Art. n° 35 – **CONFRONTI** fra le varie **TECNICHE d'OSSERVAZIONE** in microscopia

In molti strumenti che l'uomo costruisce per osservare immagini ingrandite degli oggetti (cannocchiali, binocoli, telescopi) non vi è modo di modificare le proprietà dell'oggetto, per la buona ragione che esso è inaccessibile.

In microscopia, invece, si può spesso sezionare, lucidare, colorare, ecc.

In ogni caso, comunque, è possibile intervenire sull'immagine fornita dallo strumento, sia nel caso della ripresa su emulsione fotografica, con mezzi chimico-fisici, sia nel caso della ripresa elettronica, con mezzi informatici.

Nel caso della microscopia, poi, è possibile modificare l'immagine già nello strumento, con mezzi esclusivamente ottici: sia modificando il sistema illuminante (fondo scuro, illuminazione obliqua, radiazione polarizzata, fluorescenza, episcopia, sistemi confocali), sia il sistema formatore d'immagine (contrasto di fase, contrasto interferenziale, contrasto d'ampiezza, ecc.).

Ognuna di queste diverse "tecniche" consente di ottenere immagini spesso assai diverse fra loro, ma ogni volta mettendo in luce differenti proprietà dell'oggetto.

Il presente articolo intende proprio illustrare alcuni oggetti, solo qualche esempio preso quasi a caso fra gli innumerevoli possibili, ma ognuno come appare in un microscopio ottico dotato di vari accessori e quindi applicando alcune fra le più comuni "tecniche": tecniche "di contrasto" in genere. Per ogni immagine si cercherà di illustrare pregi e difetti di ogni "tecnica" per facilitare la scelta dell'osservatore, in vista di una sessione di lavoro o di un acquisto.

La maggioranza degli oggetti presentati vengono dal mondo delle scienze naturali e della biologia. Le fotomicrografie che seguono hanno subito il minimo ammontare possibile di manipolazione elettronica in vista del principio fondamentale per cui il disegno, la fotografia od il filmato di un oggetto naturalistico ha come scopo di documentare, rendere visibili dettagli e caratteristiche dell'oggetto altrimenti poco o affatto visibili ad occhio nudo. Insomma, un mezzo per illustrare un oggetto, non un fine a sé stesso. Quando l'elaborazione dell'immagine prende il sopravvento, ne può uscire un'opera d'arte, ma la comprensione dell'oggetto sarà impedita o falsata. Si rientra nel campo dell'arte, non della scienza. Occorre scegliere fra valori estetici e comprensione obbiettiva della realtà.

EPISCOPIA¹

Le foto presentate in questo capitolo sono state riprese con un microscopio episcopico Reichert, mod. Polyvar (vedi la scheda tecnica nº 61 nella sezione "Approfondimenti", in questo sito) e con una fotocamera digitale Canon, mod. 400D.

Il microscopio era dotato di una lampada "alogena" da 12 V, 100W, e di una lampada ad arco a vapori di mercurio HBO 200W. I filtri per la fluorescenza in dotazione erano però "centrati" su una banda di eccitazione a 435 nm, per cui molte fotografie sono riuscite bene anche con la sola lampada alogena. Non sono stati usati fluoromi, per cui la fluorescenza osservata è "primaria".

L'oculare utilizzato era un modello speciale "a pupilla alta" (vedi l'art. n° 13: "Fotomicrografia al Microscopio con Fotocamere Digitali"), acromatico.

Gli obbiettivi erano planari, a grande campo (s' = 30 mm), con condensatore anulare per fondo scuro e "seconda coniugata infinita". In ogni figura è indicato l'obbiettivo utilizzato.

Lo strumento era fornito del prisma di Wollaston per il DIC ma questa tecnica, come è noto, si applica con successo solo ad oggetti a superficie molto piana o quasi lucida.

¹ Si può consultare, in questo sito, sez. "Approfondimenti di microscopia", l'art. n° 8: "L'osservazione in episcopia nel campo delle scienze naturali".

Fig. 1 – Fondo chiaro. La pagina inferiore della foglia di *Philadelphus sp.* (Sassifragacee) è coperta di peli stellati, che però non si distinguono rispetto alla superficie della foglia. Il riflesso della cuticola è, infatti, molto forte. Del resto, è noto che l'episcopia in fondo chiaro soffre in genere di cattivo contrasto a causa dei riflessi sulle lenti.

L'immagine è globalmente piuttosto deludente.

Il *Philadelphus coronarius* L. ("Fiori d'angelo") è una pianta che forma alti cespugli, con molti fiori bianchi assai odorosi, usata a scopo ornamentale.



Fig. 2 – Lo stesso campione, in fondo scuro. Il contrasto è certamente aumentato, e si vedono chiaramente le piccole pustole scure dell'epidermide, ma la foglia è secca e la cuticola diffonde ancora tanta luce da nascondere i peli. Fig. 3 - Anche semplicemente con l'uso della lampada alogena, senza scomodare la sofisticata lampada a vapori di mercurio, alcuni peli, i più grandi, appaiono fortemente fluorescenti e spiccano con evidenza. I contorni delle cellule dell'epidermide sono pallidi.



Fig. 4 – Con la lampada a vapori di mercurio l'immagine è naturalmente più luminosa (maggior potenza e maggior rendimento fotometrico dell'arco), ma alcuni dettagli (i contorni delle cellule epidermiche) sono più visibili.





Fig. 5 – Solo la radiazione polarizzata² rende giustizia a questo oggetto: tutti i peli appaiono ben evidenti, in ogni dettaglio.

Anche i contorni frastagliati delle cellule epidermiche appaiono più chiaramente.



Fig. 6 – Visto che stiamo parlando di peli vegetali, andiamo a vedere sotto le foglie del rododendro rugginoso (Rhododendron ferrugineum L., Ericacee) che vive in prevalenza sulle rocce cristalline delle nostre Alpi: la superficie inferiore delle foglie appare vivacemente color ruggine; la specie affine R. hirsutum L. ("Rosa delle Alpi") mostra invece normali foglie verdi, con qualche pelo bianco. Il color ruggine del R. ferrugineum è dovuto a buffi peli a forma di ombrello, dall'orlo sfrangiato, con un "manico" molto corto. In fondo chiaro li si intui-

sce a fatica: sono molto ravvicinati e si coprono a vicenda.



² Qualche informazione su questa tecnica si trova in questo sito, nella sezione "Approfondimenti di microscopia", nell'articolo "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata"

Fig. 7 – In fondo scuro, i peli ad ombrello si distinguono meglio, ed in particolare è visibile un punto scuro al centro di ognuno, che indica il peduncolo. I peli sono così fitti che, per vedere l'epidermide sottostante, è necessario raschiarli con una lametta. Avendo eliminato il riflesso speculare della cuticola, appare meglio il color ruggine della pagina inferiore della foglia, dovuto solo ai peli.

Fig. 8 – L'illuminazione in radiazione polarizzata non aggiunge molto, ma sono più evidenti i peduncoli come punti brunastri al centro di ogni pelo. Il color ruggine rimane.



Fig. 9 – L'osservazione della fluorescenza eccitata dalla lampada ad arco lascia distinguere in ogni pelo due zone concentriche, la più esterna delle quali era quasi invisibile nelle foto precedenti.



Fig. 10 – Per restare in ambito vegetale, si può prendere uno dei bastoncini che, nella tavola cinese, si usano in luogo delle nostre posate. Tradizionalmente, questi oggetti sono ricavati dai fusti del bambù (*Bambusa sp.*, Graminacee) e non è difficile, con un "cutter", ottenerne una sezione trasversale sufficientemente liscia.

Si distinguono, già in fondo chiaro, i fasci fibrovascolari "collaterali" con la parte legnosa ("xilema") costituita da un paio di grosse trachee che conducono la linfa grezza dalle radici alle foglie, la parte del "libro" ("floema") con pochi vasi più piccoli per la linfa elaborata (che scende in senso inverso) e ammassi di grosse fibre di rinforzo (Scl: sclerenchima).



Fig. 11 – L'immagine in fondo scuro non aggiunge molto, ma sono più evidenti i fasci collaterali, immersi in un tessuto non conduttore, a cellule rotondeggianti ("parenchima").

Nella foto qui sotto si può fare il confronto con il fusto del papiro il quale, essendo pianta acquatica, possiede un "parenchima aerifero" con grandi lacune (diascopia, FS).





Fig. 12 – In fluorescenza non si aggiunge nulla: addirittura appare meno visibile la struttura del parenchima.

Solo in alto si nota una fascia più chiara: lì il tessuto è più vicino al centro del fusto della pianta.



Ora diamo un'occhiata al legno fossile. Se ne trovano campioni nei mercatini, a volte già levigati. La levigatura non è facile, data la durezza del materiale. Fig. 13 – Un campione lucidato di legno silicizzato proveniente dall'Arizona. Col tempo, in opportune condizioni, il materiale biologico viene sostituito molecola per molecola dal minerale, conservando le strutture fini del legno.

In fondo chiaro, il riflesso della superficie lucida abbassa molto il contrasto. Risaltano solo le vene di minerale puro, di colore bianco omogeneo, depositate negli interstizi e nelle fessure presenti nel legno.





Fig. 14 – In fondo scuro, mancando il riflesso anche nelle lenti, si distinguono molte altre strutture. Fig. 15 – L'immagine in radiazione polarizzata mostra assai maggiori dettagli.

Le macchie scure rotondeggianti sembrano essere grossi fasci fibrovascolari.

Le vene minerali bianche appaiono ancora senza struttura.

Obb. 5 - Pol 68 Obb. 5 - Fluor. HBO 61

Fig. 16 – In fluorescenza, la parte legnosa è ora poco strutturata, mentre diventa visibile la presenza di cristalli aghiformi all'interno della vena chiara centrale.

Le parti esclusivamente minerali si differenziano meglio dalle parti legnose (confronta colla foto precedente). Fig. 17 – La corteccia degli alberi e dei cespugli, benché costituita da tessuto morto ed inerte (sostanzialmente, sughero), rappresenta il terreno adatto per una quantità di piccoli organismi: acari, insetti, nematodi (anguillule), licheni, funghi inferiori, alghe terrestri.

Qui, in campo chiaro, si vede solo un intrico di filamenti biancastri (miceli fungini) e grumi verdastri (alghe unicellulari, Protococcacee e simili).





Fig. 19 – In radiazione polarizzata sono più evidenti i grumi di alghe ma scompaiono quasi le ife fungine.



Fig. 20 – In fluorescenza (lampada a mercurio) appare molto chiaro il "fondo", cioè la superficie della corteccia ma, improvvisamente, appaiono con la classica fluorescenza rossa della clorofilla alcune alghe unicellulari.

Questi esseri, di pochi micron di diametro, vivono in un ambiente aereo sfruttando l'umidità atmosferica, l'aria e la luce per ricavarne il glucosio, su cui "campa" quasi tutta la materia vivente.

Se potessimo fare altrettanto ...



Fig. 21 – Passando al mondo animale, tutti avranno visto nella vegetazione qualche esemplare di un piccolo coleottero, lungo pochi millimetri, dai colori metallici: il criptocefalo. Il *Cryptocephalus* sp. (fam. Crisomelidi) prende nome da due radici greche che significano "nascosto" e "capo". Infatti, molti membri della famiglia tengono il capo ricurvo sotto un globoso protorace.

I colori sgargianti nascono in genere, sia fra i coleotteri, sia fra gli insetti in generale, sia negli uccelli, dagli stessi fenomeni che danno colore alle bolle di sapone: uno strato sottile di materiale trasparente provoca un doppio riflesso alle sue due superfici ed i due fasci riflessi possono interferire fra loro secondo lo schema dell'interferometro di Pérot e Fabry. Se si opera in luce bianca, dallo spettro generale verranno attenuate alcune bande spettrali e ne risulteranno vivaci "colori di sottrazione".

Nel caso dei colori degli animali, lo "strato sottile" è costituito dagli strati più superficiali del tegumento, composti da proteine come la cheratina, negli uccelli, la chitina negli insetti, e così via. Spesso, si tratta di molti strati sovrapposti, con diverso spessore ed indice di rifrazione. Andiamo adesso a curiosare nel "capo nascosto" del criptocefalo.



Obb.5-Fondo chiaro

Fig. 22 – In campo chiaro, si distingue discretamente la fine scultura dell'esoscheletro e la presenza delle corneole alla superficie degli occhi composti.





94b

Fig. 24 (a destra) – La radiazione polarizzata sembra "vedere" al disotto della superficie delle corneole, ed in particolare mostra più chiare le zone in cui, col disseccamento progressivo del campione, le corneole stesse si sono staccate dal tessuto sottostante.

Il riflesso sull'esoscheletro del capo è molto attenuato. (99–3b)





Fig. 25 (a sinistra) – L'osservazione in fluorescenza (lampada a mercurio) dimostra come le cellule pigmentate che circondano ogni ommatidio dell'occhio composto siano fluorescenti. Anche le setole, quasi invisibili nelle foto precedenti, appaiono qui come sottili punte chiare (vedi il dettaglio, qui sotto).





Fig. 26 (a sinistra) – Pagina superiore delle ali di una farfalla nostrana: la Vanessa pavone o "Pavonia di giorno" (*Vanessa Io*, Ninfalidi, farfalle diurne o Ropaloceri).

La copertura di queste ali è ben nota: scagliette epidermiche, ognuna con un piccolo peduncolo, disposte "come le tegole di un tetto".

In campo chiaro, come al solito, cattivo contrasto; i colori delle varie scagliette sono molto sbiaditi. Fig. 27 – In fondo scuro, è assai più evidente la tavolozza dei colori. Nel quadrante in basso a sinistra, un gruppo di scagliette semi-trasparenti.



Fig. 28 – La radiazione polarizzata offre una diversa mappa della distribuzione dei vari tipi di scagliette.

Nel quadrante a destra in alto, un po' sopra la linea mediana, è evidente una piccola zona scura priva di scagliette, che non appare nella foto precedente. Fig. 29 – In fluorescenza, i colori propri delle scagliette scompaiono e l'immagine è completamente diversa.

Per es., nella metà superiore appaiono nere alcune scagliette che nella foto precedente apparivano bianche. Segno che la fluorescenza (foto a destra) non ha nulla a che fare né con la capacità di depolarizzare la radiazione polarizzata (foto precedente), né col colore pigmentale evidente nelle foto 26/27 (vedi la metà destra della foto, che è nera in fluorescenza ma di un bel color arancio nelle foto precedenti).

Prima di chiudere il capitolo dell'episcopia, concediamoci un'occhiata al mondo della tecnologia. Esaminiamo un oggetto con superficie piana e basso rilievo: un cellula fotovoltaica al sipolicristallino. licio Vedremo una distesa di cristallini tutti orientati allo stesso modo. Il campo appare attraversato da sottili strisce orizzontali che corrispondono ai conduttori per il prelievo della corrente in uscita.

Fig. 30 – In fondo chiaro, il contrasto è già buono.



Fig. 31 – In fondo scuro la superficie altamente riflettente del campione appare ovviamente scura (il fascio illuminante giunge sull'oggetto con un'apertura maggiore di quella dell'obbiettivo e quindi non viene da questo raccolto). Appaiono solo i contorni dei cristalli che diffondono una parte del fascio illuminante in tutte le direzioni.



Fig. 32 – L'osservazione in radiazione polarizzata è piuttosto deludente. Meglio non insistere.

Fig. 33 – La superficie pianeggiante dell'oggetto consente l'uso del DIC ed il piccolo rilievo dell'oggetto produce immagini con colori che variano a seconda della posizione trasversale del prisma di Wollaston. La tecnica offre molta flessibilità nel determinare le caratteristiche dell'immagine.



Fig. 34 – Basta una piccola regolazione, ed ecco una tavolozza piuttosto diversa.

Si badi: le immagini del DIC sono seducenti, ma i colori non hanno molto significato riguardo le caratteristiche dell'oggetto.

DIASCOPIA

Ora occupiamoci del campo, almeno altrettanto vasto, dell'osservazione in trasparenza ("luce trasmessa").

Lo strumento utilizzato è un buon biologico classico (Wild M20) fornito di obbiettivi per campo chiaro, per contrasto di fase e per contrasto colorato ("Varicolor"³). L'oculare utilizzato è l'appropriato compensatore $10 \times$, con indice di campo s' = 18 mm.

Per l'illuminazione obliqua è stato usato un obbiettivo per campo chiaro ed un cartoncino infilato sotto al condensatore: sistema semplice, economico ed efficace.

Per il campo scuro, un normale condensatore di Abbe ed un diaframma anulare del diametro di 20 mm.

Per tutte le foto seguenti sono stati utilizzati solo obbiettivi con ingrandimento proprio 20:1. NA compresa fra 0,45 e 0,6.

Salvo eccezioni indicate di volta in volta, tutti i preparati qui figurati sono permanenti, montati in balsamo del Canada naturale.

Iniziamo con vari esempi tratti dal mondo vegetale.



Fig. 35 – Il polline delle conifere (in questo caso *Pinus silvestris*) viene trasportato dal vento – si parla di piante anemofile – e pertanto deve essere leggero e magari munito di "vele". Madre natura ha provveduto con due vescichette vuote, appena visibili in campo chiaro. S'intravede anche il nucleo del granulo (inizialmente unico).

³ Vedi, in questo sito, l'art. n° 33, "Le tecniche di contrasto", pag. 20.



Fig. 36 - Un semplice cartoncino sul porta filtri consente un'immagine con apparente rilievo che non ha nulla da invidiare al DIC. Ben evidenti le vescichette vuote sopra citate.

Fig. 37 – In certi casi il campo scuro, che si ottiene facilmente con gli obbiettivi a secco medio-deboli, anche con un condensatore normale, offre delle splendide immagini, ricche di dettagli.

Si notino, all'interno delle vescicole aerifere, le fini costolature che servono ad irrigidirne la parete. Un dettaglio già visibile in fondo scuro. In basso a destra, un forte alone dovuto ad un granulo estraneo fuori fuoco: uno degli inconvenienti del contrasto di fase.

Fig. 38 – Il contrasto di fase, a parte la presenza dell'alone, offre circa la stessa sensibilità del campo scuro riguardo alla rivelazione delle piccole differenze di indice nell'oggetto. Entrambe le tecniche sfruttano le variazioni di indice, e quindi di cammino ottico, nel piano oggetto; si possono considerare "tecniche sensibili alla fase", non alla trasparenza dell'oggetto, come del resto anche il DIC.

Fig. 39 - In una variante del contrasto di fase, il "Varicolor" della Wild, si hanno analoghi risultati, ma con una differenza: si possono distinguere gli oggetti meno rifrangenti del mezzo circostante, che appaiono in verde chiaro, da quelli più rifrangenti, che appaiono in rosso.

Essendo questa tecnica molto sensibile, gli oggetti molto rifrangenti, come la parete dei granuli, subiscono la "inversione del contrasto"⁴ ed appaiono bianchi.

⁴ Vedi in questo sito l'articolo n° 33: "Le tecniche di contrasto", pag. 15.

Fig. 40 – Lo stesso oggetto, in radiazione polarizzata. A parte le piccole druse sferoidali di cristalli di ignota natura, appaiono più chiare le pareti dei granuli dove si trovano molecole allungate di polisaccaridi ad orientamento parallelo (esina).

Fig. 41 – Se ai due polarizzatori si aggiunge un compensatore λ ("rosso di 1° ordine") si mette in evidenza la struttura a strati concentrici delle druse rotondeggianti chiare viste sopra: in quadranti opposti del granulo appaiono i colori arancio - blu, quelli che stanno ai lati del "rosso di 1° ordine" nella scala di Newton.

Fig. 42 – La famosa epidermide delle foglie carnose del bulbo di cipolla (*Allium cepa* L., Liliacee), oggetto di tutti i primi esperimenti del micrografo alle prime armi, colorata con blu di toluidina ed eosina. In campo chiaro, se non fosse per la colorazione, si vedrebbe ben poco. Il blu di toluidina, sovracolorato e poi differenziato con acido acetico, mostra i nucleoli in rosa (piccole palline chiare all'interno di alcuni nuclei.

Fig. 43 – L'illuminazione obliqua non fornisce in questo caso sensibili vantaggi: questa tecnica si presta meglio per oggetti non colorati e montati in acqua.

Fig. 44 – Il campo scuro invece mostra meglio i ridotti strati di citoplasma che circondano il nucleo ed aderiscono qua e là alle pareti (brizzolatura in verde chiaro); il preparato è stato fissato male ed il citoplasma è coagulato. In alto a sinistra un alone chiaro dovuto ad un granulo di polvere sfocato, che si trova alla superficie del copri oggetto.

Fig. 45 – L'immagine in radiazione polarizzata mostra invece le strutture birifrangenti (pareti cellulari in particolare), con dettagli difficilmente apprezzabili nelle foto precedenti. Nel rettangolino rosso, per es., sono visibili sottili increspature della parete cellulare, invisibili con altre tecniche d'osservazione.

In campo vegetale soprattutto, un'occhiatina "in pol" può sempre rivelarsi una preziosa sorgente d'informazioni. Basta inserire i filtri.

Fig. 46 – La radiazione polarizzata, con l'aggiunta del compensatore λ ("Rosso di 1° ordine") mostra in arancio o blu le zone della parete cellulare in cui le molecole di cellulosa sono orientate in quadranti opposti rispetto alle direzioni principali dei polarizzatori.

Fig. 47 - II contrasto di fase, ovviamente, mostra in maggior contrasto le increspature dello strato di citoplasma aderente alle pareti.

Fig. 48 – Il contrasto di fase "Varicolor" aggiunge colori che danno qualche indicazione in più riguardo alla differenza di indice fra oggetto e mezzo di montaggio.

Fig. 49 – Ora invece osserviamo le foglie coriacee che circondano lo stesso bulbo di cipolla, quelle che i botanici chiamano pomposamente "catafilli papiracei esterni" ("... la scienza è l'arte di chiamare con nomi difficili le cose più semplici..."). Si tratta di foglie morte trasformate, costituite da due strati epidermici con pareti ispessite e poche nervature in mezzo. Le nervature si rivelano per via degli ispessimenti spiralati delle pareti cellulosiche delle trachee (vedere a destra, un po' obliqua). Trattandosi però di tessuti morti, i "catafilli" vengono sfruttati dalla pianta per depositarvi i prodotti del catabolismo che, nelle piante, non sono basati sull'acido urico, ma su quello ossalico. I corpi poliedrici che s'intravedono sono cristalli di ossalato di calcio. La pianta li mette lì, in parcheggio permanente, visto che non ha i reni ...

Fig. 50 – Ovviamente, l'illuminazione obliqua aumenta il contrasto, specie nelle strutture allungate in direzione perpendicolare all'inclinazione del fascio illuminante.

Con questa tecnica, raramente il campo visuale è omogeneamente illuminato, ma i vantaggi sono tanti ...

Fig. 51 – Anche il contrasto di fase aumenta il contrasto (vedi la nervatura sulla destra), ma l'oggetto è troppo spesso e rifrangente e l'immagine si riduce ad un'intricata sovrapposizione di aloni.

Fig. 52 – Anche il contrasto Varicolor produce immagini ben colorate, ma i cristalli sono troppo rifrangenti, subiscono la "inversione del contrasto" e sono sommersi nell'alone bianco.

Fig. 53 – Anche il fondo scuro produce un buon contrasto, ma non differenzia bene le strutture fini delle cellule (confronta con le foto precedenti) né le trachee (la nervatura sulla destra è sparita).

Fig. 54 – In radiazione polarizzata sono assai brillanti i cristalli di ossalato di calcio per via della loro forte birifrangenza. La nervatura a destra è appena visibile.

Fig. 55 – Sempre in radiazione polarizzata, ma con i polarizzatori non incrociati, il contrasto si abbassa. A seconda del loro orientamento, i cristalli appaiono con luminosità assai diversa.

Fig. 56 – In radiazione polarizzata, a Nicol incrociati, con l'aggiunta del compensatore λ ("Rosso di 1° ordine"), si aggiungono colori relativi all'orientamento delle molecole di cellulosa. Anche le trachee spiralate della nervatura appaiono con più evidenza.

Fig. 57 – Per inciso, si può confermare l'importanza dell'osservazione in radiazione polarizzata nei prodotti vegetali dal presente confronto. Sul margine di un chicco di grano, un corpicciolo rotondeggiante appare evidente con qualunque altra tecnica (qui: illuminazione obliqua); ma solo in radiazione polarizzata (a destra) si evidenziano quei quadranti di diverso colore che denunciano l'orientamento delle molecole di amido in strati concentrici, in direzione radiale. Anche nelle pareti delle grosse cellule superficiali le molecole di cellulosa rivelano di essere orientate in direzione preferenziale, ma parallela alla superficie. Infatti, nei quadranti corrispondenti delle due strutture, i colori sono complementari.

È possibile, con una lama ben affilata, ottenere sezioni sottili di legno abbastanza regolari da consentire un'osservazione fruttuosa. E la struttura del legno è assai più complicata di quanto si creda. Impossibile in questa sede andare a fondo, ma occorre precisare qualche dettaglio sul legno delle conifere, quale è illustrato nelle foto seguenti.

In ogni caso, nel legno si trovano sottili tubicini ("vasi") che conducono la linfa "greggia" dalle radici alle parti superiori della pianta. Vi sono in maggioranza vasi longitudinali, ma anche vasi radiali, contenuti nei cosiddetti "raggi midollari". Fra i vasi longitudinali come pure fra quelli longitudinali e quelli radiali, esistono numerose "punteggiature", ovvero piccole zone in cui la parete è assai sottile e consente scambi di sostanze fra vasi adiacenti.

Nelle Conifere le punteggiature sono più complicate: tanto per cominciare la loro forma non è semplicemente circolare come avviene di solito nelle Angiosperme, ma può anche essere ellittica o trapezoidale. Inoltre, le punteggiature delle Conifere sono "areolate" in quanto sono circondate dai due lati da una specie di cupoletta con un foro in cima. Nella figura seguente, si vede uno schema di punteggiatura areolata.

I colori arancio e verde indicano i citoplasmi delle due cellule confinanti.

Fig. 58 – Sezione schematica di punteggiatura areolata di legno di Conifera. In punteggiato, le pareti della cellula matura. In grigio, la sottile "membrana della punteggiatura" che separa i citoplasmi delle due cellule contigue. L'alone interno alla cupola è flessibile, al punto che, quando la pressione interna delle cellule contigue è differente, l'ispessimento centrale ("toro") si sposta da un lato o dall'altro in modo da chiudere il poro e ridurre gli scambi inter-cellulari. Ciò rallenta gli effetti del disseccamento di una parte del tessuto con vantaggio per quelli vicini.

Fig. 59 – Una sezione sottile di legno di cipresso. In questa specie, le punteggiature sono ellittiche, mentre in tutte le altre Conifere nostrane sono circolari: un ottimo carattere diagnostico (cfr.: G.P. Sini – Mikroskopie und Musi-kinstrumente – Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. VIII – Nr. 2, Wetzlar, Aprile 1982, ristampato in Italia col titolo: Il

legno che suona - Gli strumenti musicali - Jackson Ed., Milano, Maggio 1980).

Le grosse linee scure inclinate indicano le superfici lungo le quali le pareti di due cellule adiacenti sono a contatto; tali linee sono parallele all'asse del tronco. In alto a sinistra e sul lato destro si vedono brevi tratti di "raggi midollari", fasci di vasi diretti radialmente. La presente sezione del legno è infatti radiale.

Il contrasto non è forte, nonostante la forte rifrangenza della lignina e della cellulosa, poiché il preparato non è colorato ed è montato in Balsamo.

Fig. 60 – L'illuminazione obliqua mostra meglio il contorno circolare delle areole e, all'interno di esse, il poro ellittico (a occhio di gatto), caratteristica del cipresso nostrano.

Fig. 61 – La radiazione polarizzata mette in evidenza le strutture birifrangenti; nel mondo vegetale si tratterà di strutture contenenti molecole allungate, generalmente polimeri del glucosio, disposte con gli assi paralleli: amido (fig. 57), cellulosa, lignina, cutina, ecc. Si noterà che, per ognuna delle areole visibili nella foto precedente, qui si forma una "croce di Malta" scura: segno che le molecole di cellulosa, all'interno della cupola, sono orientate con andamento circolare, come l'amido nel granulo di fig. 57. Nel resto della parete cellulare, le molecole sono dirette secondo l'asse del vaso.

Fig. 62 – Le croci di Malta della figura precedente mostrano ora i quadranti di colori opposti. Si confrontino ancora queste figure subcircolari col granulo d'amido della fig. 57: la differenza nei colori rispecchia una differenza nell'orientamento delle molecole.

Fig. 63 – Il contrasto di fase, ovviamente, aumenta il contrasto, anche troppo (non si può dire che il preparato sia formato da "pochi elementi in un campo vuoto"), ma mette bene in evidenza la forma delle punteggiature.

Fig. 64 – Alghe filamentose d'acqua dolce (Edogoniali?) montate in liquido di Perrin. Nonostante il tempo passato (il preparato porta la data del 1951!), struttura e colori si sono conservati bene. In campo chiaro, si vede quasi tutto quello che c'è da vedere. Il citoplasma, rimpinzato di cloroplasti, si stacca bene dalla parete cellulare, semi-trasparente e poco visibile.

Fig. 65 – L'illuminazione obliqua distingue meglio le granulazioni del citoplasma e la parete cellulare. Anche molti granuli sospesi nel liquido di montaggio sono meglio contrastati.

Fig. 66 - Il fondo scuro può produrre immagini accattivanti. Le pareti cellulari appaiono in tutta evidenza.

Fig. 67 – A parte i soliti aloni rompiscatole, solo con questa tecnica si mettono bene in evidenza le catenelle di batteri aderenti ai filamenti algali (sottili filamenti scuri variamente inclinati).

Fig. 68 – In radiazione polarizzata, ancora una volta, si mettono in evidenza le strutture dotate di maggior potere birifrattivo: le pareti cellulosiche.

Fig. 69 – L'aggiunta ai polarizzatori di un compensatore λ ("Rosso di 1° ordine"), consente di distinguere i colori ancora collegati con l'orientamento delle molecole di cellulosa.

Fig. 70 – Passando al mondo animale, vi sono altre occasioni di osservazione. Alcuni tessuti mostrano una struttura caratteristica. Cominciamo col tessuto osseo compatto che, nei Vertebrati superiori, è formato da architetture piccole, ma assi superiori al livello cellulare: gli "osteoni". Si tratta di fasci colonnari di lamelle disposte a cilindri concentrici. Al centro del cilindro rimane un canalicolo vuoto: il "canale di Havers", che consente il passaggio dei vasi sanguigni necessari alla nutrizione del tessuto.

In sezione trasversale, gli osteoni appaiono come sistemi di anelli concentrici. Stiamo osservando un femore umano.

Fig. 71 – L'illuminazione obliqua non aggiunge molto: il preparato è colorato (emallume-eosina) e comunque molto rifrangente. Il contrasto è comunque buono.

Si noti che, inframmezzate alle lamelle concentriche, vi sono tante piccole cavità ellittiche: in ognuna di esse è alloggiato un osteocita, una di quelle cellule che costruiscono il tessuto osseo. Il rimanente dello spazio, che è la maggior parte, è costituito da una matrice, la sostanza intercellulare, composta da materiale organico, fibre connettivali, fosfato e carbonato di calcio. Tutta questa matrice è secreta proprio dagli osteociti.

Fig. 72 – Anche il campo scuro non è di grande giovamento: il preparato è troppo rifrangente e troppo pieno di strutture. In contrasto di fase sarebbe anche peggio.

Fig. 73 – Illuminante è invece la radiazione polarizzata: la classica croce di Malta ci ricorda che abbiamo di nuovo a che fare con materiale costituito da molecole organiche allungate (fibre collagene) e/o da componenti minerali (i fosfati ed i carbonati sopra nominati), tutti birifrangenti.

Il colore generale rosato dipende dalla colorazione preventiva del preparato.

Fig. 74 – Eccoci in radiazione polarizzata, con l'aggiunta del compensatore λ ("Rosso di 1° ordine"). Può darsi che la distribuzione dei colori ci indichi come sono orientate le "direzioni principali" del materiale birifrangente, ma anche l'occhio vuole la sua parte ...

Fig. 75 – Una rapida incursione nel tessuto muscolare, alla ricerca delle caratteristiche striature trasversali dei muscoli scheletrici "volontari" (lingua di coniglio, colorata). Qui si tratta di rivelare le striature, che sono finissime. Il fondo chiaro non dice granché, anche perché il preparato è vecchio e scolorito.

Fig. 76 – Le striature sono ben visibili nei tre fasci inclinati, che sono paralleli alla superficie della sezione. Gli altri fasci sono stati sezionati trasversalmente e quindi i piani delle loro striature risultano più o meno paralleli alla sezione.

Questa immagine in illuminazione obliqua sembra non avere nulla da invidiare a quelle che seguono.

Fig. 77 – Anche il contrasto di fase si comporta bene. Gli aloni sono sempre fra i piedi, ma il contrasto è ottimo, nonostante un preparato "troppo pieno".

Fig. 78 - Anche la radiazione polarizzata può aiutare: le fibrille muscolari sono birifrangenti poiché sono costituite in gran parte da molecole allungate, fra loro parallele, di due proteine: actina e miosina. La macchia chiara centrale era appena visibile nelle foto precedenti (macchia scura nella foto 75).

Figg. da 79 a 82 – Per dimostrare che ogni tecnica 83 va utilizzata solo in certi casi basta poco: un oggetto molto rifrangente, e magari di forte spessore.

Si tratta di alcuni Foraminiferi fossili. Tutte le tecniche danno forte contrasto, ma nessuna offre informa-

qua, fondo scuro e contrasto di fase.

Ora proviamo con un oggetto minerale: una sezione di andesite, una roccia vulcanica effusiva (magma emerso e raffreddato in superficie), a grana fine. La composizione mineralogica è di tipo dioritico (feldspati, biotite, orneblenda, quarzo). In questo campione (La Garde, Var.) è presente anche augite, che appartiene alla famiglia dei pirosseni (silicati di calcio, magnesio, ferro e metalli alcalini).

Fig. 83 - II campo chiaro produce già un buon contrasto per via delle differenze di indice di rifrazione fra i vari granuli cristallini. Dato lo spessore della sezione (circa 30μ), quasi tutti i minerali sono più o meno trasparenti.

Fig. 84 – L'illuminazione obliqua produce un gradevole effetto di rilievo ma, essendo tale rilievo dovuto a differenze di indice, può produrre false interpretazioni: le superfici della sezione di roccia sono piane, lucide e parallele e non esiste alcun rilievo.

Fig. 85 - Il fondo scuro crea una tale confusione di chiari-scuri che non se ne trae molto vantaggio.

Fig. 86 - II contrasto di fase è l'ultima tecnica da usare per un oggetto simile. L'immagine sarà anche ben contrastata, ma non ci si capisce nulla.

Fig. 87 – In radiazione polarizzata, a polarizzatori non del tutto incrociati, cominciano a comparire alcuni elementi. Ruotando il tavolino girevole del microscopio polarizzatore, misurando certi angoli, registrando i "colori d'interferenza", ecc. si possono identificare le varie specie mineralogiche.

Fig. 88 – L'uso del compensatore "Rosso di 1° ordine" o di compensatori regolabili di vario tipo consente di acquisire altri valori e precisare la diagnosi.

L'identificazione delle specie mineralogiche con l'esame microscopico è stata per decenni la principale tecnica utilizzata. Da molti anni sono però entrate in uso tecniche più sbrigative che si avvalgono della diffrazione degli elettroni o dei raggi X ed operano anche su campioni polverizzati.

CONCLUSIONI

Dopo un catalogo così scarso ed incoerente, si può ancora tentare di trarre qualche conclusione, il che era poi lo scopo di questo articolo.

— È ovvio come il fondo chiaro sia la tecnica più semplice e più economica. Ed è la più usata. Magari anche la più utile.

Quando il contrasto è scarso, occorre resistere alla tentazione di chiudere il diaframma d'apertura poiché questo fa perdere luminosità e soprattutto risoluzione.

-- Le "tecniche di contrasto" sono ovviamente preziose con oggetti incolori o non colorati, ma soffrono sempre di qualche inconveniente.

— L'illuminazione obliqua è semplicissima ed economica e si passa facilmente da fondo chiaro ad illuminazione obliqua semplicemente maneggiando un cartoncino sotto al condensatore. Ma con un condensatore normale il campo difficilmente avrà una brillanza uniforme. L'impressione di rilievo è paragonabile a quella del DIC, ma non produce colori. Le caratteristiche dell'oggetto che producono l'impressione di rilievo sono le differenze di cammino ottico, sia nell'illuminazione obliqua, sia nel DIC.

Il contrasto nell'immagine negli ultimi due casi ha una direzione preferenziale; quindi le strutture allungate hanno un contrasto variabile a seconda del loro orientamento.

— Il contrasto di fase non produce contrasto con direzione preferenziale, ma l'alone che accompagna ogni linea di confine fra oggetti diversi può nascondere oggetti piccoli vicini alle linee di confine stesse⁵. Inoltre un corredo di fase è molto costoso e richiede un'accurata centratura dei diaframmi anulari. In genere, quando si cambia l'obbiettivo occorre sostituire anche il diaframma anulare.

— Il fondo scuro non presenta alone ed offre il massimo contrasto possibile È facile da ottenere con un condensatore normale ed un diaframma anulare, purché l'apertura dell'obbiettivo non superi 0,5 - 0,6. Per gli obbiettivi forti a secco occorre un condensatore *ad hoc* e tanto più per quelli ad immersione.

-- Sia per il contrasto di fase che per il fondo scuro, l'oggetto deve essere molto "pulito" cioè contenere pochi oggetti piccoli in un campo vuoto ed omogeneo. Anche i corpi estranei, come gli immancabili granuli di polvere, specialmente se fuori fuoco (per es. sulla superficie esterna del coprioggetto), sono assai fastidiosi poiché producono aloni con forte contrasto (vedi le foto 38 e 39 a pag. 20 oppure la foto 44 a pag. 23).

— La radiazione polarizzata può dare preziose informazioni sulla disposizione ordinata delle molecole dell'oggetto, anche in campo biologico. Per un esame qualitativo, la tecnica richiede solo due filtri polarizzanti, del tipo Polaroid, e magari qualche compensatore; utile un tavolino girevole. Non produce aloni né direzioni preferenziali del contrasto.

Poiché la polvere è in genere costituita da residui vegetali o minerali birifrangenti, essa crea spesso macchie ed aloni chiari.

— Il DIC opera in radiazione polarizzata e quindi la sensazione del rilievo, oltre ad essere dovuta alle differenze di cammino ottico, non alla forma dell'oggetto, è disturbata dalla presenza di oggetti o parti di oggetto birifrangenti; ciò può condurre a false interpretazioni. Né il contrasto di fase, né il fondo scuro, né l'illuminazione obliqua soffrono di questa limitazione.

-- Oltre a quello che si è appena detto, il DIC richiede qualche regolazione in più e costa molto caro. In genere occorre cambiare il prisma di Wollaston quando si cambia obbiettivo.

-- Una variante del fondo scuro, l'illuminazione secondo Rheinberg, in tutte le sue varianti, può dare immagini accattivanti, ma non fornisce ulteriori informazioni sulle caratteristiche dell'oggetto rispetto al campo scuro.

-- Il contrasto d'ampiezza, con tutte le sue varianti, può dare risultati migliori dell'illuminazione obliqua ma usa spesso radiazione polarizzata e la sua regolazione è critica. Il contra-

⁵ Vedi in questo sito l'art. n° 25 – "La formazione dell'alone nel contrasto di fase".

sto ha ancora una direzione preferenziale.

Dunque, nessuna tecnica può risolvere tutti i problemi né fornire tutte le informazioni possibili sulle proprietà dell'oggetto. Bisognerebbe disporre degli accessori per tutte le tecniche speciali e provarle una per una in relazione ad ogni nuovo oggetto. Una conclusione un po' scomoda.

In fondo, sono le caratteristiche dell'oggetto ad indicare come occorre predisporre lo strumento e quale tecnica può essere più adatta.

Ed ancora: sono quelle caratteristiche, in relazione agli oggetti che ci si aspetta di esaminare più di frequente, che indicheranno quale dovrà essere il corredo dello strumento che ci si prepara ad acquistare.

Ultima indicazione: conoscere il meccanismo di funzionamento delle varie tecniche è necessario per prevenire errori d'interpretazione. Si veda in proposito la fig. 84 a pag. 41.