**, 10. Springer Verlag, Berlin, 1955. *Phot. Korr.* **91**, 179, 199 (1955).
6. — Bunsentagung 1956 Freiburg. *Z. Elektrochem.* **60**, 998 (1956).
7. KÖNIG, H. and HELWIG, G., *Z. Physik* **129**, 491 (1951).
8. KÖNIG, H. and KSOCH, M., *Phys. Verhandl.* **2**, 14 (1955).

Gelatin in the Photographic Process

G. VANDERMEERSSCHE, C. MAERTENS and G. LION

Centre de Microscopie Electronique, Médical, Industriel et Agricole, Brussels-Uccle

As early as 1935 Russian scientists have tried to find a practical classification for photographic gelatins (5). This classification was based only on the value of gamma and on the sensitivity of emulsions prepared with the different gelatins but American workers proved this classification to be impractical (12).

It is the aim of the present paper to show the marked differences which exist when emulsions are made under completely identical conditions except for the fact that different gelatins are used.

The raw material which had been used to make the six different types of gelatin can be classified in two main groups, ossein and skin. The duration of liming for the skin gelatin has been similar for two of the specimens but there was a difference in treatment, one skin-gelatin being prepared with nitric acid, the other with hydrochloric acid.

The ossein gelatins were different with respect to their extraction-temperatures and also with respect to the fact that one sample came from hard bones, another one from soft bones and a third one from sinews.

The emulsions were prepared in the classical way as indicated in the literature on photographic emulsion techniques (3, 13). As developers we have used the formulas given in the Gevaert handbook. A first series of emulsions has been exposed to light, developed and then washed in order to remove most of the gelatin present on the specimen grid. A second series has been treated in the same way but the gelatin has been removed before exposure to light. Use has also been made of the specimen preparation technique described by Hamm and Comer (7), which consists in utilizing the thin film of the silver-gelatin complex which exists as a tightly fitting envelope around the photographic grains. In that case the gold development has been applied.

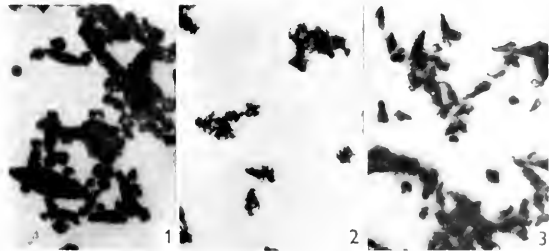


Fig. 1. Gelatin 1: ossein from hard bone, 1st extraction.
Fig. 2. Gelatin 2: ossein from hard bone, 3rd extraction.
Fig. 3. Gelatin 3: ossein from soft bone.

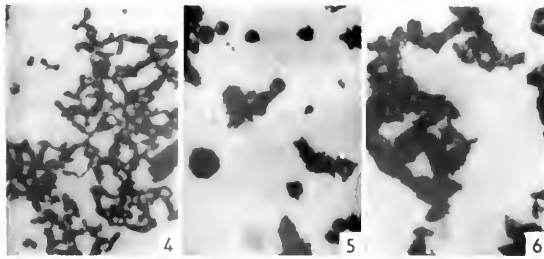


Fig. 4. Gelatin 4: ossein from sinews.
Fig. 5. Gelatin 5: skin, nitric acid treatment.
Fig. 6. Gelatin 6: skin, hydrochloric acid treatment.

The emulsions were exposed to light (one minute) and then developed.

Figs. 1-6 show the difference in grains obtained when six different gelatins are used in emulsions which are otherwise completely similar.

From this investigation it seems to be impossible to draw a definite conclusion about the relation between silver-grain size and silver-grain colour without taking into account the kind of gelatin used.

For the ossein gelatin the grains are more compact and more dense in the blue-black pictures, while for the skin-gelatin the effect is just opposite.

Further work is in progress in order to interpret these different findings while taking into account the physical and chemical properties of the gelatins used.

We wish to express our sincere appreciation to Messrs. L. de Barcy and P. Frottier of the Entreprises Chimiques et Electriques at Vilvorde for permission to publish this paper.

REFERENCES

1. AMMANN-BRASS, H., Colloque de Science Photogr., Paris 1951.
2. ARENS, H., *Z. wiss. Phot.* **43**, 120 (1948).
3. BAKER, TH., *Photographic Emulsion Technique*. Mc Millan.
4. BRADLEY, D. E., *Brit. J. Appl. Phys.* **5**, 96 (1954).
5. CHIBISOV, K. V. and MIKHAILOVA, A. A., *Kino Photo Chem. Ind.* **3**, 24 (1937). (In Russian.)
6. HALL, C. E. and SCHOEN, A. L., *J. Opt. Soc. Am.* **31**, 281 (1941).
7. HAMM, F. A. and COMER, J. J., *J. Appl. Phys.* **24**, 1495 (1953).
8. JOHANN, I. and KLEIN, E., *Sc. et Ind. Phot.* **27**, 91 (1956).
9. KARPOVA, A. L. and MOSHKOVSKII, *Sc. et Ind. Phot.* **27**, 346 (1956).
10. LEVENSON, G. I. P. and TABOR, J. H., *Sc. et Ind. Phot.* **23**, 295 (1952).
11. POURADIER, J., *Chim. et Ind.* **74**, 1175 (1955).
12. TRIVELLI, A. P. H. and SMITH, W. F., *Z. wiss. Phot.* **37**, 123 (1938); **37**, 140 (1938).
13. WALL, E. *Photographic Emulsions*.

The Microstructure of Photoconductive PbTe Layers

A. FELTYNOWSKI, I. GLASS, and L. GRELEWICZ

Institute of Physics, Polish Academy of Sciences, Warsaw

The microstructure of PbTe layers has been investigated by means of electron diffraction and electron microscopy. These layers are photosensitive in low temperatures and show high sensitivity to the infra-red radiation (2).

They are usually formed in a glass envelope of the diameter 45 mm and the height 20 mm. The envelope is provided with appropriate electrodes to enable the measurements of the photosensitivity. The layers are formed by a twofold evaporation process: in the first stage the substance is evaporated onto a wall without electrodes, whence, in the second stage, it is made to evaporate onto the opposite wall bearing electrodes; the wall on which the PbTe vapour condenses is subjected to intense cooling.

In order to prepare specimens for electron diffraction and microscopic investigation the envelope was opened after the first evaporation and a thin glass plate (cover-glass) was placed on the wall bearing electrodes. It should be noted that the glass plate covered only a part of the wall; on the remaining part electrodes had been painted with "aquadag" and provided with tungsten leads. To the glass plate the grids of phosphor bronze were attached by a thin formvar film. The envelope had a glass pipe, through which the plate with the grids was placed inside without heating the envelope. Then the envelope was closed and evacuated and the layer evaporated onto the wall bearing the glass plate with the grids.

The photosensitivity of these cells can be measured.

The photocell was opened and the grid with PbTe layer adhering to the formvar film was carefully deposited onto the specimen holder.

PbTe forms crystals of NaCl type cubic structure with the lattice constant 6.34 \AA (3).

The diffraction pattern (fig. 1) obtained with the thin layer corresponds to simple cubic structures

(Table 1) with the lattice constant 3.21 \AA . A similar diffraction pattern was obtained with the PbTe layer evaporated onto the film directly from a tungsten ribbon.

Such inconsistency in the case of thin layers prepared by evaporation is an indication that a new form of PbTe is present. A possible explanation should be found in random distribution of the tellurium and lead atoms over the lattice points in the thin layer, resulting in extinction of those

TABLE 1.

No.	Ring diameter mm	Intensity	Lattice indices h k l	Lattice distances \AA
1	14.55	very strong	1 0 0	3.21
2	20.55	very strong	1 1 0	2.27
(MgO)*	(22.20)		(2 0 0)	(2.10)
3	25.15	medium	1 1 1	1.85
4	29.05	faint	2 0 0	1.605
5	32.45	strong	2 1 0	1.437
6	35.65	medium	2 1 1	1.309
7	41.15	very faint	2 2 0	1.135
8	43.70	faint	2 2 1	1.068
9	46.10	faint	3 0 0	1.012
10	48.30	faint	3 1 0	0.967
11	52.55	faint	3 1 1	0.888
			3 2 0	0.888

* Used as standard.

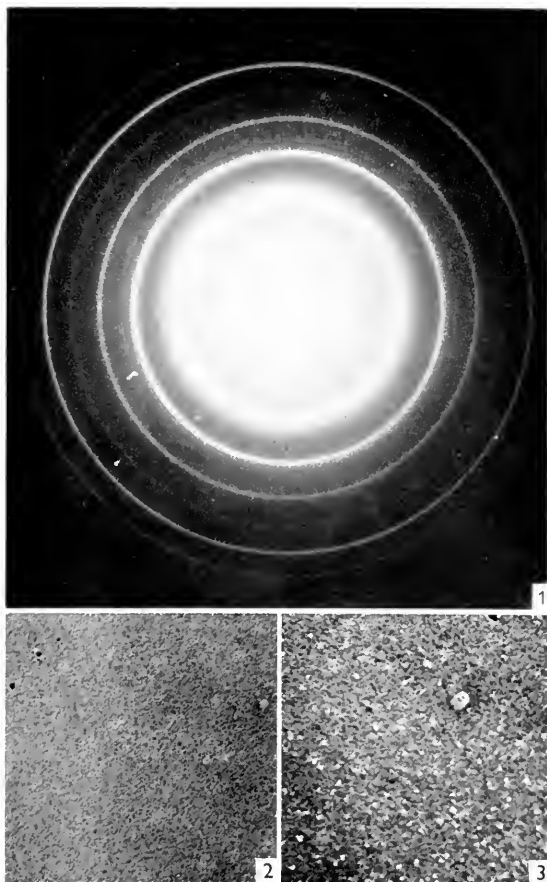


Fig. 1. Diffraction pattern of PbTe layer.

Fig. 2. PbTe layer exposed to intense electron beam during 10–20 seconds. Magnification $\times 6000$.

Fig. 3. PbTe layer exposed to intense electron beam longer than 20 seconds. Magnification $\times 6800$.

rings of the NaCl type structure, the intensity of which is determined by the difference of atom factors. Thus, a crystal lattice of the kind proposed shows an electron diffraction pattern corresponding to simple cubic structure with the lattice constant halved.

Of the three analogous compounds PbS, PbSe and PbTe, the properties of PbS are the best known. Experimental data and a theoretical analysis (1) prove this compound to be only slightly ionic in character. The lesser difference in atomic numbers of the components in PbTe should cause the ionic properties to recede still further. These considerations should make the authors' assumption of the Pb and Te atoms replacing each other in the crystal lattice points seem more plausible.

The PbTe layers were also examined with the electron microscope. When magnified 10,000 times they appeared to be homogeneous. Following illumination with an intense electronic beam for 10–20 seconds the layer underwent changes: small crystals formed, at first very minute in size, and later on separate, scantily distributed crystals attaining 1000 Å (fig. 2). Further illumination caused gaps in the layer (fig. 3).

The authors wish to express their gratitude to Professor L. Sosnowski for his valuable discussions in interpreting the results.

REFERENCES

1. BELL, D. G., HUM, D. M., PINCHERLE, L., SCIAMA, D. W., and WOODWARD, P. M., *Proc. Roy. Soc. A*, **217**, 71 (1953).
2. CHECIŃSKA, H. and SOSNOWSKI, L., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. III*, 383 (1954).
3. WYCKOFF, *Crystal Structures*. Interscience, New York 1953.

Identification of Minerals Present in Mine Dusts by Electron Diffraction and Electron Microscopy

J. H. TALBOT

*Research Laboratories, Transvaal and Orange Free State Chamber of Mines,
Johannesburg, South Africa*

Introduction.—An investigation of the dust content of the air in Witwatersrand mines has revealed the existence of large numbers of submicroscopic particles in the air leaving working places. X-ray diffraction methods have given no information concerning the composition of these particles, since, although they are present in very large numbers, their proportion by weight of the sample is small (less than 5%). Thus their contribution to the diffraction pattern is obscured by that of the larger particles.

The difficulty is overcome by using electron dif-

fraction. Particles much larger than 0.1μ absorb nearly all the electrons incident on them; those not absorbed lose coherence through multiple scattering and can only add to the diffuse background of the diffraction pattern. Thus the effect is due pre-eminently to the particles smaller than 0.1μ . Once the various constituents of the sample have been identified it is necessary to determine their relative proportions and the particle sizes in which they are present. A method of doing this is described.

Preparation and examination of samples.—Samples

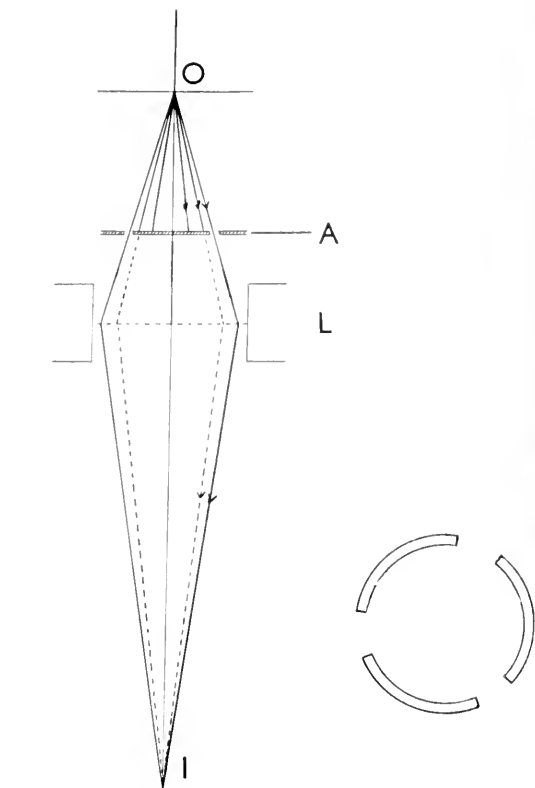


Fig. 1. Ray diagram illustrating the principle of the dark-field system. At the right is shown the special annular aperture.

are collected with a thermal precipitator directly on beryllium films about 30 \AA thick. After collection they are heated to 550°C to remove organic matter and condensed oil vapour. At the same time the beryllium oxidizes to form a crystalline oxide film, the diffraction pattern of which is used to calibrate the diffraction pattern of the mine dust.

Using a three-stage electron microscope, bright-field micrographs and the diffraction patterns of several parts of the specimen are recorded. The constituents are identified by comparison of the diffraction patterns with standard diffraction patterns of substances, the presence of which is suspected, or by comparison with the A.S.T.M. index.

Having determined the various chemical constituents present in a sample by electron diffraction, it may be desirable to establish in which parts of the specimen the various constituents are present. For example, assume that several constituents have been identified in a sample containing a large number of particle sizes and shapes. It might be that one or other constituent is confined to particles of a particular size range or of a particular shape. If this is so, and the relation between each constituent and the particle size range or shape can be established, then it is a simple matter to determine the number and the sizes of the particles of each chemical compound present.

To establish the relationship, if any exists, between a particular constituent and any peculiarities of the sample, a new system of dark-field electron micro-

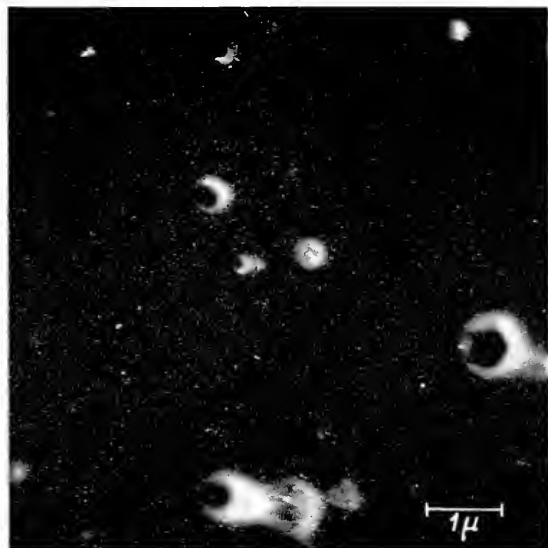


Fig. 2. Dark-field micrograph of part of a sample of mine dust showing the distribution of sodium chloride.

scopy is used. The system is illustrated in figure 1. *O* is the object from which a number of co-axial cones of electrons (Bragg reflections) emerge. A diaphragm (*A*) with a narrow annular aperture, such as that shown at the right, is introduced between the object and the objective lens. By varying the distance of the cones of electrons from the object any one of the cones of electrons can be made to pass through the aperture, all other electrons being stopped by the diaphragm. In this way a dark-field image is obtained which is formed by only one cone of electrons corresponding to one ring of the diffraction pattern. Only those parts of the object which contribute to the particular cone of electrons selected are visible in the image, appearing bright on a dark background.

Best separation of the Bragg reflections can be obtained by means of an aperture in the back focal plane of the objective lens, for it is here that the diffraction rings are sharpest. However, it is difficult to design an annular aperture the size of which can be varied at will. Owing to the very small lens apertures, and the small field examined, in electron microscopy it is not essential to locate the aperture diaphragm in the back focal plane.

Results.—To test the effectiveness of the dark-field method a sample of sodium chloride crystals ranging from 500 \AA to 1000 \AA in size was prepared on an aluminium film with a grain size of $100\text{--}200 \text{ \AA}$. Dark-field micrographs were obtained using reflections first from the aluminium then from the sodium chloride. In the first only particles of $100\text{--}200 \text{ \AA}$ were observed and in the second only particles of $500\text{--}1000 \text{ \AA}$.

Figure 2 is a dark-field micrograph showing the distribution of sodium chloride in a sample of mine dust.

A limited number of samples of mine dust have been examined. Preliminary indications are that the bulk of the submicroscopic particles consists of non-siliceous particles.

Conference papers published elsewhere

An Electron Microscopic Study of Sexual Conjugation between Strains of *Escherichia coli*.

T. F. ANDERSON, ELIE WOLLMAN, and J. JACOB, *Service de Physiologie Microbienne, Institut Pasteur, Paris. Ann. Inst. Pasteur*, in press.

The Behavior of Color Film in the Electron Microscope.

T. F. ANDERSON, *Johnson Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, Penn. Bull. Microscopic Appliquée* 6, 2^e Sér., 152, 1956.

Elektronenemissionsmikroskopische Untersuchung der Karburierung von Molybdän aus der Gasphase.

E. B. BAS, W. EPPRECHT und L. G. PRUSS, *Institut für Technische Physik an der ETH, Zürich. Acta Metallurgica*, in press.

Emission électronique des métaux soumis à des contraintes mécaniques. Etudes macroscopique et microscopique.

R. BERNARD, F. DAVOINE, C. GUILLAUD et R. GOUTTE, *Laboratoire d'Optique Electronique, Université de Lyon. J. Physique Radium* 17, 859, 1956.

Some Preliminary Results of a Study on the Effects of OsO₄ Fixation Carried out under Different Environmental Conditions on Cells of *B. cereus*.

A. BIRCH-ANDERSEN and R. G. E. MURRAY, *Statens Seruminstitut, Copenhagen, and Dept. of Bacteriology, University of Western Ontario, London, Canada. Canadian J. Microbiol.*, in press.

The Use of an Epoxy Resin as Embedding Medium for Sectioning and Electron Microscopy of Bacteria.

A. BIRCH-ANDERSEN and O. MALOI, *Statens Seruminstitut, Copenhagen.*

Sixth Symp. Soc. Gen. Microbiol. "Bacterial Anatomy", London 1956.

Sur l'ultrastructure des cellules exocrines et endocrines du pancréas du rat au cours de son développement.

D. FERREIRA, *Laboratoire de Microscopie Electronique, Institut de Recherches sur le Cancer Gustave Roussy, Villejuif.*

Internat. J. Ultrastructure Research, in press.

Virus-Innenstrukturen.

D. PETERS, *Tropeninstitut, Hamburg. Nature* 178, 1453, 1956.

Electron Microscopy of Cytological Specimens Prepared by Low-Temperature Sublimation and Replication.

R. L. STERE, *Virus Laboratory, University of California, Berkeley, Cal.*

J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 45, 1957.

Die Uranylacetat-Kontrastierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen an Pflanzenzellen.

S. STRUGGER, *Botanisches Institut, Münster.*

Protoplasma 48, 231, 1957; *Protoplasma*, in press; *Z. Naturforschung*, in press; *Berichte Deutsch. Bot. Ges.*, in press.

Der Feinbau und das Verhalten der Mitochondrien in Tumorzellen.

N. WEISSENFELS, *Zoologisches Institut der Universität Bonn und Zentrallaboratorium f. angew. Übermikroskopie der Universität Bonn.*

Z. Naturforschung, in press.

