

# DIE NATURWISSENSCHAFTEN

In der dritten der folgenden Arbeiten wird die geometrisch-optische Darstellbarkeit der Fadenmoleküle von Virusproteinen gezeigt. Vorher werden die Eigenschaften der übermikroskopischen Abbildung und die Untersuchungstechnik dargestellt, die man zur Deutung der Ergebnisse überblicken muß.

## Eigenschaften der übermikroskopischen Abbildung\*.

Von B. v. BORRIES und E. RUSKA, Berlin-Siemensstadt.

### 1. Bildentstehung.

Im Übermikroskop<sup>1</sup> wird das zu untersuchende Objekt durchstrahlt. Der Strahlenverlauf zwischen Elektronenquelle und erstem Bild (Zwischenbild) wird in Fig. 1 anschaulich dargestellt. Bei der als Strahlenquelle verwendeten Glühkathode bildet sich kurz vor der Kathode ein engster Querschnitt

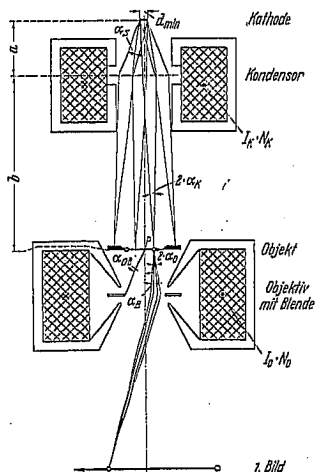


Fig. 1. Erzeugung des Bildes im Übermikroskop durch enge Strahlbündel. (Die zweite Vergrößerungsstufe ist weggelassen.)

des Strahlenbündels vom Durchmesser  $d_{\min}$  aus, den man als strahlende Fläche ansehen kann. Von ihm wird in die Strahlerapertur  $\alpha_1$ , die bei etwa 0,02 liegt, der gesamte Strom entsandt, so daß wir es mit einem stark gebündelten Richtstrahler zu tun haben im Gegensatz zur Lichtquelle einer Mikroskopierlampe, die nach allen Richtungen strahlt. Innerhalb des Winkels  $\alpha_1$  strahlt jedoch jeder Punkt des engsten Querschnitts nach allen Richtungen, d. h. in einer diffusen (optischen) Strahlung.

Zwischen Strahlenquelle und Objekt ist die Kondensatorspule angeordnet. Wenn die Stromdurchflutung (Amperewindungszahl  $J_K \cdot N_K$ ) dieser Spule erhöht wird, so wirkt dies so, als ob die Strahlen von einer hinter der Kathode liegenden, virtuellen Strahlenquelle herkämen. Entsprechend

\* Mitteilung aus dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.G.

<sup>1</sup> E. RUSKA, Z. Physik 87, 580 (1934). — B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Wiss. Veröff. Siemens 17, 99 (1938).

zieht sich das Strahlenbündel mehr und mehr über dem Objekt zusammen. Dabei steigt die Stromdichte im Objekt an. Während aber die Kondensatorapertur  $\alpha_K$ , unter der ein bestimmter Objektpunkt  $P$  von Elektronenstrahlen getroffen wird, bei stromloser Kondensatorspule gegeben ist durch

$$\alpha_{K\min} = \frac{d_{\min}}{z(\alpha + b)}, \quad (1)$$

steigt diese Apertur mit steigender Stromdurchflutung, d. h. kleiner werdender Brennweite an, um ebenso wie die Objektstromdichte des Kondensators ein Maximum zu erreichen, wenn die Strahlquelle (engster Querschnitt) auf dem Objekt abgebildet wird, dann gilt

$$\alpha_{K\max} = \frac{\alpha}{b} \cdot \alpha_2. \quad (2)$$

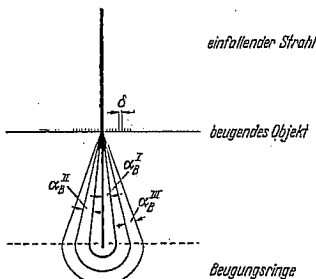


Fig. 2. Elektronenbeugung durch Objektteile vom Abstand  $\delta$

$$\alpha_B \approx \sin \alpha_B = \frac{\lambda}{\delta}.$$

Steigert man den Strom weiter, so werden Kondensatorapertur und Objektstromdichte wieder kleiner. Zwischen dem Größtwert und dem Kleinstwert ist die Kondensatorapertur stetig regelbar.

Wie in einer früheren Arbeit<sup>2</sup> gezeigt werden konnte, werden die Konturen des übermikroskopischen Bildes nun nicht etwa von allen Elektronen erzeugt, die das Objekt im Punkt  $P$  verlassen, sondern ausschließlich von denjenigen, welche ohne merkliche Veränderung ihrer Richtung hindurchtreten, also ebenfalls etwa ein Bündel mit der Apertur  $\alpha_K$  bilden. Wenn es gilt, sehr feine Objektstrukturen vom Abstand  $\delta$  aufzulösen (vgl. Fig. 2), so ist das vom durchstrahlten Objektpunkt gerichtete ausgehende Bündel um den Beugungswinkel

$$\alpha_B \approx \sin \alpha_B = \frac{\lambda}{\delta} \quad (3)$$

<sup>2</sup> B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Z. techn. Physik 19, 402 (1938).

verbreitert, wobei nur das erste Beugungsmaximum berücksichtigt wird. Die Wellenlänge  $\lambda$  der Elektronenstrahlen ist dabei gegeben durch

$$\lambda = \frac{1,23}{\sqrt{U(\text{Volt})}} \cdot 10^{-8} \text{ mm.} \quad (4)$$

Sie beträgt bei 57 kV-Strahlspannung etwa  $\lambda = 5 \cdot 10^{-9}$  mm.

Die für die Abbildung maßgebende Objektivapertur  $\alpha_0$  ist also gegeben durch

$$\alpha_0 = \alpha_K + \alpha_B. \quad (5)$$

Diese Objektivapertur  $\alpha_0$  ist bei praktischen Verhältnissen ebenso wie die Kondensorapertur  $\alpha_K$  etwa gleich  $10^{-3}$ , demnach also klein gegen die durch die Objektivblende gegebene Apertur  $\alpha_{0B}$ , die im allgemeinen bei  $10^{-2}$  liegt. Infolgedessen beaufschlagt das vom Objektpunkt kommende Bündel nur einen kleinen Teil des Objektivs, und für seine Abbildung kommen auch nur die diesem kleinen Gebiet zukommenden Öffnungs- und Beugungsfehler in Betracht.

## 2. Die Tiefenschärfe.

Die Tiefenschärfe eines Mikroskops ergibt sich aus folgender Überlegung. Es sei  $a'$  die Dingweitenänderung, um die das Objekt gegen das Objektiv bei ungeänderter Objektivbrennweite verschoben

als umgekehrt proportional dem Sinus der Kondensorapertur, so daß gilt

$$T = \frac{a'}{\delta} = \frac{1}{\sin \alpha_K}. \quad (6)$$

Um in einem Zahlenbeispiel diese Beziehung zu erläutern, seien folgende, für das Übermikroskop praktisch gegebene Beispiele gebracht:  $\sin \alpha_K \approx \alpha_K = 1/1000$ ;  $\delta = 0,01 \mu$ ; dann ist  $a' = 10 \mu$  und  $T = 1000$ . Diese Tiefenschärfe ist ganz außerordentlich, wenn man bedenkt, daß sie bei 25000facher Vergrößerung besteht. Aus Fig. 3 kann man damit feststellen, daß die axiale Ausdehnung der Rußflocke an der unscharf wiedergegebenen Stelle  $10 \mu$  überschreitet. Im Gegensatz dazu ist die Tiefenschärfe eines Lichtmikroskopes bestimmt durch folgendes Beispiel:  $\sin \alpha_K = 0,95$ ;  $\delta = 0,2 \mu$ ; dann ist  $a' = 0,2 \mu$  und  $T = 1,05$ . Die gegenüber dem Lichtmikroskop roofach größere Tiefenschärfe hat einerseits den Vorteil zur Folge, daß man das ganze Gesichtsfeld des Objekts gleichzeitig scharf einstellen kann; andererseits entfällt die Möglichkeit durch ein in axialer Richtung ausgedehntes Objekt nacheinander in verschiedener Tiefe „optische Schnitte“ zu legen und damit die räumliche Gestalt des Objekts festzulegen.

## 3. Der Kontrast.

Die Kontraste in den übermikroskopischen Bildern zeigen, daß eine Steuerung der Zahl der unbeeinflusst bzw. gestreut das Objekt verlassenden Elektronen durch die verschiedene Massendicke der Objektpunkte erfolgt. Dabei wird mit steigendem Wert der durchstrahlten Massendicke (Objektdicke  $x$  [mm]  $\cdot$  Objektdichte  $\gamma$  [g/ccm]) der Bruchteil der Elektronen, der das Objekt mit der ursprünglichen Kondensorapertur  $\alpha_K$  wieder in Richtung auf und durch das Objektiv verläßt, kleiner, der gestreute Bruchteil also größer. Entsprechend sind die Bildpunkte von Stellen größerer Massendicke dunkler. Demnach ließe sich also eine Gradationskurve angeben, die den Zusammenhang zwischen durchstrahlter Massendicke des Objektes und der Differenz der Schwärzungen von Bildpunkt und Bild einer objektfreien Stelle der Objektebene angibt. Da bisher Angaben über das Verhältnis der Zahl der unbeeinflusst durchgehenden Elektronen fehlen, kann eine quantitative Darstellung noch nicht gegeben werden. Solche Messungen dürften aber jetzt von besonderem Interesse sein, da die Bestimmung der Dicke von Objektteilen eine wichtige Aufgabe der Übermikroskopie ist. Grundsätzlich ist es möglich, solche Messungen im Übermikroskop selbst durchzuführen, wenn man beispielsweise die Intensitätsschwächung durch kleine Kügelchen (Kolloide) bekannter Dichte und bekannten Durchmessers im Bild bestimmt.

Die Gradationskurven sind für verschiedene Spannungen verschieden in dem Sinne, daß bei kleineren Strahlspannungen schon geringere Objektdickendifferenzen merkbare Kontraste auf der Platte liefern. Es kann daher notwendig sein, zur



II 642/38.

Fig. 3. Ruß aus Zedernölflamme. Die räumliche Flocke wird in den meisten Teilen infolge der großen Tiefenschärfe scharf abgebildet; nur in der linken unteren Ecke ist die axiale Ausdehnung so groß, daß die Abbildung unscharf geworden ist. (Aufnahme: H. RUSKA.) el.opt. 25000 : 1.

werden kann, ohne daß die Bilder zweier Objektpunkte vom Abstand  $\delta$  infolge ihrer Zerstreungskreise ineinander verlaufen. Dann ist die Tiefenschärfe  $T$  offenbar um so besser, je größer das Verhältnis von  $a'/\delta$  ist; dieses Verhältnis errechnet sich

Darstellung sehr schwacher Dicken- oder Dichteunterschiede kleinere Strahlspannungen zu wählen, obwohl man damit eine relativ höhere Objektbelastung, eine Verringerung des Auflösungsvermögens und Herabsetzung der Leuchtschirmhelligkeit in Kauf nehmen muß. Die kleinste Dicke eines Objektes, die einen noch genügenden Kontrast ergibt, so daß das Teilchen erkennbar ist, wurde von MARTON als das Tiefenauflösungsvermögen eingeführt<sup>3</sup>. MARTON hat damals auch eine Rechnung gegeben, die eine quantitative Abschätzung dieser Größe erlauben sollte. Die Rechnung ging aber noch von der nach unseren Erfahrungen unzutreffenden Annahme aus, daß das Bild von vielfach gestreuten Elektronenstrahlen erzeugt wird, die die gesamte Objektivöffnung, also die Objektivblendenapertur beaufschlagen; die Rechnungsergebnisse sind daher, wie ein Vergleich mit den inzwischen erzielten experimentellen Werten zeigt, größenordnungsmäßig falsch.

Während die unbeeinflussten Elektronen für den Kontrast maßgebend sind, kann die Verteilung der gestreuten Elektronen des bestrahlenden Bündels auf den gesamten Raumwinkel hinter dem Objekt je nach der Struktur und Massendicke des Objekts verschieden sein und ist im einzelnen ebenfalls noch nicht bekannt. Sicher ist nur, daß die mittlere Intensität im Raumwinkel sehr klein gegen die Intensität im bestrahlenden Kegel ist; macht sich doch der Anteil, der durch die gegenüber dem abbildenden schmalen Bündel linear etwa 10mal, räumlich etwa 100mal größere Objektivblendenapertur eindringt und demgemäß auf das Bild treffen wird, dort nicht bemerkbar. Erst wenn man die Objektivblendenapertur etwa räumlich 1000mal so groß macht, wie die vom abbildenden Bündel beaufschlagte Objektivapertur, beobachtet man eine merkliche Kontrastverschlechterung des Bildes. Dies bedeutet, daß die gestreuten Elektronen in namhafter Anzahl in das Bild gelangen und dort eine Grundhelligkeit verursachen, keineswegs aber an den ihnen zukommenden Bildort gelangen, weil sie nicht einen bestimmten Objektteil durchsetzen haben, sondern die gesamte Linse als verhältnismäßig weit geöffnetes Bündel beaufschlagten und demgemäß dem gesamten Öffnungsfehler der Linse unterlagen.

Dieses experimentelle Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Überlegung, daß der Raumwinkel der Halbkugel etwa 10<sup>6</sup>mal so groß ist wie der Raumwinkel des abbildenden Strahles. Bei Berücksichtigung der 100mal größeren Raumapertur der Objektivblende gegenüber der Kondensorapertur ergibt sich also immer noch ein nur 10<sup>-6</sup>mal so großer Streustrom, wenn man z. B. annimmt, daß im abbildenden Bündel die Hälfte der auffallenden Elektronen sich wiederfindet und der Rest gleichmäßig über die Halbkugel verteilt ist. Selbst wenn die Intensität je Raumwinkel-einheit bei den gestreuten Elektronen in der Nähe

der Achse erheblich, z. B. 100fach größer ist als im Mittel über die Halbkugel, ergibt sich immer noch ein sehr kleiner Streustromanteil ( $\frac{1}{100}$ ), der dem starken Öffnungsfehler der Objektivblendenapertur unterliegt. Infolge seiner Kleinheit kann er nicht mehr bildverschlechternd wirken.

#### 4. Die Konturen.

Neben der durch die Massendicke der Objekten bedingten Steuerung der Zahl der innerhalb der Objektivapertur das Objekt verlassenden Elektronen müssen wir jedoch noch eine, wenn auch beschränkte Steuerung dieser bilderzeugenden Objektivapertur annehmen, wenn wir eine auf den übermikroskopischen Bildern immer wiederkehrende Erscheinung erklären wollen. Eine Vergrößerung der Objektivapertur  $\alpha_0 = \alpha_K + \alpha_B$  könnte beispielsweise eintreten durch größere Beugungsaperturen  $\alpha_B$ , die durch nicht mehr aufgelöste Einzelheiten des Objekts hervorgerufen sind. Die beobachtete Erscheinung besteht in einem Saum, der jede Kante und jedes Einzelteilchen von seiner weniger massendicken Umgebung trennt (Fig. 4a bis c). Die Erklärung für das Zustandekommen dieser Umsäumung gibt Fig. 5. Wir betrachten zunächst den Übergang von einem Gebiet ohne Objekt (vgl. Fig. 4b) zu einem dünnen Objekt (Collod. Film 10<sup>-2</sup>  $\mu$ ) und denken uns das Objekt an der Übergangsstelle aufgeteilt. Wir betrachten nun getrennt die Strahlintensitäten, die in den Bildern der beiden Objektteile vorhanden sind, und wie rasch sie am Rand des betrachteten Teilobjekts auf Null abklingen würden, wenn nur der jeweils betrachtete Objektteil bestrahlt würde. Von den Punkten des Filmloches treten in die Objektivlinse Bündel der ungeänderten Kondensorapertur  $\alpha_K$ . Infolge des auch bei dieser kleinen Apertur merklichen Öffnungsfehlers der Magnetlinse sinkt die Bestrahlungsintensität im Bild des Filmloches am Lochrand nicht plötzlich auf Null, sondern innerhalb einer Strecke, die durch das Öffnungsfehlerscheibchen gegeben ist (Fig. 5b).

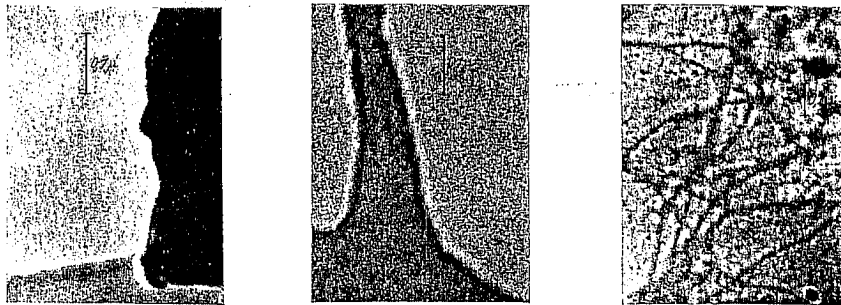
Die gleiche Betrachtung für den Film führt bei Annahme einer durch den Film bedingten Vergrößerung der Objektapertur zu einer über eine größere Strecke sich erstreckenden Abnahme der an sich kleineren Bestrahlungsdichte im Bild des Filmbereichs (Fig. 5c). Durch Überlagerung beider Stromdichten gelangt man zu der auf der photographischen Platte registrierten Schwärzung (5d) und nach Umkehrung (Abzug von einem Festwert) zur Schwärzungsverteilung auf dem Abzug (5e). Man sieht, daß die Schärfe der Umrisse gegeben ist durch die Steilheit des Abfalls des Lochbildes (sehr geringe Massendicke), während die Breite der Säume abhängt von der Abklingsbreite des Bildes des Films (größere Massendicke). Diese Verhältnisse ändern sich nicht wesentlich, wenn dichtere Objekte auf den sehr dünnen Objektträger aufliegen (vgl. Fig. 4a unten).

Fig. 6 zeigt die Schwärzungsverhältnisse, wenn ein kleines dichteres Objektteilchen auf dem

<sup>3</sup> L. MARTON, Physica 3, 959 (1936).

Trägerfilm liegt. Den entsprechenden Saum erkennt man in Fig. 4c längs der Molekülfäden des Tabakmosaikvirus. In der folgenden Arbeit von G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH UND H. RUSKA<sup>4</sup> sind

zung die mittlere Schwärzung herrscht (Halbwertsbreite). Liegt das Objekt als Kugel statt als Prisma vor, so ist sein Durchmesser etwas größer, als er aus der Halbwertsbreite der Schwärzung bestimmt wird.



a) II 327/38.

b) II 639/38.

c) II 672/38.

(Aufnahmen: H. O. MÜLLER.)

el.opt. etwa 25000:1. Gesamtvergr. 100000:1.

(Aufnahme: H. RUSKA.)

el.opt. 25000:1. Gesamtvergr. 50000:1.

Fig. 4. Bildsäume an Konturen. a) Zementteilchen. b) Rest eines Objektträgerfilms; bei diesen Bildern erkennt man Säume an Rändern zwischen Masse und masselosen Stellen (vgl. Fig. 5). c) Tabakmosaikvirus auf Objektträgerfilm; hier sieht man die Säume um die Virusfäden, die auf dem Film liegen (vgl. Fig. 6).

in Fig. 13 Schwärzungskurven eines Tabakmosaikfadens wiedergegeben, die deutlich die beschriebenen Säume zeigen.

Den wahren Ort der Kante eines größeren Teilchens hat man in der Mitte des steilsten Abfalls zu

Gelegentlich treten Mehrfachsäume auf; auch diese lassen sich ähnlich erklären, wenn man annimmt, daß Objektpunkte nicht durch einfache Öffnungsfehlerscheibchen abgebildet werden, sondern durch Fehlerscheibchen in der Form von Ringen mit Mittelpunkten.

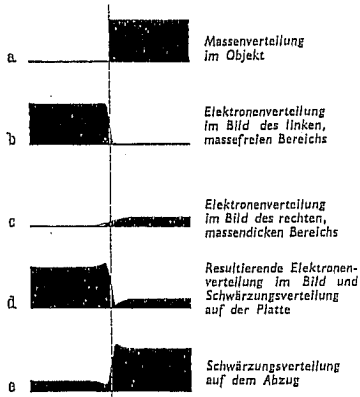


Fig. 5. Erklärung des hellen Hofes dichter Objekte und des dunklen Hofes dünner Objekte.

suchen. Bei kleinen Objekten bestimmt sich nach Fig. 6 der Durchmesser ohne große Fehler aus der Breite des Schwärzungstals auf der Platte an der Stelle, wo zwischen kleinster und größter Schwär-

<sup>4</sup> G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH u. H. RUSKA, Naturwiss. 27, 292 (1939).

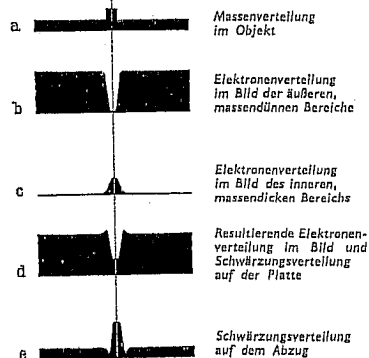


Fig. 6. Abbildung kleiner, gegenüber dem Trägerfilm nicht dicker Objekte.

Aus der Übergangsbreite der Kanten eines Bildes und aus der Breite der Bildsäume kann man auf den Öffnungsfehler des Objektivs und seinen Gang mit steigender Beaufschlagung des Objektivs schließen, wenn man gleiche Objekte mit verschiedener Kondensorapertur aufnimmt. Als solche

Objekte eignen sich wegen der weitgehend definierten Herstellungsmöglichkeit Objektträgerfilme aus Kolloidum und darauf liegende Schwermetallkolloide<sup>6</sup>.

### 5. Energie- und Ladungsaufnahme der Objekte.

Die gegenseitige Beeinflussung von Objekt und den einzelnen Elektronen ereignet sich in der unvorstellbar kurzen Zeit von  $10^{-16}$  bis  $10^{-18}$  sec. Von den das Objekt durchstrahlenden Elektronen bleiben einige im Objekt völlig stecken (Absorption), andere erleiden einen mehr oder weniger großen Geschwindigkeitsverlust. Diese Elektronen geben also ihre Bewegungsenergie ganz oder teilweise an das Objekt ab, wodurch dieses erwärmt wird. Die Wärmeaufnahme des Objektes durch Absorption der Elektronenstrahlen läßt sich nach den von LENARD<sup>7</sup> gegebenen Vorstellungen und quantitativen Angaben berechnen. Wenn die Dicke  $x$  einer Schicht kleiner ist als diejenige Dicke  $x_1$ , innerhalb deren die auftreffenden Elektronen ihren parallelen Gang annähernd beibehalten, ohne durch Diffusion wesentlich zerstreut zu werden, was bei den in der Elektronenmikroskopie noch scharf abgebildeten Schichten der Fall ist, so gilt für den absorbierten Anteil  $J_a$  und den auftreffenden Anteil  $J_s$  des Elektronenstroms:

$$\frac{J_a}{J_s} = 1 - e^{-\alpha_0 x}, \quad (7)$$

wobei  $\alpha_0^*$  das wahre Absorptionsvermögen ist. Da bei  $x < x_1$  der Wert  $\alpha_0 \cdot x$  immer klein ist gegen 1, kann man in Vereinfachung von (7) schreiben:

$$\frac{J_a}{J_s} = \alpha_0 \cdot x = \frac{\partial J / \partial x}{J_s} \cdot x. \quad (8)$$

$\alpha_0$  kann man mit einer für die hier interessierende Genauigkeit ausreichenden Schärfe als dem spezifischen Gewicht  $\gamma$  der durchsetzten Schicht proportional ansehen. Die Größe  $\alpha_0/\gamma$  ist eine Funktion der Voltgeschwindigkeit  $U_s$  der Elektronen und in Fig. 7 dargestellt.

Neben der Absorption der Elektronen, bei der die absorbierten Stromanteile ihre gesamte Energie an das Objekt abgeben, tritt nun noch ein Geschwindigkeitsverlust ein, den die das Objekt durchsetzenden Elektronen in mehr oder weniger starkem Maße erleiden. Dabei bestimmt man zahlenmäßig den mittleren Geschwindigkeitsverlust  $U_v$  nach den von LENARD gegebenen Vorstellungen für dünne Schichten  $x < x_1$  wie folgt: (Zur Kennzeichnung, daß wir uns im Gebiet der Parallelfalldicke befinden, schreiben wir mit LENARD  $x = x_0$ .)

$$\frac{U_v}{U_s} = \frac{\partial U / \partial x}{U_s} \cdot x = \frac{\partial v / \partial x \cdot \alpha_0 \cdot \partial U / \partial v}{U_s} \cdot x = \epsilon_0 \cdot x, \quad (9)$$

wobei  $v$  die lineare Geschwindigkeit bedeutet. Auch hier können wir in einer für unsere Zwecke aus-

reichenden Annäherung annehmen, daß der Geschwindigkeitsverlust der Dichte proportional ist. Der Geschwindigkeitsverlust  $\epsilon_0/\gamma$  ist nun eine Funktion von  $U_s$  und ebenfalls in Fig. 7 dargestellt.

Will man die gesamte in Wärme umgesetzte Leistung  $N_0$  berechnen, die in einem Objekt der Dichte  $\gamma$  und der Dicke  $x$  erzeugt wird, wenn ein Elektronenstrom  $J_s$  von der Strahlspannung  $U_s$  auftrifft, so gilt

$$N_0 = U_s \cdot J_a + U_v \cdot J_s. \quad (10)$$

Mit der Strahlleistung

$$N_s = U_s \cdot J_s \quad (11)$$

finden wir nach Einführung von (8), (9) und (11) in (10)

$$N_0 = N_s \cdot x \cdot \gamma \left( \frac{\alpha_0}{\gamma} + \frac{\epsilon_0}{\gamma} \right). \quad (12)$$

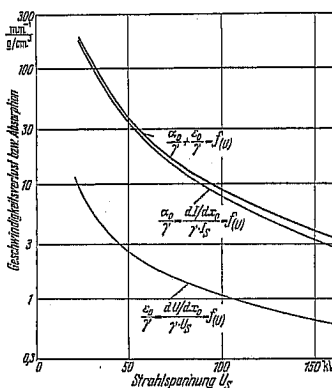


Fig. 7. Absorption  $\alpha_0$  und Geschwindigkeitsverlust  $\epsilon_0$  als Funktionen der Strahlspannung  $U_s$ .

Die Summe  $(\alpha_0/\gamma + \epsilon_0/\gamma)$  ist in Fig. 7 ebenfalls eingetragen, so daß es damit möglich ist, die aufgenommene Leistung zu bestimmen.

Es ist nun noch zu untersuchen, wie groß die sog. „Parallelfalldicken“ sind, innerhalb welcher die Beziehungen (8) und (9) gelten. Mit einer gewissen Annäherung kann man nach LENARD setzen:

$$x_f = \frac{\ln(1,11 - 0,11 p^2)}{2 \gamma \frac{\alpha_0}{\gamma} \cdot B \cdot f}, \quad (13)$$

darin ist  $B$  der sog. „Umfangfaktor“, der angibt, um wievielfach länger ein Elektronenweg bei diffusum Lauf der Elektronen im betrachteten Medium gegenüber dem geraden Lauf ist.  $p$  ist die Rückdiffusionskonstante und mit  $B$  durch die Gleichung

$$B = \frac{1 + p}{1 - p} \quad (14)$$

verknüpft.  $B$  und  $p$  sind Funktionen des Atomgewichtes bzw. des mittleren Atomgewichtes  $A$  des Objektes und für die uns interessierenden Strahlspannungen von dieser unabhängig.  $f$  ist ein Fak-

<sup>6</sup> H. RUSKA, Naturwiss. 27, 287 (1939).

<sup>7</sup> P. LENARD, Quantitatives über Kathodenstrahlen. Heidelberg 1924.

\* Diese von LENARD stammende Bezeichnung  $\alpha_0$  ist nicht zu verwechseln mit der am Anfang dieser Arbeit eingeführten Objektivapertur  $\alpha$ .

tor, der ebenfalls als von der Spannung unabhängig und vom Atomgewicht abhängig angesehen werden kann. Die Kenntnis dieser 3 Werte ist verhältnismäßig ungenau, insbesondere ist über den Wert von  $f$  bei kleinen Atomgewichten wenig bekannt, doch sollen hier ja auch nur größenordnungsmäßige Anhaltspunkte für  $\alpha_i$  gegeben werden.

In Fig. 8 sind die aus (13) mit den Kurven Fig. 7 errechneten Werte von  $\alpha_i \cdot \gamma$  als Funktion von  $U_i$  eingetragen, so daß es möglich ist, für Schichten, deren  $\gamma$  bekannt ist, die Parallelfalldicke überschläglich zu bestimmen. Eine organische Schicht (z. B. Kolloidum und Eiweiß), für die ein mittleres Atomgewicht von  $A = 7$  angesetzt werden kann, würde bei einem spezifischen Gewicht von  $\gamma = 1,2$  und bei einer Strahlspannung von 60 kV demnach

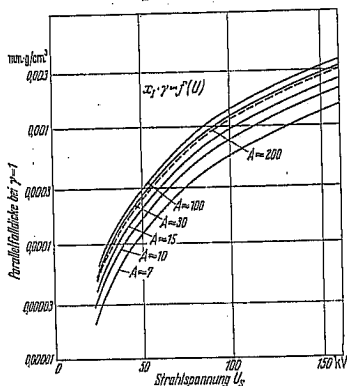


Fig. 8. Parallelfalldicke  $\alpha_i$ , abhängig von spez. Gewicht  $\gamma$ , Atomgewicht  $A$  und Strahlspannung  $U_i$ .

ein  $\alpha_i$  von etwa  $0,00015 \text{ mm} = 0,15 \mu$  haben. Unsere eingangs gemachte Annahme, daß die untersuchten Dicken innerhalb der Parallelfalldicke liegen, besteht also zu Recht.

Will man das gegenüber dem Lichtmikroskop höhere Auflösungsvermögen des Übermikroskops ausnutzen, so müssen die untersuchten Schichten mindestens dünner als  $\alpha_i$  sein. Je kleiner sie gegen  $\alpha_i$  sind, um so näher kann man an das Grenzauflösungsvermögen des Übermikroskops herankommen.

Wenn man annimmt, daß nur ein Teil des Strahlstromes das Objekt durchsetzt, daß also das Objekt mit einer Stromdichte  $j_0$  ( $A/\text{mm}^2$ ) getroffen wird, so ergibt sich mit  $P_0$  als Objektfläche die Objekt-Wärmeleistung aus (12) zu

$$N_0 = U_i j_0 P_0 \omega \gamma \left( \frac{\alpha_0}{\gamma} + \frac{e_0}{\gamma} \right) \quad (15)$$

und die auf das Objektvolumen bezogene Leistung  $N_0^v$  zu

$$N_0^v = \frac{N_0}{P_0 \alpha} = U_i j_0 \gamma \left( \frac{\alpha_0}{\gamma} + \frac{e_0}{\gamma} \right) \quad (16)$$

Bei den von uns benutzten, in der folgenden Arbeit<sup>5</sup> beschriebenen Objektträgerfilmen beträgt

nach einer Beobachtung die noch ausgehaltene Belastung  $1 \text{ mA}/\text{mm}^2$  bei 55 kV. Damit findet sich

$$N_0^v = 55000 \cdot \frac{1}{1000} \cdot 1,2 \cdot 30 \approx 2 \frac{\text{kW}}{\text{mm}^2}$$

Dieser erstaunlich hohe Wert ist nur verständlich, wenn man bedenkt, daß infolge des sehr dünnen Films von  $10^{-5} \text{ mm}$  Dicke nur der sehr viel geringere Energiebetrag von  $0,02 \text{ Watt}/\text{mm}^2$ , bei einer Fläche des Objektträgerfilms von  $10^{-2} \text{ mm}^2$  also nur  $N_0 = 200 \mu\text{W}$  abzuführen sind. Bei einer zweiten Beobachtung erfolgte ein Einreißen eines Objektträgerfilms von  $\frac{1}{100} \text{ mm}^2$  Fläche unter einer Bestrahlung von  $0,1 \text{ mA}/\text{mm}^2$  bei etwa  $\frac{2}{3}$  Belegung des Films mit  $\frac{1}{3} \mu$  dicken Bakterien. Mit diesen Werten ist:

$$N_0 = \frac{55000}{10000} \cdot \frac{2/3}{100} \cdot \frac{1}{3000} \cdot 1,2 \cdot 30 = 440 \mu \text{ Watt}$$

Die Übereinstimmung dieser beiden Werte ist mit Rücksicht auf die Versuchsunauigkeiten als genügend zu betrachten. Ein Objekt reißt also bei Überschreitung eines bestimmten Wertes der Wärmeleistung je Flächeneinheit, während die Volumenbelastung bei sehr dünnen Objekten sehr hoch werden kann. Es liegt dies daran, daß im Vakuum eine Wärmeabgabe nur durch Abstrahlung von der Objektfläche erfolgen kann. Demnach kann man ein dünnes Objekt mit größeren Stromdichten bestrahlen als ein dickeres.

Messungen über die sich einstellenden Temperaturen sind nicht durchgeführt, weil sie aus begreiflichen Gründen schwierig sind. Man könnte daran denken, fein verteilte Objekte verschiedener Schmelz- und Umwandlungspunkte auf den Trägerfilm zu bringen und ihre Veränderungen bei der Bestrahlung zu beobachten. Diese Frage ist bis jetzt nicht bearbeitet worden, da sie nicht dringlich scheint. Beobachtet man doch z. B. bei nicht zu lange Zeit normal belasteten Bakterien noch kaum eine Bräunung.

Verwendet man sehr dicke Objekte, die alle Elektronen absorbieren, so kann man erhebliche Leistungsdichten in der Flächeneinheit der bestrahlten Körper erzeugen. Mit dem obigen Beispiel erhält man:

$$\frac{N_0}{P_0} = U_i j_0 = \frac{55000}{10000} = 55 \frac{\text{Watt}}{\text{mm}^2}$$

Diese Leistungsdichte kann ausreichen, sehr erhebliche Temperaturen zu erzeugen, wenn die Wärme nicht genügend abgeführt werden kann. Wir beobachteten beispielsweise Umkristallisation während der übermikroskopischen Betrachtung einer Rasterklingschneide oder Schmelzen von Silberdrähten, also Temperaturen um  $1000^\circ \text{C}$ .

#### Aufladung der Objekte.

Bei den meist vorliegenden, nicht leitenden Objekten kann eine Aufladung durch die absorbierten Elektronen erfolgen. Da die absorbierten Elektronen nicht nur ihre ganze Energie, sondern auch ihre ganze Ladung an das Objekt abgeben, ist das

Verhältnis der aufgenommenen zur durchgehenden Ladung ebenfalls  $J_a/J_s = \alpha_0 \cdot \omega$ . Um eine negative Aufladung des Objektes gegen seine Umgebung und damit Bildstörungen zu verhindern, ist es daher nötig, daß die durchgehenden Elektronen im Objekt durch Sekundäremission denselben geringen Bruchteil  $\alpha_0 \cdot \omega$  auslösen.

Eine so geringe Sekundärausbeute der Größenordnung  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  scheint immer vorhanden zu sein, so daß Bildstörungen, die auf eine Aufladung der Objekte schließen ließen, bisher nicht beobachtet wurden.

Die das Objekt haltenden Blenden und die Objektpatrone absorbieren natürlich fast alle auftretenden Elektronen. Die Aufladung dieser Teile kann aber, da sie leitend sind, durch konstruktive Maßnahmen am Übermikroskop vermieden werden, so daß auch dadurch eine Erschwerung des Mikroskopierens nicht eintritt. Ebenso ist es natürlich notwendig, diese Patronen in gutem Wärmekontakt mit den gekühlten Teilen des Gerätes zu halten.

### Zusammenfassung.

Das übermikroskopische Bild entsteht durch Fokussierung sehr schmaler Strahlenbündel mittels eines Objektivs großen Öffnungsfehlers. Die Apertur der abbildenden Bündel liegt etwa bei  $1/1000$  und ist praktisch gegeben durch die Kondensorapertur, vermehrt durch die im Objekt entstehenden Beugungswinkel erster Ordnung. Die Kontraste entstehen dadurch, daß mit steigender Massendicke der Objektpunkte die Zahl der das Objekt unbeeinflusst in unveränderter Richtung verlassenden und dadurch das Bild erzeugenden Elektronen ab- und der diffus gestreute, zum Bild nicht beitragende Anteil entsprechend zunimmt. Bildsäume, die an den Konturen übermikroskopischer Bilder häufig auftreten, können aus dem Öffnungsfehler der Linse erklärt werden. Für die vom Objekt infolge Absorption der Elektronen aufgenommene Wärme und elektrische Ladung werden quantitative Angaben gemacht; es wird erläutert, warum beide unschädlich bleiben.

## Übermikroskopische Untersuchungstechnik.\*

Von H. RUSKA, Berlin-Nikolassee.

Durch die Entwicklung und die technische Durchbildung des Übermikroskopes sind die Voraussetzungen für eine bildliche Wiedergabe von Teilchen bis zu  $5 \mu$  Durchmesser (Gitterkonstante  $\nu$   $m\mu$ ) geschaffen worden<sup>1, 2</sup>. Die übermikroskopischen Bilder geben dabei die Massenverteilung in den Objekten wieder<sup>3</sup> und nicht andere, sekundäre Eigenschaften wie die lichtmikroskopischen Bilder. Da die Elektronenstrahlen, die diesen Fortschritt in der optischen Auflösung ermöglicht haben, jedoch ein sehr beschränktes Massendurchdringungsvermögen besitzen, und eine Aufrichtmikroskopie aus anderen Gründen große Schwierigkeiten bietet, kann man die für die Lichtmikroskopie entwickelten Untersuchungsverfahren in der Übermikroskopie nicht ohne weiteres übernehmen. Objektträger, Deckgläser und selbst Schichten von der Dicke dünnster Mikrotomschnitte ( $> 1 \mu$ ) sind für die Durchstrahlung mit Elektronen zu dick.

verteilung in den Objekten gemacht werden sollen: Der Trägerfilm muß im Elektronenstrahl durchsichtig erscheinen wie der Objektträger und das Deckglas im Lichtmikroskop. Er muß von einheitlicher Dicke sein und frei von jeder sonstigen elektronenoptisch sichtbaren Eigenstruktur. Er darf beim Aufbringen der Objekte und bei der Durchstrahlung mit Elektronen nicht zerreißen. Die aufgebrachten Objekte müssen auf ihm festhaften, und schließlich muß man eine Untersuchung des Films im Übermikroskop durchführen können, bevor er mit dem Objekt beschickt wird. Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, so können Täuschungen durch zufällig entstehende Kunstprodukte und dem Film anhaftende, objektfernde Bestandteile eintreten. Aus der Lichtmikroskopie bekannte Objekte wird man auf solchen Trägern auch dann wieder erkennen, wenn diese Forderungen nur in mäßigem Umfang erfüllt sind. Handelt es sich aber darum, auf derartigen Filmen Objekte zu betrachten, die wegen ihrer Kleinheit einer lichtoptischen Abbildung unzugänglich sind, und bei denen indirekte Meßverfahren zu teilweise widerspruchsvollen Ansichten über Gestalt und Größe geführt haben, wie es vielfach in dem Gebiet der Virusforschung<sup>4</sup> der Fall ist, so sollte von den angestellten Bedingungen keinesfalls abgewichen werden. Sie sind nicht zuletzt auch zu stellen, um die Bedenken bei der Beurteilung übermikroskopischer Bilder zu zerstreuen, die dort auftauchen können, wo zwar einerseits mit dem jeweils untersuchten Gegenstand Vertrautheit herrscht, wo andererseits aber noch die Möglichkeit fehlt, Erfahrungen mit dem Übermikroskop selbst zu

### I. Anforderungen an übermikroskopische Objektträger.

Gut durchstrahlbare Schichten dürfen nur eine Dicke von kolloiden Dimensionen besitzen, d. h., es müssen Gebilde sein, die der Kolloidchemiker als Filme bezeichnet. Diese können entweder selbst Gegenstand der Untersuchung werden, oder als Träger für andere Objekte dienen. Von Objektträgerfilmen müssen die folgenden Bedingungen erfüllt sein, wenn sichere Aussagen über die Massen-

\* Mitteilung aus der I. Medizinischen Universitätsklinik der Charité und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.G.

<sup>1</sup> E. RUSKA, Z. Physik 87, 580 (1934).

<sup>2</sup> B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Wiss. Veröff. Siemens 17, 99 (1938).

<sup>3</sup> B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Naturwiss. 27, 281 (1939).

<sup>4</sup> Näheres s. in der folgenden Arbeit von G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH u. H. RUSKA, Naturwiss. 27, 202 (1939).