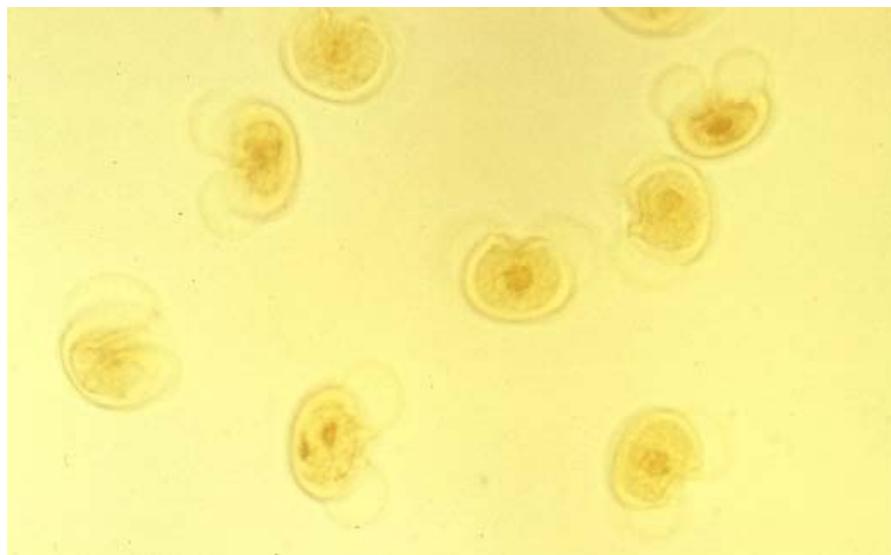


## LA FORMAZIONE DELL'ALONE NEL CONTRASTO DI FASE



*Pinus silvestris*, polline. (100 : 1 sulla pellicola 24x36).

Ogni granulo è fornito di due sacche piene d'aria, dalla parete esilissima, che gli consentono di essere meglio trascinato dal vento, appena visibili in campo chiaro (sopra).

In contrasto di fase (sotto) oltre alle pareti delle sacche, sono visibili in quanto molto scure le sottili nervature interne che servono da rinforzo. All'esterno delle sacche, ben visibile l'orlo chiaro, caratteristico di questa tecnica di osservazione. La parete del granulo invece appare in contrasto di fase come più chiara del fondo: questo è un ottimo esempio della "inversione di contrasto" sotto citata.

Chi si occupa di microscopia, prima o poi, ha avuto modo di osservare, direttamente o riprodotta in qualche foto, un'immagine ottenuta con la tecnica del "contrasto di fase"; si tratta di una delle "tecniche di contrasto", cioè dei dispositivi ottici che si applicano ad un microscopio normale (non stereoscopico) per aumentare il contrasto nell'immagine rispetto al contrasto dell'oggetto. Queste tecniche sono utili nell'osservazione di oggetti molto trasparenti, ad es. cellule o microrganismi, che si vogliono seguire nelle loro attività vitali, o comunque senza colorazione.

Ma, sempre osservando una qualunque immagine in contrasto di fase, si sarà notato che

gli orli dell'oggetto sono marcati da un doppio alone, di solito scuro all'interno e chiaro all'esterno. Se tale alone è utile per mettere in risalto i contorni dell'oggetto, per contro, come vedremo, nasconde i dettagli presenti in corrispondenza dell'alone stesso.

Ma quale è la sua causa?

Nella letteratura tecnica tale causa viene di solito ignorata: perché è troppo complicata o perché nessuno se ne cura?

Vogliamo qui proporre una spiegazione qualitativa, intuitiva, ma prima di tutto occorre richiamare alcune nozioni di ottica ondulatoria, nonché il principio basilare del contrasto di fase.

Va premesso che le immagini qui sopra, come avviene nella gran maggioranza dei casi, sono ottenute con la variante “contrasto di fase positivo normale”; accenneremo infatti ad altre varianti del metodo, anche se commercialmente poco sfruttate: il contrasto di fase si può infatti realizzare in tanti modi diversi, ognuno con vantaggi e svantaggi; il mercato poi, alla fine, decide qual è la versione più gradita dagli utenti e le altre vengono abbandonate. Comunque, ci limiteremo ai principi fondamentali senza entrare negli aspetti matematici. Presupporremo anche che si abbia sempre a che fare con oggetti sottili; infatti, se l'oggetto è spesso o fortemente rifrangente<sup>1</sup> può accadere che il contrasto si inverta<sup>2</sup>: un oggetto più rifrangente del mezzo che lo circonda non appare più scuro ma più chiaro del fondo, come si vede nella seconda figura di sopra, in corrispondenza dell'orlo della parte centrale del granulo.

Già dal 1941 è stata messa a punto negli stabilimenti Zeiss di Jena, in base ai calcoli di Fritz Zernicke del 1932, che valsero all'autore il premio Nobel per la Fisica nel 1953, una tecnica di osservazione microscopica che, nonostante il rilevante prezzo di fabbricazione, ha assunto una diffusione sempre più larga in ogni genere di ricerca che si basi sull'uso del microscopio.

Quasi tutti i costruttori si sono dedicati negli anni immediatamente successivi alla fabbricazione di dispositivi del genere: nel 1948-49 la Wild e la Koristka, nel 1951 la Leitz, ecc.

Il metodo consiste nell'applicare ad un normale microscopio una serie di obbiettivi speciali (“di fase”) ed un condensatore munito di opportuni diaframmi anulari.

Dal punto di vista dell'applicazione, il contrasto di fase essenzialmente porta a costituire, di un oggetto assai trasparente ed immerso in un mezzo di indice di rifrazione simile al suo, una immagine dai margini assai netti, generalmente più scuri e circondati da un alone più chiaro del fondo. Il contrasto di fase classico mostra infatti la maggior parte degli oggetti (o i loro margini) più scuri in rapporto ad un fondo più luminoso.

Se l'oggetto è piccolo, esso può apparire interamente più scuro del campo poiché l'alone scuro interno ne occupa interamente la superficie, il tutto attorniato dall'alone più chiaro. Se l'oggetto ha una struttura complessa, cioè è costituito da numerose infrastrutture, ogni infrastruttura apparirà scura o bordata da linee scure, e la sovrapposizione dei rispettivi, aloni chiari potrà far apparire l'oggetto complessivo più chiaro del campo.

In osservazioni con sistemi ottici normali (in “campo chiaro”), un oggetto poco o punto colorato, assai trasparente, e con indice di rifrazione assai simile a quello del mezzo in cui si

---

<sup>1</sup> In realtà, quello che conta è lo sfasamento prodotto dall'oggetto sulla radiazione che l'attraversa; tale sfasamento dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione e dal **cammino ottico** dell'oggetto. Il cammino ottico è il prodotto dello spessore dell'oggetto per l'indice di rifrazione di esso. Quindi dire “oggetto spesso e/o molto rifrangente” è come dire “oggetto con cammino ottico molto maggiore del mezzo circostante”. “Oggetto sottile e/o poco rifrangente” = “oggetto con cammino ottico di poco maggiore ...”.

<sup>2</sup> Per l'esattezza, l'inversione del contrasto avviene quando lo sfasamento introdotto dall'oggetto (vedi sotto, nota 7, come va inteso e come si esprime lo sfasamento) supera  $35 - 55^\circ$ ; il valore esatto dipende dalla trasparenza dell'anello di fase: un anello più assorbente provoca l'inversione per minori valori di sfasamento dell'oggetto. Quando lo sfasamento arriva a  $360^\circ$  (una lunghezza d'onda), il contrasto si annulla, ma questa condizione è priva di importanza poiché un simile oggetto è visibilissimo anche senza contrasto di fase a causa di altri fenomeni (rifrazione, riflessioni interne, ecc.) che si possono riassumere nel termine di “linea di Becke”.

trova immerso, risulta quasi invisibile.

Tale situazione è assai comune nell'osservazione microscopica:

1) In Biologia, quando si osserva una cellula, un frammento di tessuto, batteri, protozoi, piccoli metazoi, gameti, ecc. “in vivo”, cioè quando si vuol evitare di uccidere, fissare e colorare l'oggetto, il che comporta una tecnica di preparazione spesso lunga e complessa, Si ricordi che l'osservazione in vivo, oltre ad essere notevolmente più semplice e più rapida, permette di osservare un oggetto vivente nella sua normale attività vitale, e di studiarne quindi le funzioni, ed inoltre non richiede alcuna manipolazione o aggiunta di sostanze estranee al preparato, e dà quindi generalmente la garanzia che ciò che si osserva non è un artefatto di preparazione, ma una struttura normalmente esistente nell'oggetto.

2) In Chimica, nell'Industria alimentare, ecc. quando si devono osservare emulsioni, sospensioni colloidali o comunque di particelle solide, corpi eterogenei, materie sintetiche, polveri.

3) Nell'industria dei vetri ottici, per l'osservazione delle inomogeneità del vetro o delle irregolarità delle sue superfici.

4) Nell'industria delle fibre tessili, specialmente sintetiche.

5) Nell'industria cartaria.

6) In Cristallografia, per lo studio dei microcristalli e del loro accrescimento.

In tutti questi casi, il metodo del contrasto di fase può permettere di osservare oggetti o strutture altrimenti invisibili, oppure di osservare a fresco o in vivo oggetti o strutture che altrimenti sarebbero visibili solo dopo opportuna colorazione.

Il contrasto che si ottiene con questo metodo è generalmente assai spiccato, e l'immagine risulta sempre di facile interpretazione. La messa a punto del sistema è semplice e non critica, specie se le tolleranze nella costruzione meccanica dello stativo sono sufficientemente strette.

Il prezzo di un corredo ottico “di fase” è generalmente il doppio del corrispondente sistema ottico non di fase, composto dagli stessi obiettivi con le stesse caratteristiche. Un corredo ottico di fase può generalmente essere montato su uno stativo da microscopio normale.

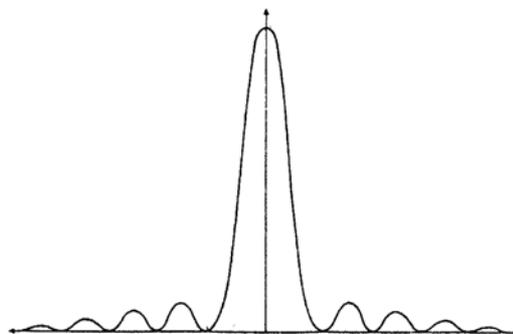
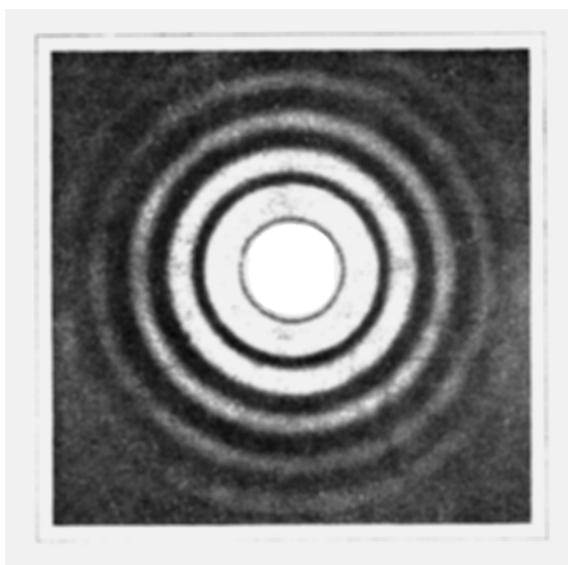
Gli obiettivi speciali per contrasto di fase possono, salvo rare eccezioni (episcopia, fluorescenza, ecc.), venire usati anche per osservazioni in campo chiaro e campo scuro, poiché sono costituiti da un sistema di lenti normale. Una limitazione rimane però riguardo al contrasto generale dell'immagine: un obiettivo “di fase”, usato in campo chiaro, presenta un contrasto inferiore al corrispondente obiettivo normale, cioè per campo chiaro. Ciò deriva dal fatto che nella “centrica” (vedi sotto) da esso prodotta gli anelli periferici sono più intensi per la presenza dell’ “anello di fase” (vedi subito sotto) ed il sovrapporsi di tutti gli anelli corrispondenti a tutti i punti dell'immagine crea un velo di luce diffusa che abbassa il contrasto.

Esistono, presso ogni fabbricante, obiettivi di fase ed obiettivi normali in tutto identici dal punto di vista dell'ingrandimento, apertura, correzioni, ecc. Anche il condensatore di fase può venire usato per campo chiaro, in unione ad un diaframma ad iride, ed in certi casi anche per campo scuro. Ciò che distingue l'obiettivo di fase da quello normale è la presenza, nel piano focale posteriore del sistema obiettivo, di un “**anello di fase**”, cioè una zona anulare centrata rispetto all'asse del sistema<sup>3</sup>, generalmente costituita da uno strato di materiale trasparente dielettrico ad elevato indice di rifrazione, in grado quindi di ritardare la fase dell'onda che l'attraversa, e da uno strato metallico semitrasparente con coefficiente di trasmissione piuttosto basso (dal 10% al 40% a seconda del costruttore) (**d** in fig. 1). L'anello di fase è di solito depositato per evaporazione sotto vuoto su apposita lamina di vetro plan-parallela oppure sulla superficie di una delle lenti dell'obiettivo, anche all'interno di un doppietto incollato. Se lo sfasamento da esso operato è in ritardo, come avviene di solito, tale

---

<sup>3</sup> La “piastrina di fase” di forma anulare è oggi universalmente accettata, ma si sono tentate altre forme: a nastro, a croce, ecc., tutte abbandonate poiché producono un contrasto direzionale, non simmetrico rispetto al centro del campo, e per la maggior difficoltà di centratura.

ritardo può essere pari a  $\lambda/4$  oppure a  $3/4 \lambda$ ; quest'ultimo ritardo è equivalente però ad un anticipo di  $\lambda/4$ . Si possono quindi ottenere con lo stesso metodo, variando lo spessore dell'anello, ritardi o anticipi di fase. La tecnologia degli anelli di fase è comunque assai complessa.



Aspetto di una “centrica” o “figura di diffrazione” (immagine di un oggetto otticamente puntiforme<sup>5</sup> fornita da un sistema ottico in condizioni ideali) e suo profilo fotometrico.

Da: V. Ronchi, “Théories Energétiques de la vision” (Atti Fondaz. Ronchi, 5, XXIII, p. 596-598; Firenze, 1968).

NB: Il disco di Airy, il primo anello e forse il secondo sembrano quasi della stessa intensità, ma ciò è dovuto alla non linearità della risposta dell'emulsione fotografica, che non riesce a registrare i fortissimi contrasti presenti nella centrica

==== Prima di procedere, dobbiamo allora richiamare qualche dettaglio sulla formazione delle immagini in ottica.

In breve, tutte le volte che un'onda (ottica) incontra una discontinuità (variazione di trasparenza, di spessore, di indice di rifrazione, ecc.) nel suo cammino, non prosegue in linea retta, ma devia secondo leggi che dipendono dal tipo di discontinuità, dalla lunghezza d'onda, dalla forma dell'onda, ecc. e non più dalle semplici regole dell'ottica geometrica: si potrebbe dire che essa viene sparpagliata. In gergo, l'onda viene “diffratta” ed il fenomeno si chiama “diffrazione”. Ne deriva che, indipendentemente dal sistema ottico che si usa per creare un'immagine di un oggetto, l'immagine non è più geometricamente simile all'oggetto: qualunque oggetto mostra delle discontinuità (di colore, di trasparenza, di spessore, ecc.) e queste discontinuità, i suoi orli o gli orli di qualunque suo dettaglio, appaiono “sfumati”, non definiti.

Nel caso di uno spigolo vivo (per es. l'orlo di un corpo opaco), la sua immagine apparirà bordata, accompagnata, da una serie di alcune sottili linee parallele (“**frange**”), sfumate, che si attenuano via via che ci si allontana dall'ombra geometrica dello spigolo. Se l'oggetto si presenta come una serie di righe alternate di pari larghezza, di diversa trasparenza o spessore, ecc., le cose si complicano perché i sistemi di frange creati dai singoli bordi di ognuna delle righe si sovrappongono, (in gergo si dice che “interferiscono”) ed il risultato è un'altra serie di frange, più numerose, più regolari e generalmente più fitte. Un oggetto con una simile struttura a righe parallele e regolari si chiama genericamente “**reticolo**”. Per **passo** del reticolo si intende la larghezza di una coppia di righe, trasparente ed opaca ad es., cioè la larghezza della struttura che si ripete periodicamente quando si traversa il reticolo in direzione perpendicolare alle righe.

Nel caso di un oggetto qualunque, con una struttura complessa e quindi con un fitto intreccio di discontinuità, tutto il complesso dell'onda diffratta può assumere un andamento assai irregolare ed un'apertura quasi a tutto spazio, nel senso che occupa quasi tutto lo spazio davanti e dietro al fronte dell'onda.

Se invece consideriamo un'oggetto “puntiforme”, cioè di dimensioni trascurabili, le cose sono più semplici: le “frange” citate sopra, che accompagnano l'immagine di un oggetto con bordi netti, in un certo senso si ripiegano su sé stesse e formano una caratteristica figura, come si vede nel riquadro che precede,

<sup>4</sup> Con  $\lambda$  (lettera **l** minuscola dell'alfabeto greco o “lambda”) si indica la lunghezza d'onda di una qualsiasi onda come quella ottica. Nello spettro ottico, ai diversi valori di  $\lambda$  corrispondono nell'occhio umano “medio” diverse sensazioni di colore, nello spettro acustico si hanno invece diverse sensazioni di “altezza” dei suoni.

<sup>5</sup> In ottica si considera puntiforme un oggetto la cui immagine geometrica è più piccola del disco di Airy corrispondente.

chiamata “figura di diffrazione” o “figura di Airy” o “**centrica**”. In essa, la gran parte dell’energia si concentra in un disco centrale (“**disco di Airy**”) ad orli sfumati, ma esso è circondato da una serie di **anelli** concentrici di diametro crescente e di intensità decrescente. Il profilo fotometrico di questa figura, cioè la variazione dell’intensità che si riscontra attraversandola lungo uno qualunque dei suoi diametri, è visibile nella figura a destra di quella della centrica.

La centrica rappresenta quindi l’immagine di un oggetto puntiforme come viene imposta dai soli fenomeni di diffrazione. Nella realtà, un sistema ottico qualunque non fornisce mai di un “punto oggetto” un’immagine del tutto identica alla centrica come quella descritta; vi possono essere difetti di progetto legati alla rifrazione (“aberrazioni del punto”), difetti costruttivi, difetti nei materiali o nel montaggio, e così via, per cui alla centrica ed alla diffrazione si sovrappongono altri fenomeni e le cose peggiorano sempre. Comunque, per varie ragioni tecniche, in un microscopio di qualità anche modesta, se correttamente usato, si può riconoscere, almeno nella regione centrale del campo, una centrica quasi perfetta.

Si comprende come, quanto più piccola è la centrica, migliore sarà la risoluzione, cioè la capacità di distinguere nell’immagine punti vicini, cioè dettagli fini. Il diametro della centrica rappresenta quindi il limite della risoluzione di un sistema ottico. Per calcolarne il raggio, o almeno il raggio del disco di Airy, si può usare la notissima formula:

$$r = 0,6 \lambda / NA \quad (1)$$

in cui  $\lambda$  è la lunghezza d’onda della radiazione utilizzata ed  $NA$  è la “apertura numerica” del sistema ottico.

Quanto abbiamo detto per una sorgente “puntiforme” si può ripetere per ognuno degli infiniti punti di cui si può considerare costituito un oggetto esteso; l’immagine di un tale oggetto sarà costituita allora dal sovrapporsi di un’infinità di centriche di varia intensità ma completamente sovrapposte e quindi indistinguibili fra loro. =====

Un problema a parte riguarda il potere risolutivo di un obiettivo di fase; si pensi che l’anello di fase provoca uno sfasamento in una piccola parte dell’onda che attraversa l’obiettivo; tale parte risulterà generalmente in quadratura di fase rispetto alla parte restante. Un simile sfasamento rappresenta in un certo senso un’aberrazione “sui generis”, e ne deve risultare un’alterazione della forma della centrica data dall’obiettivo di fase: il diametro della macchia centrale della figura di diffrazione (disco di Airy) risulta nei normali obiettivi di fase un poco minore di quello ottenuto dal corrispondente obiettivo non di fase. Quindi un obiettivo di fase, usato in contrasto di fase oppure in campo chiaro, ha un potere risolutivo anche leggermente maggiore di quello del corrispondente obiettivo non di fase.

Per contro, l’immagine di diffrazione data da un obiettivo di fase mostra un aumento di intensità degli anelli, specialmente del terzo e del quarto, rispetto alla figura normale, quindi un obiettivo di fase produce un contrasto leggermente inferiore a quello di un obiettivo normale equivalente. Di questo si è già accennato. Naturalmente, il fenomeno del contrasto di fase compensa largamente questa perdita di contrasto, e quindi si ha uno svantaggio solo quando si usa l’obiettivo di fase per osservazioni in campo chiaro. Si ricordi comunque che tale diminuzione del contrasto diviene apprezzabile solo con obiettivi forti.

Nel condensatore di fase esiste una serie di diaframmi anulari intercambiabili (ogni diaframma può funzionare accoppiato con 1 o 2 obiettivi di fase di diverso ingrandimento) che lasciano entrare la luce nel condensatore solo in corrispondenza di una fascia anulare centrata (vedi fig. 1).

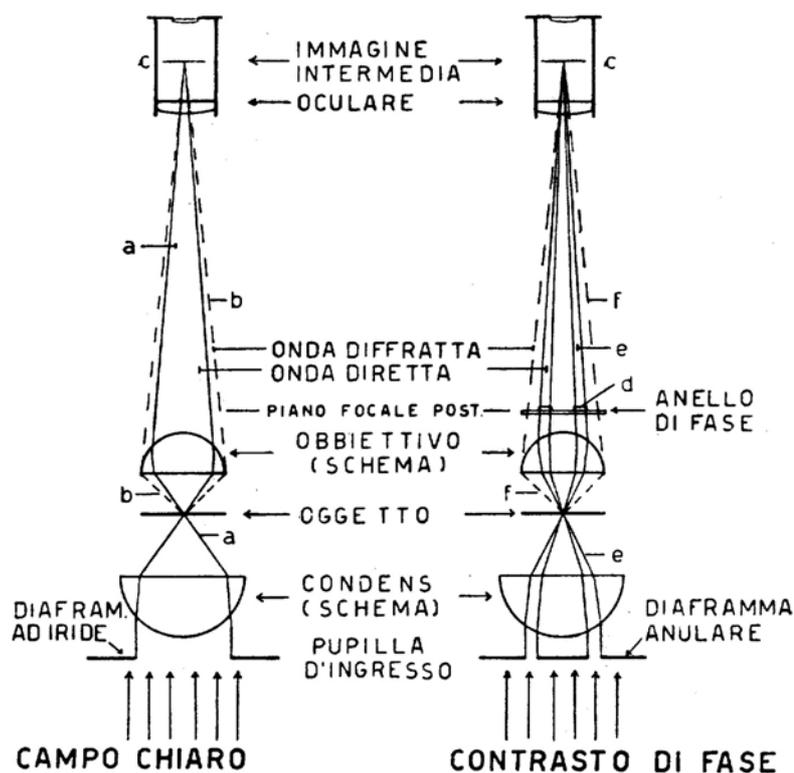


Fig. 1 – Schema di microscopio normale ed in contrasto di fase.

Il diaframma anulare si trova a livello della pupilla d'ingresso, cioè del piano focale anteriore del condensatore e quindi, quando la distanza fra condensatore ed obiettivo è corretta, con larga tolleranza, l'immagine del diaframma anulare appare nel piano focale posteriore dell'obiettivo; scegliendo opportunamente il diaframma in relazione al tipo di obiettivo usato e correggendone eventualmente la centratura con le apposite viti, si ha un ricoprimento perfetto fra immagine del diaframma e anello di fase dell'obiettivo.

Il principio di funzionamento del contrasto di fase è noto, e si basa sulla teoria delle immagini microscopiche di Ernst Abbe: in un microscopio normale correttamente messo a punto, si ha un fascio di luce convergente che emerge dal condensatore ed ha una apertura eguale o di poco inferiore a quella dell'obiettivo (a, fig. 1). Tale fascio, dopo aver attraversato l'oggetto, viene interamente accolto dall'obiettivo, e concorre a formare l'immagine intermedia c che verrà poi raccolta dall'oculare. Chiameremo questo fascio “onda diretta”.

Ora, va considerato che l'oggetto, per le sue inomogeneità, si comporta come un “reticolo” (come sopra definito), e provoca una diffrazione della luce che lo attraversa. L'onda diffratta (b, fig. 1), generalmente a forte apertura<sup>6</sup>, viene accolta dall'obiettivo solo in parte, secondo un'apertura pari a quella utile dell'obiettivo stesso e, sommandosi con l'onda diretta a, contribuisce alla formazione dell'immagine intermedia c.

L'oggetto può dunque ricondursi ad un reticolo di diffrazione, ma occorre distinguere:

a) Se l'oggetto è costituito da parti diversamente trasparenti o diversamente colorate, in un mezzo trasparente avente il loro stesso indice di rifrazione, le onde dirette e diffratte che emergono dall'oggetto dopo averlo attraversato hanno diversa ampiezza e fase opposta. Si parla di “RETICOLO DI AMPIEZZA”. A questo tipo di “reticolo” si avvicinano le sezioni istologiche colorate, incluse in materiali come il balsamo del Canada, aventi lo stesso indice

<sup>6</sup> L'apertura dell'onda diffratta, globalmente intesa, è tanto maggiore quanto più fini sono le strutture dell'oggetto, cioè quanto più piccolo è il passo del reticolo equivalente. Per reticolo equivalente si intende ogni dettaglio dell'oggetto in cui si riconosca il ripetersi per una o più volte di una medesima struttura (per es., una zona scura ed una chiara contigue).

del vetro. Tali oggetti comprendono dettagli più o meno trasparenti o colorati, circondati generalmente da un mezzo trasparente.

L'onda diretta che attraversa le zone chiare e quelle scure dell'oggetto può cambiare di ampiezza ma conserva la stessa fase. Invece, l'onda diretta e l'onda diffratta che dall'oggetto entrano nell'obbiettivo hanno fase opposta e, incontrandosi ("interferendo") nell'immagine intermedia dello strumento, danno un fenomeno di interferenza negativa, cioè danno una risultante più debole della luce che non ha attraversato l'oggetto. Sono questi fenomeni di interferenza che conferiscono l'aspetto definitivo all'immagine osservata: le zone meno trasparenti dell'oggetto appaiono con minore intensità, cioè più scure. L'oggetto è visibile quindi non semplicemente per il fatto di essere opaco o colorato, ma per un fenomeno di diffrazione (a livello dell'oggetto) e di interferenza (a livello dell'immagine intermedia).

b) Se l'oggetto è costituito invece da parti con diverso indice di rifrazione, ma egualmente trasparenti e non colorate, si può dimostrare che l'onda diretta ha dappertutto la stessa fase e la stessa ampiezza (non viene assorbita, visto che l'oggetto è trasparente) ma l'onda diretta e l'onda diffratta sono sfasate fra loro di  $\lambda/4$  circa; si parla allora di "RETICOLO DI FASE". In questo caso, l'onda diretta e diffratta, incontrandosi a livello dell'immagine intermedia, a causa del loro sfasamento "in quadratura", non possono produrre fenomeni di interferenza<sup>7</sup>; l'immagine dell'oggetto è quindi costituita da un'onda risultante in tutto simile all'onda diretta che dà l'immagine del campo; ne deriva che l'oggetto risulta invisibile, almeno nella misura in cui esso è assimilabile ad un reticolo di fase ideale.

In realtà, l'onda primaria che proviene dalla sorgente di luce viene leggermente sfasata dopo aver attraversato l'oggetto (in ritardo se l'oggetto ha un indice di rifrazione più alto del mezzo che lo circonda) e da questo sfasamento, per la decomposizione vettoriale della radiazione, nasce l'onda diffratta (vedi fig. 2 B). Ma per la comprensione dei risultati pratici si può trascurare il lieve sfasamento dell'onda diretta e supporre che, per gli oggetti normalmente osservati in microscopia, l'onda diffratta venga ritardata di  $\lambda/4$  rispetto l'onda diretta.

Nel dispositivo a contrasto di fase l'onda diretta esce dal condensatore, ed entra nell'obbiettivo, sotto forma di fascio anulare (**e**, fig. 1); essa va a cadere sull'anello di fase dell'obbiettivo (**d**) ed in quella sede viene attenuata e sfasata di  $\lambda/4$ ; l'onda diffratta invece non passa in massima parte attraverso l'anello di fase che è piuttosto stretto, e perciò non subisce sfasamenti (**f**, fig. 1).

---

<sup>7</sup> Se rappresentiamo ogni onda ottica con il suo vettore di campo elettrico che oscilla con legge sinusoidale, le variazioni periodiche di ampiezza del vettore si possono rappresentare come effetto della proiezione di un vettore di lunghezza costante su una retta complanare mentre il vettore stesso effettua una rotazione periodica attorno alla sua origine. Un intero periodo dell'onda, corrispondente alla lunghezza d'onda  $\lambda$ , corrisponde allora alla rotazione del vettore di  $360^\circ$ . Se si segue questa rappresentazione, uno sfasamento (un ritardo o un anticipo) di un'onda rispetto ad un'altra di pari  $\lambda$  si rappresenta come una diversa posizione angolare del vettore. Così, uno sfasamento di  $\lambda/4$  corrisponde ad una rotazione di  $90^\circ$ .

A questo punto però si comprende come due vettori sfasati fra loro di  $90^\circ$  non possano interferire: ognuno dei due vettori è perpendicolare rispetto all'altro e quindi non ammette componenti nella direzione dell'altro; i due vettori "si ignorano" reciprocamente. Non essendovi interferenza, il vettore risultante non muta ampiezza e perciò l'oggetto trasparente appare né più scuro né più chiaro del campo circostante.

Se due onde sono sfasate di  $180^\circ$  ( $\lambda/2$ ), sono in opposizione di fase e l'ampiezza risultante è la differenza delle ampiezze delle due onde interferenti. Se lo sfasamento è un multiplo intero di  $360^\circ$  ( $m\lambda$ , con  $m$  intero), le due onde sono in fase e le loro ampiezze si sommano.

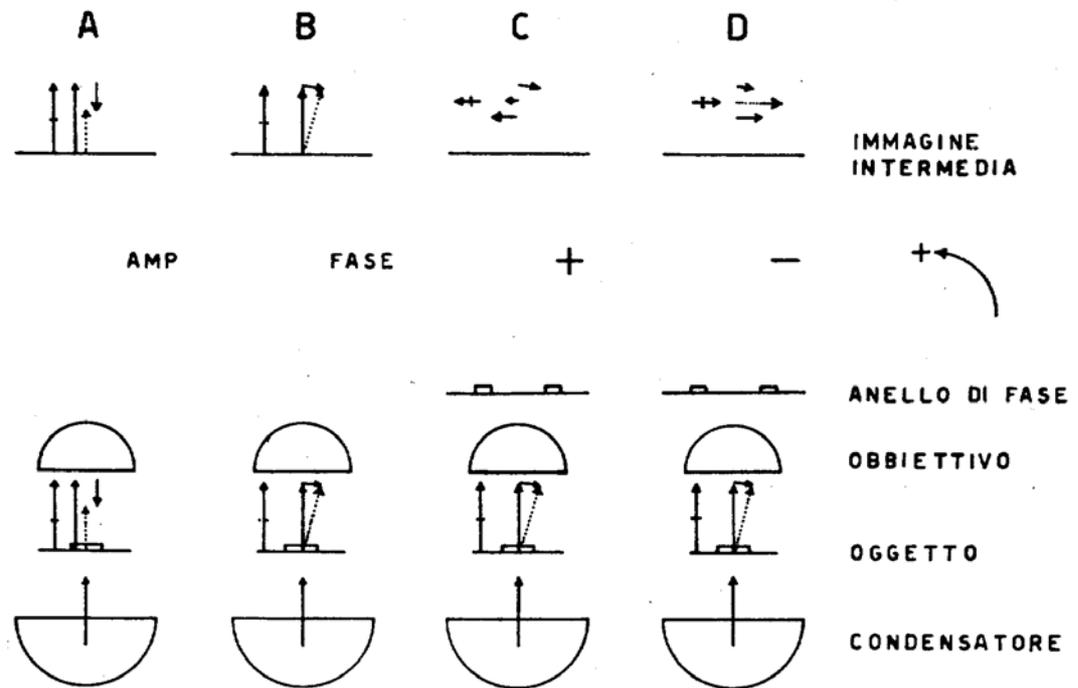


Fig. 2 – I rapporti di fase nella formazione dell'immagine al microscopio. La freccia ricurva a destra indica una rotazione del vettore (uno sfasamento) in anticipo.

A - *Oggetto di ampiezza osservato da un microscopio normale.* L'onda che attraversa il campo (freccia tagliata a sinistra) si può considerare priva di attenuazione e sfasamento. L'onda che attraversa l'oggetto (punteggiata, al terzo posto da sinistra) è attenuata poiché l'oggetto è assorbente e si può considerare costituita da un'onda diretta non attenuata (freccia intera, al secondo posto da sinistra) e da un'onda diffratta più piccola in opposizione di fase, che si sottrae all'onda diretta (onda accorciata, al quarto posto da sinistra). L'immagine dell'oggetto è meno luminosa del fondo essendo costituita da un'onda meno ampia.

B - *Oggetto di fase osservato da un microscopio normale.* L'oggetto non è assorbente, quindi non attenua l'onda diretta che lo colpisce, ma a causa di una differenza di indice provoca uno sfasamento (negativo in figura, indicato da una rotazione in senso orario del vettore) della luce che lo attraversa. L'onda sfasata (freccia punteggiata leggermente inclinata a destra) si può ancora decomporre in una onda diretta non sfasata ed un'onda diffratta, assai piccola, circa in quadratura con l'onda diretta (piccolo vettore orizzontale). L'immagine dell'oggetto è costituita da un'onda sfasata, della stessa ampiezza dell'onda che dà l'immagine del campo: essendo l'occhio insensibile agli sfasamenti, l'oggetto di fase è invisibile.

C - *Oggetto di fase in contrasto positivo.*

L'onda diretta che attraversa il campo e l'oggetto viene anticipata di  $\lambda/4$  a livello dell'anello di fase e quindi nell'immagine intermedia (grafico in alto, sotto la lettera C, frecce intera e tagliata dirette a sinistra) essa si trova circa in opposizione di fase con l'onda diffratta, che è stata ritardata dall'oggetto ma non alterata dall'anello di fase (freccia diretta a destra). L'onda risultante che dà l'immagine dell'oggetto (freccia corta diretta a sinistra) deriva da una interferenza negativa ed è quindi più debole dell'onda che dà l'immagine del campo (frecce a sinistra). Un oggetto più rifrangente del mezzo circostante appare quindi più scuro del fondo, come se fosse un oggetto di ampiezza. L'onda diretta è non solo anticipata ma anche attenuata dall'anello di fase e quindi la sua ampiezza è simile a quella dell'onda diffratta; la risultante delle due è allora assai piccola (oggetto molto scuro).

D - *Oggetto di fase in contrasto negativo.*

L'anello di fase attenua e ritarda di  $\lambda/4$  l'onda diretta (frecce a sinistra ed in basso), la quale dunque viene ad avere la stessa fase dell'onda diffratta (freccia piccola in alto) provocata da un oggetto più rifrangente del mezzo. Nell'immagine intermedia si ha interferenza positiva fra onda diffratta e diretta, e quindi la risultante, che fornisce l'immagine dell'oggetto (freccia più lunga verso destra), è più ampia dell'onda che dà l'immagine del campo. L'oggetto appare più chiaro del fondo.

Se l'oggetto osservato in contrasto di fase era assimilabile ad un reticolo di ampiezza, l'onda diretta e diffratta erano in opposizione di fase all'uscita dall'oggetto stesso, ma sono in quadratura all'uscita dell'anello di fase; l'immagine osservata ne risulta variamente alterata. Se invece l'oggetto si poteva ricondurre ad un reticolo di fase, l'onda diffratta da esso

prodotta era sfasata rispetto l'onda diretta, ma quest'ultima viene sfasata dalla stessa quantità ad opera dell'anello di fase, e quindi nell'immagine intermedia le due onde risultano in fase o in opposizione di fase e possono produrre gli stessi fenomeni di interferenza, e quindi gli stessi contrasti, che si hanno con i reticoli di ampiezza.

Va poi ribadito che lo sfasamento operato dall'anello di fase sull'onda diretta può essere in anticipo o in ritardo. Supponendo di osservare un oggetto ad indice di rifrazione più alto del mezzo circostante, l'onda diffratta giunge nel piano focale posteriore dell'obbiettivo in ritardo di fase su quella diretta.

1) Se l'onda diretta viene anticipata dall'anello di fase, le due onde escono dall'anello di fase in opposizione ( $-\lambda/4$  sull'onda diffratta e  $+\lambda/4$  sull'onda diretta porta ad uno sfasamento totale di  $\lambda/2$ ). Dunque le due onde che vanno a costituire l'immagine dell'oggetto si elidono parzialmente e l'oggetto apparirà scuro su fondo chiaro.

2) Se l'onda diretta è ritardata, essa si ritrova in fase con l'onda diffratta a livello dell'immagine intermedia. A questo punto le due onde si sommano e l'oggetto apparirà più chiaro del fondo.

Nel primo caso si parla di CONTRASTO POSITIVO, nel secondo di CONTRASTO NEGATIVO. Si noti che i termini “Positivo” e “Negativo” sono del tutto convenzionali, e si riferiscono comunque al comportamento dell'anello di fase dell'obbiettivo, non ai caratteri dell'immagine ottenuta. Questi ultimi sono legati anche alle caratteristiche dell'oggetto. Si è infatti supposto più sopra che l'oggetto provochi un ritardo nell'onda che l'attraversa; ma lo sfasamento operato dall'oggetto è proporzionale al suo “cammino ottico”, cioè al prodotto del suo spessore per il suo indice di rifrazione (più esattamente per la differenza fra il suo indice e quello del mezzo circostante). Se l'oggetto ha un indice inferiore a quello del mezzo, lo sfasamento da esso operato sull'onda diretta è in anticipo, e di solito molto lieve, e quindi l'onda diffratta, secondo la composizione dei vettori, sarà pure in anticipo. Come si vede, il comportamento del sistema si inverte e con esso il contrasto.

In ogni caso, come il calcolo e l'esperienza dimostrano, si ottiene il migliore contrasto facendo sì che i fenomeni di interferenza portino ad un'onda risultante assai piccola o assai grande, cioè facendo sì che le onde diretta e diffratta abbiano un'ampiezza assai simile; poiché l'onda diffratta è in genere assai debole, occorre attenuare l'onda diretta. Questo si ottiene, come si è detto, a livello dell'anello di fase, per mezzo di uno strato (generalmente metallico) semitrasparente. In conseguenza di ciò, la sorgente di luce deve essere più intensa che nelle osservazioni in campo chiaro (lampada a bassa tensione con collettore, per es.).

Altro problema: si è visto che nel contrasto di fase classico l'anello di fase provoca un parziale assorbimento ed uno sfasamento della luce che l'attraversa; tale assorbimento e sfasamento sono **quasi** indipendenti dalla lunghezza d'onda, e quindi quel metodo dà **quasi** gli stessi risultati, con qualunque colore di luce si operi. Ma qualcosa cambia col variare della lunghezza d'onda, in particolare lo sfasamento, sia per la “dispersione” dell'indice dell'anello di fase, sia perché lo sfasamento è dato dal rapporto fra cammino ottico e lunghezza d'onda: Le condizioni di contrasto sono quindi variabili all'interno dello spettro ottico e, in sostanza, si ottiene la sovrapposizione di infinite immagini leggermente diverse fra loro, corrispondenti a tutti i valori di  $\lambda$  presenti nella radiazione utilizzata. Ciò riduce il contrasto e compromette la definizione. È per questo motivo che molti costruttori forniscono nel corredo di fase un filtro verde: introducendolo nell'illuminatore, si fa lavorare il sistema per quella porzione dello spettro per cui l'occhio è più sensibile e per cui, quindi, il progettista ha calcolato il sistema.

Rimane il problema di come ottimizzare il sistema: come ottenere il contrasto più forte, come ridurre gli aloni (vedi sotto), come ridurre la perdita fotometrica (perdita di brillantezza dell'immagine), ecc. Su questa linea, ogni costruttore cerca qualche soluzione di miglior compromesso, ma si tratta sempre di scelte relative in quanto il risultato finale dipende ANCHE dalle caratteristiche dell'oggetto. Il costruttore cerca quindi di ottimizzare il sistema

(diametro dell'anello, sua larghezza, sua trasparenza, suo sfasamento, ecc.) in vista dell'oggetto che più probabilmente verrà osservato con i suoi strumenti. Il sistema ottico, in altre parole, viene progettato su misura di un certo oggetto.

Per rendere più flessibile questa tecnica, quindi, molti costruttori hanno proposto sistemi flessibili in cui è possibile variare qualche parametro al fine di adattarli al meglio alle caratteristiche dell'oggetto. Accenniamo ad alcuni di questi.

In sostanza: l'oggetto osservato può essere estremamente vario nelle sue caratteristiche fisiche, soprattutto indice e dimensioni, e lo sfasamento dell'onda diffratta non è necessariamente di  $\lambda/4$ ; può risultare quindi assai vantaggioso poter variare l'assorbimento e lo sfasamento dell'onda diretta operato dall'anello di fase per adattare il sistema ottico alle caratteristiche dell'oggetto ed ottenere, caso per caso, il migliore contrasto. Si potrà in altre parole cercare di riportare le due onde che confluiscono nell'immagine intermedia in condizioni di sfasamento nullo o  $\lambda/2$  esatti, e con ampiezza assai simile.

Ciò è stato tentato da varie case costruttrici in vari modi; un primo modo (Leitz, ecc.) consiste nel costruire, per ogni sistema obiettivo, differenti serie contenenti anelli di fase in grado di sfasare ed assorbire in varia misura la luce che li attraversa; il cambiamento di obiettivo permette di modificare le condizioni del sistema e cercare caso per caso la resa migliore. È possibile così, ad esempio, passare da un contrasto "positivo", come quello che si ha generalmente, ad uno "negativo", con chiari e scuri invertiti, oppure avere anelli di fase più trasparenti (minor contrasto, aloni più deboli, adatti ad oggetti grossi e/o molto rifrangenti) o meno trasparenti (contrasto forte, aloni più marcati, per aumentare la visibilità di oggetti piccoli)<sup>8</sup>. Questo metodo richiede però un grande numero di obiettivi; a parte le considerazioni economiche, ciò spesso impone di smontare un obiettivo per sostituirlo e comunque, anche facendo uso dei soli obiettivi montati a dimora sul revolver, l'osservazione in vivo può risultare difficile specie se si deve ritrovare un oggetto mobile dopo la rotazione del revolver.

Altra soluzione al problema di un contrasto di fase variabile è stata cercata da vari autori (4) (7) e realizzata da PZO, ad es., sfruttando taluni effetti della luce polarizzata; ma anche questa soluzione presenta una limitazione, in quanto rende complessa l'interpretazione delle immagini di oggetti birifrangenti, il che si presenta assai spesso, sia in biologia che in varie tecnologie industriali (amidi, cellulose, fibre, sostanze cristalline, ecc.). La realizzazione degli anelli di fase polarizzanti o birifrangenti è inoltre assai difficile, e spesso riesce impossibile inserire tali anelli negli obiettivi di forte ingrandimento.

Talune case tedesche (Zeiss Jena) hanno costruito obiettivi con doppio anello di fase (due anelli concentrici di diverso diametro e larghezza: sistema PhV); variando il diametro del diaframma d'apertura, si può illuminare uno solo o entrambi gli anelli e con ciò variare il contrasto. Si richiede per questo sistema un condensatore speciale con diaframmi anulari doppi.

Più utile è un dispositivo che viene inserito nel tubo del microscopio e permette di sostituire l'anello di fase senza sostituire l'obiettivo. Si richiede in questo caso una complicazione del sistema ottico, ed inoltre il comportamento dell'anello di fase si può variare per scatti, non in maniera continua. (Sistema "Contrast" della Zeiss Jena). Si usano in compenso con questa tecnica obiettivi normali e, oltre al contrasto di fase, è possibile realizzare con lo stesso sistema il campo scuro ed il contrasto interferenziale DIC.

Anche certi sistemi interferenziali, come l'"Interphako", sempre della Zeiss Jena, consentono con qualche accessorio in più di realizzare il contrasto di fase variabile ed invertibile, anche a colori (immagini colorate di un oggetto incolore).

Il sistema "Varicolor" (brevetto Wild, posto in commercio nel 1950) risolve nella maniera più razionale il problema del contrasto variabile; esso ottiene il risultato di variare lo sfasamento e l'assorbimento dell'onda diretta (e, fig. 1) a livello dell'anello di fase, dando a quest'ultimo, secondo gli studi di M. Locquin, la struttura di un filtro interferenziale.

---

<sup>8</sup> La trasmissione degli anelli di fase, a seconda delle scelte del costruttore, varia da 10 a 40 %.

Tale filtro è costituito da uno strato di materiale dielettrico trasparente posto fra due strati metallici sottili semi-riflettenti; il tutto supportato da una lastrina di vetro, plan-parallela. Esso applica il principio dell'interferometro di Pérot-Fabry: le riflessioni multiple che l'onda incidente subisce nello strato dielettrico, il cui spessore è dell'ordine della lunghezza d'onda della luce, portano a sfasamenti tali fra onde dirette e riflesse che, per una certa lunghezza d'onda, la luce attraversa di poco attenuata il filtro, mentre per tutte le altre viene riflessa indietro. Rispetto ad un filtro ad assorbimento, cioè a vetro colorato, il filtro interferenziale presenta il vantaggio di una banda assai più stretta e di un riscaldamento assai minore, poiché viene riflesso quasi tutto ciò che non viene trasmesso. Con un filtro di questo genere si possono ottenere coefficienti di trasmissione, per la lunghezza d'onda "passante", cioè di massima trasmissione, pari a 30-40% con un rapporto fra trasmissione massima e minima di oltre 300 ed una larghezza di banda passante "a metà altezza" di 8-20 nm (0,008 – 0,020  $\mu$ ).

Inoltre, il filtro interferenziale provoca nella luce trasmessa uno sfasamento che va da  $+\lambda/4$  per lunghezze d'onda minori di quella passante a  $-\lambda/4$  per lunghezze d'onda maggiori, con un passaggio graduale nell'intorno della lunghezza d'onda di massima trasmissione. Questo fenomeno permette di usare l'anello di fase degli obiettivi Varicolor in contrasto positivo per lunghezze d'onda basse ed in contrasto negativo per lunghezze d'onda elevate.

Usando un semplice dispositivo nel sistema illuminante, è possibile variare la lunghezza d'onda della sorgente e quindi variare entro ampi limiti le condizioni di contrasto. Con un filtro "didimo" (una larga banda di assorbimento nella regione del verde) si ottiene un bel contrasto colorato.

Anche questo sistema aveva qualche limite (i filtri interferenziali col tempo si alterano) ed anch'esso, come quasi tutti quelli nominati, è uscito dalla produzione da molti anni.

Questa lunga premessa ci consente ora di affrontare il tema degli aloni, l'inconveniente più forte del contrasto di fase.

In concreto, un tentativo di ridurre l'intensità degli aloni è stato effettuato dalla casa Reichert di Vienna dietro gli studi di A. Wilska (sistema "Anoptal") per mezzo di anelli di fase diffondenti, ma su questo non ci soffermiamo per gli scarsi vantaggi concreti.

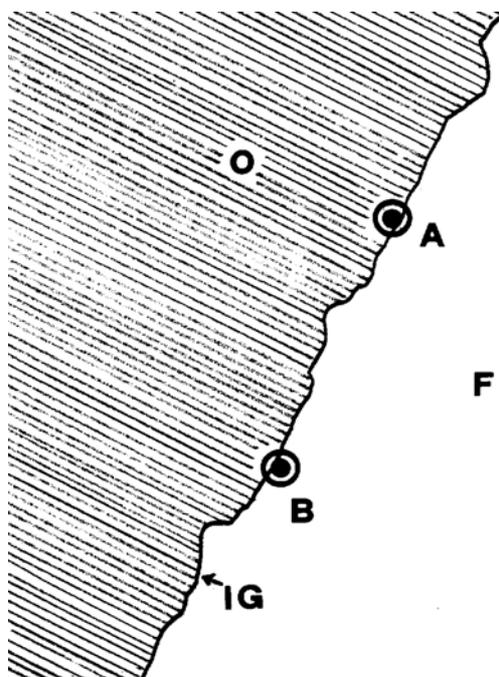


Fig. 3 – Schema per spiegare la formazione degli aloni

Parliamo per semplicità soltanto del contrasto di fase "positivo", nel quale un oggetto di

fase (piccolo, altrimenti si verifica l'inversione del contrasto!) più rifrangente del mezzo circostante appare più scuro di esso. Nel caso del contrasto di fase negativo, il discorso che faremo si applica ancora, invertendo i segni degli sfasamenti e del contrasto.

Nel contrasto di fase positivo sappiamo che l'immagine dell'oggetto (più rifrangente del mezzo) nasce da interferenza negativa e quindi da diminuzione di intensità, per sovrapposizione dell'onda diffratta dall'oggetto (che è ritardata di circa  $90^\circ$  per oggetti piccoli) con l'onda "diretta", indisturbata, costituente il fascio illuminante (che viene anticipata di  $90^\circ$  quando attraversa l'anello di fase). E' questo anticipo di fase dell'onda diretta che la mette in opposizione di fase con l'onda diffratta, recante l'informazione sulla struttura dell'oggetto; ed è questa opposizione di fase che riduce (o annulla) l'intensità nell'immagine dell'oggetto.

Ma qui dobbiamo considerare la struttura dell'immagine di diffrazione (centrica) creata dall'obbiettivo per ogni punto a fuoco dell'oggetto, supponiamo in assenza di aberrazioni. È bene riferirsi alla figura 3, qui sopra.

Sappiamo che in tale centrica vi è un disco centrale ("disco di Airy") contenente circa l'84 % dell'energia totale della centrica<sup>9</sup>; dopo un anello scuro che circonda il disco, vi è un anello chiaro di diametro circa doppio del disco di Airy, contenente il 7,1 % dell'energia. Segue un secondo anello chiaro col 2,8 % dell'energia e poi altri che possiamo trascurare per la loro intensità decrescente.

Ebbene, il  $2^\circ, 4^\circ, 6^\circ$  ecc. anello è costituito da un'onda che ha la stessa fase del disco di Airy, mentre il  $1^\circ, 3^\circ, 5^\circ$  ecc. anello ha fase opposta ed il primo non può essere trascurato dal punto di vista dell'intensità.

Dunque, quella opposizione di fase descritta sopra, che è l'essenza del contrasto di fase e che rende più scura l'immagine dell'oggetto, vale per il disco di Airy, mentre per il  $1^\circ, 3^\circ, 5^\circ$  ecc. anello si ha concordanza di fase e quindi aumento di intensità.

In altre parole, per ogni punto di un oggetto osservato in contrasto di fase si ha una centrica GLOBALMENTE più scura (poiché è indebolito il disco di Airy) ma circondata da un anello più chiaro di quanto si avrebbe senza contrasto di fase. L'attenuazione del disco prevale sull'intensificazione del primo anello (abbiamo visto che il disco contiene la maggior parte dell'energia della centrica) per cui, all'interno di un oggetto esteso, la brillantezza è minore.

Abbiamo dunque questa situazione, nell'osservazione di un oggetto di fase esteso in contrasto di fase positivo: all'interno dell'immagine dell'oggetto si ha una luminosità minore per via dell'attenuazione del disco di Airy corrispondente ad ogni punto dell'oggetto; l'intensificazione del primo anello contrasta solo in parte quella attenuazione. Fuori dell'immagine dell'oggetto non perviene la radiazione diffratta dall'oggetto, quindi non vi è nessuna opposizione di fase né alcuna attenuazione di intensità, a parte la generale attenuazione dell'onda diretta, operata dal potere assorbente dell'anello di fase, che vale anche all'interno dell'immagine dell'oggetto.

Ma ora consideriamo l'orlo dell'immagine di un oggetto di fase esteso ( O in figura ) osservato in contrasto di fase e che appare più scuro del fondo ( F ) supponendo che esso sia più rifrangente del mezzo che lo circonda.

In O, per le ragioni sopra dette, l'intensità è minore che in F.

Ma consideriamo i punti dell'ogg ( A per es. ) nella cui immagine il disco di Airy è tangente (da dentro) all'orlo dell'immagine geometrica dell'oggetto complessivo (IG in figura). Consideriamo anche quei punti del fondo ( B per es. ) la cui immagine si trova subito fuori di O, in modo che il loro disco di Airy sia ancora tangente ad IG, ma dall'esterno.

Ebbene, consideriamo quella regione di O (immagine dell'oggetto) che sta subito all'interno di IG, e che corre lungo IG come un orlo interno; la larghezza di questo orlo sia pari alla larghezza (non al diametro) del primo anello dei punti come B. Ricordiamo che tale larghezza dipende dalla struttura dell'obbiettivo e quindi è la stessa per i punti come A, ed

---

<sup>9</sup> In realtà, in un obbiettivo a contrasto di fase, per la presenza dell'anello di fase, questa percentuale è minore e, per gli anelli attorno al disco di Airy, maggiore.

inoltre è circa pari al raggio dei dischi di Airy.

Ora, questo orlo interno ad IG è formato essenzialmente dai dischi di Airy dei punti come A, che sono attenuati per via del contrasto di fase, più i primi anelli dei punti come B, che non sono esaltati poiché per essi non si verifica il contrasto di fase.

Questo orlo interno ad IG è più scuro delle altre regioni di O poiché, in queste ultime, ai dischi di Airy attenuati si sovrappongono i primi anelli di ogni punto, che sono intensificati per le ragioni sopra viste.

In altre parole, l'immagine dell'oggetto in queste condizioni termina con un orlo scuro.

Ma ora consideriamo un orlo esterno ad IG, della stessa larghezza.

Esso è formato sostanzialmente dai dischi centrali dei punti come B, non attenuati dal contrasto di fase, più i primi anelli dei punti come A, che sono esaltati per quanto detto sopra.

Questo orlo esterno ad IG appare più luminoso del fondo F poiché, in tutte le altre regioni di F, gli anelli non sono esaltati non esistendo ivi un contrasto di fase.

Questo orlo più chiaro (accompagnato dall'orlo scuro all'interno di IG) che circonda l'immagine di tutti gli oggetti in contrasto di fase è il famoso "alone", l'inconveniente maggiore del contrasto di fase.

Esso è dannoso poiché un oggetto che risulti così piccolo da dare un'immagine geometrica di dimensioni analoghe alla centrica, e la cui immagine cada all'interno dell'alone, può risultare invisibile perché nascosto da quest'ultimo.

La larghezza dell'alone dipende dunque dalla forma e dalle dimensioni della centrica e quindi dalle caratteristiche dell'obbiettivo e dell'anello di fase. Si comprende quindi come i costruttori cerchino di minimizzare l'alone modificando quelle caratteristiche.

Si ricordi però che una riduzione dell'alone si accompagna in genere ad una diminuzione del contrasto, quindi ad una minor sensibilità del metodo nel rivelare la presenza di oggetti debolmente rifrangenti e/o molto piccoli.

Si ricordi anche quanto detto sopra: indipendentemente dal gioco degli sfasamenti, la presenza dell'anello di fase nella pupilla dell'obbiettivo modifica comunque la struttura della centrica, nel senso di rendere più piccolo e meno intenso il disco di Airy (possibile aumento di risoluzione!), ma esaltando l'intensità degli anelli.

Questo fatto però non rientra nel discorso sulle cause dell'alone fatto finora poiché interessa sia i punti dell'oggetto che quelli del fondo.

Il fenomeno degli aloni è il motivo per cui molti utilizzatori scelgono, come tecnica di contrasto, il contrasto interferenziale (vedi bibliografia). Quest'ultima tecnica però si può realizzare in molti modi diversi. Gli strumenti più completi consentono, oltre all'accentuazione del contrasto, misure di cammino ottico sull'oggetto, e quindi, indirettamente, di spessore, di indice di rifrazione, di concentrazione (nel caso di soluzioni), ecc. Ma tali strumenti sono quasi tutti usciti dal commercio per l'alto costo, la complessità e l'instabilità delle regolazioni. In grande maggioranza, i sistemi interferenziali attuali si riducono al sistema DIC ("Differential Interference Contrast") ideato da G. Nomarski (1951) in Francia. Il DIC fornisce gradevoli immagini, anche colorate, con un'apparenza di rilievo, ma ha qualche limite:

il sistema è di uso abbastanza semplice, ma è costoso;

viene utilizzata la radiazione polarizzata, con le solite complicazioni quando si osservano oggetti birifrangenti;

l'apparenza di rilievo nelle immagini non è dovuta alla forma dell'oggetto ma alle sue variazioni di cammino ottico (vedi nota 1). Pertanto, l'interpretazione delle immagini del DIC non è semplice.

## BIBLIOGRAFIA

- K. ANTENEN, *Variabler Phasenkontrast mit Farben* (« Wild-Varicolor »), Schweizer Brauerei-Rundschau, Nr. 4 (1956).
- K. ANTENEN, *Vom klassischen zum variablen Phasenkontrast*, « Mikroskopie », Band 11, Sept. 1956, S. 129-135.
- A. H. BENNET, H. JUPNIK, H. OSTERBERG e O.W. RICHARDS - *Phase microscopy. Principles and applications*. (1951) (testo esauriente con ricca bibliografia sul contr. di fase in generale). New York, John Wiley & Sons. London, Chapman & Hall Ltd.
- H. BEYER e H. RIESENBERG - *Handbuch der Mikroskopie* - Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 . 455 pagg. Uno dei testi più rigorosi e completi nel campo della microscopia ottica.
- C. DUFOUR und M. LOCQUIN, *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*, 232 (1951): 2087.
- M. FRANCON, *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*, Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 1954.
- M. LOQUIN und M. BESSIS, *Revue d'optique*, 1952, 237.
- G. P. SINI, *Il contrasto di fase interferenziale "Wild Varicolor"*, Atti della Fondazione G. Ronchi, Firenze, XX, 4, Luglio - Agosto 1965, pagg. 374-393.
- G.P. SINI - *Microscopia interferenziale* - Fondazione "Giorgio Ronchi", XI; Baccini & Chiappi, Firenze, 1968. 87 pagg.
- J.P. VIRET, *Du contraste de phase normal au supercontraste de phase*. Rapporto interno della casa WILD HEERBRUGG, Heerbrugg, St. Gallen, Svizzera, IX. 59 Vi/lw.