

10. Daria BOCCIARELLI e Giulio Cesare TRABACCHI. — **Tecnica delle ombre nella microscopia elettronica.**

Riassunto. — Si descrive un apparecchio per realizzare con facilità la *tecnica delle ombre* in microscopia elettronica.

Résumé. — On décrit un appareil pour réaliser avec facilité la *techniques des ombres* dans la microscopie électronique.

Summary. — An apparatus is described, which permits to carry out in an easy manner the *shadow technique* in electron microscopy.

Zusammenfassung. — Es wird ein Apparat beschrieben um die *Technik der Schatten* in der Elektronenmikroskopie mit Leichtigkeit realisieren zu können.

E' stata recentemente messa in uso ⁽¹⁾ una nuova tecnica per mettere in evidenza alcuni particolari nei preparati che si osservano al microscopio elettronico. Questa consiste nel far cadere sui preparati già pronti per l'osservazione, sotto un angolo di incidenza piuttosto piccolo, dei raggi molecolari provenienti da un metallo che si fa evaporare nel vuoto. I raggi molecolari così proiettati, determinano una metallizzazione del preparato, e se l'angolo di incidenza è stato scelto opportunamente, si possono ottenere degli effetti di « ombra » che non solo possono permettere di giudicare assai agevolmente dello spessore degli oggetti sostenuti dalla sottile membrana sulla quale essi sono disposti per l'osservazione al microscopio elettronico, ma mettono in evidenza particolari che non si potrebbero rilevare con la semplice osservazione diretta.

Per poter sfruttare questa tecnica a vantaggio del lavoro che si svolge nel nostro Istituto al microscopio elettronico, abbiamo montato un apparecchio, quanto più possibile pratico, che riteniamo opportuno descrivere qui brevemente, presentando anche i primi risultati ottenuti.

L'operazione dell'evaporazione del metallo deve essere fatta in un vuoto almeno di 10^{-6} tor, non solo per ottenere vapore di metallo puro,

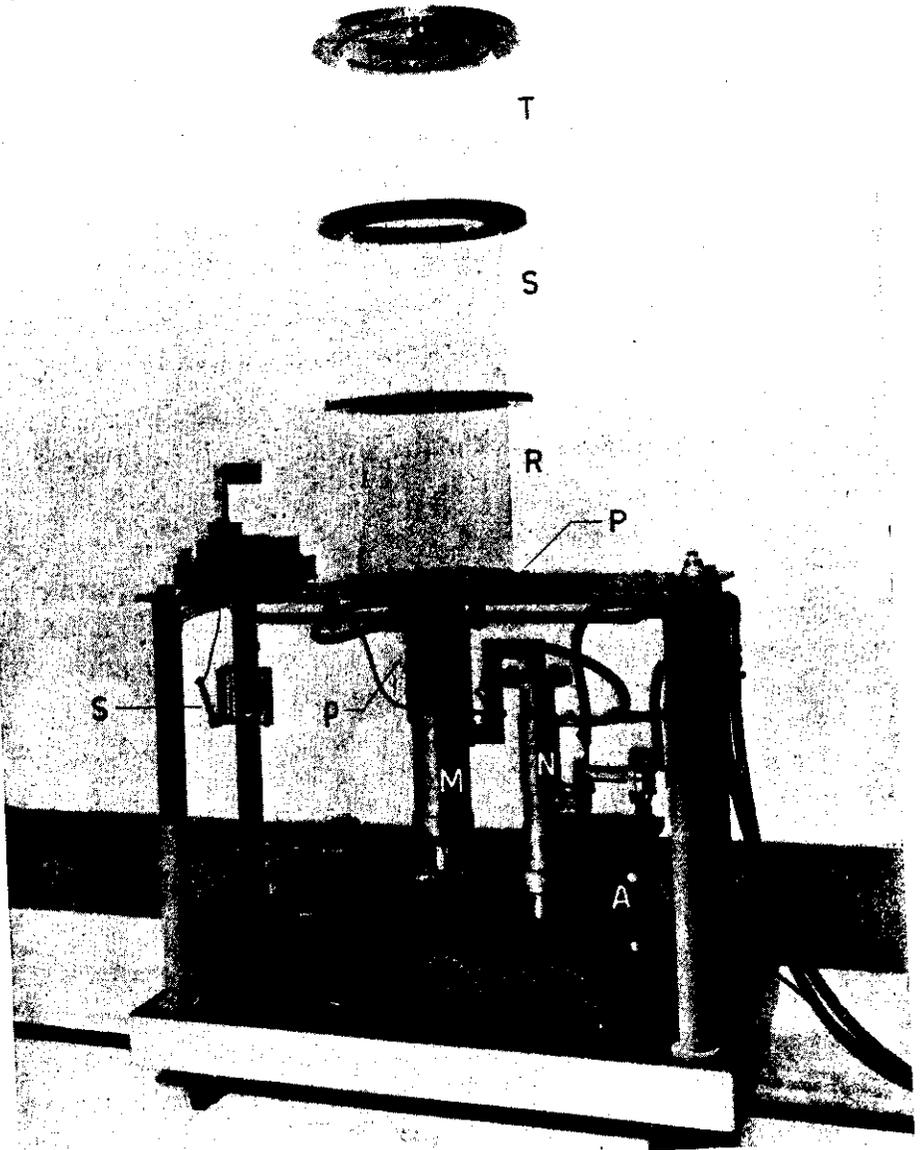
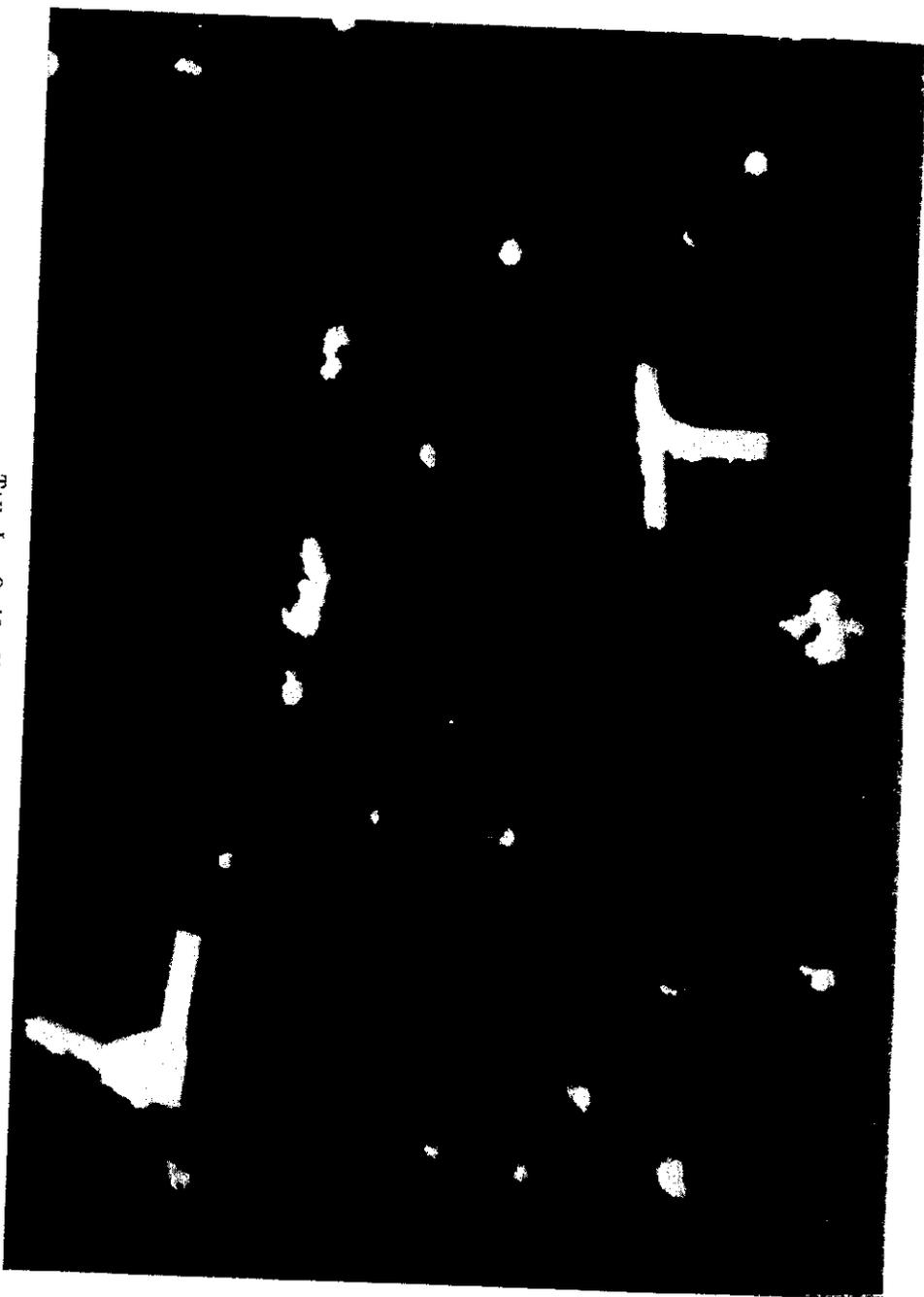
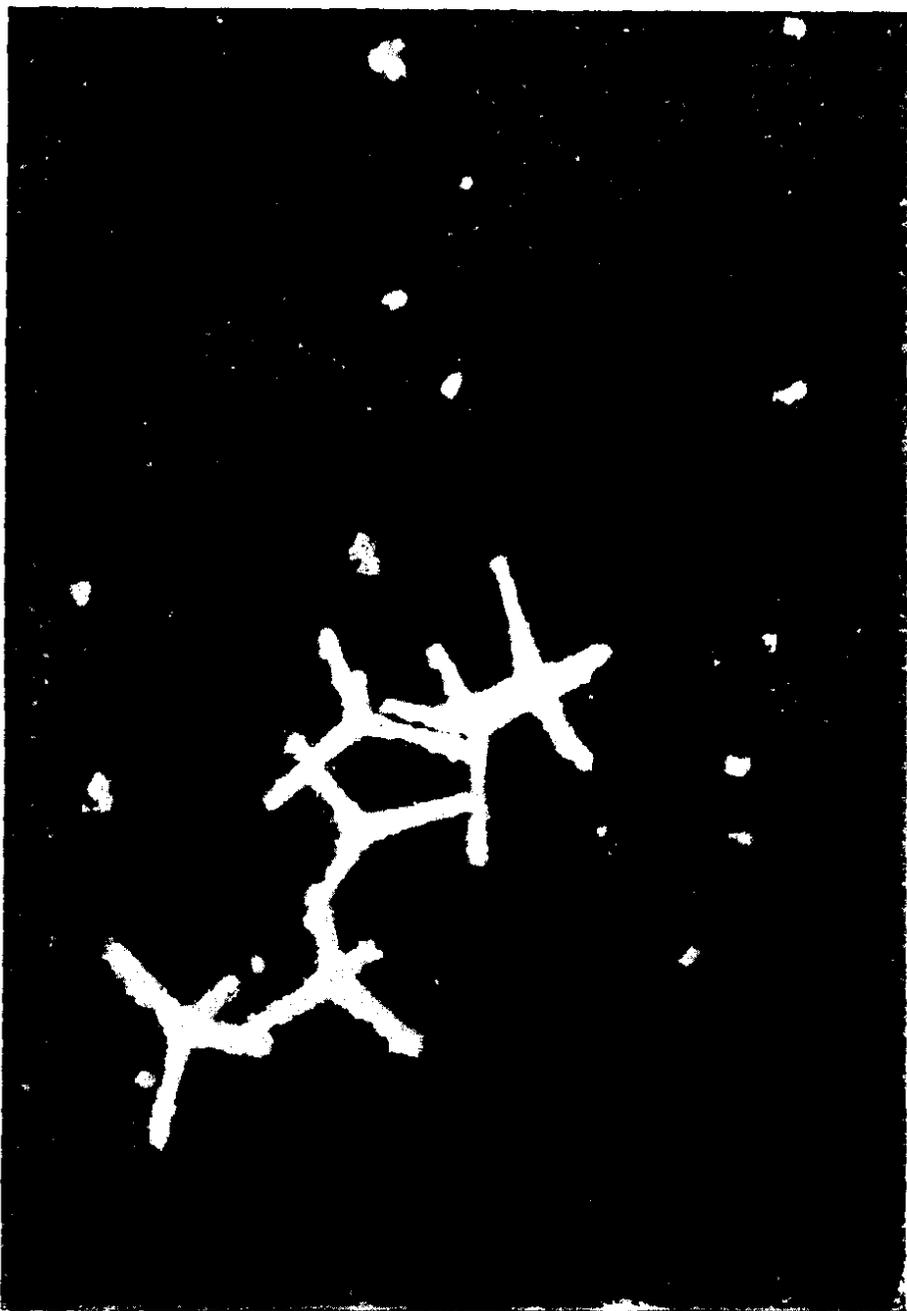


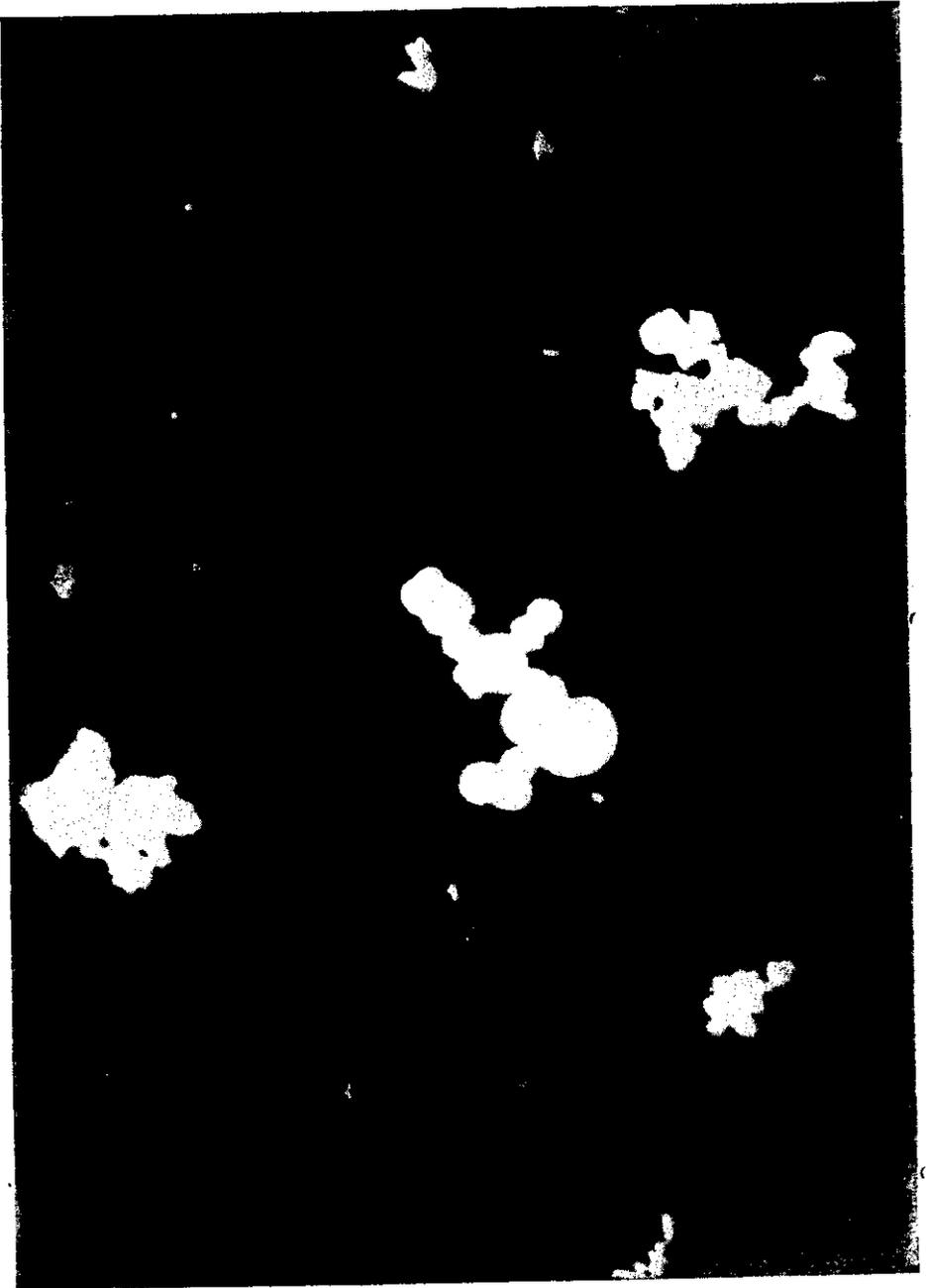
FIG. 1.



TAV. I. - Ossido di zinco (fumi)
40.000 X



TAV. II. - Ossido di zinco (fumi)
40.000 X



TAV. III. - Ossido di tungsteno (fiumi)
40.000 X

TAV. IV. - Ossido di magnesio (fumi)
10.000 X





TAV. V. - *B. brevis*
40,000 ×

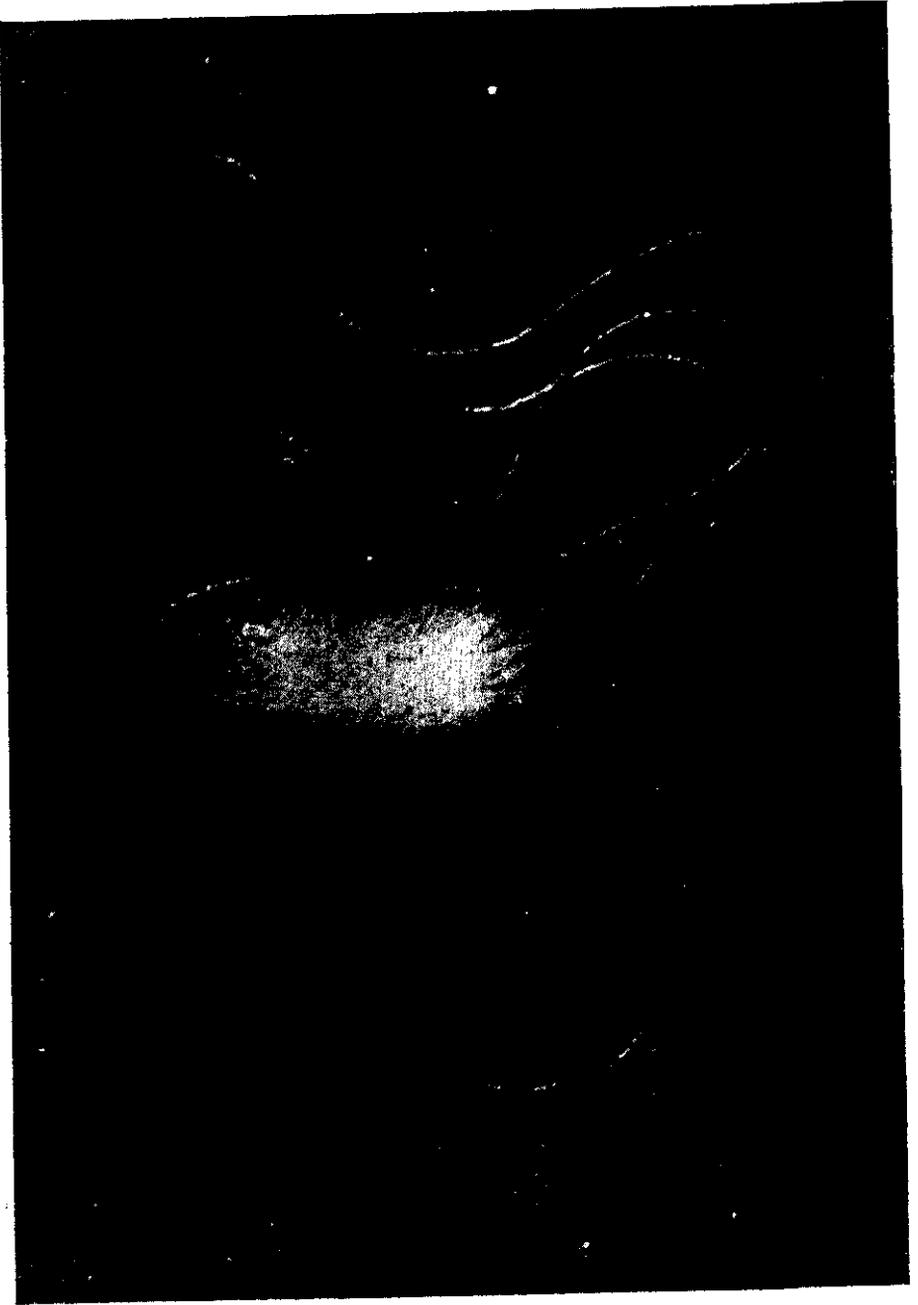


PLATE VI. - *Proteus vulgaris*
40,000 X

PLATE VIII. - Tuberculosis (aviania)
40,000 X

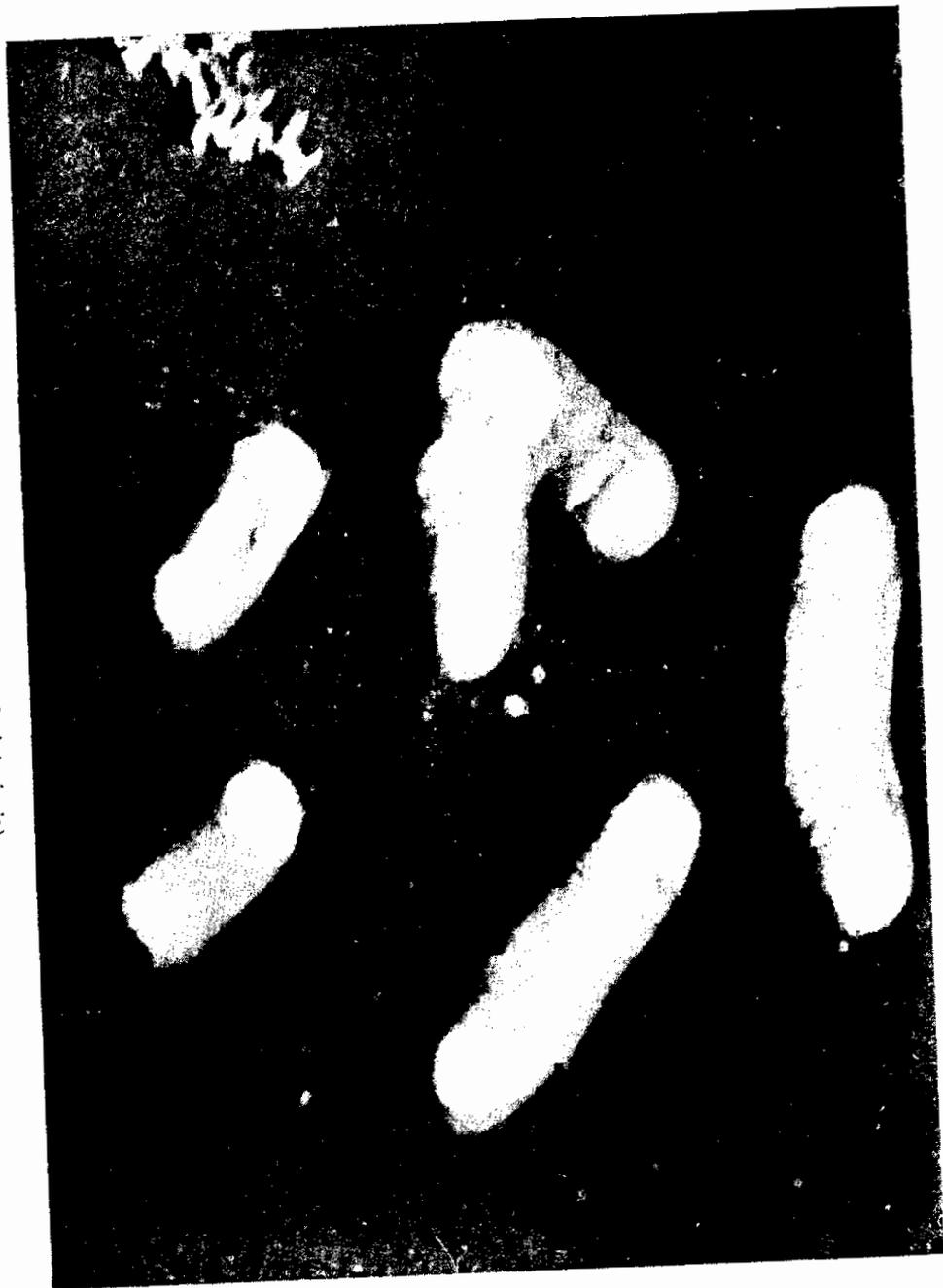
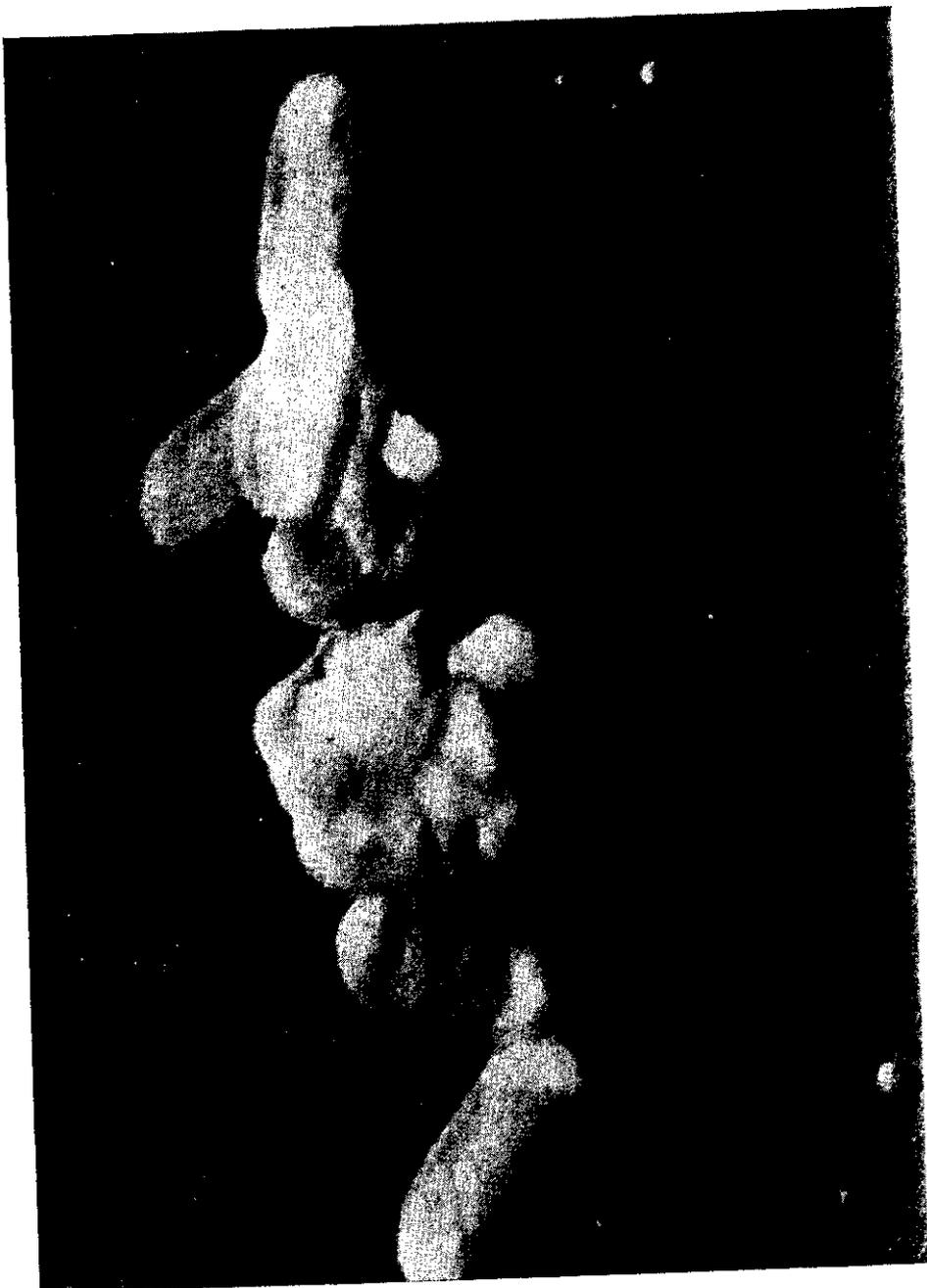


PLATE VIII. - Tuberculosis (aviaria)
40,000 X





TAV. IX. - Tubercolosi (avianis)
40.000 X



TAV. X. - Rinoscleroma
40,000 X

ma anche perchè i raggi molecolari possano percorrere traiettorie rettilinee, allo scopo di ottenere ombre nitide; i preparati sui quali si vuole fare la metallizzazione devono essere posti a una certa distanza dal metallo che evapora, anch'essi nel vuoto; l'apertura e la chiusura del recipiente entro cui si fa l'operazione deve essere facile, rapida e a tenuta sicura.

Abbiamo usato a questo scopo uno degli impianti di alto vuoto in uso nel nostro laboratorio, e precisamente quello già descritto in questi Rendiconti (vol. IV, pag. 1133) del quale riportiamo nella fig. 1 la fotografia. Dei cilindri di vetro sovrapponibili è stato adoperato il solo elemento T messo al posto di R: esso costituisce la campana da vuoto. Il foro, largo 15 cm, della flangia superiore di detta campana, viene chiuso, a tenuta in gomma, da un disco metallico che porta i due elettrodi (A e B, fig. 2) isolati fra loro. Tra questi elettrodi che arrivano quasi alla base del cilindro, viene

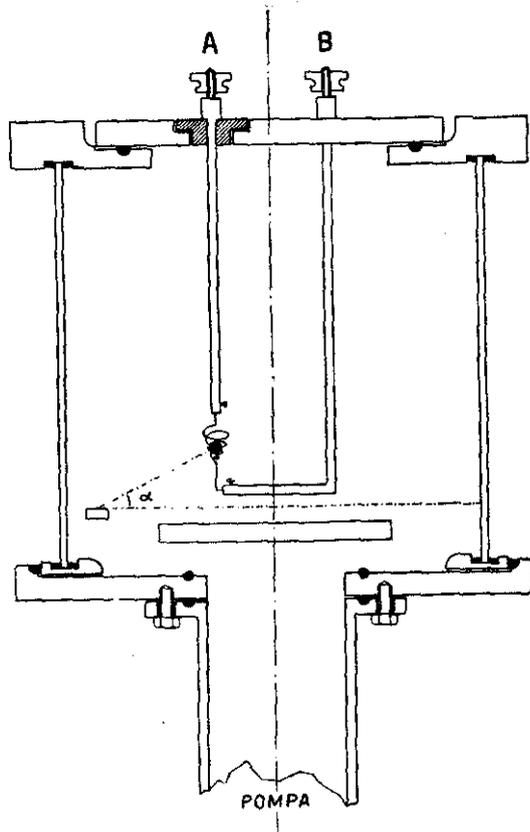


FIG. 2.

disposta una spirale conica di filo di tungsteno di mm 0,5, la quale ha il vertice rivolto in basso. Si mette il metallo da evaporare in questa specie di cestello, si chiude l'apparecchio e si mettono in funzione le pompe. Queste consistono in una coppia (M e N, fig. 1) di pompe a vapori di olio Apiezon con una bocca di aspirazione di cm 10 di diametro; precede una pompa rotativa A capace di raggiungere il centesimo di tor.

I preparati che devono ricevere i raggi di vapore vengono allineati su un vetrino che si pone a lato del cestello di tungsteno, in modo che i

raggi di vapore li colpiscono con inclinazione opportuna. Quando il vacuometro annesso alla campana indica che il vuoto occorrente è stato raggiunto, si manda nel filo di tungsteno una corrente di una ventina di ampère, sufficiente a fare evaporare il metallo destinato a produrre i raggi molecolari. Dopo un tempo più o meno lungo (da pochi secondi a qualche minuto) a seconda del metallo e della temperatura alla quale lo si porta, si comincia a produrre un lieve annerimento della parete del cilindro che costituisce la campana e degli oggetti in essa contenuti.

Siccome la lastrina sulla quale sono disposti i portapreparati è di vetro *bianco-latte* si può facilmente giudicare quando la proiezione di metallo ha raggiunto il valore conveniente. Si sospende allora l'operazione e facendo abbassare, con un opportuno dispositivo che si può comandare dalla flangia superiore, il coperchio disposto (fig. 2) sulla bocca della pompa, questa che è munita di una guarnizione di gomma viene chiusa ermeticamente in modo che si può fare entrare l'aria nel cilindro mentre le pompe rimangono in funzione. Aperto superiormente il cilindro, si possono estrarre immediatamente i preparati. Quando se ne devono trattare degli altri questi vengono messi al loro posto; si chiude il cilindro e vi si fa il vuoto con la pompa preparatrice. Quando ciò è fatto si ristabilisce la comunicazione con le pompe dell'alto vuoto e si ripetono le operazioni già descritte.

Le nostre prime ombreggiature sono state fatte con vapori di argento, e sotto un angolo di incidenza dei raggi compreso tra 20 e 30°.

Le tav. I, II e III mostrano i risultati che si possono ottenere in queste condizioni. In esse si vedono cristalli di ossido di magnesio, di ossido di zinco e di ossido di tungsteno, ed è facile dedurre dalle ombre proiettate la loro posizione rispetto al piano di appoggio, mentre nella tav. IV in una fotografia, senza ombre, di ossido di magnesio, non è possibile dare un analogo giudizio, inquantochè essendo assai grande la profondità di fuoco del microscopio elettronico, non si ha nessun aiuto, in questo giudizio, dalla nitidezza nei vari punti del quadro.

Le tav. V e VI, mostrano alcuni batteri trattati nello stesso modo. Si osserva per es., come particolare messo in rilievo esclusivamente da questa tecnica, la presenza di brevissime ciglia in un bacillo (*Proteus vulgaris*).

Siamo poi passati ad impiegare vapori di cromo. Per vaporizzare questo metallo, occorre una temperatura più alta e un tempo maggiore,

ma il deposito che si ottiene è più finemente suddiviso, cosicchè l'effetto plastico che si ottiene è più fedele ed efficace.

Le tav. VII, VIII, IX e X rappresentano dei bacilli trattati in questa maniera.

Naturalmente con questa tecnica le fotografie che si ottengono al microscopio elettronico, se venissero stampate, su carta o su diapositive, presenterebbero le ombre invertite rispetto a quelle che siamo abituati a vedere comunemente: occorre perciò ricavare un « controtipo » per servirsene per la stampa.

Roma. - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di fisica. Gennaio 1948.