

## CONCETTI INTRODUTTIVI ALLA

# MICROSCOPIA OTTICA

(Riferimenti alle schede n° 6, 12, 13 e 18)

### 1 – RISOLUZIONE e PERCEZIONE nell'OSSERVAZIONE degli OGGETTI

Nella nostra esperienza quotidiana, abbiamo a che fare con oggetti che possiamo esplorare con i nostri sensi, specialmente il tatto e la vista, per trarne "informazioni" (forma, dimensioni, colore, struttura interna, ecc.). Se gli oggetti sono troppo lontani e ci appaiono troppo piccoli, possiamo averne un'immagine ingrandita o "ravvicinata" con appositi strumenti ottici, come se ci fossero più vicini; si tratta di strumenti assai diversi quanto a prestazioni, ma basati sullo stesso principio: cannocchiale, telescopio, binocolo, ecc.

Questo mondo di oggetti direttamente percepibili con i nostri sensi può essere chiamato "macroscopico" (dal greco "macros" = lungo, grande, e "scopeo" = vedere).

Se indaghiamo per capire quale è l'oggetto più piccolo che possiamo percepire, cioè qual'è il limite inferiore del "mondo macroscopico", dobbiamo subito distinguere due problemi:

1) Quali dimensioni minime deve possedere un oggetto per essere percepito dai nostri sensi? (limite o soglia di percezione).

2) Quale è la distanza minima fra due "punti" perché noi possiamo distinguerli, cioè vederli separati, risolti? (limite o soglia di risoluzione).

• In questa indagine dobbiamo precisare alcune convenzioni, che schematizzano le condizioni di osservazione al fine di ottenere risultati semplici e riproducibili:

– per "punto" si intende un oggetto così piccolo che, se fosse più piccolo, l'occhio "medio" non vedrebbe alcuna differenza;

– si suppone che le osservazioni siano compiute da una persona dotata di un "occhio medio" (le cui prestazioni corrispondono alla media di quelle delle persone con occhi sani);

– si suppone che la luminosità dell'oggetto sia adeguata alla sensibilità dell'occhio "medio" e che il suo contrasto sia eguale ad 1 (oggetto luminoso su fondo nero oppure oggetto nero su fondo luminoso);

– l'osservazione va compiuta ad una distanza fissa "convenzionale", pari a 250 mm;

– gli oggetti osservati sono sottili (senza spessore), piani, disposti su un piano ("piano oggetto"), che è perpendicolare all' "asse visuale" (retta che congiunge il nostro occhio col centro dell'oggetto). •

Ebbene, si scoprirà che la soglia di risoluzione è assai maggiore di quella di percezione: due punti appaiono distinti (risolti) nelle condizioni sopra elencate quando distano fra loro almeno un decimo di millimetro o poco meno: 80-100  $\mu$  o millesimi di millimetro<sup>1</sup>, mentre si può percepire un oggetto nero su fondo bianco con un diametro di circa un quarto ( 25  $\mu$  ) ed una linea nera con una larghezza di meno di un ventesimo ( 4  $\mu$  = 1 mm diviso 250). Ciò significa che un oggetto così piccolo può essere percepito, ma non si può "risolvere" la sua struttura, cioè non si può sapere se è fatto di punti o linee più piccoli raggruppati.

Ogni strumento ottico destinato all'osservazione degli oggetti (compreso l'occhio), cerca quindi non solo di farci percepire la presenza di un oggetto, ma di mostrarci la sua struttura, cioè di offrircene un'immagine contenente dettagli più fini possibile.

Indicazioni didattiche: si può verificare il limite di risoluzione e di percezione con osservazioni al microscopio di oggetti opportuni (frustoli di Diatomee, scaglie di Lepidotteri, ecc.) o con diapositive. Più semplice è osservare ad occhio nudo una fotografia su un qualunque giornale: sembra costituita da sfumature continue; ma basta una normale lente d'ingrandimento per mostrare la "retinatura" che ha decomposto la figura in punti così piccoli da non essere visti in condizioni normali. La retinatura viene tenuta appena sotto alla soglia di risoluzione dell'occhio "medio".

• La "risoluzione" diviene allora:  $R = 1/d$  in cui  $d$  è la distanza minima di due punti che si possono ancora percepire come distinti: il potere risolutivo è tanto maggiore quanto più piccola è quella distanza minima. Il potere risolutivo dell'occhio umano è già stato definito ( $R = 1/80 \mu$ ). Per il microscopio ottico, esso è legato all' "apertura" dell'obbiettivo, cioè all'ampiezza del cono di "raggi" che provengono da un punto dell'oggetto e che possono venir utilizzati dall'obbiettivo stesso, nonché da altri fattori. In pratica, il potere risolutivo del microscopio ottico con gli obbiettivi della massima apertura, non supera:  $R = 1/0,2 \mu$ , il che corrisponde a 000'5 linee/mm nel piano dell'oggetto. •

<sup>1</sup> Il millesimo di mm ( 0,001 mm =  $10^{-3}$  mm ) è chiamato "micrometro" (  $\mu$ m ) o semplicemente "micron" (  $\mu$  ); il segno  $\mu$  è la lettera greca "m" minuscola (mi o mu).

Ora occupiamoci della **struttura** degli oggetti.

Ogni oggetto può venir studiato a vari livelli di risoluzione. Tralasciando la struttura interna dell'atomo, ogni oggetto è costituito da "atomi" o da gruppi di atomi ("molecole") legati fra loro da forze chimiche. Il diametro dell'atomo è intorno a un decimo di milionesimo di mm.

- Si dice che tale diametro è dell'ordine di  $10^{-7}$  mm, ma si ricordi che l'atomo non è una piccola pallina solida, ma una "nube" di particelle assai più piccole e poco conosciute, gli elettroni, che ruotano attorno ad un nucleo centrale più grande e pesante; tali particelle sono circa  $10^4$  volte più piccole dell'atomo, il quale quindi appare come uno spazio quasi vuoto nel quale orbitano gli elettroni. •

Ebbene, gli atomi sono troppo piccoli per essere visti col microscopio ottico od elettronico. Nel mondo delle sostanze organiche però vi sono molecole, comprendenti fino a decine di migliaia di atomi, che talvolta sono visibili al microscopio elettronico o eccezionalmente al microscopio ottico.

Possiamo a questo punto distinguere gli oggetti in due grandi categorie:

Oggetti senza struttura microscopica: al di sotto della struttura macroscopica, l'oggetto è omogeneo, senza struttura, finché non si arriva al livello di atomi o molecole. Es.: il vetro, i minerali, le materie plastiche, i liquidi, i gas.

Oggetti con struttura microscopica: nei limiti del microscopio ottico (risoluzione da  $100\ \mu$  a  $0,2\ \mu$ ), o comunque ad un livello superiore a quello atomico, sono visibili strutture che sfuggono completamente ai nostri sensi. Es.: quasi tutti i materiali organici, molte rocce, molte polveri, molte leghe metalliche, molti prodotti industriali.

In particolare, i materiali organici, cioè gli esseri viventi o loro parti, mostrano anche dopo la morte una struttura molto complessa, anche a più livelli, come quella dei tessuti che risultano composti da cellule di vario tipo, ogni cellula con molti "organelli", ognuno di questi più o meno complesso, ecc. Ogni essere vivente è come una scatola cinese: via via che aumenta il potere risolutivo dell'osservatore o del suo strumento, si scoprono livelli di strutture sempre più fini, e l'osservazione produce livelli di informazione sempre più allargati.

Si possono illustrare questi concetti con serie di diapositive od osservazioni dirette dello stesso oggetto riprese a diverso ingrandimento: sezioni istologiche colorate, elitre di Cicindela, vari Licheni, foglie di Muschi, scaglie di farfalle, ecc.

## 2 – LALENTE D'INGRANDIMENTO

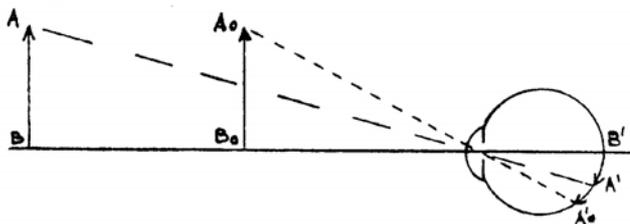
- In molti schemi ottici, si traccia una retta orizzontale che collega il centro dell'oggetto col centro della lente, detta "asse ottico". A sinistra si pone l'oggetto (o la sorgente di radiazione); a destra l'immagine. Per semplicità, si schematizza spesso una sola metà dell'oggetto; poiché l'oggetto si suppone piano, nello schema l'oggetto appare in sezione, come un segmento (il piano oggetto è perpendicolare all'asse). Così, nella figura 1,  $B - B'$  è l'asse ottico;  $AB$  è un segmento nella metà superiore del piano oggetto;  $A'B'$  è l'immagine di questo segmento, creata dal sistema ottico dell'occhio, che si forma sulla superficie interna di esso, dove si trova uno strato di cellule nervose sensibili, detto "rètina". •

Quando osserviamo un oggetto ad occhio nudo, come la freccia  $AB$  nella figura 1, sul fondo dell'occhio, sulla rètina, si forma un'immagine impiccolita dell'oggetto ( $A'B'$ ) ad opera delle "lenti" dell'occhio. Se avviciniamo l'oggetto all'occhio ( $A_0B_0$ ), l'immagine di esso risulta più grande ( $A'_0B'_0$ ); quando osserviamo un oggetto piccolo, istintivamente facciamo proprio questo, affinché esso ci appaia più grande.

L'occhio è dotato di un sistema ottico a focale variabile, paragonabile in parte ad un obiettivo fotografico di tipo "zoom", per cui, entro certi limiti, l'immagine in esso si forma sempre sulla rètina, cioè appare sempre nitida, "a fuoco". Se avviciniamo troppo l'oggetto, questo meccanismo automatico dell'occhio, chiamato "accomodazione", non basta più. A questo punto, per avvicinare ulteriormente l'oggetto, occorre aiutare l'occhio fornendo un'aggiunta al potere convergente (o "potenza") del suo sistema ottico; ciò si fa interponendo fra oggetto ed occhio una lente convergente o "lente d'ingrandimento".

Aumentando la potenza della lente d'ingrandimento, si potrebbero osservare oggetti piccoli quanto si vuole, semplicemente avvicinando sempre più l'oggetto all'occhio. Ma questo rende scomoda l'osservazione. Inoltre, per aumentare la potenza di una lente, occorre aumentare la curvatura delle sue facce, e questo significa diminuirne il raggio e quindi il diametro. Una lente forte e piccola comporta così una riduzione delle dimensioni osservabili dell'oggetto ("campo oggetto"). In conclusione, una lente d'ingrandimento è utilizzabile in pratica solo fino a 20 ingrandimenti circa anche se, talvolta, si è andati molto più in là.

Fig. 1



Si possono confrontare lenti di differente potenza, notando la relazione esistente fra potenza, curvatura, diametro e lunghezza focale. Si possono eseguire misure di focale creando l'immagine di un oggetto a notevole distanza, come il sole o una finestra.

Oltre questo limite, si ricorre al "microscopio composto", cosiddetto perché è costituito da almeno due sistemi distinti di lenti, mentre la lente d'ingrandimento ("microscopio semplice") è costituita da un solo sistema e spesso da una lente semplice.

### 3 – IL MICROSCOPIO COMPOSTO

Negli strumenti reali, si trovano spesso sistemi di lenti o accessori di ogni tipo, ma i sistemi essenziali sono due: l'obbiettivo e l'oculare. Si suppone che l'oggetto sia convenientemente illuminato, e per questo esistono numerosi dispositivi che tengono conto della natura dell'oggetto e dei risultati che si vogliono ottenere.

L' **obbiettivo** è una lente convergente di forte potenza che può sembrare simile ad una forte lente d'ingrandimento, ma opera con un principio diverso, paragonabile a quello di un obbiettivo da proiettore. Infatti, l'immagine prodotta da una lente d'ingrandimento è destinata a venir raccolta dall'occhio, mentre quella dell'obbiettivo deve essere "proiettata" su uno schermo.

Si possono eseguire alcune prove proiettando su una parete il filamento di una lampadina elettrica con una lente convergente dotata di ingrandimento proprio di circa  $2,5 \times$ , (circa 100 mm di focale, pari a 10 diottrie).

• A questo punto, si potrebbe dire che anche la lente d'ingrandimento produce un'immagine, ma questa è formata da raggi paralleli o divergenti per cui essa non si può raccogliere su uno schermo; essa può solo essere ricevuta dall'occhio che si avvale dei propri mezzi rifrangenti per rendere convergenti i raggi divergenti forniti dalla lente d'ingrandimento. Questo tipo d'immagine, proprio perché non converge in un piano, è detta "**virtuale**". Se invece un sistema ottico fornisce un fascio convergente (un fascio per ogni punto dell'oggetto), esso produce un'immagine in un piano definito, nel senso che su quel piano si forma un'immagine "a fuoco" dell'oggetto. È quanto avviene in un proiettore per diapositive o cinematografico. Tale immagine è detta "**reale**". •

In un microscopio, l'obbiettivo fornisce un'immagine reale dell'oggetto, che è racchiuso nel "vetrino" o qualcosa di simile; tale immagine, detta "immagine intermedia", si forma in un piano interno allo strumento; qui non si trova uno schermo, ma lo si potrebbe mettere, e si vedrebbe che l'immagine è ingrandita e rovesciata rispetto l'oggetto: tutti sanno che in un proiettore la diapositiva deve essere rovesciata per avere sullo schermo un'immagine diritta.

Si possono mostrare questi fenomeni con un microscopio munito di un obbiettivo 10:1 o 20:1 e focalizzando su un reticolo di passo circa 0,1 mm, o su un micrometro o qualcosa di simile. L'immagine intermedia si potrà raccogliere su un vetro smerigliato posto sull'estremità superiore del tubo, dopo tolto l'oculare; si potrà notare che un movimento dell'oggetto provoca uno spostamento in senso opposto della sua immagine.

Subito dopo questa "immagine intermedia", vi è un altro sistema convergente detto **oculare**, all'estremità superiore del "tubo" del microscopio. L'oculare "vede" l'immagine intermedia come se fosse un oggetto, e ce ne mostra un'immagine (virtuale) ulteriormente ingrandita: si comporta come una lente d'ingrandimento<sup>1</sup>. Dunque, l'ingrandimento totale del microscopio è dato dal prodotto di due ingrandimenti: quello dell'obbiettivo e quello dell'oculare.

Con opportuni schemi ottici, si spiega la formazione delle immagini reali e virtuali, il concetto di ingrandimento e di lunghezza focale, il calcolo dell'ingrandimento per l'obbiettivo, l'oculare ed il microscopio. Si possono anche eseguire misure di queste grandezze con "micrometri" ed altri accessori.

### 4 – L'INGRANDIMENTO "UTILE"

Oltre ad ingrandire di più, il microscopio composto supera tutte le limitazioni della lente d'ingrandimento: la distanza di osservazione (distanza occhio-oggetto) è comoda, una ventina di centimetri; il "campo" visuale è grande, ecc. Ma non si creda che il microscopio consenta ingrandimenti elevati quanto si vuole: tutto dipende dalla risoluzione. Per es., immaginiamo una pagina stampata con caratteri più o meno piccoli, ad una distanza tale che non riusciamo a distinguere (cioè a risolvere) i singoli caratteri. Con un binocolo, supponiamo di riuscire a leggere bene la pagina: quello strumento ha una risoluzione sufficiente. Supponiamo ora di ridurre l'ingrandimento del binocolo fino al punto che i caratteri si distinguono ancora. Quell'ingrandimento è

<sup>1</sup> In realtà qualche differenza c'è, e sta nella posizione della "pupilla" della lente.

sufficiente, e si chiama "ingrandimento utile". Se l'ingrandimento dello strumento è superiore a quello "utile", in linea di principio è eccessivo o "a vuoto", nel senso che la struttura dell'oggetto (i singoli caratteri) è già visibile con l'ingrandimento "utile" senza bisogno di andare oltre.

Supponiamo ora che le scritte sul foglio stampato non siano visibili nel binocolo, o perché i caratteri sono confusi, o perché il binocolo è di cattiva qualità e l'immagine poco nitida. Allora possiamo dire che lo strumento non ha sufficiente risoluzione (per quell'oggetto e per quella distanza d'osservazione); l'ingrandimento può essere grande quanto si vuole, ma la struttura dell'oggetto non è "risolta", non è visibile.

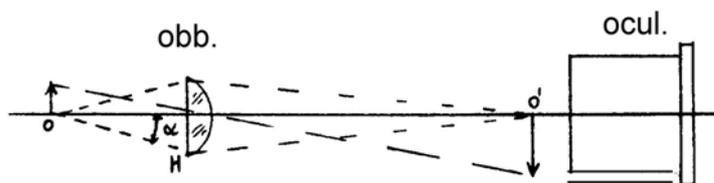
Ecco dunque che l'ingrandimento di uno strumento ottico ha poca importanza, purché sia superiore a quello "utile"; quello che conta è la risoluzione.

Così avviene in un microscopio.

La risoluzione di un microscopio dipende da molti fattori, fra cui il contrasto dell'oggetto, le condizioni di illuminazione, ecc. Ma, supponendo di aver ottimizzato tutti questi fattori legati all'oggetto, rimangono due fattori predominanti legati allo strumento: l'apertura dell'obiettivo e la "definizione".

Si può verificare tutto ciò al microscopio osservando oggetti opportuni (per es. frustoli di Diatomee) con obiettivi di diversa apertura, variando l'apertura del condensatore, e forzando poi l'ingrandimento dell'immagine finale con oculari di forte potenza.

Fig. 2



• Nella fig. 2 è schematizzato un obiettivo da microscopio (obb) ed il relativo oculare (ocul). O – O' è l'asse ottico; O è il punto centrale dell'oggetto, che giace sull'asse; O' è la sua immagine. Il segno "α" (alfa = lettera greca "a") indica l'ampiezza dell'angolo compreso fra l'asse ottico ed il raggio estremo OH ("estremo" poiché è il più inclinato che l'obiettivo possa accogliere). L'angolo α è l'"apertura angolare" (massima) dell'obiettivo; si usa in microscopia una funzione trigonometrica di α e cioè l'"**apertura numerica**"  $NA = \sin \alpha$ ; la risoluzione dell'obiettivo cresce al crescere di α o di NA; per l'esattezza, la distanza minima risolta è  $d = 0,6 \lambda / NA$  in cui λ (lambda, lettera greca "l") è la lunghezza d'onda della luce (circa 0,5 μ a metà dello spettro ottico).

La NA di un obiettivo da microscopio può andare da 0,05 ad 1,4. Conoscendo NA, che è sempre dichiarata dal costruttore, si calcolano anche i limiti di percezione (per un oggetto circolare:  $D = 0,12 \lambda / NA$ ; per una linea:  $L = 0,01 \lambda / NA$ ), nonché l'ingrandimento utile (circa 800 NA).

Per "**definizione**" si intende la nitidezza dell'immagine, cioè il passaggio più o meno netto fra zone chiare e scure, la presenza o mancanza di aloni o sfumature, ecc. Una cattiva definizione può ridurre fortemente la risoluzione, anche se l'apertura è elevata.

La definizione dipende dall'abilità del progettista, che deve minimizzare certi fenomeni ottici detti "aberrazioni", e del costruttore, che deve curare la qualità dei vetri ottici, la lavorazione delle lenti, ecc.

Ecco dunque che è inutile valutare la qualità di uno strumento in base all'ingrandimento: quello che conta è la risoluzione, che dipende da un fattore normalmente inciso sugli obiettivi (l'apertura numerica) e dalla bontà del progetto e della costruzione (definizione). Purtroppo, per valutare la definizione occorre molta esperienza e molte conoscenze di ottica.

Esistono in commercio microscopi economici che promettono ingrandimenti elevati, ma con risoluzione così bassa da far rimpiangere gli ingrandimenti minori. Si ricordi che l'ingrandimento utile del microscopio ottico, con gli obiettivi speciali detti "ad immersione" (HI), non supera mai  $1'200 \times$ . E, del resto, molto dipende dal sistema illuminante, che è rudimentale o assente in molti strumenti economici.

## 5 – IL MICROSCOPIO STEREOSCOPICO

Molto lavoro su piante inferiori, fiori, insetti, micro-fossili, cristalli, ecc. può essere svolto ad ingrandimento modesto, anche con una lente d'ingrandimento, ma è assai più pratico un microscopio "stereoscopico", e qui conviene scendere in qualche dettaglio.

Un microscopio "normale", cioè munito di un solo obiettivo, tende a fornire la massima risoluzione per consentire i più alti ingrandimenti; e questo è necessario in molti campi della biologia e della medicina. Ma la

massima risoluzione si ottiene solo a prezzo della massima apertura dell'obiettivo. Questo porta alla maggior luminosità possibile dell'immagine, ma abbassa in proporzione la profondità di fuoco e la distanza di lavoro (distanza fra obiettivo ed oggetto).

• Per es., un obiettivo del tipo più comune ("a secco") può avere una risoluzione massima di  $0,35 \mu$ , pari a circa 2.850 linee/mm nel piano oggetto, il che consente un ingrandimento "utile" fino a  $1'000 \times$  al massimo, ma con una profondità di fuoco inferiore a  $0,5 \mu$  ed una distanza di lavoro di circa 0,2 mm, il che è chiaramente molto critico. •

In queste condizioni, l'oggetto deve essere liscio come uno specchio o, se è trasparente, molto sottile. Questo comporta che, tranne rari casi (sospensioni liquide di cellule, microrganismi o particelle, che si possono stendere in strati sottili, ecc.), l'oggetto va tagliato o sezionato in fette sottili in modo da presentare superfici ben piane. Spesso occorre anche una colorazione ed altri trattamenti. Si deve poi confezionare un "preparato" o "vetrino", racchiudendo l'oggetto fra lamelle di vetro di spessore normalizzato (1 mm e 0,17 mm, rispettivamente dal lato inferiore e superiore: vetrino "porta-oggetti" e "copri"oggetti").

Questi microscopi per uso biologico inoltre richiedono una lampada speciale ed una presa di corrente. L'immagine da essi fornita è rovesciata. Anche se vi sono diversi obiettivi montati su una calotta girevole (detta "revolver"), l'obiettivo utilizzato di volta in volta è unico, ed anche quando gli oculari sono due (microscopi "bi-oculari") le due immagini presentate ai due occhi sono identiche. **Non è quindi possibile la percezione del rilievo.**

Ma la maggioranza degli oggetti naturali non richiede un'osservazione a forte ingrandimento e non è sempre possibile applicare raffinate tecniche di preparazione. L'ideale sarebbe uno strumento che permettesse di osservare oggetti anche di grandi dimensioni e di forma irregolare, senza preparazioni particolari, maneggiandoli con le mani, come si può fare durante una gita.

Ciò presuppone:

- percezione del rilievo ("stereoscopia", dal greco "stereon" = solido, a tre dimensioni).
- immagine diritta;
- distanza di lavoro di parecchi cm;
- profondità di fuoco di qualche mm;
- immagine abbastanza luminosa da permettere l'osservazione con luce ambiente.

Proprio per soddisfare queste esigenze, da oltre un secolo esistono i "microscopi stereoscopici" o "binoculari" (non confondere con "bi-oculari", come detto sopra).

Il termine "binoculare" allude al fatto che vi sono due sistemi ottici identici ed indipendenti, quindi due obiettivi, come in un binocolo: le due immagini presentate ai due oculari sono diverse, poiché i due obiettivi guardano l'oggetto da due punti di vista diversi, con i due assi ottici inclinati fra loro di circa  $15^\circ$ <sup>1</sup>, e **si rende così possibile la visione del rilievo.**

Le condizioni sopra elencate possono essere soddisfatte e la praticità dello strumento è sorprendente.

Ma questo a prezzo di una riduzione dell'apertura e dell'ingrandimento totale: generalmente non superiore a  $100 \times$ .

Questi strumenti stereoscopici non costano molto meno di quelli normali poiché, in base a quanto si è detto, il sistema ottico deve essere doppio e deve includere due sistemi di prismi per raddrizzare le due immagini.

Con questi strumenti, le operazioni di messa a punto sono solo due: 1) la regolazione della distanza fra gli oculari: come in ogni binocolo, i due corpi porta-oculari sono incernierati fra loro per adattare la distanza fra gli oculari alla distanza inter-pupillare dell'osservatore e la visione deve avvenire con entrambi gli occhi senza muovere la testa. 2) la messa a fuoco, con una delle manopole poste ai due lati. Quest'ultima operazione diviene superflua se l'oggetto, invece di essere poggiato sulla base dello strumento, viene tenuto in mano: mentre lo si orienta, si può facilmente "tenerlo a fuoco".

Anche con modesti ingrandimenti ( $10$  o  $20 \times$ ), si allarga il campo delle osservazioni naturalistiche in modo imprevedibile; sotto uno strumento stereoscopico si può infilare qualunque cosa, anche un pizzico di terriccio, e la varietà delle forme viventi che possono apparire è incredibile.

La manipolazione dell'oggetto direttamente con le mani e l'immagine diritta permettono l'osservazione anche alle persone più sprovviste. La distanza di lavoro di molti centimetri rende possibile pure l'osservazione all'interno di oggetti cavi, come le corolle dei fiori.

La sola precauzione da prendere è evitare di sforzare l'occhio, cioè di "accomodarlo" come quando si osserva da vicino: l'occhio deve rimanere rilassato, come se guardasse un panorama lontano. Chi si stanca o prova mal di testa al microscopio ha inconsciamente accomodato l'occhio, cioè sforza inutilmente il muscolo ciliare; per evitare questa sterile fatica, il microscopio è sempre progettato per fornire immagini "virtuali" poste a distanza molto grande.

• La maggior parte dei modelli disponibili è costruita sullo schema "CMO", in cui i due obiettivi sono rappresentati da due regioni periferiche della stessa lente: si riconoscono guardando dentro l'obiettivo da sotto, poiché si vede un'unica lente del diametro di 30 - 50 mm.

In altri modelli, "sistema Greenough", vi sono due obiettivi distinti, di solito visibili guardando sempre da sotto.

---

<sup>1</sup> Questo è l' "angolo di stereo" e corrisponde all'angolo fra gli assi dei nostri occhi quando osserviamo un oggetto alla distanza convenzionale di 250 mm.

Il tipo CMO, ad obiettivo comune, è più adatto per oggetti piani ed il cambiamento dell'ingrandimento è molto semplice, in genere a mezzo di un tamburo rotante su un asse orizzontale. La distanza di lavoro è di solito fra 8 e 10 cm, e non cambia variando l'ingrandimento. Questo lo fa preferire in molti casi. C'è però una serie di limitazioni ottiche per cui la "nitidezza" dell'immagine è modesta e l'ingrandimento non dovrebbe superare  $50\times$ .

Nell'altro tipo ("Greenough"), ad obiettivo doppio, si hanno difficoltà di focalizzazione per oggetti piani e la distanza di lavoro può scendere sotto ad 1 cm, ma la bontà dell'immagine consente di arrivare a  $100\times$ .

Concludendo, quando si studia la forma e l'aspetto esterno di un oggetto senza arrivare al livello delle cellule od altre strutture fini, cioè a basso ingrandimento, allora è preferibile il microscopio stereoscopico ed il suo uso risulta assai più facile.

Quando invece si devono osservare oggetti o strutture molto fini (cellule e loro strutture, polline, spore, microrganismi, ecc.) non si può fare a meno di un microscopio "normale" o "biologico" e della confezione del "vetrino". Come si è detto, ciò permette i massimi ingrandimenti e la massima risoluzione possibile.

I due tipi fondamentali di strumenti sono dunque complementari: ciò che si fa con l'uno non si può fare con l'altro e viceversa.

Si può dimostrare l'effetto stereoscopico notando le differenze fra le due immagini parziali.  
Si può fare il confronto fra l'osservazione di oggetti piani ed oggetti a tre dimensioni.  
È possibile eseguire numerose osservazioni su oggetti naturali e non, senza preparazione, in modo da rilevare l'immediatezza nell'uso di questi strumenti.

## 6 – LE APPLICAZIONI

Da quanto si è detto sulla struttura degli oggetti, dovrebbe riuscire chiaro come siano poche le categorie di oggetti che non possano esser meglio conosciute attraverso l'osservazione al microscopio.

Vi sono intere branche di studio e di applicazione che non esisterebbero senza il microscopio o sono nate solo dopo la sua introduzione: la microbiologia (studio dei microrganismi), la citologia (studio della struttura delle cellule), ecc.

Impossibile dunque elencare tutte le applicazioni, ma almeno si deve ricordare che, anche a piccolo ingrandimento, la maggioranza degli oggetti naturali può venir compresa appieno solo con l'uso del microscopio.

*Si possono eseguire molte osservazioni, anche attraverso un circuito chiuso televisivo:*

### **MATERIALI VIVENTI IN MOVIMENTO:**

*Culture di microrganismi d'acqua dolce;*

*Zoospore di Equiseti ed Epatiche;*

*Correnti plasmatiche in peli vegetali di varie specie, ecc.*

### **MATERIALI A FRESCO:**

*Pollini, spore, sezioni vegetali a mano, epidermidi vegetali e catafilli;*

*Funghi inferiori, Muschi, Licheni, Felci, anatomia dei fiori; semi; (microscopio stereoscopico);*

*Gusci e scheletri di microrganismi acquatici in campioni di sabbia o di argille (microscopio stereoscopico); farine fossili;*

*Insetti di ogni genere, ragni, acari, ed altri Invertebrati; ali ed altri organi di insetti (m. stereoscopico);*

*Fibre naturali ed artificiali;*

*Semiconduttori miniaturizzati; sezioni di campioni metallici, ecc.*

*Sospensioni di particelle solide (tempera o inchiostro di china diluiti) per l'osservazione dei moti browniani (al massimo ingrandimento possibile).*

### **MATERIALI PREPARATI:**

*Microrganismi in strisci o colture.*

*Sezioni istologiche animali e vegetali.*

*Strisci di sangue di animali di vari gruppi sistematici.*

*Sezioni di legno. Sezioni di rocce. Microcristalli.*

*Ove possibile, si può fare un accenno ai fenomeni della radiazione polarizzata ed al loro valore diagnostico riguardo alla microstruttura di oggetti naturali ed artificiali; si possono osservare:*

*Fibre artificiali e naturali, peli, ecc.*

*Tessuti vegetali e loro inclusi cristallini, catafilli, ecc.*

*Esoscheletri di insetti, ecc.*

*Sezioni di tessuto osseo, denti, epidermidi, ecc.*

*Microcristalli e sezioni di rocce.*

*Fenomeni di fotoelasticità in resine sintetiche, ecc.*

## 7 – LE “TECNICHE SPECIALI” (cenni)

Spesso, si ha a che fare con oggetti di difficile visibilità, o perché sono trasparenti (microrganismi, cellule o tessuti viventi), o perché contengono strutture troppo piccole. Un metodo classico per aumentare la visibilità di essi o delle loro parti è quello di colorarli con opportune sostanze; i coloranti usati in microscopia sono sempre più o meno selettivi e si fissano, rendendoli ben visibili, solo sul nucleo, o sul condrioma, ecc.

Ma per vari motivi (esami veloci, esami su materiale vivente, mancanza di coloranti adatti, ecc.) non è sempre possibile procedere alla colorazione. Per aumentare il contrasto, si possono allora utilizzare tecniche di carattere fisico, che operano per via ottica, modificando la struttura dello strumento, senza intervenire sull'oggetto. Citiamo le principali.

### ILLUMINAZIONE OBLIQUA

Con un semplice intervento sul condensatore (basta un pezzo di cartone a livello del diaframma d'apertura) si può obliterare una parte del fascio illuminante in modo da illuminare l'oggetto di lato, obliquamente; dosando questa obliquità, è possibile ottenere un campo semi-oscuro in cui l'oggetto spicca con contrasto aumentato e con un effetto di ombreggiatura che simula un rilievo.

### CAMPO SCURO

Con un opportuno diaframma anulare posto subito sotto il condensatore, è possibile obliterare tutta la parte centrale del fascio illuminante in modo che nulla di esso penetri nell'obbiettivo. Il fondo dell'immagine appare nero, ma l'oggetto, illuminato da tutti i lati dai raggi più obliqui che sfuggono all'obbiettivo, appare chiaro su fondo oscuro. In questo modo il contrasto nell'immagine è elevatissimo.

Questa tecnica è semplicissima (un diaframma anulare in un condensatore normale di forte apertura), ma per gli obbiettivi di maggiore apertura occorre un condensatore speciale a specchi (oppure specchi e lenti, al fine di ridurre le aberrazioni) e gli obbiettivi di apertura superiore ad 1 debbono possedere un diaframma interno che ne limiti l'apertura.

### FLUORESCENZA

Consiste nell'illuminare (“eccitare”) l'oggetto con radiazione di corta lunghezza d'onda (regione blu-viola dello spettro, oppure ultravioletta) e nell'osservare l'immagine formata dalla radiazione di fluorescenza eventualmente emessa dall'oggetto. L'oggetto appare così colorato su fondo nero. Se l'oggetto non è spontaneamente fluorescente (“fluorescenza primaria”) è possibile in genere trattarlo con opportune sostanze coloranti fluorescenti (“fluocromi”); si ha così la “fluorescenza secondaria” o “indotta”. Poiché i fluocromi, come in genere i coloranti, hanno affinità specifiche per talune parti dell'oggetto, anche la fluorescenza indotta diviene uno strumento per mettere in evidenza strutture od oggetti particolari in mezzo ad altri oggetti.

L'osservazione in fluorescenza richiede una lampada forte, anche ad incandescenza, ma preferibilmente ad arco in vapori di mercurio, ed una serie di filtri opportuni.

### CONTRASTO DI FASE

Con questa tecnica si opera una manipolazione sulla radiazione che traversa l'oggetto direttamente, e la si mette in opposizione di fase con la radiazione diffratta dall'oggetto stesso. Ne deriva un'immagine fortemente contrastata anche se l'oggetto è trasparentissimo: tutto si basa sulle differenze di indice di rifrazione fra l'oggetto ed il mezzo che lo circonda. Il fondo dell'immagine rimane chiaro.

Per questa tecnica occorre un condensatore ed una serie di obbiettivi speciali, di alto costo.

### CONTRASTO INTERFERENZIALE

Questa tecnica cerca ancora, come il contrasto di fase, di sfruttare le differenze di indice fra l'oggetto ed il mezzo in cui è immerso; l'immagine che ne risulta è fortemente contrastata o colorata.

Questa tecnica si può realizzare con molte diverse soluzioni.

La più diffusa è il “DIC” (Differential Interference Contrast”), che produce una specie di ombreggiatura dell'oggetto con la sensazione di un falso rilievo (come l'illuminazione obliqua). Per questa applicazione occorrono prismi speciali (prismi di Wollaston, formati da un doppio cuneo in cristallo birifrangente), a coppie, una coppia per ogni obbiettivo. Il costo è quindi elevatissimo.

### RADIAZIONE POLARIZZATA

Tutti i fenomeni legati alla polarizzazione, e quindi alla birifrazione degli oggetti, come si possono osservare in scala macroscopica, possono essere osservati al microscopio con opportuni accessori. Per osservazioni qualitative, assai utili nel caso di certe strutture viventi, specialmente vegetali, sono sufficienti due o tre filtri applicati ad un microscopio normale; per eseguire misure di certe grandezze ottiche (potere birifrangente, orientamento degli assi ottici, ecc.) occorre invece uno strumento specialmente predisposto, con tavolino girevole, ecc. e questa diventa una tecnica preferenziale per il riconoscimento delle specie mineralogiche.

Probabilmente, il vetro fu prodotto accidentalmente dall'uomo quando accese il fuoco su una base di sabbia silicea; manipolando il vetro fuso formato sotto le fiamme, gli deve essere accaduto di lasciar cadere una goccia di impasto su una superficie liscia. Il vetro si è rappreso in forma di goccia, piana di sotto e convessa di sopra; questa calotta sferica di vetro aveva forma di lenticchia, donde il nome di "lenticchie ("lenti") di vetro": "lente" è una variante di "lenticchia". La cattiva qualità di quel vetro ne limitava molto le applicazioni in ottica, ma da lungo tempo l'uomo ha imparato a lavorare i cristalli naturali, a volte molto omogenei e trasparenti, utilizzando polvere di altri minerali più duri (smeriglio, ad es.) per fabbricare lenti adatte a correggere alcuni difetti della vista: si sono trovate queste lenti negli scavi di Ninive (l'antica capitale degli Assiri) e si sa che Nerone, notoriamente miope, "osservava i combattimenti dei gladiatori attraverso uno smeraldo".

Ma col vetro fuso l'uomo ha imparato certamente presto anche a produrre oggetti in vetro soffiato: immergendo un tubo di metallo nel vetro fuso e soffiandovi dentro è possibile ottenere delle bocce cave, dei palloni in vetro. Riempiendo questi palloni con acqua si ottiene una rudimentale lente convergente che può essere utilizzata per concentrare i raggi solari ed accendere il fuoco. Accenni di questa applicazione si trovano nella commedia "Le Nuvole" dello scrittore greco Aristofane, nelle opere di Plinio e di Seneca. Una boccia di vetro piena d'acqua può essere utilizzata anche come una modesta lente d'ingrandimento.

Nel corso del medioevo, molti artigiani avevano acquistato la capacità di lavorare specchi concavi: sfregando un cristallo od un pezzo di vetro o di metallo con un tampone intriso di polvere abrasiva, si ricava facilmente una superficie concava. Un tale specchio può ugualmente essere usato per produrre immagini virtuali ingrandite, come si fa con certi specchi concavi "da barba".

Il fiorentino Rucellai (1475 - 1525) impiegò uno specchio concavo per studiare l'anatomia dell'ape e pubblicò un'opera con le sue illustrazioni, ottenute a quel modo.

Ma in quell'epoca si cominciavano a fabbricare lenti per occhiali in vetro, convergenti e divergenti. Combinando una lente di un tipo con una dell'altro è possibile ottenere un cannocchiale, sia pure di modeste caratteristiche; è probabilmente ciò che fece qualche artigiano olandese (Hans e Zacharias Janssen) e che divenne presto una cosa normale. Può darsi che non sia stato il primo in questa invenzione, ma certamente G. Galilei perfezionò questo cannocchiale e lo applicò allo studio dell'astronomia<sup>1</sup>. Già il Galilei e poi Keplero ed altri ottennero risultati migliori utilizzando due lenti convergenti, una più debole rivolta verso l'oggetto ("obbiettivo") ed una più forte verso l'occhio ("oculare"); e questa formula è largamente utilizzata, nonostante il fatto che produca un'immagine rovesciata e richieda un sistema di prismi o lenti per il raddrizzamento.

Se come obbiettivo si usa una lente sempre più forte, è possibile avvicinare sempre più l'oggetto e l'ingrandimento aumenta. A questo punto è già realizzato in essenza il microscopio composto. Anche questo ritrovato non si sa bene a chi sia venuto in mente per primo, ma probabilmente agli stessi uomini che inventarono il cannocchiale poiché il passaggio da cannocchiale a microscopio è breve: basta aumentare la potenza dell'obbiettivo.

Questi strumenti iniziali erano però quasi inservibili: alcuni fenomeni legati alla rifrazione, e che rendono poco "nitida" l'immagine formata da una lente semplice (le "aberrazioni"), sono relativamente tollerabili in un cannocchiale ma diventano preponderanti nel microscopio poiché le lenti debbono aver maggiore potenza. E così, fino alla fine del '700 il microscopio composto non era stato preso molto sul serio, proprio a causa della cattiva qualità delle immagini. I suoi perfezionamenti avvenivano quasi solo nelle parti meccaniche.

Ma, per opera di artigiani inglesi (in quel paese, il problema dei cannocchiali da marina era molto sentito e vi era un forte impulso al perfezionamento tecnico), verso la metà del '700 si arrivò alla correzione della principale aberrazione, quella "cromatica". Si fa spesso il nome di J. Dollond, anche se pare che egli abbia imitato risultati ottenuti da altri suoi compatrioti. Solo all'inizio del secolo successivo questa innovazione fu applicata all'obbiettivo da microscopio, sempre da artigiani inglesi, forse al seguito dello stesso Dollond; un altro inglese (A. Ross) riuscì poco dopo a correggere anche l'aberrazione "sferica".

Poi, intorno al 1860, le officine C. ZEISS a Jena (Germania) assunsero un giovane fisico dell'Università locale e gli affidarono una revisione di tutte le basi teoriche e tecniche della microscopia. Questo vero e proprio genio, Ernst Abbe, riuscì in pochi anni a rivoluzionare tutta l'ottica, e non solo quella del microscopio, e da allora i microscopi prodotti dagli stabilimenti Zeiss e poi imitati da altri costruttori, divennero assai perfezionati poiché la loro costruzione era basata su principi teorici rigorosi e su accorgimenti tecnici raffinati.

Anche i costruttori inglesi e quelli francesi, come gli Chevalier, ottennero ottimi risultati; l'italiano G.B. Amici ideò la "immersione" degli obbiettivi, poi perfezionata dai francesi e da Abbe.

Va notato infine come il perfezionamento tecnico e gli sviluppi scientifici teorici siano andati di pari passo: mentre i costruttori fornivano ai ricercatori, soprattutto biologi, medici e naturalisti, strumenti sempre più perfezionati per l'osservazione e la raccolta di dati, e ponevano ai fisici stessi sempre nuovi quesiti circa i fondamenti teorici dell'ottica, dall'altra parte la scienza, la fisica e la matematica, offrivano ai costruttori sempre nuove idee e soluzioni.

<sup>1</sup> Questo tipo di cannocchiale si chiama normalmente "galileiano" ed è ancora usato per piccoli ingrandimenti, come nei binocoli da teatro. Esso fornisce un'immagine dritta ma il campo angolare è piccolo.

Vi sono scienze, come la Microbiologia, che non sarebbero nate senza lo sforzo dei costruttori di microscopi, ed altre, come la Biologia, che sarebbero rimaste ad uno stato molto arretrato. Si può dire che molte malattie infettive, come la tubercolosi, sono state sconfitte solo dopo che l'osservazione al microscopio ha consentito l'individuazione del batterio patogeno che le provoca.

Oggi vi sono novità nel campo dell'ottica: la radiazione coerente del laser, il calcolo elettronico che consente di ottimizzare le "ricette" degli obbiettivi, i miglioramenti della chimica dei vetri ottici, l'esplorazione del territorio dell'ottica "non lineare", ecc.

Queste novità hanno consentito nuove tecniche, come l'ottica "confocale", che permette di superare i limiti convenzionali della risoluzione e della profondità di campo e la fluorescenza dei tempi brevi ("lifetime") che osserva i fenomeni di fluorescenza con la risoluzione del picosecondo ( $ps = 10^{-12} s$ ).

L'elettronica ha poi aperto la strada all'automazione degli strumenti, alla ripresa televisiva e fotografica digitale, alle indagini statistiche, ecc.

Il cammino della scienza e della tecnica sembra senza fine.

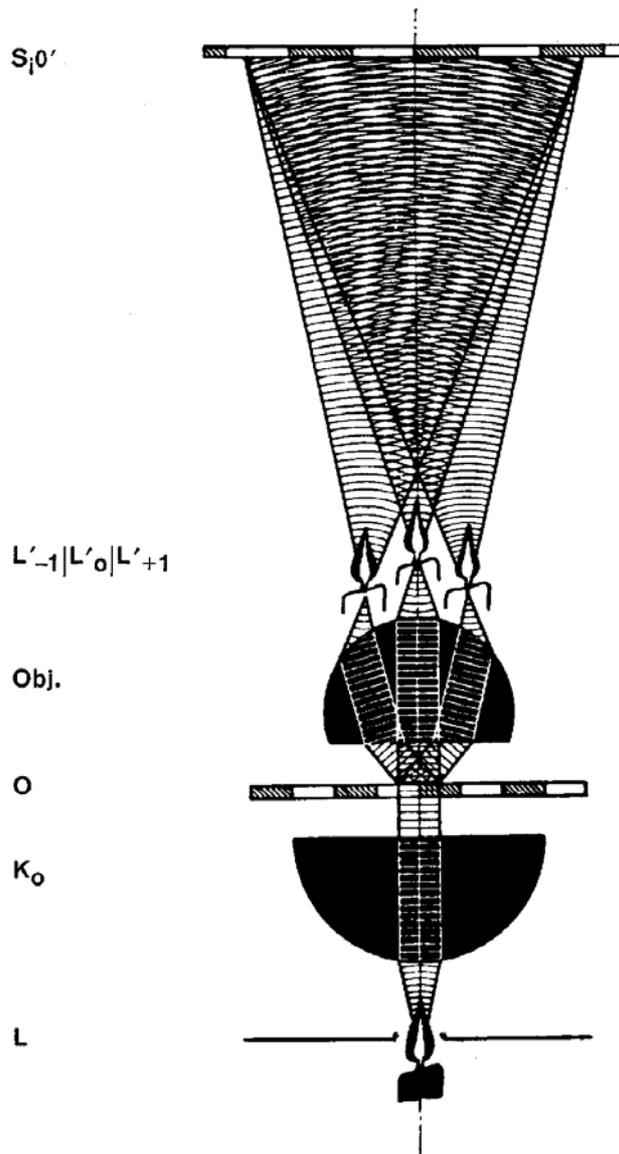


Fig. 3 - La formazione dell'immagine intermedia ( $SiO'$ ) nel microscopio. È schematizzato l'oggetto ( $O$ ) come un reticolo in sezione;  $Obj.$  è lo schema dell'obiettivo; l'oculare non è rappresentato.  
 Da: A. Schaefer, "Problèmes posées par l'éclairage de la préparation microscopique", "Mikroskopion", n°10, 1967; ed. WILD Heerbrugg, St. Gallen (Suisse).

La formazione dell'immagine nel microscopio, oltre che dal punto di vista geometrico, come visto sopra, si può spiegare in base ai fenomeni di interferenza. Il fascio illuminante che traversa l'oggetto  $O$ , e che proviene dal condensatore  $Ko$ , viene diffratto dalle strutture dell'oggetto che si comporta come un reticolo più o meno irregolare. I fasci diffratti, dopo aver traversato l'obiettivo ( $Obj$ ), confluiscono verso l'immagine intermedia  $SiO'$ , ove interferiscono. La struttura dell'oggetto appare nell'immagine  $SiO'$  proprio a causa di questa interferenza. Infatti, se si adopera un obiettivo ad apertura insufficiente, che non riesce ad accogliere i fasci diffratti  $L' - 1$  ed  $L' + 1$ , l'immagine intermedia  $SiO'$  è costituita dal solo fascio illuminante ( $L'o$ ), il quale produce un fondo immagine omogeneo: l'informazione sulla struttura dell'oggetto è portata solo dai fasci diffratti.

È anzi possibile avere un'immagine dell'oggetto sopprimendo del tutto il fascio illuminante o diretto ( $L'o$ ): l'oggetto appare chiaro su fondo nero e la sua immagine è formata dalla sola radiazione diffratta. È questa la tecnica del "campo scuro".