

FONDAZIONE “GIORGIO RONCHI”
XI

GIOVANNI PIETRO SINI

MICROSCOPIA INTERFERENZIALE



L'autore ed il gestore del sito www.FUNSCI.com
ringraziano la Fondazione “Giorgio Ronchi” di Firenze
per aver consentito la riedizione di questo testo, il quale può essere copiato
ed utilizzato liberamente, purché a titolo gratuito e con citazione della fonte.

FIRENZE 1968

MICROSCOPIA INTERFERENZIALE

GIOVANNI PIETRO SINI *

RIASSUNTO. - Si descrive il principio e lo scopo della microscopia interferenziale, i suoi vantaggi ed i suoi svantaggi rispetto alle altre tecniche della microscopia. Si descrivono poi i vari metodi possibili nel campo della microscopia interferenziale, i risultati conseguibili ed i vari strumenti finora realizzati. In ogni caso si è cercato di sottolineare il principio di funzionamento, i pregi ed i difetti essenziali di ogni metodo e di ogni strumento.

RÉSUMÉ. - On décrit le principe et le but de la microscopie interférentielle, ses avantages et ses désavantages en comparaison des autres techniques de la microscopie. On décrit par la suite les différentes méthodes possibles dans le domaine de la microscopie interférentielle, les résultats qu'on peut obtenir et les différents instruments réalisés jusqu'ici. En chaque cas on a cherché a souligner le principe de fonctionnement, les prix et les défauts essentiels de chaque méthode et de chaque instrument.

SUMMARY. - The principle and the aim of interference microscopy is described. Its advantages and disadvantages are compared with those of the other techniques of microscopical analysis. The various methods one may use in the field of interference microscopy, the results one may achieve and the instruments so far designed are discussed. In each case we strove to point out the working principle, the essential weak and strong points of the different methods and instruments.

ZUSAMMENFASSUNG. - Wir stellen hier das Prinzip und die Ziele der Interferenzmikroskopie vor und vergleichen ihre Vor- und Nachteile mit anderer Mikroskopiertechniken. Sodann beschreiben wir die verschiedenen Methoden der Interferenzmikroskopie, die Rückschlüsse, die man ziehen kann, und die verschiedenen bereits existierenden Instrumente. Wir versuchen jedenfalls das Arbeitsprinzip und die wesentlichen Werte und Schwächen jeder Methode und jedes Instruments herauszustellen.

* Del C.N.A.F. – Istituto Nazionale di Fisica Nucleare di Bologna

PRESENTAZIONE

È solo in tempi relativamente recenti che i metodi interferenziali sono stati applicati alla microscopia: è del 1911 un micro-interferometro a riflessione di Sagnac e del 1930 un micro-interferometro a trasparenza di Lebedeff.

Strumenti veramente pratici sono comparsi solo dopo il 1930 e la maggior parte degli strumenti del genere oggi in commercio si rifanno agli ultimi pochi decenni.

Una tecnica giovane, dunque.

Ma il numero degli strumenti oggi disponibili e dei principi a cui si ispira il loro funzionamento è abbastanza vasto ormai da giustificare una rassegna a carattere riassuntivo.

Intendiamo infatti nelle pagine che seguono elencare i metodi di osservazione interferenziale finora ideati ed i principali microscopi oggi disponibili che facciano uso di metodi interferenziali. Lo scopo non è di scendere in sottili disquisizioni teoriche sulla bontà dei metodi, ma di fornire a tutti coloro che possono avere interesse alla microscopia interferenziale per qualunque ricerca di carattere scientifico o tecnologico, una breve rassegna delle tecniche e degli strumenti attualmente disponibili descrivendo di ognuno pregi e difetti essenziali. Da ciò potrà venire un aiuto nella scelta e nell'impiego di tecniche o strumenti interferenziali.

La presente rassegna non pretende di essere completa ed aggiornata: troppi sono i modelli finora posti in commercio e troppe le varianti apportate loro dai costruttori; ma almeno i modi di funzionamento essenziali sono descritti, in modo da permettere una scelta oculata ed orientare l'utilizzatore sulle possibilità offerte dalle varie soluzioni pratiche.

NB: La riedizione di questo lavoro del 1968 dopo quasi quarant'anni può sembrare fuori posto, nonostante qualche aggiornamento, ma va notato che i principi teorici utilizzati sono ancora gli stessi, allora come oggi. Gli strumenti recenti si basano sugli stessi schemi, che sono stati semplicemente adattati a qualche nuova esigenza di lavoro. In sostanza, poche novità. Altri modelli classici e tecnicamente validissimi non sono più in produzione da anni o decenni, poiché erano troppo critici nelle regolazioni o semplicemente poiché le loro applicazioni, e quindi il numero dei pezzi venduti, sono troppo scarsi per ammortizzare gli altissimi costi di produzione.

Del resto, in campo biomedico almeno, la complessità e la criticità delle tecniche interferenziali ha portato quasi tutti i costruttori a concentrarsi sul metodo differenziale (DIC).

CARATTERI GENERALI DELLA MICROSCOPIA INTERFERENZIALE

Lo scopo

Da un lato, la microscopia interferenziale si propone lo stesso fine del contrasto di fase: rendere visibili gli «oggetti di fase», cioè gli oggetti trasparenti che differiscono dal campo circostante non per un diverso assorbimento («oggetti d'ampiezza»), ma per un diverso cammino ottico. La differenza di cammino ottico può essere data da una differenza di indice (come nel caso di oggetti immersi in un liquido e racchiusi fra due vetri da microscopio) oppure da una differenza di spessore (come nel caso di oggetti trasparenti di spessore ineguale).

In questo senso, si ha ancora identità di scopi fra microscopia interferenziale e microscopia a contrasto di fase quando si tratti di osservare la superficie di oggetti opachi (osservazioni «per riflessione» o «per episcopia»): si tratta ancora di rivelare sfasamenti della radiazione incidente dovuti a differenze di livello nella superficie osservata.

Ma sotto un altro aspetto i due metodi differiscono radicalmente: il microscopio interferenziale permette di misurare il cammino ottico e da ciò, come vedremo, l'indice di rifrazione e lo spessore dell'oggetto osservato, il contrasto di fase permette solo di **rivelare** l'oggetto. Il primo è dunque uno

strumento di misura, e fornisce indicazioni quantitative, il secondo è uno strumento di osservazione e fornisce dati qualitativi. È come mettere a confronto un calibro ed una lente di ingrandimento: col primo si misura, con la seconda si osserva.

Vedremo poi che questo vantaggio del microscopio interferenziale ne rende l'uso insostituibile in certi casi, ma è compensato ad usura da numerosi svantaggi.

Il principio

Ogni interferometro, e quindi ogni microscopio interferenziale, consiste essenzialmente di un dispositivo capace di dare due (qualche volta parecchie) onde ottiche, piane o non, fra loro coerenti, cioè il cui rapporto di fase è costante nel tempo per ogni coppia di punti corrispondenti sulle due onde. Delle due onde, una attraversa il campo oggetto e viene quindi perturbata dall'oggetto nel senso che dopo di esso l'onda non ha più andamento regolare, ovvero la sua fase non è costante da punto a punto. L'altra onda rimane imperturbata, cioè conserva una forma geometrica regolare e, quando le due onde vengono ricombinate in modo da interferire, se ne potrà ricavare un'immagine contenente l'informazione legata alla struttura dell'oggetto. L'oggetto apparirà rispetto al campo circostante con una luminosità od un colore diverso a seconda della fase delle due onde che interferiscono e del tipo di radiazione emessa dalla sorgente utilizzata: se l'oggetto non esistesse e le due onde interferenti avessero lo stesso andamento, la loro relazione di fase sarebbe la stessa in tutti i punti del campo, ed il campo stesso apparirebbe di intensità (o colore) uniforme in relazione al risultato dell'interferenza fra le due onde citate. L'oggetto perturba localmente la fase di una delle onde, cioè la relazione di fase fra le onde interferenti, e quindi la luminosità del campo (o il suo colore) in corrispondenza della propria immagine.

I vari microscopi interferenziali differiscono essenzialmente nel modo di ottenere le due (o le parecchie) onde coerenti, l'onda-oggetto perturbata e l'onda di riferimento imperturbata, e nel modo di ricombinarle. Si tratterà dunque di differenze tecniche, ma il principio rimane.

In ogni caso un microscopio interferenziale può presentare uno o più dei seguenti metodi di funzionamento, piuttosto diversi per risultati pratici e campo di applicazione:

A) *Contrasto interferenziale semplice (« Tinta unita »).*

Supponiamo che l'onda di riferimento e l'onda-oggetto siano del tutto indipendenti, in modo che l'oggetto non alteri in nulla l'onda di riferimento. È il caso più semplice e più razionale, che tutti i microscopi interferenziali dovrebbero adottare, ma che richiede tali complessità costruttive da essere spesso sostituito con sistemi meno razionali ma più economici, che vedremo.

Supponiamo che le due onde coerenti, al momento di ricombinarsi e di interferire, siano perfettamente parallele, cioè presentino la stessa fase relativa in ogni punto. Lo strumento conterrà un qualche elemento capace di alterare la fase di una delle due onde senza alterarne l'inclinazione. Supponendo per ora che non vi sia alcun oggetto nel cammino ottico, le due onde interferiscono dunque con una fase che dipende dallo stato di regolazione dello strumento.

Se si opera con radiazione monocromatica (in pratica, con uno spettro sufficientemente ristretto di radiazioni quale può essere ottenuto da una lampada ad incandescenza o ad arco seguita da un filtro interferenziale) si avrà una luminosità uniforme nel campo immagine, il valore della quale dipenderà dalla fase relativa delle due onde dell'interferometro. Con onde in fase si avrà luminosità massima (interferenza positiva); con onde in opposizione di fase, luminosità minima (interferenza negativa). Se si usa invece luce bianca, il campo immagine apparirà con una luminosità od un colore dipendente dalla fase relativa delle due onde, e la relazione fra fase e colore si ricava dalla «serie di Newton» cioè dalla serie delle frange colorate di interferenza in luce bianca, ben note a chi ha usato il microscopio polarizzatore a Nicol paralleli.

Se l'oggetto ha perturbato in parte o totalmente l'onda che ha attraversato il campo oggetto, ne risulterà una variazione della fase relativa delle due onde in corrispondenza dell'immagine dell'oggetto. Tale variazione di fase produrrà una luminosità (in radiazione monocromatica) od un

colore (in luce bianca) dell'immagine dell'oggetto diverso da quello del fondo. Ecco l'immagine dell'oggetto spiccare sul fondo per « contrasto interferenziale » (fig. 2, in confronto alla fig. 1).

Poiché il fondo circostante l'oggetto ha una luminosità od un colore uniforme, questo metodo di osservazione viene indicato anche come « tinta unita » (« teinte plate » degli autori francesi).

Per l'osservazione qualitativa, in luce bianca è utile portare lo sfasamento fra onda oggetto e onda di riferimento a 280 nm circa in modo da avere opposizione di fase (estinzione) per una lunghezza d'onda pari a 560 nm circa (zona intermedia dello spettro ottico); il colore risultante del campo visuale sarà allora il magenta, cioè la « tinta sensibile » o « rosso di 1° ordine », largamente sfruttato nei microscopi polarizzatori, risultante dalla sottrazione della banda del verde da uno spettro continuo.

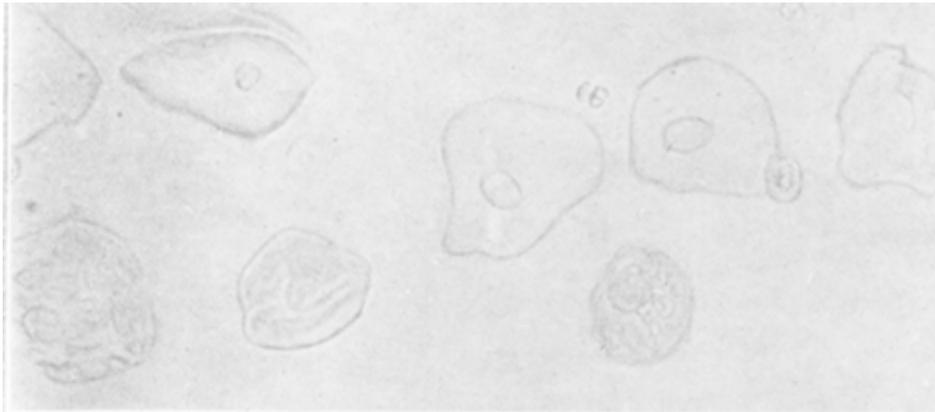


FIG. 1

Cellule epiteliali carcinomatose non colorate. Campo chiaro. (Da: K. Michel, Zeiss Oberkochen, Notice 40-560 e, 1961).

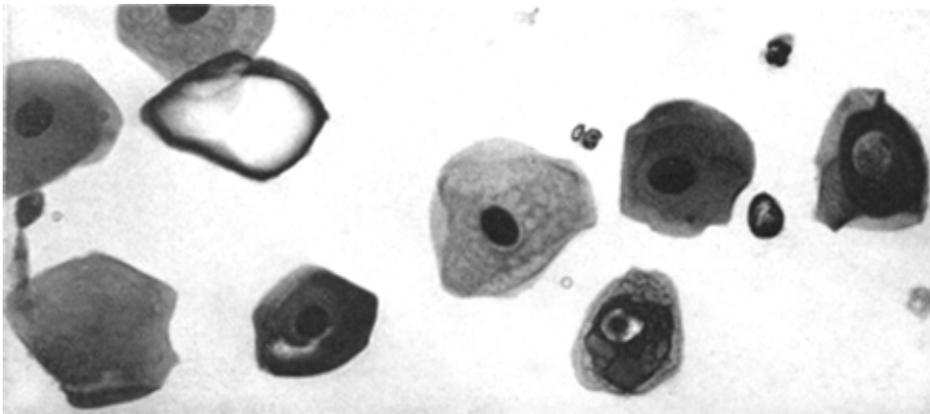


FIG. 2

Stesso preparato di fig. 1, osservato in contrasto interferenziale a tinta unita, positivo (oggetto più scuro del fondo); regolazione per la minima luminosità dell'oggetto. (Stessa fonte di fig. 1).

Per il minimo sfasamento introdotto dall'oggetto nell'onda che l'attraversa si ha uno spostamento della banda di lunghezze d'onda sopresse, ed il colore magenta vira rapidamente verso il blu o il giallo-arancio. In queste condizioni si hanno cioè i cambiamenti di colore più vistosi in corrispondenza dell'immagine dell'oggetto. Il metodo possiede la massima sensibilità.

Se la fase relativa delle due onde dell'interferometro viene portata con le apposite regolazioni a $\lambda/2$, l'oggetto apparirà chiaro su fondo nero in radiazione monocromatica, poiché le due onde sono in opposizione di fase e si elidono salvo in corrispondenza dell'oggetto che altera la fase dell'onda-oggetto.

Questa situazione assomiglia apparentemente al campo oscuro, ma con due differenze

essenziali: a) l'onda diretta che dà il fondo dell'immagine non viene interrotta (come nel campo oscuro) ma solo estinta per interferenza. L'interruzione dell'onda diretta dà luogo a fenomeni di diffrazione in corrispondenza dell'oggetto (a parte la diffrazione operata dalla pupilla dell'obbiettivo), il che non avviene nel microscopio interferenziale. b) L'intensità dell'immagine prodotta dal campo oscuro è proporzionale al quadrato della variazione di fase introdotta dall'oggetto nella radiazione incidente; questo significa che, di un oggetto omogeneo, vengono visti solo i contorni, cioè i punti in cui si ha una variazione rapida di indice o di spessore; una sferetta trasparente immersa in un liquido di diverso indice apparirebbe cioè come un cerchio. Qualcosa del genere avviene anche nel contrasto di fase, ma con minore intensità poiché la luminosità dell'immagine dipende dallo sfasamento operato dall'oggetto, non dal suo quadrato. Si pensi al fenomeno degli « aloni » del contrasto di fase.

Nell'immagine interferenziale tutto ciò non avviene ed un oggetto omogeneo risulta di luminosità (o colore) omogeneo, e non appaiono solo i suoi bordi (fig. 3).

Il contrasto interferenziale a tinta unita **permette la misura dello sfasamento introdotto dall'oggetto nella radiazione che lo attraversa, cioè la misura della differenza di cammino ottico fra oggetto e campo circostante.** Conoscendo il cammino ottico del campo, si ricava il cammino ottico nell'oggetto.

Ecco il metodo di misura: si mette a fuoco l'immagine dell'oggetto; si regola la fase relativa delle due onde dell'interferometro con l'apposito compensatore in modo da dare al campo immagine la minima luminosità (l'occhio è un sensibile strumento come « rivelatore di minima »)(fig. 3). Si legge a questo punto la posizione del compensatore, cioè lo sfasamento da esso introdotto, capace di dare il fondo oscuro. Si regola di nuovo il compensatore in modo da rendere il più possibile oscura l'immagine dell'oggetto, trascurando ora il fondo immagine. Si esegue una nuova lettura dello sfasamento introdotto dal compensatore; la differenza delle due letture sul compensatore dà la misura dello sfasamento introdotto dall'oggetto.

L'apprezzamento della minima luminosità nel campo visivo e nell'oggetto non solo può essere eseguito visivamente, ma reso più preciso con metodi fotometrici diretti od indiretti. Esistono infatti in commercio vari dispositivi fotometrici anche automatici, oculari « a penombra », ecc.

Con un buon strumento ed un minimo di cura, un tale metodo permette di misurare sfasamenti inferiori a $\lambda/100$, cioè differenze di cammino ottico di 50 Å o meno, senza uso di tecniche fotometriche speciali.

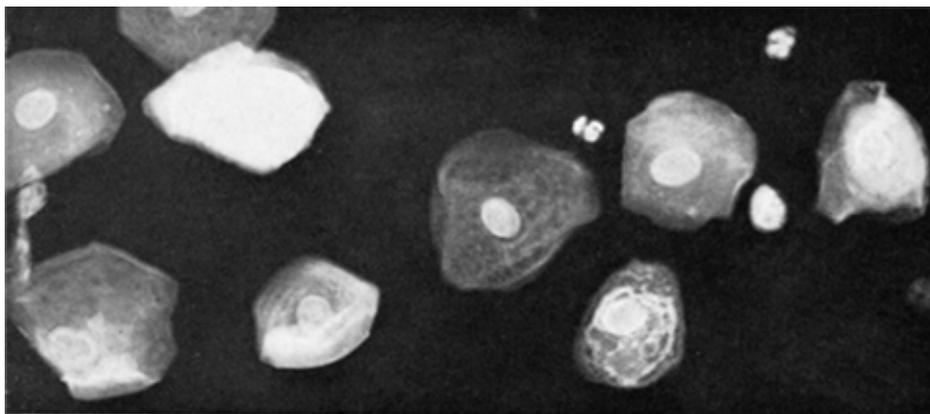


FIG. 3

Stesso preparato di fig. 1, osservato in contrasto interferenziale a tinta unita, negativo (oggetto più chiaro del fondo); regolazione per la minima luminosità del fondo immagine. Si noti che l'oggetto appare in tutta la sua interezza, mentre in campo oscuro si vedrebbero solo i suoi bordi. (Stessa fonte di fig. 1).

Ma poiché il cammino ottico di un oggetto è dato dal prodotto del suo indice di rifrazione per il suo spessore, la differenza di cammino ottico fra oggetto e campo circostante così misurata è equivalente alla differenza $(n \cdot d) - (n' \cdot d')$ dove « n » è l'indice di rifrazione dell'oggetto, « n' » del mezzo circostante; « d » è lo spessore dell'oggetto, « d' » del mezzo circostante. Se l'oggetto è immerso in un liquido racchiuso fra due vetrini paralleli, si può considerare uno spessore di liquido

pari a « d », per cui $d' = d$. Conoscendo « n' » (con misure rifrattometriche) dal valore di « d » (= « d' »), in base alla formula di cui sopra si ricava « n » e viceversa:

$$(1) \quad (n \cdot d) - (n' \cdot d') = (n - n') d = T_1 \quad d \cdot n = T_1 + d \cdot n'$$

T_1 è la differenza di cammino ottico sopra citata, misurata col metodo dell'annerimento massimo nel campo e nell'oggetto.

Ma l'equazione (1) è di primo grado, e se due valori sono incogniti, ad esempio « n » e « d » come avviene di solito quando si osserva un oggetto assai piccolo non direttamente misurabile, l'equazione non si può risolvere.

Supponiamo allora di ripetere la misura di differenza di cammino ottico, cioè di ricavare un secondo valore di T_1 (che chiameremo T_2) in corrispondenza di un diverso valore dell'indice del mezzo circostante all'oggetto (che chiameremo « n'' »); si ha allora una seconda equazione di primo grado a due incognite:

$$(2) \quad (n - n'') d = T_2 \quad d \cdot n = T_2 + d \cdot n''$$

Combinando le due equazioni (1) e (2) in un sistema di primo grado (risolvibile) otteniamo:

$$(3) \quad \begin{array}{l} | d \cdot n = T_1 + d \cdot n' \\ | d \cdot n = T_2 + d \cdot n'' \end{array}$$

da cui:

$$T_1 + d \cdot n' = T_2 + d \cdot n'', \text{ cioè: } d(n'' - n') = T_1 - T_2$$

Infine:

$$(4) \quad d = (T_1 - T_2) / (n'' - n')$$

Dalla (4), conoscendo T_1 e T_2 , misurabili al microscopio interferenziale e conoscendo « n' » ed « n'' » misurabili al rifrattometro, si ricava « d », cioè lo spessore dell'oggetto. Sostituendo il valore così calcolato di « d » in una delle equazioni (3) si ricava « n », cioè l'indice di rifrazione dell'oggetto:

$$(5) \quad n = (T_1 + d \cdot n') / d$$

Le due misure di « T » che si sono utilizzate per i calcoli corrispondono, si è detto, a due diversi valori dell'indice di rifrazione del liquido in cui è immerso l'oggetto: « n' » ed « n'' ».

Per variare tale indice vi sono vari sistemi:

1) sostituire il liquido di inclusione dell'oggetto con altro di indice noto; per preparati biologici si usano spesso soluzioni di albumina di diversa concentrazione. Naturalmente il liquido di inclusione deve essere tale da non reagire in alcun modo con l'oggetto né provocarvi modificazione alcuna.

2) variare la temperatura del preparato e misurare l'indice del mezzo di inclusione alle due temperature usate. Si suppone che le variazioni di temperatura non alterino l'oggetto.

3) variare la lunghezza d'onda della radiazione usata, e misurare l'indice del mezzo di inclusione alle due lunghezze d'onda usate.

Con due sole misure, il microscopio interferenziale permette dunque di determinare indice e spessore dell'oggetto.

Questo metodo di misura, almeno in principio, è applicabile a tutti gli strumenti capaci di sfruttare il metodo del contrasto interferenziale. È sufficiente la presenza di un compensatore nel cammino di una delle due onde che devono interferire, capace di variare in limiti abbastanza ampi la fase dell'onda che l'attraversa.

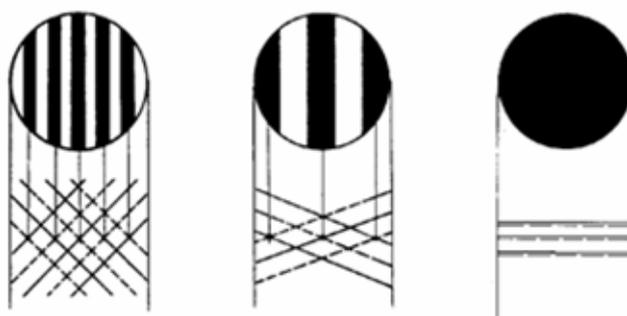


FIG. 4

Schema illustrante il passaggio da interferogramma a contrasto interferenziale in tinta unita: con forte inclinazione fra le onde interferenti (a sinistra) si hanno frange strette; diminuendo l'inclinazione fra le onde si allarga il sistema di frange (al centro) ed al limite si arriva al parallelismo fra le onde (a destra) e quindi ad una larghezza infinita fra le frange, cioè alla tinta unita. (Da: F. Walter (1963), «Blut», IX, E. Leitz 92-52-106).

B) Metodo delle frange (« Interferogramma »)

Supponiamo ancora di disporre di un micro-interferometro in cui l'oggetto non perturba l'onda di riferimento. Sul cammino di una delle due onde si interpone un elemento, ad es. un cuneo di vetro, capace di variare di poco l'inclinazione dell'onda che l'attraversa. Al momento di interferire, le due onde non sono più parallele, e la loro fase relativa varia da punto a punto. A seconda del valore di questa fase relativa, la luminosità di ogni punto del campo (o il suo colore operando in luce bianca) sarà diverso e si vedrà apparire nel campo immagine un sistema di frange chiare e scure, se si opera in radiazione monocromatica o un sistema di frange colorate rappresentanti la serie di Newton, se si opera in luce bianca. In ogni caso, le frange rappresentano linee di egual differenza di fase fra le due onde. Se le due onde sono piane, le frange sono diritte e parallele allo spigolo del diedro formato dalle due onde.

Se la radiazione « monocromatica » è contenuta in uno spettro sufficientemente stretto, le frange che si ottengono hanno tutte la stessa larghezza ed intensità, entro limiti molto ampi. In luce bianca, invece, si hanno tanti sistemi di frange di diversa larghezza quante sono le lunghezze d'onda presenti, data la variazione del ritardo di fase al variare della lunghezza d'onda; si ha quindi, fin dalle prime frange d'interferenza, una parziale sovrapposizione dei vari sistemi di frange, e salendo con l'ordine delle frange, si arriva ad un tale miscuglio di colori che alla fine le frange scompaiono dando luogo ad una tinta uniforme.

Il passaggio da contrasto interferenziale ad interferogramma è schematizzato nella fig. 4.

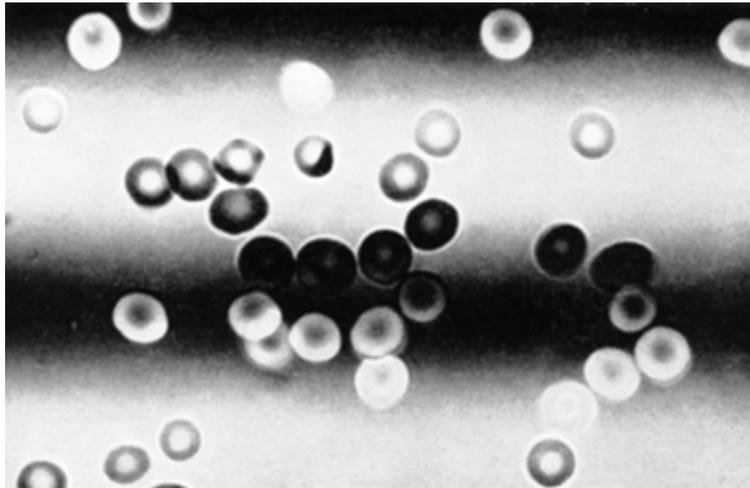


Fig. 5

Eritrociti non colorati da sangue umano. Interferogramma a grande passo di frange. Si noti che gli oggetti possono apparire più chiari o più scuri del fondo a seconda della relazione di fase fra le onde interferenti nel punto ove si trova l'oggetto. (Stessa fonte di fig. 4).

Quando il passo delle frange diviene molto più piccolo dell'oggetto (fig. 6) l'immagine dell'oggetto scompare e rimane segnata solo dalle interruzioni delle frange. È ovvio che lo spostamento delle frange in corrispondenza dell'immagine dell'oggetto è dovuto allo sfasamento dell'onda che ha attraversato l'oggetto stesso, cioè alla differenza di cammino ottico fra oggetto e campo circostante: dati due piani secanti, la retta d'intersezione (nel caso nostro la frangia) si sposta se uno dei piani si muove secondo la normale ad essi (cioè se un'onda viene sfasata, nel caso nostro). Se l'oggetto è immerso in un mezzo trasparente contenuto fra due vetrini paralleli, la differenza di cammino ottico fra oggetto e campo dipende solo da una differenza di indice; in caso contrario, possono entrare in gioco differenze di spessore.

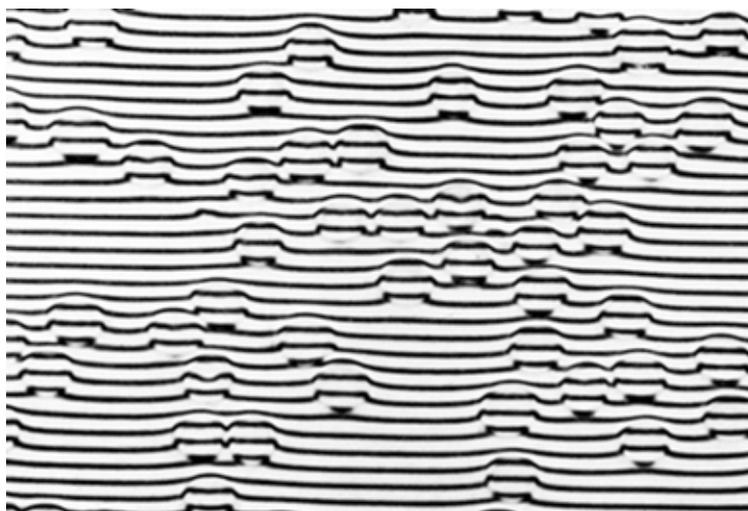


FIG. 6

Stesso preparato di fig. 5. Interferogramma con passo delle frange inferiore alle dimensioni degli oggetti. Si apprezza uno spostamento laterale delle frange di circa mezza lunghezza d'onda in corrispondenza dell'oggetto. (Stessa fonte di fig. 4).

Si può dire che lo spostamento trasversale di una frangia per una distanza pari al passo delle frange equivale ad uno sfasamento operato dall'oggetto pari a λ , essendo λ la lunghezza d'onda della radiazione usata. Frazioni di « frangia » si apprezzano misurando lo spostamento trasversale di una

frangia in corrispondenza dell'immagine dell'oggetto; se « y » è lo spostamento della frangia (in unità lineari qualunque) e « z » il passo medio delle frange (nelle stesse unità), lo sfasamento operato dall'oggetto sarà:

$$(6) \quad T = d(n - n') = \lambda y / z \quad \text{ove } \lambda \text{ ha il solito significato. Vedi la fig. 7.}$$

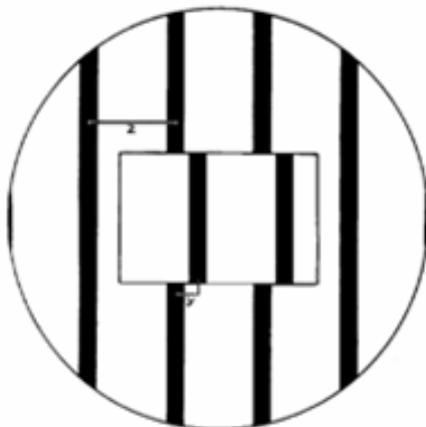


FIG. 7

Schema illustrante lo spostamento delle frange interferenziali in corrispondenza di un oggetto « di fase ». Se « y » è lo spostamento laterale di una frangia e « z » il passo fra le frange, la differenza di cammino ottico fra oggetto e campo circostante è: $T = \lambda y / z$ (Stessa fonte di fig. 4).

Se si allargano opportunamente le frange, una eguale frazione di frangia si apprezza meglio all'esame visivo e la sensibilità del metodo aumenta. La variazione del passo delle frange si ottiene variando l'angolo formato dalle due onde interferenti a mezzo di appositi compensatori.

Comunque, il metodo di misura diretto in base allo spostamento delle frange è meno sensibile del metodo del contrasto interferenziale in tinta unita; non si supera infatti una sensibilità di $\lambda/50$, la metà del metodo precedente.

Un aumento di sensibilità si può ottenere a mezzo di laboriose misure: si esegue una misura fotometrica dell'interferogramma, o della sua fotografia, ricavando la densità ottica, punto per punto. Tracciando il grafico delle linee di egual densità ottica (linee equi-densitometriche) si possono apprezzare le minime deviazioni delle frange.

Applicando la tecnica equi-densitometrica allo studio degli interferogrammi in radiazione monocromatica si arriva ad una sensibilità di $\lambda/200$ ed oltre, quindi molto più che con gli altri metodi citati. Si vedano in proposito i lavori di W. Krug e E. Lau nella rassegna bibliografica.

La misura di sfasamento dà poi la differenza di cammino ottico da cui si risale, come detto sopra, alla misura dell'indice e dello spessore dell'oggetto esaminato.

Va detto infine che, quando l'oggetto è più piccolo dell'intervallo delle frange, il metodo dell'interferogramma è difficilmente applicabile.

C) Lo sdoppiamento laterale (« *Shearing method* »)

Con numerosi strumenti che descriveremo più sotto è possibile sdoppiare il fascio di radiazione che attraversa il campo oggetto, cioè il preparato. I due fasci ottenuti sono più o meno paralleli e costituiscono l'onda di riferimento e l'onda-oggetto. Essi possono essere anche del tutto separati, ma attraversano entrambi il campo oggetto, e quindi l'onda di riferimento può essere perturbata dall'oggetto, cioè non avere più una fase costante. Se i due fasci sono separati prima dell'oggetto, vengono ricombinati dopo averlo attraversato, ed in questo punto interferiscono.

Questo sistema prevede un solo condensatore ed un solo obiettivo, è quindi economico e perciò è spesso preferito dai costruttori.

Nel caso ideale, di oggetto piccolo che interessa una porzione trascurabile dell'onda di riferimento o se ne trova addirittura fuori, si può contare su di un'onda di riferimento non perturbata, ma ciò è assai problematico in pratica. In genere, l'oggetto viene attraversato da

entrambe le onde e si possono avere due immagini dell'oggetto, lateralmente spostate, magari entrambe a fuoco, dovute allo sdoppiamento del fascio; nel caso migliore, ognuna delle due immagini dell'oggetto, contenute nelle due onde, interferisce con una porzione non perturbata dell'altra onda.

Supponiamo allora che lo sdoppiamento laterale dell'immagine sia superiore alle dimensioni medie dell'oggetto: si hanno così due immagini ben distinte dell'oggetto, che non si sovrappongono. È questo lo « Sdoppiamento totale » (« Dédoublément total » degli autori francesi, « Total image splitting » degli inglesi).

Le due onde interferenti possono essere in fase, oppure longitudinalmente sfasate oltre che lateralmente spostate, a seconda del sistema ottico usato. La luminosità od il colore del fondo dipenderà dallo sfasamento fra le due onde, cioè si ricade nel caso del contrasto interferenziale, a parte lo sdoppiamento dell'immagine.

In certi strumenti, lo sfasamento fra le due onde è variabile con continuità, e si possono quindi eseguire le misure di cammino ottico sopra descritte (metodo dell'equiparazione della luminosità nell'oggetto e nel fondo); in altri casi, lo sfasamento è fisso, oppure variabile per quantità prefissate, e la misura è impossibile, a meno di apprezzare lo sfasamento operato dall'oggetto in base ai colori interferenziali presentati dall'immagine dell'oggetto e del fondo, come si fa per le misure di potere birfrangente presentato da oggetti cristallini, al microscopio polarizzatore.

Finora si è supposto di creare lo sdoppiamento laterale con strumenti in cui le due onde interferenti sono parallele: il colore o la luminosità del fondo sono omogenei. Ma in altri strumenti le due onde non sono parallele, per cui il campo visivo è solcato da un sistema di frange (monocromatiche o colorate a seconda della radiazione usata). Si ricade in questo caso nell'interferogramma, a parte lo sdoppiamento dell'immagine (fig. 8).

In certi strumenti è possibile variare con continuità l'inclinazione relativa delle due onde, fino al parallelismo; con ciò si varia a volontà la larghezza delle frange, fino ad avere la tinta unita (contrasto interferenziale). In altri strumenti esiste solo la possibilità di ottenere la tinta unita, oppure solo le frange, oppure è possibile alternare i due metodi senza poter variare la larghezza delle frange.

Lo sdoppiamento laterale dell'immagine può essere però anche molto piccolo, pari al limite di risoluzione dello strumento, cioè inferiore alla grande maggioranza degli oggetti osservabili. In questo caso, di un oggetto esteso si vedono solo gli orli (o le brusche variazioni di cammino ottico) poiché nel centro della sua immagine le due onde hanno lo stesso sfasamento che nel campo circostante (fig. 9). L'oggetto appare dunque solo per essere circondato da un orlo di diversa luminosità o di diverso colore creato dallo sfasamento locale delle due onde; si ha qualcosa di apparentemente simile al contrasto di fase, ma con lo svantaggio che le bordature dell'immagine dell'oggetto nascono da uno spostamento laterale di un'onda rispetto all'altra, e cioè si comportano come le ombre date da una sorgente posta di lato: il contrasto sarà massimo per i bordi perpendicolari alla direzione di spostamento dell'onda, e minimo per i bordi perpendicolari rispetto ai precedenti (lungo di essi lo spostamento laterale delle due onde tende ad essere nullo); si ha dunque una direzione preferenziale per il contrasto, cosa che non avviene col contrasto di fase per la forma anulare della lamina di fase (fig. 10).

Questo tipo di immagine è legato dunque alla variazione, alla differenza, di indice che si ha lungo il contorno dell'oggetto: ciò spiega il termine entrato largamente nell'uso di « contrasto interferenziale differenziale » o « differential interference contrast » (DIC). La tecnica, che oggi è molto diffusa, viene realizzata di solito secondo lo schema di Nomarski, che esamineremo più avanti.

Il colore di fondo del campo immagine dipenderà dallo sfasamento relativo imposto alle due onde; conviene in molti casi usare luce bianca e dare uno sfasamento alle due onde di circa 280 nm; ciò porta alla estinzione della regione intermedia dello spettro ottico per cui il campo appare color magenta. Si è visto che, in queste condizioni, la sensibilità del metodo è massima.

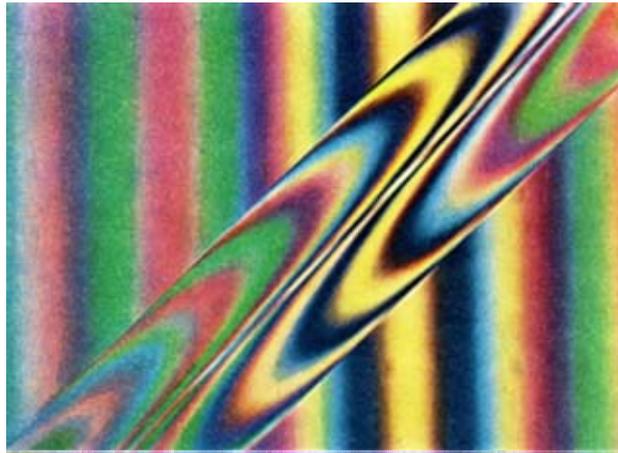


Fig. 8

Fibra di materia plastica immersa in olio minerale. Interferogramma in luce bianca con sdoppiamento totale di immagine: si vede l'immagine di due fibre, mentre il preparato ne contiene una sola. Che la duplicità dell'immagine sia un artefatto appare chiaro dalla diversa deformazione delle frange nelle due immagini: queste ultime sono contenute in due onde inclinate fra loro, e quindi la variazione di fase relativa procede in senso opposto. (Da: H. Beyer e G. Schöppe, Jena Review, I, 1965, Veb Carl Zeiss, Jena).

Questa tecnica di sdoppiamento minimo dell'immagine è stata chiamata anche « Sdoppiamento differenziale dell'immagine » (« Procédé différentiel » degli autori francesi, « Differential image splitting » degli inglesi); essa è capace di far apparire gli oggetti con una spiccata ombreggiatura, ma **incapace di fornire misure di sfasamento**, specie se l'oggetto ha una struttura complessa. Solo l'interpretazione dei colori di interferenza sui bordi dell'immagine può dare qualche indicazione in proposito (vedi il volume di M. Françon, « Le microscope à contrastes de phase et le microscope interférentiel », Ed. C.N.R.S., pag. 116).

Generalmente il metodo differenziale non si può alternare con lo sdoppiamento totale sullo stesso strumento, ma vi sono strumenti (vedi sotto) capaci di variare con continuità lo spostamento laterale delle due onde in modo da regolare a piacere lo sdoppiamento dell'immagine e passare gradatamente dallo sdoppiamento totale al metodo differenziale, con larghezza variabile delle ombreggiature.

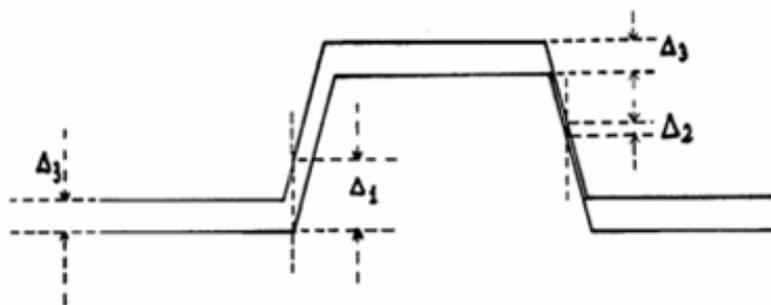


Fig. 9

Schema di formazione dell'immagine interferenziale con sdoppiamento differenziale. Un oggetto di struttura omogenea appare della stessa luminosità (o colore) del fondo poiché in corrispondenza della sua immagine la differenza di fase fra le due onde interferenti (Δ_3) è la stessa che si ha per il fondo dell'immagine. Sui bordi dell'immagine, la differenza di fase può essere invece maggiore (Δ_1) o minore (Δ_2), e quindi solo i bordi dell'oggetto sono visibili per una diversa luminosità (o colore).

Nel caso dello sdoppiamento differenziale, non ha senso inclinare i due fronti d'onda fra loro per ottenere le frange: le interruzioni delle frange sarebbero troppo piccole perché contenute nelle bordature dell'immagine, quindi non misurabili. Si usa allora in ogni caso la « tinta unita ».

Lo sdoppiamento dell'immagine, totale o differenziale, si può poi ottenere senza sdoppiare il fascio di illuminazione che attraversa l'oggetto, ma sdoppiando il fascio di radiazione fra obiettivo ed oculare del microscopio, o addirittura dopo l'oculare.

In tal caso, forzatamente, le due onde hanno attraversato entrambe l'oggetto e sono perturbate entrambe; si hanno cioè in ogni caso due onde identiche.

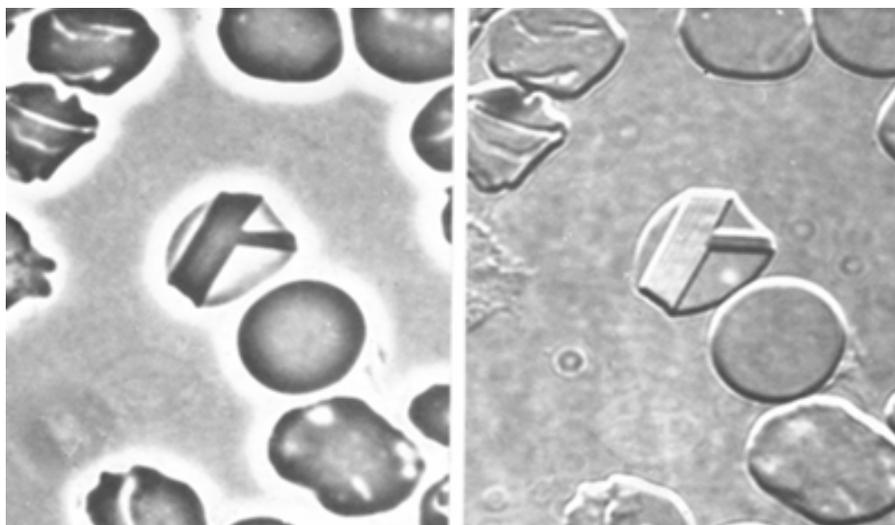


FIG. 10

Eritrociti non colorati con cristalli di emoglobina da sangue umano. A sinistra in contrasto di fase, a destra con microscopio interferenziale a sdoppiamento differenziale. Si noti a sinistra la presenza di aloni, a destra le caratteristiche « ombreggiature ». La preferenza ad uno dei due metodi può essere data solo in base a criteri soggettivi o a circostanze o esigenze particolari. (Da: M. Bessis e J. P. Thiéry, *Revue d'Hématologie*, 12, 4, (1957).

A seconda dell'ampiezza dello spostamento laterale delle due onde, della loro inclinazione e della loro fase relativa, è possibile sfruttare anche in questo caso tutti i metodi visti sopra:

a) Sdoppiamento laterale totale in tinta unita; la separazione delle due onde deve essere maggiore delle dimensioni medie degli oggetti da osservare; le onde sono parallele. A seconda della fase relativa delle due onde, si può avere un campo immagine più o meno chiaro (radiazione monocromatica) o variamente colorato (luce bianca). Se è possibile variare la fase relativa delle due onde con continuità, si possono eseguire misure di sfasamento, con lo stesso procedimento visto sopra a proposito del contrasto interferenziale.

b) Sdoppiamento laterale totale in interferogramma. In questo caso i due fronti d'onda non sono paralleli ed il campo appare solcato da frange. In certi casi è possibile variare la larghezza e l'orientamento delle frange. Il colore delle frange dipende dalla composizione spettrale della radiazione usata. Si possono eseguire misure di spostamento di frangia come nell'interferogramma normale.

c) Sdoppiamento laterale differenziale o ombreggiatura. L'ampiezza dello sdoppiamento ed il colore di fondo del campo immagine possono essere regolabili o non.

I dispositivi a sdoppiamento di immagine si sono dunque distinti in due categorie; nella prima si divide il fascio di illuminazione che sta fra condensatore ed obiettivo, nella seconda il fascio emergente dall'obiettivo. La differenza fra le due tecniche è però più apparente che reale. Nel primo caso infatti esisterà un elemento separatore posto prima dell'oggetto; esso sdoppia il fascio uscente dal condensatore, cioè l'immagine della sorgente (il diaframma di apertura del condensatore); un secondo elemento identico posto dopo l'oggetto ricombina i due fasci parziali. Questo elemento di ricombinazione però, se è capace di riportare sullo stesso cammino due fasci separati, è capace anche di separare in due un fascio unico, per esempio il fascio che formerà l'immagine dell'oggetto. In altre parole, l'elemento ricombinatore opera una separazione

dell'immagine dell'oggetto.

Ma nel secondo caso, di strumenti che separano il fascio emergente dall'obbiettivo, si ha la stessa situazione: l'immagine dell'oggetto viene sdoppiata; non viene però sdoppiata l'onda proveniente dalla sorgente.

Come vedremo nelle conclusioni, il fatto di avere due elementi (separatore prima dell'oggetto e ricombinatore dopo l'oggetto) porta ad una compensazione reciproca di essi, e permette l'uso di radiazione incoerente a livello dell'oggetto; il fatto di avere un solo elemento, separatore, dopo l'oggetto, impone l'uso di radiazione coerente a livello dell'oggetto, e quindi l'uso di un condensatore ad apertura minima, munito di diaframma a fenditura.

La prima soluzione, più complessa e costosa, permette di sfruttare la piena apertura del condensatore e la massima risoluzione dell'obbiettivo; la seconda soluzione, più semplice ed economica, riduce il potere risolutivo dello strumento per la ridottissima apertura del condensatore.

Per finire, molti microscopi interferenziali a sdoppiamento d'immagine, usando per lo sdoppiamento dell'onda un cristallo birifrangente in cui il raggio ordinario e quello straordinario percorrono cammini diversi, riescono a far sì che una delle due immagini risulti più o meno sfuocata e si osserva l'altra, a fuoco.

Si creano così nel campo immagine degli « spettri » più o meno sbiaditi, lo sdoppiamento dell'immagine non è più apprezzabile (una delle immagini è troppo sfuocata), e si ha l'impressione di avere un contrasto interferenziale semplice.

I vantaggi del microscopio interferenziale

1) Si è già accennato sopra al confronto fra campo oscuro e microscopia interferenziale, e si è visto come il secondo metodo faccia apparire l'immagine integrale dell'oggetto, e non solo l'immagine differenziale prodotta dalle rapide variazioni di indice, cioè dai bordi dell'oggetto (Fig. 3).

Inoltre, nel microscopio interferenziale non si ha interruzione dell'onda proveniente dal condensatore come nel campo oscuro, e quindi si evitano fenomeni di diffrazione parassiti: l'immagine dell'oggetto nel campo oscuro è costituita esclusivamente dall'onda diffratta dall'oggetto, senza la partecipazione dell'onda diretta. Nel microscopio interferenziale l'onda diretta (di fondo) viene annullata quando l'interferenza è negativa, ma non eliminata ad opera di un diaframma, e quindi concorre a formare l'immagine dell'oggetto.

Anche nei confronti del contrasto di fase, il microscopio interferenziale rappresenta un vantaggio poiché non si formano i caratteristici aloni ai bordi dell'oggetto: gli aloni del contrasto di fase sono dovuti a complessi rapporti di fase fra le varie parti della figura di Airy ai confini dell'immagine dell'oggetto (vedi l'articolo n° 25 in questo sito: "La formazione dell'alone nel contrasto di fase").

Nulla di simile avviene nel microscopio interferenziale.

Va detto però che il metodo dello sdoppiamento differenziale ricade in analogo svantaggio poiché mostra solo i bordi degli oggetti, cioè rivela solo le variazioni di indice, e per di più presenta una direzione privilegiata di contrasto massimo ed una di contrasto minimo, come detto sopra (fig. 10, 12, 13, 14).

2) Nel microscopio interferenziale vengono poste a confronto l'onda diretta imperturbata (di riferimento) proveniente dall'apparato illuminante e l'analogo onda, perturbata, che ha attraversato il campo oggetto. Queste due onde hanno un'apertura ben determinata, pari alla più piccola delle due aperture dell'apparato di illuminazione e dell'obbiettivo. Le dimensioni dell'oggetto non influiscono sull'apertura suddetta e quindi neppure sui risultati finali.

Invece nel contrasto di fase si ha la separazione fra onda diretta ed onda diffratta dall'oggetto, e quando l'oggetto è grande l'apertura dell'onda diffratta è piccola e quindi quell'onda si mescola troppo con l'onda diretta per poterle separare completamente. Il contrasto di fase sarebbe quindi

limitato all'osservazione di oggetti piccoli, ma in pratica ciò non rappresenta un limite poiché gli oggetti grandi vengono osservati con obbiettivi deboli di piccola apertura, quindi l'anello di fase corrispondente ha una piccola apertura e non interferisce sensibilmente con l'onda diffratta. D'altra parte, tutti i dispositivi interferenziali a sdoppiamento totale prevedono un'onda di riferimento che attraversa il campo oggetto e quindi presuppongono un oggetto piccolo e ben isolato che non disturbi l'onda di riferimento. Questo limite nel contrasto di fase non è così stringente. Anche da questo secondo confronto, dunque, il microscopio interferenziale non esce con troppo onore.

3) Più essenziale è invece il vantaggio, offerto dal microscopio interferenziale e sopra citato, di permettere misure di cammino ottico, e quindi di indice di rifrazione e di spessore. Ciò non è possibile con altri metodi di osservazione tranne casi particolari (metodo della linea di Becke usato in mineralogia, misure fotometriche di oggetti assorbenti, ecc. Vedi l'articolo n° 24: "La microscopia ottica dall'osservazione alla misura", in questo sito).

Dalle misure di indice di rifrazione è poi possibile, in molti casi, risalire alla misura della «sostanza secca» quando si tratti di preparati biologici costituiti da soluzioni di cristalloidi o colloidi in acqua: dalle ricerche di R. Barer (vedi Bibliografia) è noto che negli oggetti biologici l'indice di rifrazione è proporzionale alla concentrazione; il coefficiente di proporzionalità, che chiameremo A (incremento specifico di refrattività) varia di poco da una soluzione all'altra: è pari a 0,0018 per le proteine, a 0,0016 per gli acidi nucleici, ad esempio.

Tablette dettagliate dei valori di A sono date nei lavori di H. G. Davies (vedi indicazioni bibliografiche).

Avremo dunque:

$$(7) \quad n - n' = A c$$

ove « n » ed « n' » sono gli indici di rifrazione dell'oggetto e del mezzo circostante e « c » è la concentrazione. Ma dalla formula (1) sopra vista si ricava:

$$(8) \quad n - n' = T / d$$

quindi:

$$(9) \quad T / d = A c \quad \text{e:} \quad T = A c d$$

in cui « d » è lo spessore dell'oggetto e « T » il suo cammino ottico.

Se « x » è la massa secca dell'oggetto, « v » il suo volume e « q » la sua area di base (supponendo che l'oggetto si possa ricondurre ad un prisma oppure un cilindro), è possibile misurare « q » con un oculare micrometrico o direttamente sulla fotografia, e si ha allora:

$$(10) \quad c = x / v = x / (q \cdot d)$$

(11)

$$\text{quindi:} \quad T = A \cdot c \cdot d = A \cdot x \cdot d / (q \cdot d) = A \cdot x / q$$

e infine:

$$(11) \quad x = q \cdot T / A$$

Se « c » è data in percentuale, si divide il risultato per 100.

Senza alcun intervento sull'oggetto è quindi possibile misurare la massa secca dell'oggetto (« x ») in base ad una misura di superficie (« q ») ed una misura di sfasamento (« T ») che si riduce a due letture su un compensatore.

Difficilmente una micro-tecnica potrebbe essere più semplice e più elegante. È questo un merito indiscutibile della microscopia interferenziale.

La precisione ottenibile in condizioni ottimali sembra essere di 10^{-14} grammi (vedi i lavori di Barer, Grehn, Schiemer, Walter, ecc. nella rassegna bibliografica).

4) Come conseguenza del punto 1) sopra visto, se l'immagine interferenziale è integrale, sarà possibile osservare qualunque variazione o gradiente di cammino ottico (di indice o di spessore), anche lentissimo. Le immagini in contrasto di fase o in campo oscuro rivelano solo le brusche variazioni di cammino ottico cioè, in sostanza, i bordi dell'oggetto, in corrispondenza dei quali la derivata della variazione di fase dell'onda ha valore elevato.

5) Sul piano teorico, la sensibilità del microscopio interferenziale e del microscopio a

contrasto di fase, cioè la capacità di rivelare deboli variazioni di cammino ottico con un minimo di contrasto nell'immagine, è la stessa. In ogni caso infatti si mette a confronto un'onda diretta, imperturbata, con un'onda (diretta o diffratta) perturbata dall'oggetto, e si fanno interferire le due.

In pratica, il limite di sensibilità è dato dalla luce diffusa che vela l'immagine abbassandone il contrasto; entra in gioco allora il numero delle superfici aria-vetro, la bontà dei trattamenti anti-riflettenti, ecc., cioè si hanno fra i due metodi solo differenze sul piano tecnico e costruttivo.

Il campo oscuro risulta meno sensibile dei due metodi sopra visti poiché l'intensità dell'immagine con quel metodo dipende dal quadrato della variazione di fase, e quando tale variazione è piccola, il quadrato è ancora più piccolo. Occorrono dunque sorgenti di luce fortissime per mettere in risalto deboli variazioni di cammino ottico, ma in questo caso la luce diffusa, specie quella diffusa da oggetti fuori del piano focale dell'obiettivo, pone rapidamente un limite alla sensibilità del metodo.

Globalmente dunque il vantaggio del metodo interferenziale risiede nella possibilità di eseguire misure di cammino ottico, e quindi di indice di rifrazione, di spessore, di concentrazione, di massa secca, ecc. con mezzi fisici, senza l'intervento di agenti chimici né alcuna manipolazione sull'oggetto.

Gli svantaggi del microscopio interferenziale

1) A parte gli inconvenienti relativi ai singoli strumenti, di cui si parlerà più sotto, è inevitabile che ogni microscopio interferenziale comporti regolazioni delicate e complesse; la stessa finezza delle misure e del principio di funzionamento impone un continuo ritocco di certi comandi, e le strettissime tolleranze in certe quote (piccole frazioni di lunghezza d'onda) rendono ogni micro-interferometro uno strumento poco stabile.

È ovvio che la osservazione semplicemente qualitativa può tollerare errori di messa a punto ed instabilità delle regolazioni molto di più che non la misura quantitativa.

2) Un'altro svantaggio inevitabile del metodo interferometrico è la limitazione dell'apertura dell'apparato illuminante; se infatti consideriamo un oggetto di forma laminare attraversato da una delle due onde dell'interferometro, è ovvio che tale onda attraversa un diverso spessore dell'oggetto a seconda della sua inclinazione. Dunque l'onda perturbata da un oggetto di spessore ed indice uniforme subirà uno sfasamento non uniforme, ma variabile a seconda dell'apertura¹ del raggio considerato. Ciò non può che dare errori nelle misure (fig. 11), ed abbassare il contrasto dell'immagine per il sovrapporsi di fenomeni di interferenza diversi in corrispondenza ai diversi valori di apertura.

In questo senso c'è un parallelismo stretto fra microscopio interferenziale e microscopio polarizzatore: anche in quest'ultimo si provoca infatti l'interferenza di due onde (l'ordinaria e la straordinaria create da un oggetto anisotropo) e lo sfasamento fra le onde interferenti è legato all'apertura dell'onda incidente: in entrambi gli strumenti infatti l'allargamento del diaframma di apertura peggiora il contrasto dell'immagine mentre aumenta la risoluzione e la luminosità dell'immagine stessa.

Il solo rimedio consisterebbe nell'illuminare l'oggetto con raggi paralleli, cioè con apertura zero. Ma è noto che l'apertura equivalente di un microscopio è data all'incirca dalla media dell'apertura dell'obiettivo e del condensatore; quindi un'apertura zero del condensatore significherebbe ridurre l'apertura equivalente alla metà dell'apertura dell'obiettivo, quindi provocare forti fenomeni di diffrazione a livello della pupilla dell'obiettivo, cioè ridurre il potere risolutivo di esso.

Un rimedio meno intollerabile consiste nell'introdurre nelle misure apposite correzioni, che tengano conto dell'apertura effettiva del condensatore; tali correzioni dipendono però dalla forma

¹ Per "apertura" qui si intende l'inclinazione rispetto all'asse ottico dello strumento.

dell'oggetto, non sempre facilmente determinabile.

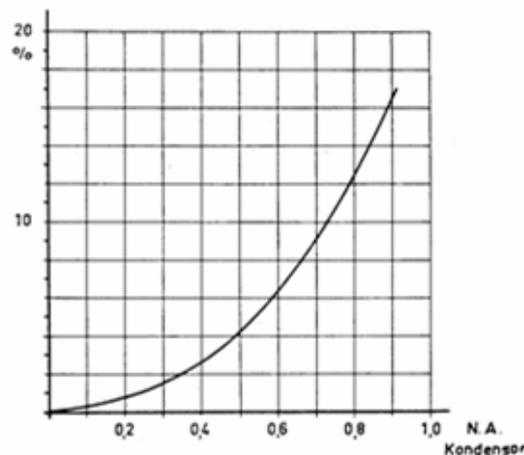


FIG. 11

Curva dell'errore introdotto nelle misure di cammino ottico dell'oggetto (ordinata) al variare dell'apertura del fascio illuminante (ascissa). Con apertura numerica = 0,3, l'errore sta intorno all' 1,5%. (Da: Ingelstam e Johansson, 1958).

Comunque è ovvio che il potere risolutivo (che richiede forti aperture di condensatore) è inconciliabile con la precisione delle misure (che richiede aperture minime). In pratica si cerca un compromesso, per esempio un'apertura numerica del condensatore pari a 0,3, e si cerca di riguadagnare in potere risolutivo aumentando l'apertura dell'obbiettivo fin dove è possibile. Per esempio, con un condensatore di apertura 0,3 ed un obbiettivo di apertura 1,3 si ha una apertura equivalente di $(0,3 + 1,3) / 2 = 0,8$ (circa).

La cosa diviene ancora più complicata quando il fascio d'illuminazione deve attraversare elementi birifrangenti, in cui si generano un raggio ordinario ed uno straordinario, il cui sfasamento relativo dipende dallo spessore attraversato nel corpo birifrangente, cioè dall'apertura. Ma di questo parleremo più avanti.

Contro tali limitazioni di principio è ovvio che si può solo usare come rimedio un ragionevole compromesso.

3) Nell'osservazione visuale, quando si ha a che fare con un oggetto di complessa struttura, l'immagine in contrasto interferenziale o in interferogramma è sempre complessa e di difficile interpretazione. È difficile ad occhio seguire l'andamento delle frange o la successione dei colori di interferenza. In radiazione monocromatica, un oggetto molto irregolare appare come una sovrapposizione di zone chiare e scure alle quali è ben difficile associare un particolare sfasamento. In luce bianca è più facile seguire la successione dei vari ordini di interferenza, ma le irregolarità dell'oggetto possono rendere irriconoscibili i colori, e del resto dopo il 4° o 5° ordine di interferenza le frange divengono abbastanza sbiadite da non potersi facilmente riconoscere l'una dall'altra.

Forse il metodo interferenziale è troppo sensibile per una semplice osservazione: la minima variazione di indice o di spessore dell'oggetto provoca i più vivaci mutamenti di colore nell'immagine.

Con altri metodi di osservazione ciò non avviene, per esempio col contrasto di fase: anche i metodi più sofisticati, come il « Varicolor » Wild, permettono di distinguere a colpo d'occhio un oggetto più rifrangente del mezzo circostante da uno meno rifrangente e la forma dell'oggetto è resa con plasticità immediata.

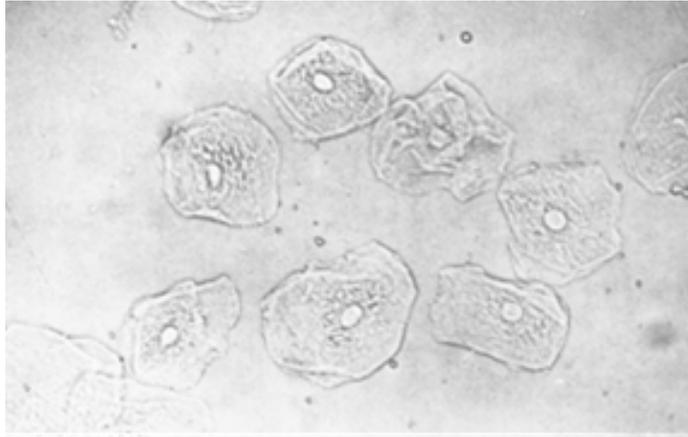


FIG. 12

Cellule epiteliali desquamate della mucosa boccale di uomo, non colorate. Campo chiaro. (Da: Phasenkontrast und Interferenzkontrast, Zeiss, Oberkochen, 40-160 d)

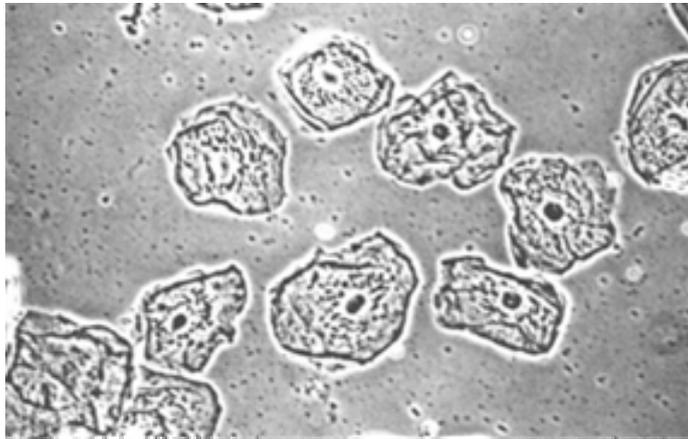


FIG. 13

Stesso preparato della figura precedente. Contrasto di fase. È ben nitida la struttura « di fase » dell'oggetto data da variazioni di spessore o di indice. (Stessa fonte di fig. 12).



FIG. 14

Stesso preparato della figura precedente. Contrasto interferenziale con sdoppiamento differenziale (DIC). La viva apparenza di contrasto è suggestiva ma può portare ad interpretazioni errate poiché può essere provocata non dalla forma dell'oggetto ma dalle sue variazioni di indice. Per es., i nuclei delle cellule sembrano sporgere dalla superficie delle cellule stesse, mentre invece sono contenuti all'interno di esse (Stessa fonte di fig. 12).

Va ripetuto qui ciò che si è detto all'inizio: il microscopio interferenziale è prima di tutto uno

strumento di misura, mentre per l'osservazione qualitativa è generalmente preferibile servirsi di altre tecniche, salvo il caso delle tecniche semplificate, di sola osservazione, come il DIC (vedi oltre).

4) Quando il microscopio interferenziale si avvale di dispositivi birifrangenti, come vedremo sotto, avviene che l'obbiettivo è spesso attraversato da radiazioni polarizzate. Questo significa che questi strumenti devono obbedire alle stesse regole dei microscopi polarizzatori: evitare gli obbiettivi contenenti fluorite, curare che i vetri usati siano privi di tensioni interne, evitare le superfici riflettenti, ecc.

5) Le immagini date dal metodo dello sdoppiamento differenziale per osservazioni in trasparenza danno all'occhio una viva impressione di rilievo. Questo rilievo non esiste generalmente nell'oggetto poiché è generato di solito da variazioni nel solo indice di rifrazione. Esso quindi falsa completamente la comprensione della forma reale che si vuole osservare. In contrasto di fase, le variazioni di indice danno solo variazioni non direzionali di luminosità, cioè un'immagine in chiaro-scuro che rende molto meglio l'idea della struttura dell'oggetto (vedi le figure 10, 12, 13, 14).

GLI STRUMENTI PER OSSERVAZIONI IN TRASPARENZA

Micro-interferometri del tipo Mach-Zehnder

Il principio di funzionamento (fig. 15), chiamato dagli autori inglesi « round the square », prevede lo sdoppiamento di un fascio di radiazione proveniente dalla sorgente L a mezzo di un organo semiriflettente T_1 . Le due onde risultanti, necessariamente coerenti fra loro, sono riflesse dagli specchi S_1 ed S_2 e ricombinate da un altro elemento semi-riflettente: T_2 . In linea di massima, le due onde distinte e coerenti fra T_1 e T_2 vengono usate come onda di riferimento ed onda-oggetto. Una sola di esse quindi attraversa l'oggetto.

A) *Micro-interferometro Leitz.*

Questo strumento utilizza integralmente il principio dell'interferometro di Mach-Zehnder appena descritto, tenendo completamente separati i due rami dopo lo sdoppiamento (fig. 16).

Dopo il primo semi-riflettente (T_1), i due fasci sono riportati in direzioni parallele a mezzo di due prismi a riflessione totale. Lungo i due cammini ottici si susseguono, prima di arrivare al semi-riflettente di ricombinazione (T_2), elementi ottici del tutto equivalenti in modo da rispettare scrupolosamente la inclinazione, la centratura e la fase reciproca delle due onde.

Dal basso in alto si incontrano i seguenti elementi:

--- Due lamine plan-parallele di vetro, una per lato, girevoli attorno ad un asse orizzontale (i due assi perpendicolari fra loro) indicate con P_1 ; esse deviano lateralmente il fascio che le attraversa in direzione perpendicolare al loro asse di rotazione, mantenendone invariata la direzione. Il loro scopo è di centrare i due fasci in modo che essi coincidano al momento di ricongiungersi in T_2 . Le due lamine ruotano attorno ad assi orizzontali ortogonali fra loro e permettono due spostamenti in direzioni sempre ortogonali fra loro; quindi è sempre possibile far coincidere gli assi dei due fasci.

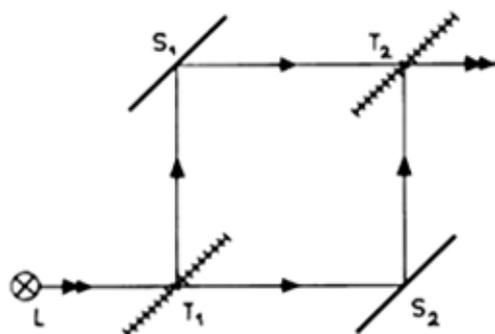


FIG. 15

Principio di funzionamento dell'interferometro di Mach-Zehnder. T_1 e T_2 sono elementi semi-riflettenti; S_1 ed S_2 sono specchi. I raggi (coerenti fra loro) separati in T_1 si ricombinano ed interferiscono in T_2 (Stessa fonte di fig. 4)

--- Due compensatori, uno per lato (P_2); dal lato onda-oggetto si tratta di due semplici lamine plan-parallele fisse che compensano il cammino ottico nell'elemento contro-laterale; dal lato onda di riferimento si tratta di tre cunei di vetro (cuneo di Arago) di cui due fissi ed uno mobile nel piano orizzontale. Regolando la posizione del cuneo mobile si varia lo spessore totale del sistema di cunei e quindi la fase dell'onda che l'attraversa senza deviarla lateralmente. Con apposito tamburo si leggono sfasamenti di $1/70$ di lunghezza d'onda in un campo massimo di 20 lunghezze d'onda. Il campo di sfasamento possibile si può allargare per mezzo di lamine supplementari montate su un disco-revolver che si possono rapidamente intercambiare, sempre introdotte nel lato onda di riferimento.

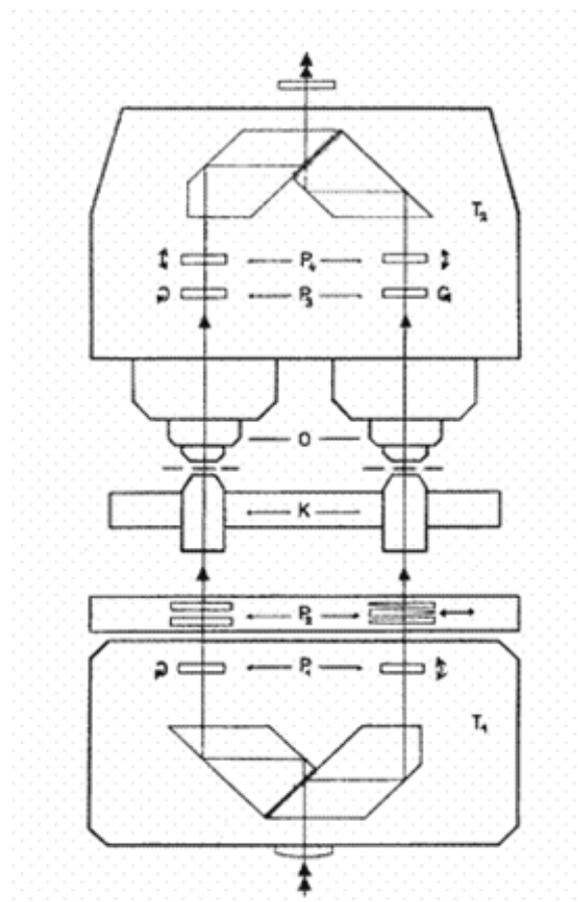


FIG. 16

Principio di funzionamento del Micro-interferometro Leitz (spiegazione nel testo). (Da: E. Leitz, Wetzlar, Catal.

52-23).

--- Due condensatori identici (K).

--- L'oggetto, montato fra apposite lamine plan-parallele; dal lato onda di riferimento, il preparato è sostituito da analoghe lamine contenenti lo stesso mezzo di inclusione o da un compensatore in vetro. Se l'obbiettivo è ad immersione, si pone l'olio per immersione sui due preparati, regolando lo spessore dello strato d'olio nel lato onda di riferimento a mezzo di apposita regolazione che permette di variare la distanza fra il preparato « vuoto » di riferimento e l'obbiettivo che gli sovrasta.

--- Due obbiettivi identici selezionati (O).

--- Due compensatori girevoli su un asse orizzontale (P_3) che permettono di variare l'inclinazione relativa delle due onde in modo da ruotare il sistema di frange o spostarlo in blocco in direzione trasversale alle frange.

--- Altri due compensatori (P_4) girevoli su assi orizzontali diversamente orientati permettono di variare l'angolo fra le due onde in modo da allargare o stringere il sistema di frange. Al limite, l'allargamento delle frange porta ad una larghezza di frange superiore al diametro del campo visivo, cioè alla tinta unita o contrasto interferenziale (onde parallele).

--- Segue la seconda coppia di prismi che riportano le due onde a miselarsi nel secondo organo semi-riflettente (T_2).

Sopra, sono sistemati i tubi fotografici o di osservazione binoculare.

Questo strumento permette di regolare in ogni senso l'inclinazione e lo sfasamento relativo delle due onde per cui si possono avere interferogrammi con ogni possibile larghezza o direzione delle frange. La variazione della fase relativa fra le due onde interferenti porta allo spostamento della frangia di ordine zero, facilmente riconoscibile in luce bianca.

Il contrasto interferenziale è possibile con ogni sfasamento di base fra le due onde, cioè con ogni possibile colore o luminosità del fondo.

Lo strumento prevede due sorgenti di radiazione alloggiate nel basamento, e cioè una lampada ad incandescenza da 30 W per osservazioni in luce bianca, ed una lampada a mercurio a bassa pressione seguita da filtri interferenziali per osservazioni a 546 e 436 nm.

Un prisma mobile permette di usare una sola delle due sorgenti o di miselare le due radiazioni; quest'ultima combinazione permette di sovrapporre nell'interferogramma le frange monocromatiche alle frange colorate, cioè di identificare la frangia di ordine zero; questa possibilità è preziosa quando si osservano oggetti fortemente rifrangenti in cui lo spostamento laterale delle frange è forte e non è possibile seguire l'andamento delle frange monocromatiche.

La completa separazione dell'onda-oggetto e dell'onda di riferimento nello strumento elimina ogni pericolo di perturbamento dell'onda di riferimento da parte dell'oggetto; ogni misura è quindi precisa e sicura. La stabilità meccanica dello strumento è notevole e la raffinatezza degli organi di regolazione permette ogni sorta di compensazione.

L'apertura numerica dell'apparato di illuminazione è 0,3, un ragionevole compromesso.

Sono disponibili obbiettivi da 20 ingrandimenti (N.A. = 0,35), 50 ingrandimenti (N.A. = 0,85) e 100 ingrandimenti, ad immersione (N.A. = 1,36). Gli obbiettivi vanno naturalmente cambiati a coppie, ogni coppia essendo montata su una guida a coda di rondine.

Con questo strumento è possibile applicare il metodo della tinta unita e dell'interferogramma, ed eseguire misure di sfasamento, ma non è possibile usare il metodo dello sdoppiamento laterale.

Un grande vantaggio consiste nell'uso di radiazione non polarizzata; ciò evita difficoltà di interpretazione durante l'osservazione di oggetti birifrangenti nonché forti perdite di intensità della radiazione proveniente dalla lampada.

Naturalmente è previsto l'uso di filtri polarizzanti e di compensatori per l'osservazione in luce polarizzata al fine di determinare l'indice di rifrazione di oggetti birifrangenti in direzioni particolari, e magari il loro potere di birifrangenza, l'orientamento degli assi ottici, ecc.

Lo svantaggio principale del dispositivo Leitz è la complessità (tutto il sistema ottico è duplice), l'ingombro ed il costo dello strumento. Ma ciò era inevitabile, dato il principio di funzionamento adottato.

B) Il sistema « Interphaco » Zeiss di Jena.

È questo probabilmente il microscopio interferenziale più ingegnoso e più versatile che sia stato messo sul mercato.

Il principio usato è ancora quello di Mach-Zehnder, ma il principio è stato applicato e sfruttato in maniera del tutto originale ed ardita.

Osserviamo la figura 17: la sorgente di radiazione, il condensatore (1), l'oggetto (O) e l'obbiettivo (2) sono quelli di un normale microscopio a trasparenza; il diaframma di campo (LB) è coniugato col piano oggetto (O) ed il diaframma di apertura (Sp) è coniugato colla pupilla di uscita dell'obbiettivo, cioè col suo piano focale posteriore (Sp'); l'illuminazione è dunque del tipo di Köhler, usuale.

La lente negativa (3) coniuga all'infinito l'immagine intermedia dell'oggetto data dall'obbiettivo²; i raggi che formano tale immagine sono dunque paralleli nel prisma (4), e spostando tale prisma lungo l'asse ottico si varia la distanza fra la lente (3) ed il gruppo (5) senza alterare la posizione dell'immagine dell'oggetto cioè la messa a fuoco. Il gruppo (5) inferiore riprende l'immagine intermedia dell'oggetto e la coniuga in O' ; il gruppo (5) superiore coniuga l'immagine intermedia presente in O' col piano oggetto dell'oculare (O''). In O'' si forma dunque una seconda immagine intermedia dell'oggetto.

La pupilla di uscita dell'obbiettivo, contenente l'immagine del diaframma di apertura (Sp') è coniugata ad opera delle lenti (3) e (5) in Sp'' . Per questa immagine, il fascio attraversante il prisma (4) non è coniugato all'infinito, e quindi lo spostamento del prisma stesso provoca uno spostamento assiale di Sp'' . Questo significa che, quando si cambia obbiettivo e la posizione di Sp' cambia per la diversa distanza focale dell'obbiettivo, l'immagine Sp'' può essere riportata sempre nello stesso punto con una regolazione del prisma (4).

Dunque, con qualunque obbiettivo si operi, si ha una immagine reale dell'oggetto in O'' , ed una immagine reale del diaframma del condensatore in Sp'' .

I prismi (6) e (7) costituiscono l'interferometro propriamente detto: ognuno di essi contiene una superficie semi-riflettente ed una superficie speculare; sulla superficie semi-riflettente S_1 il fascio viene sdoppiato e dall'estremo inferiore (A) del prisma (7) si preleva il fascio misto, il risultato dell'interferenza dei due fasci parziali.

Osserviamo dunque che l'oggetto è fuori dell'interferometro, essendo quest'ultimo posto dopo l'obbiettivo.

Nei due rami dell'interferometro si trova l'immagine della pupilla di uscita dell'obbiettivo (solo una è indicata con Sp'') cioè l'onda perturbata dall'oggetto, ma per il funzionamento dell'interferometro l'onda perturbata si deve trovare in un solo ramo, mentre nell'altro ramo (supponiamo che si tratti del ramo superiore di fig. 17) deve esistere l'onda di riferimento, imperturbata, cioè l'immagine Sp'' deve essere l'immagine del diaframma di apertura quale si avrebbe in assenza dell'oggetto.

Un simile risultato, apparentemente impossibile, si può ottenere utilizzando la radiazione diretta che ha attraversato l'oggetto e scartando quella diffratta: è noto dalla teoria del contrasto di fase che l'onda sfasata che ha attraversato l'oggetto di fase si può decomporre in un'onda diretta non perturbata né deviata ed un'onda diffratta, deviata e sfasata di circa $1/4$ di lunghezza d'onda. Togliendo l'onda diffratta si ottiene l'onda diretta imperturbata, che può servire come onda di riferimento dell'interferometro.

² In una versione successiva, sono stati usati obbiettivi con seconda coniugata infinita, per cui il percorso telecentrico è stato assicurato senza lente divergente.

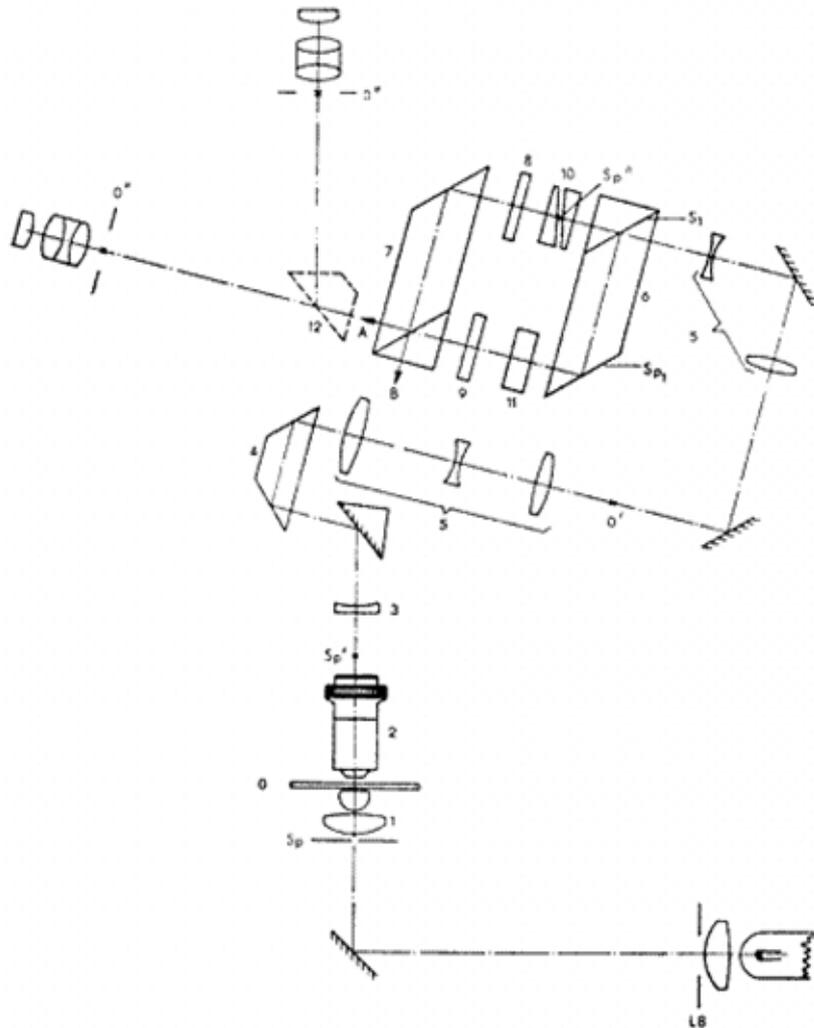


Fig. 17

Principio di funzionamento del dispositivo interferenziale « Interphaco » Zeiss di Jena. Disposizione per il metodo dello sdoppiamento di immagine. Spiegazione nel testo. (Stessa fonte di fig. 8)

In pratica, si pone sotto il condensatore un diaframma anulare identico a quelli del contrasto di fase, ed in corrispondenza dell'immagine di tale diaframma (Sp'' nel caso nostro) si pone un eguale diaframma dello stesso diametro dell'immagine; si fa dunque il contrario di quanto si fa in contrasto di fase: invece di attenuare l'onda diretta con un anello opaco e lasciar passare l'onda diffratta, si blocca del tutto l'onda diffratta e si utilizza l'onda diretta come onda di riferimento. In Sp'' (invece del doppio cuneo mostrato in figura) si pone quindi un diaframma anulare che si fa coincidere con l'immagine del diaframma del condensatore a mezzo delle regolazioni già previste nel contrasto di fase. Se l'apertura dell'onda diffratta è grande, cioè se l'oggetto osservato è sufficientemente piccolo, si può ammettere che l'onda diffratta venga in massima parte eliminata dalle porzioni opache del diaframma.

All'uscita del prisma (7) si ha dunque la stessa immagine che si avrebbe ponendo l'oggetto nel ramo inferiore dell'interferometro.

È questo il metodo « Interphaco » che permette di sfruttare il principio dell'interferometro di Mach-Zehnder in maniera semplificata, cioè con un unico sistema obbiettivo-condensatore.

Appositi compensatori (8 e 9) a forma di cuneo permettono di variare l'inclinazione e la fase relativa delle due onde per cui si può sfruttare il metodo del contrasto interferenziale con uno sfasamento fra le onde interferenti (e quindi un colore o una luminosità di fondo) variabile a volontà, oppure l'interferogramma con larghezza e posizione variabile delle frange; si possono ottenere da 0 a 32 frange nel campo di un oculare di ingrandimento $12,5 \times$.

La presenza di un diaframma anulare nel condensatore impone al fascio di radiazioni che incide sull'oggetto un'apertura ben determinata e contenuta in limiti ristretti, ma in ogni caso bisogna ammettere che una parte della radiazione diffratta può passare attraverso il diaframma posto nell'interferometro, per quanto stretto esso sia, e può mescolarsi alla radiazione diretta.

Questo significa che si introduce un certo sfasamento nell'onda di riferimento e quindi un errore nelle misure.

Come avviene nel contrasto di fase, occorre tener conto del prodotto di due grandezze: le dimensioni dell'oggetto ed il raggio del diaframma anulare. In base a questo dato è possibile calcolare il valore dell'errore « E »:

$$(12) \quad E = (3 B R) / f \lambda$$

in cui « B » è il diametro dell'oggetto, « R » la larghezza del diaframma anulare, « f » la focale del sistema (obbiettivo con i sistemi intermedi che lo seguono) che crea l'immagine del diaframma anulare, e « λ » la lunghezza d'onda utilizzata.

Ma se l'oggetto è grande l'errore è anche grande, poiché la radiazione diffratta dall'oggetto ha piccola apertura e passa in buona parte attraverso il diaframma anulare in Sp'' .

A questo punto conviene convertire il dispositivo « Interphaco » in un interferometro a sdoppiamento totale: si elimina il diaframma anulare nel condensatore che viene sostituito da una fenditura regolabile (Sp) allo scopo di limitare l'apertura del fascio illuminante; si elimina anche il diaframma anulare in Sp'' e lo si sostituisce con un doppio cuneo (10) le cui due metà possono ruotare in senso opposto affinché lo spigolo del diedro equivalente sia sempre parallelo all'immagine della fenditura Sp .

Si hanno dunque nei due rami dell'interferometro due onde eguali, egualmente perturbate dall'oggetto, ma lateralmente spostate l'una rispetto all'altra ad opera del doppio cuneo (10): lo strato d'aria compreso fra le due metà del cuneo opera come una lamina plan-parallela inclinata rispetto all'asse ottico e devia lateralmente il fascio che l'attraversa.

Al momento di interferire le due onde danno un'immagine in cui l'oggetto appare sdoppiato (fig. 8).

Il dispositivo però, si è visto, permette di variare a volontà lo sfasamento e l'inclinazione delle due onde a mezzo dei compensatori (8) e (9); quindi si potrà avere un campo a tinta unita (contrasto interferenziale) di qualunque luminosità o colore oppure un interferogramma con posizione e con passo delle frange variabile; sempre, s'intende, con immagine sdoppiata.

Si presuppone naturalmente che l'oggetto sia piccolo e che le due immagini di esso non si sovrappongano; se l'oggetto è grande e le sue immagini si sovrappongono, il dispositivo permette di passare al metodo dell'ombreggiatura (sdoppiamento differenziale): la regolazione dei cunei (10) permette di variare a volontà lo sdoppiamento laterale dell'onda per cui si può passare gradatamente al metodo differenziale; contrariamente a quanto avviene in altri strumenti che sfruttano il metodo differenziale, come il comune DIC, lo spostamento laterale delle immagini è regolabile; ciò significa che l'ampiezza delle « ombreggiature » nell'immagine dell'oggetto si può adattare alle caratteristiche dell'oggetto stesso.

Completano il dispositivo « Interphaco » una lente di Amici-Bertrand che permette di osservare l'immagine Sp'' attraverso l'oculare, una serie di filtri polarizzanti per l'osservazione e le misure su oggetti birifrangenti, una lamina compensatrice che divide il campo immagine in due metà sfasate di un quarto di lunghezza d'onda al fine di aumentare la sensibilità di misura degli sfasamenti, un prisma (12) che permette di passare rapidamente dall'osservazione alla microfotografia, ecc.

Difficilmente si potrebbe immaginare uno strumento più raffinato e versatile; tutti i metodi di osservazione per interferenza sono possibili: contrasto interferenziale, interferogramma, sdoppiamento laterale totale regolabile in tinta unita o con frange, sdoppiamento differenziale regolabile. In più, il condensatore a diaframmi anulari è il medesimo usato per il contrasto di fase, e si passa quindi rapidamente dall'osservazione interferenziale a quella in contrasto di fase oppure in campo chiaro, ecc.

Naturalmente lo strumento in pratica diviene complesso e macchinoso, ma ciò è ben

compensato da altri vantaggi: non viene usata radiazione polarizzata (benché sia possibile questa tecnica ove si renda necessario); non vi è limitazione eccessiva dell'apertura utile del condensatore col metodo « Interphaco »; non è necessario uno stativo speciale, né obbiettivi né condensatore speciali poiché il dispositivo è racchiuso interamente in una scatola che si applica sotto al tubo porta-oculari.

Si potrebbe obiettare che il metodo dello sdoppiamento laterale è ottenuto a mezzo di una fenditura nel condensatore, il che dà una direzione preferenziale al contrasto, oltre a ridurre la risoluzione, ma questo è un difetto comune alla maggioranza degli strumenti del genere.

C) *Micro-interferometri a immagini simmetriche.*

Vogliamo accennare qui a due micro-interferometri assai curiosi in cui l'oggetto è posto fra due sistemi ottici identici (in pratica, due obbiettivi), di cui uno si comporta da condensatore e l'altro da obiettivo. Il fascio illuminante viene sdoppiato ad opera di un semi-riflettente e, con un complicato gioco di specchi, viene inviato sul complesso obiettivo-oggetto-obiettivo prima da sopra e poi da sotto. Cioè le due metà del fascio attraversano quel complesso in senso opposto, ed ognuno dei due obbiettivi si comporta da obiettivo vero e proprio per uno dei fasci parziali e da condensatore per l'altro. Alla fine, si ricongiungono i due fasci parziali per mezzo dello stesso semi-riflettente visto sopra ed il risultato della loro interferenza viene osservato attraverso l'oculare. Schema di Mach-Zehnder, dunque, in cui il semi-riflettente è unico.

Le due onde che interferiscono sono entrambe perturbate dall'oggetto e sono ruotate di 180° l'una rispetto all'altra attorno all'asse ottico del sistema; ne consegue che, nel campo immagine, appaiono due immagini dell'oggetto, simmetricamente disposte rispetto all'asse ottico. Si presuppone che tali immagini non abbiano dimensioni superiori ad un semi-campo, e che le si spostino in maniera da essere contenute ognuna in una metà del campo. Dunque, ognuno dei due semi-campi, contenenti l'oggetto, viene fatto interferire con l'altro semi-campo, che si presuppone libero.

Le due immagini si vengono a trovare sullo stesso piano, e sono quindi a fuoco assieme.

Si ha qui una specie di sdoppiamento dell'immagine, ma non in senso laterale, bensì per rotazione attorno all'asse ottico.

Due strumenti sono stati ideati secondo questo principio: il dispositivo « Spirociclico » di Philpot (1950) ed il dispositivo «a onde anti-parallele» di Nomarski (1952). Nessuno dei due risulta sia mai stato costruito in serie.

Il primo dei due richiede uno stativo speciale per sistemare i numerosi specchi; il secondo è più versatile, ma in ogni caso si richiedono i doppi obbiettivi, ecc.

Il dispositivo di Nomarski, inoltre, al fine di ridurre la radiazione diffusa che diminuirebbe il contrasto, fa uso di radiazione polarizzata e di un ingegnoso sistema di filtri polarizzanti.

Si tratta dunque di strumenti macchinosi, poco versatili. Oltre al metodo dello sdoppiamento di immagine, non è possibile applicare altri metodi di osservazione. La sola possibilità è quella di passare dalla tinta unita all'interferogramma orientando opportunamente gli specchi: si può variare in tal modo l'inclinazione reciproca delle due onde interferenti.

Maggiori dettagli su questi strumenti si trovano nel volume di M. Francon « Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel » (1954), ed. C.N.R.S. (vedi Bibliografia, voce 21).

D) *Il dispositivo di Dyson (1950).*

Questo dispositivo, fabbricato dalla casa Cooke, Troughton & Simms Ltd. (Inghilterra), si richiama ad un principio di interferometro come quello di Mach-Zehnder, ma provoca uno sdoppiamento assiale dell'immagine, per cui si hanno due immagini dell'oggetto su piani diversi, di cui solo una a fuoco (e costituisce l'onda oggetto), l'altra completamente sfuocata (e costituisce l'onda di riferimento).

Ecco lo schema di principio: l'onda proveniente dal condensatore (fig. 18), che indichiamo con

S , attraversa una prima lamina di vetro L_1 e, giunta sulla faccia superiore di quella (X_1), che è semi-riflettente, si divide in un'onda riflessa ed una trasmessa. Si può considerare quella superficie semi-riflettente come il primo elemento divisore dell'interferometro di Mach-Zehnder. L'onda trasmessa in A attraversa il preparato P , e costituisce quindi l'onda-oggetto; poi essa traversa una seconda lamina L_2 , le cui due facce X_2 e X_3 sono semiriflettenti; viene quindi riflessa in C e in D , cioè sulle due facce della lamina L_2 . In D avviene il ricongiungimento con l'altra onda, quella di riferimento, che è l'onda riflessa in A . Questa onda infatti era stata riflessa di nuovo in B ad opera di una piccola zona circolare speculare, aveva attraversato il preparato fuori dall'oggetto vero e proprio (che è posto in P) ed in D si ha l'interferenza con l'onda sopra vista, che è l'onda trasmessa in A . La superficie X_2 costituisce dunque il secondo elemento semi-riflettente dello schema di Mach-Zehnder e le due onde parziali seguono i cammini $A - P - C - D$ (onda-oggetto) ed $A - B - D$ (onda di riferimento).

L'onda di riferimento dunque attraversa il piano-oggetto nella zona circostante l'oggetto stesso e quindi può essere perturbata da altri oggetti che si trovino in quella zona, e che non vengono visti dall'osservatore perché fuori del campo visivo. Il solo rimedio possibile per evitare questo effetto negativo è di disporre un oggetto piccolo, isolato in mezzo ad un campo del tutto libero.

Ora, l'oggetto P è coniugato ad opera degli specchi X_2 ed X_3 con la zona B ; è come se l'oggetto si trovasse in B , poiché P si trova ad essere simmetrico del punto B rispetto alla superficie X_2 . Ponendo in $F - F'$ una superficie sferica riflettente concentrica con B , essa crea una immagine non ingrandita di B (cioè di P) che si riproietta in B , nel centro della sfera. Cioè i raggi giunti in E e provenienti da D proseguono per F e poi tornano in E , D e B .

Però, per la presenza di X_3 , che è semi-riflettente, si forma una seconda immagine di B in P' ; i raggi $F-E$ ritornano cioè in direzione $E-P'$. Dunque P' è coniugato di B , e quindi di P . La superficie $F-F'$ ha dunque trasportato l'immagine in grandezza naturale dell'oggetto P in P' .

Poiché lo specchio sferico è stigmatico per il suo centro, si può ammettere che l'immagine P' non sia affetta da troppo gravi aberrazioni: il campo del microscopio è piccolo.

Sopra P' vi è poi l'obbiettivo vero e proprio. È ovvio che nella zona attorno a P' la superficie riflettente $F-F'$ è interrotta, e l'obbiettivo può così osservare P' .

In pratica, il complesso L_2 - superficie $F-F'$ e l'obbiettivo sono rigidamente montati in un'unica unità che fa le funzioni apparenti di un obbiettivo normale.

In fig. 18 è disegnato a linea più sottile il percorso di un secondo raggio simmetrico rispetto a quello S .

Se le due lamine L_1 ed L_2 sono parallele e di eguale spessore, i cammini delle onde parziali $A-C-D$ ed $A-B-D$ sono identici e paralleli; le due onde parziali, al momento di ricongiungersi in D , sono parallele ed in fase. Il campo appare quindi bianco (in luce bianca) ed uniformemente illuminato. Si ha il contrasto interferenziale.

Se invece L_1 ha la forma di cuneo e la si sposta orizzontalmente a mezzo della vite V , il cammino ABD varia per il variare dello spessore di L_1 mentre il cammino ACD rimane invariato. Si può dunque variare la fase relativa delle due onde, e quindi il colore o la luminosità del fondo.

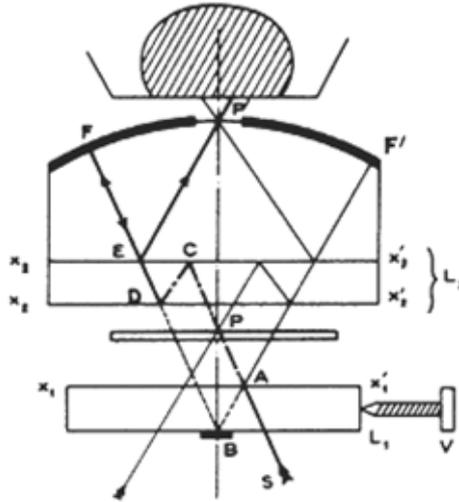


FIG. 18

Principio di funzionamento del dispositivo interferenziale di Dyson (1950). Spiegazione nel testo. (Da: M. Françon: *Le microscope à contrastes de phase et le microscope interférentiel*. Editions C.N.R.S., Paris, 1954).

Se il cuneo L_1 forma un diedro molto piccolo, lo sfasamento delle due onde si può regolare a valori molto piccoli, cioè si può lavorare nel primo ordine di interferenza ed usare senza inconvenienti la luce bianca. Questo vantaggio è comune a tutti gli strumenti descritti che si basano sul principio di Mach-Zehnder.

Naturalmente, l'elemento L_1 cuneiforme provoca una inclinazione dell'onda ABD rispetto quella ACD e per ottenere la tinta unita (onde parallele) occorre che anche la seconda lamina L_2 sia cuneiforme, con lo stesso angolo diedro di L_1 . Se la lamina L_2 è girevole attorno all'asse ottico, si può variare l'inclinazione dell'onda ACD rispetto quella ABD e quindi si può passare gradatamente dalla tinta unita all'interferogramma.

Si potrebbe osservare che le numerose superfici semi-riflettenti presenti nel dispositivo producono numerose immagini spurie sfocate, ma la zona B speculare sulla faccia inferiore di L_1 produce al centro di tutte le immagini spurie, in corrispondenza cioè dell'oggetto, una macchia nera, per cui le immagini spurie non disturbano l'immagine utile.

Non è necessario operare in luce polarizzata, e questo è un vantaggio; le misure di sfasamento sono possibili in tinta unita variando la fase relativa fra le due onde interferenti (regolazione della vite « V » che opera come un compensatore di sfasamento) ed usando il metodo del massimo annerimento nell'oggetto e nel campo, oppure prelevando una parte del fascio di illuminazione ed inviandolo ad un oculare fotometrico per metterlo a confronto con la luminosità del campo immagine. Ma questo metodo presuppone specchi esterni allo strumento e quindi può dare luogo ad errori. Per evitare i soliti errori dovuti all'apertura del fascio illuminante e per migliorare il contrasto è necessario inoltre chiudere il più possibile il diaframma di apertura.

In complesso, lo strumento è macchinoso e poco versatile, e nella sua realizzazione pratica è di difficile manipolazione e le regolazioni sono instabili. Inoltre è necessaria una triplice immersione: l'olio da immersione va posto fra condensatore ed L_1 , fra L_1 e preparato, e fra preparato ed L_2 .

Micro-interferometri del tipo Fabry-Pérot

Vanno posti in questo gruppo alcuni dispositivi che non risultano costruiti in grande serie da nessuna casa, e che d'altra parte non presentano grande interesse. Ne parleremo quindi solo a grandi linee.

Il principio dell'interferometro di Fabry-Pérot da essi direttamente o indirettamente sfruttato, è quello di due superfici parallele o sub-parallele semi-riflettenti (fig. 19). Il fascio di radiazione che incide sul sistema delle due superfici viene sdoppiato nell'attraversare la prima superficie; la metà riflessa torna indietro; la metà trasmessa prosegue in linea retta, incontra la seconda superficie, e

viene ancora sdoppiata; la metà riflessa dalla seconda superficie torna indietro, incide sulla prima superficie, viene ancora sdoppiata, e così via. Si ha dunque una parte delle radiazioni che si riflette ripetutamente restando compresa fra le due superfici ed attenuandosi ad ogni riflessione; ad ogni riflessione poi si genera un fascio trasmesso che esce dal sistema. Tutti i fasci trasmessi da un lato o riflessi dall'altro lato della coppia di superfici sono coerenti e paralleli fra loro e si sovrappongono più o meno completamente; possono quindi interferire. La fase fra ogni fascio trasmesso (o riflesso), quello che lo precede o quello che lo segue è sempre la medesima: corrisponde al cammino ottico dell'onda che ha percorso lo spazio fra le due lamine prima in un senso e poi in senso opposto. Si avrà cioè uno sfasamento pari a:

$$(13)^3 \quad T = 2 n d / \lambda \cos \alpha$$

dove « d » è la distanza fra le lamine, « n » l'indice di rifrazione del mezzo interposto fra di esse ed « α » l'angolo di incidenza del fascio sulla seconda lamina.

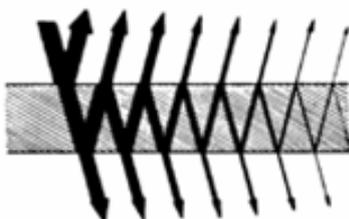


Fig. 19

Schema di interferometro di Fabry-Pérot indicante le successive riflessioni e suddivisioni del fascio incidente sul sistema costituito da due superfici semiriflettenti. I fasci successivamente originati per semi-riflessione su ognuna delle due superfici sono sempre meno intensi. (Da: D. Kossel, *Moderne interferometrische Methoden der Feinwerktechnik*, Maschinenmarkt, 97, 1963. E. Leitz, Wetzlar, 92-86-111).

Da un lato e dall'altro della coppia di superfici si hanno quindi due gruppi simmetrici di fasci paralleli, ed in seno ad ogni gruppo si hanno numerosi fasci di intensità decrescente aventi fra loro sempre lo stesso rapporto di fase « T ». Se « T » è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda si ha interferenza positiva (massima intensità del fascio complessivo riflesso o trasmesso dal sistema delle due superfici); se « T » è pari ad un numero intero dispari di mezza lunghezze d'onda si ha interferenza negativa (minima intensità) con tutti i casi intermedi fra i due estremi.

Illuminando un sistema di due superfici parallele sufficientemente vicine con radiazione monocromatica, il campo apparirà quindi di luminosità uniforme ed il valore di luminosità dipenderà da « T ». In luce bianca si avrà il campo di un colore uniforme legato ancora al valore di « T ».

Nel caso di lamine non parallele, il fattore « d » (distanza fra le lamine) varia progressivamente, quindi « T » varia proporzionalmente secondo la formula (13) e quando « T » è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda si ha interferenza positiva (frangia chiara) e con « T » pari ad un numero dispari di mezza lunghezze d'onda si ha il fenomeno opposto (frangia scura). Osservando opportunamente il sistema delle superfici si vedrà il campo solcato da frange parallele allo spigolo del diedro formato dalle superfici. In luce bianca, le frange avranno l'aspetto della serie di Newton.

Un tale interferometro permette quindi di realizzare il metodo della tinta unita o l'interferogramma a seconda della posizione relativa delle due lamine. La caratteristica essenziale che lo distingue dal tipo di Mach-Zehnder è il fatto che le onde interferenti non sono due, ma molte, egualmente sfasate fra loro.

³ Questa formula è semplificata: si sono trascurati fra l'altro gli sfasamenti che possono avvenire all'atto della riflessione.

C'è però un grave punto di svantaggio a carico dello schema di Fabry-Pérot: le due onde dell'interferometro di Mach-Zehnder possono trovarsi in fase al momento di interferire anche se i cammini ottici percorsi sono lunghi; invece nell'interferometro di Fabry-Pérot le varie onde possono essere in fase solo quando le due lamine coincidono, cioè la loro distanza è nulla. Quindi non è possibile allontanare di molto le due lamine fra loro poiché si sale troppo con l'ordine di interferenza ed anche in radiazione monocromatica le frange appaiono sbiadite.

Se quindi si pone un interferometro Fabry-Pérot davanti all'obbiettivo di un microscopio, si può porre l'oggetto fra le due lamine; l'oggetto altera il valore dell'indice e quindi del cammino ottico nello spazio fra le lamine, e quindi altera la fase dell'onda che l'attraversa. Nel campo a tinta unita l'oggetto apparirà con luminosità o colore diverso come nel classico contrasto interferenziale; nel campo a frange si avrà la solita deformazione delle frange. La difficoltà dell'interferometro di Fabry-Pérot applicato al microscopio sta nel fatto che la distanza fra le lamine non può praticamente essere molto piccola e quindi l'ordine di interferenza è sempre elevato: in luce bianca è difficile osservare le frange o i colori di interferenza col metodo a tinta unita. Inoltre le lamine semiriflettenti devono sostituirsi ai vetrini porta-oggetto e copri-oggetto, ed è quindi difficile regolarne il parallelismo e la distanza. Per fortuna, il campo-oggetto di un microscopio è piccolo, ed in esso si può supporre che due vetrini di tipo commerciale siano sufficientemente piani.

Un altro inconveniente di questa classe di micro-interferometri è che, variando l'apertura del fascio di illuminazione, non varia solo lo sfasamento introdotto dall'oggetto che viene attraversato da raggi di diversa inclinazione, ma varia anche il cammino ottico fra le superfici semiriflettenti poiché varia l'angolo di incidenza « α » sulle superfici stesse (vedi la formula 13). Per avere quindi un minimo di contrasto nelle frange occorre limitare di molto l'apertura dal lato condensatore; e questo a parte la necessità di limitare la stessa apertura per evitare errori nella misura dello sfasamento introdotto dall'oggetto, che è comune agli altri schemi di principio.

La necessità di limitare l'apertura del condensatore diviene naturalmente più sentita quando aumenta la distanza fra le due lamine dell'interferometro, poiché si sale con l'ordine di interferenza ed il contrasto delle frange peggiora, a parità di composizione spettrale della radiazione usata.

E ancora, per ragioni teoriche che non stiamo a descrivere, la sensibilità del metodo aumenta quanto maggiore è il potere riflettente delle due lamine dell'interferometro. In questo modo però il rendimento fotometrico del sistema si abbassa, ed occorre prevedere sorgenti più forti; ma la difficoltà di ottenere una sorgente con stretto spettro di emissione aumenta, se maggiore deve essere la quantità di radiazione emessa; basti pensare che i filtri a banda passante stretta hanno sempre una trasmissione bassa.

Per aumentare il rendimento fotometrico dell'interferometro di Fabry e Pérot si possono usare per le superfici semi-riflettenti i sistemi di strati sottili e multipli depositati per evaporazione sotto vuoto che funzionano ancora su un principio interferenziale; a parità di potere riflettente o trasmittente, si può avere un coefficiente di assorbimento assai minore di quanto non si avrebbe con i vecchi semiriflettenti a strato metallico semplice (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 23.1).

Un altro inconveniente del sistema Fabry-Pérot è che oggetti di fase molto piccoli, al limite del potere di risoluzione, non sono visibili, poiché interessano solo in parte il sistema delle onde multiple, che sono tutte spostate lateralmente l'una rispetto all'altra.

Interferometri ad onde multiple del tipo di quello appena descritto sono stati ideati da Frederikse (1933), da Sir Thomas Merton (1946) e da Tolansky (1946); come vedremo, essi sono spesso applicati ad osservazioni in episcopia.

Per scrupolo di completezza vogliamo descrivere per sommi capi un altro dispositivo interferenziale dovuto a Nomarski (1952) consistente in un interferometro di Fabry e Pérot a lamine non parallele posto non davanti all'obbiettivo ma sopra l'obbiettivo stesso, in corrispondenza dell'immagine del diaframma del condensatore (L_1 ed L_2 in figura 20). L'interferometro lavora per riflessione; se l'oggetto è grande, esso ne fornisce numerose immagini leggermente spostate l'una rispetto all'altra; si fa in modo che la larghezza massima della serie di immagini (delle immagini ancora visibili dopo le ripetute riflessioni) sia al limite del potere risolutivo dello strumento, per cui

si ha un tipo di ombreggiatura dell'immagine quale si ha col metodo dello sdoppiamento differenziale. L'unica differenza è che le immagini interferenti non sono due ma molte.

Con oggetti piccoli si ha un funzionamento analogo a quello del contrasto di fase: nella pupilla d'ingresso del condensatore è posta una fenditura F la cui immagine F'' , come si è detto, si proietta sull'interferometro; a seconda della distanza fra le due lamine nel punto ove si forma quell'immagine, l'onda corrispondente verrà riflessa con una fase diversa. Quell'onda equivale all'onda diretta, imperturbata, del contrasto di fase. Di essa si potrà far variare la fase variando la posizione dell'interferometro, che è cuneiforme, come si è detto. L'onda diffratta invece, che ha grande apertura essendo l'oggetto, come si è presupposto, di piccole dimensioni, occupa tutta la superficie dell'interferometro e subisce uno sfasamento medio costante. Si ha dunque un contrasto di fase a sfasamento variabile fra onda diretta e diffratta.

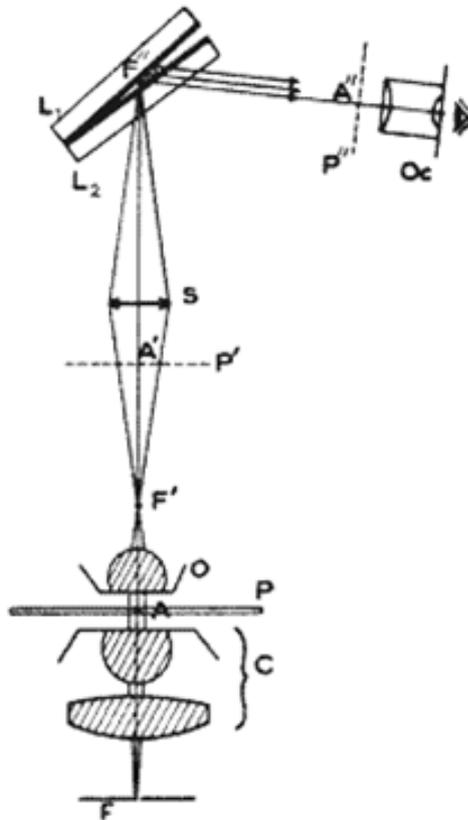


FIG. 20

Principio di funzionamento del dispositivo di Nomarski con interferometro Fabry-Pérot. L_1 ed L_2 costituiscono le lamine semiriflettenti dell'interferometro. F è la fenditura nel piano focale del condensatore C la cui immagine F' si trova nel piano focale posteriore dell'obiettivo O . Il sistema convergente S (lente relé) dà un'immagine di F' in F'' . Il preparato P è coniugato dell'immagine intermedia P' la quale è trasportata in P'' ad opera di S . Oc è l'oculare. Dopo il sistema $L_1 - L_2$ si hanno numerose onde riflesse spostate leggermente l'una rispetto all'altra e che possono interferire fra loro. (Stessa fonte di fig. 18).

Questo sistema, che è più diffusamente descritto nel citato volume di M. Françon, è ingegnoso ed economico, e consta di una unità da applicarsi su un microscopio normale in luogo dell'oculare, quindi molto pratica. Ma gli svantaggi sono molti: è possibile applicare solo il metodo dell'ombreggiatura, e solo con oggetti di medie dimensioni; per oggetti molto piccoli l'immagine non è più interferenziale. Occorre un diaframma a fessura, con le solite conseguenze.

Infine, occorre un sistema intermedio (S) che trasporti l'immagine della fessura del condensatore (cioè la pupilla di uscita dell'obiettivo F') sull'interferometro, in F'' . Questo sistema però trasporta anche l'immagine intermedia dell'oggetto (P') che risulta così ingrandita parecchie volte, in modo da

superare di molto i limiti dell'ingrandimento utile dello strumento.

Micro-interferometri a birifrangenza

In questi strumenti si ha uno sdoppiamento del fascio di illuminazione che attraversa l'oggetto oppure uno sdoppiamento del fascio di radiazione che esce dall'obbiettivo per formare l'immagine intermedia dello strumento.

Ne risultano in genere due immagini, che possono essere entrambe a fuoco (sdoppiamento laterale classico) oppure una fuoco ed una del tutto sfuocata, che sarà usata come onda di riferimento.

A volte lo sdoppiamento non è laterale (in direzione perpendicolare all'asse ottico) ma longitudinale, per cui, delle due immagini, una è necessariamente del tutto sfuocata.

In genere lo sdoppiamento non è forte, per cui si può usare un unico condensatore ed un unico obbiettivo; si tratta infatti di dispositivi economici.

Lo sdoppiamento è sempre ottenuto a mezzo di cristalli birifrangenti, nei quali ogni raggio luminoso è sdoppiato in un raggio ordinario ed uno straordinario, che possono avere percorsi assai diversi ed obbediscono alle leggi della birifrazione. Però in pratica i modi di ottenere lo sdoppiamento sono assai vari, per cui non rimane che descrivere singolarmente le varie soluzioni adottate.

A) Il principio di Jamin e Lebedeff

Questo principio, a cui si è ispirata la casa Zeiss Oberkochen per la realizzazione pratica di uno strumento, si basa sull'interferometro di Jamin (1868) che solo nel 1930 Lebedeff ha applicato al microscopio.

Ecco il principio (fig. 21): il fascio di radiazione proveniente dal sistema di illuminazione viene polarizzato linearmente dal polarizzatore « *Pol* » e attraversa il condensatore (non rappresentato in figura). « *K1* » è una lamina birifrangente tagliata obliquamente rispetto all'asse ottico, i cui piani di vibrazione sono indicati in figura. Da essa ogni raggio esce sdoppiato in un raggio ordinario O_1 che obbedisce alle leggi della rifrazione e quindi prosegue in linea retta, ed un raggio straordinario S_1 che segue nella lamina un percorso obliquo, secondo le note leggi della birifrazione. Questo raggio S_1 viene quindi spostato lateralmente e quando esce da *K1* riprende un percorso parallelo al raggio incidente e parallelo ad O_1 . I due raggi O_1 ed S_1 sono polarizzati in piani perpendicolari fra loro; trascurando per il momento l'elemento indicato « $\lambda/2$ », i due raggi attraversano il campo oggetto (non disegnato in figura) e, se l'oggetto è sufficientemente piccolo, uno solo di essi è perturbato e costituisce quindi l'onda oggetto; l'altro raggio, imperturbato, costituisce l'onda di riferimento.

Dopo l'oggetto, i due raggi incontrano un secondo elemento birifrangente *K2* dove ognuno di essi è ancora sdoppiato con le stesse modalità viste sopra. Se gli elementi *K1* e *K2* sono identici, ed egualmente orientati, il raggio ordinario derivato da S_2 , che prosegue in linea retta, dovrà coincidere all'uscita da *K2* col raggio straordinario originato da O_2 , che è stato deviato da *K2*, ed interferire con esso.

I due elementi *K1* e *K2* hanno quindi la funzione di separatore e di ricombinatore del fascio; si ha qui uno schema analogo al Mach-Zehnder, ma gli elementi semi-riflettenti di quello sono sostituiti da elementi birifrangenti, e le due onde interferenti sono polarizzate.

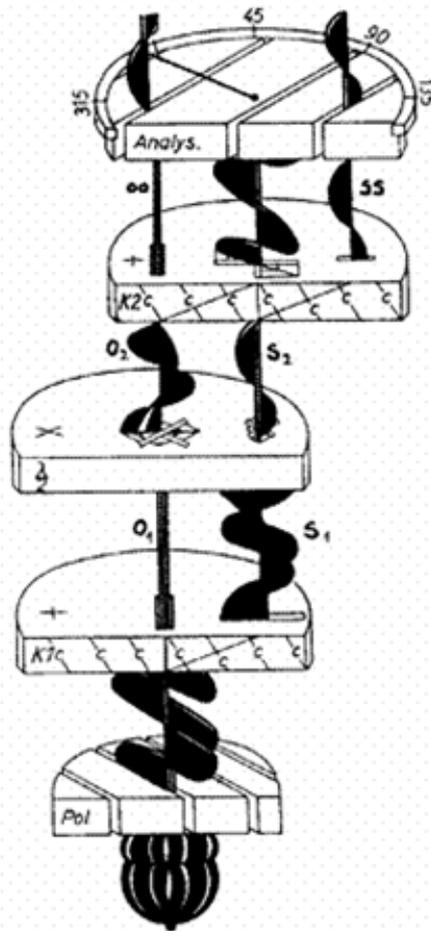


FIG. 21

Schema del microscopio interferenziale secondo il principio di Jamin e Lebedeff, basato sull'uso di lamine birifrangenti (K1 e K2); in esse «c» indica la direzione dell'asse ottico. Spiegazione nel testo. (Stessa fonte di fig. 1).

Si noti che i due raggi incidenti su K2 (O_2 ed S_2), in assenza dell'elemento indicato con « $\lambda/2$ », sarebbero polarizzati in piani paralleli ai piani di vibrazione di K2 e quindi non potrebbero sdoppiarsi, non potrebbero venire biriffratti. La funzione della lamina birifrangente indicata con « $\lambda/2$ » è proprio quella di polarizzare circolarmente i due raggi O_1 ed S_1 affinché ognuno di essi possa dar luogo in K2 a due raggi polarizzati in piani perpendicolari fra loro.

Si noti ancora che i raggi interferenti, l'ordinario proveniente da S_2 e lo straordinario proveniente da O_2 vibrano in piani perpendicolari fra loro, poiché costituiscono un raggio ordinario ed uno straordinario provenienti dalla medesima lamina birifrangente; affinché essi interferiscano occorre riportare i loro piani di vibrazione in un unico piano, cioè interporre prima dell'oculare un analizzatore (« *Analys.* » in figura).

Ed ancora: i due raggi O_2 ed S_2 non danno luogo solo ai due raggi interferenti sopra visti, ma anche ai raggi OO ed SS , l'ordinario originato da O_2 e lo straordinario originato da S_2 ; questi ultimi forniscono immagini spurie; tali immagini essendo sfuocate e lateralmente spostate, danno luogo a « spettri » ai margini del campo visivo⁴.

L'obbiettivo va posto dopo l'elemento K2. Non è possibile neppure porre l'elemento K1 prima del condensatore; cioè fra K1 e K2 non deve esistere nessun elemento avente una potenza, in pratica

⁴ La sfocatura è dovuta al diverso cammino percorso: i due raggi interferenti attraversano le lamine birifrangenti una volta come raggi ordinari (perpendicolarmente) ed una volta come raggi straordinari (obliquamente). Il raggio OO invece è sempre ordinario ed il raggio SS sempre straordinario; i percorsi ottici sono dunque diversi.

il solo preparato. La ragione di ciò sta nel fatto che i raggi O_1 ed S_1 sono paralleli e, se essi dovessero attraversare il condensatore prima di giungere sul preparato, attraverserebbero il campo oggetto obliquamente e non potrebbero ricongiungersi dopo l'obbiettivo. Occorre dunque incollare $K1$ e la lamina $\lambda/2$ sulla lente frontale del condensatore e $K2$ sulla lente frontale dell'obbiettivo. Lo spessore di $K1$ e $K2$, legato al valore dello sdoppiamento laterale, deve essere lo stesso per i due elementi per permettere il ricongiungimento dei due fasci interferenti in $K2$, e deve essere tanto minore quanto minore è il diametro del campo-oggetto, cioè quanto maggiore è la potenza dell'obbiettivo. Occorrono dunque obbiettivi e condensatori speciali, ognuno con apposite lamine birfrangenti incollate sulla lente frontale, i quali vanno usati a coppie, ogni obbiettivo con un dato condensatore.

È questo uno degli svantaggi del dispositivo di Lebedeff.

Altro svantaggio, comune ad altri sistemi a birifrangenza, è che l'onda di riferimento attraversa il campo oggetto. Un oggetto esteso ne perturba quindi la fase e provoca errori nelle misure.

Altro svantaggio ancora è il fatto di non permettere di usare il metodo dell'interferogramma né dello sdoppiamento d'immagine, ma solo il contrasto interferenziale, a parte la presenza degli «spettri» sopra citati.

Un vantaggio dello strumento nella sua realizzazione pratica è la possibilità di sostituire rapidamente gli elementi ottici per l'osservazione interferenziale con elementi per l'osservazione con tutti gli altri metodi noti in microscopia.

Nello strumento sono inoltre previsti numerosi compensatori intercambiabili e regolabili che permettono la misura dello sfasamento introdotto dall'oggetto col metodo dell'equiparazione del colore o dell'annerimento nel fondo immagine e nell'oggetto: essi sono costituiti in ogni caso da oggetti birfrangenti in cui passano i raggi interferenti ordinario e straordinario uscenti da $K2$ prima di arrivare all'analizzatore che li ricombina in un unico piano di vibrazione. Questi compensatori alterano la fase relativa di quei raggi ordinario e straordinario, cioè la fase relativa dell'onda-oggetto e dell'onda di riferimento.

Si ha dunque un contrasto interferenziale a luminosità (o colore) del fondo variabile.

Gli sfasamenti minimi misurabili con questi compensatori sono dell'ordine di $1/2.000$ di lunghezza d'onda per il compensatore di Brace-Koehler e di Sénarmont, e di $1/500$ di lunghezza d'onda col compensatore di Ehringhaus, sempre nelle migliori condizioni.

— Il compensatore di Brace-Koehler serve per sfasamenti piccoli. Il campo di regolazione arriva fino a $1/10$, $1/20$ ed $1/30$ di lunghezza d'onda. Si tratta di una sottile lamina birfrangente girevole attorno all'asse ottico del microscopio.

— Il compensatore di Sénarmont è utile per sfasamenti fino ad una lunghezza d'onda; consta di una lamina birfrangente $\lambda/4$ che va inserita sotto l'analizzatore e orientata parallelamente al polarizzatore. Lo sfasamento variabile si misura ruotando l'analizzatore attorno all'asse ottico. Occorre in questo caso servirsi di radiazione monocromatica.

— Il compensatore di Ehringhaus serve per sfasamenti fino a 122 lunghezze d'onda. Consta di una lamina birfrangente di calcite girevole attorno ad un asse perpendicolare all'asse ottico: variandone l'inclinazione rispetto alla radiazione incidente, variano i cammini ottici dei raggi ordinario e straordinario, e quindi la loro fase relativa.

Usando come materiale il quarzo lo sfasamento massimo possibile è di 7 lunghezze d'onda.

Nel dispositivo di Lebedeff l'oggetto è illuminato con radiazioni polarizzate; l'eventuale birifrangenza dell'oggetto complica le cose e rende difficile l'interpretazione dell'immagine.

L'apertura del condensatore, al solito, deve essere limitata per evitare errori di misura e perdite di contrasto.

B) *Il principio di Nomarski (oggi normalmente conosciuto come "DIC") (1952).*

Questo principio di micro-interferometro è uno dei pochi applicato da più di una casa costruttrice: Nacet (Parigi), Reichert (Vienna), BBT, Barbier, Benard & Turenne (Parigi), Zeiss (Oberkochen), ecc. Oggi è diffuso col nome di DIC (Differential Interference Contrast).

Il primo strumento del genere è stato descritto da Huxley, secondo un brevetto di Smith (1947),

e si basava sullo sdoppiamento dell'immagine ad opera di prismi di Wollaston. Tali prismi sono costituiti da lamine plan-parallele di quarzo dello spessore di uno o pochi millimetri, ottenute incollando due cunei dello stesso angolo diedro. L'angolo dei cunei è, nel caso nostro, 45' circa. I due sottili cunei sono tagliati parallelamente all'asse ottico, ma in uno di essi l'asse ottico è parallelo allo spigolo del cuneo, nell'altro cuneo l'asse ottico è perpendicolare allo spigolo (fig. 22). Poiché i due cunei sono incollati con gli spigoli paralleli, risulta che i loro assi ottici sono perpendicolari fra loro, e perpendicolari all'asse ottico dello strumento.

L'onda proveniente dall'apparato di illuminazione (non rappresentato in figura 22) viene polarizzata rettilineamente da un polarizzatore P ruotato a 45° dagli assi del prisma di Wollaston che segue (Q_1). Entrando nel prisma, ogni raggio si sdoppia in un raggio ordinario ed uno straordinario che si propagano nella stessa direzione del raggio incidente, in quanto il loro cammino è perpendicolare all'asse ottico del cristallo. Alla superficie di contatto dei due cunei, il raggio ordinario entra in un cristallo diversamente orientato e si propaga come raggio straordinario, cioè con un diverso indice; la stessa variazione di indice, in senso opposto, viene vista dal raggio straordinario. Ne consegue che, essendo la superficie di separazione dei cunei leggermente inclinata rispetto al raggio incidente, i due raggi ordinario e straordinario vengono rifratti in direzioni opposte rispetto all'asse ottico, nel piano perpendicolare agli spigoli del prisma: uno di essi si avvicina alla normale, l'altro si allontana. Quindi essi divergono. All'uscita del secondo cuneo, entrando nell'aria, i due raggi si allontanano dalla normale (che è parallela all'asse ottico) e quindi divergono ulteriormente.

Ponendo il prisma di Wollaston nel piano focale del condensatore (« Cond. » in figura) i due raggi, che escono divergenti dal prisma, escono dal condensatore paralleli, attraversano l'oggetto « O » e l'obbiettivo (« Obbiect. »), il quale li fa convergere nel suo piano focale; essi allora entrano in un secondo prisma di Wollaston (« Q_2 ») convergenti. Dunque nel piano focale posteriore dell'obbiettivo si viene a formare l'immagine del primo prisma, ed i raggi che convergono in questa immagine, cioè nel secondo prisma, verranno ricombinati ed usciranno come due raggi coincidenti. Fra questi raggi coincidenti avviene l'interferenza⁵.

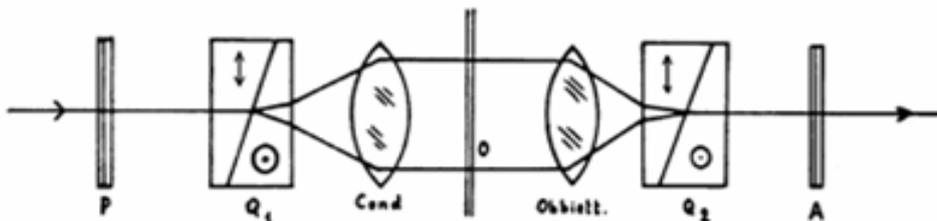


FIG. 22

Principio di funzionamento del microscopio interferenziale a birifrangenza con prismi di Wollaston. Non è rappresentata la sorgente di radiazione né l'ottica che segue l'obbiettivo. Lo spessore dei cunei è stato esagerato per chiarezza. Spiegazione nel testo.

Il secondo prisma di Wollaston compie cioè una funzione inversa del primo: il primo sdoppia l'onda, il secondo ricongiunge le due onde parziali.

È ancora il principio dello sdoppiamento dell'onda studiato a proposito del dispositivo di Jamin e Lebedeff, ma con la differenza che i due fasci parziali non sono paralleli: essi sono divergenti e divengono paralleli solo ad opera del condensatore che segue; così essi escono dall'obbiettivo convergenti ed il prisma che segue li riporta alla coincidenza. Quindi i due elementi birifrangenti si

⁵ In realtà i due raggi sono polarizzati in piani perpendicolari fra loro e possono interferire solo facendo ricombinare i due piani, cioè ponendo dopo il secondo prisma Q_2 un analizzatore « A » ruotato di 45° rispetto agli assi del prisma, in cui tutte le radiazioni producono onde polarizzate nello stesso piano.

pongono prima del condensatore e dopo l'obbiettivo, cioè i sistemi ottici medesimi possono essere del tutto normali.

È questo un grande vantaggio costruttivo rispetto al sistema precedente, in cui le lamine birifrangenti andavano incollate sulle lenti frontali del condensatore e dell'obbiettivo.

I due fasci parziali costituiscono ancora l'onda-oggetto e l'onda di riferimento, ed attraversano entrambi il campo oggetto, col solito pericolo che l'oggetto turbi l'onda di riferimento.

L'oggetto è ancora traversato da radiazioni polarizzate, col solito pericolo di rendere difficile l'interpretazione delle immagini date da oggetti birifrangenti.

Affinchè il ricongiungimento delle due onde a livello del secondo prisma di Wollaston sia perfetto, occorre che la convergenza delle due onde che entrano in tale prisma sia adattata al potere del prisma stesso; occorre cioè che gli elementi birifrangenti siano adattati alla potenza del condensatore e dell'obbiettivo.

In pratica, si lascia fisso il secondo prisma ed il condensatore, e si cambia il primo prisma, a mezzo di un revolver posto nel condensatore, tutte le volte che si cambia obbiettivo.

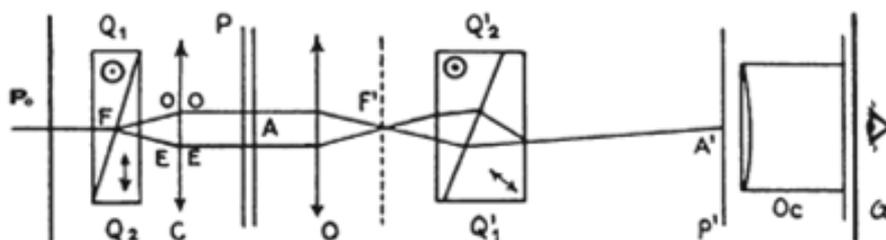


FIG. 23

Principio di funzionamento del dispositivo interferenziale di Nomarski con un prisma di Wollaston modificato. P_o = polarizzatore; $Q_1 - Q_2$ = primo prisma di Wollaston, di tipo normale; C = condensatore; P = preparato; O = obbiettivo; F' = piano focale posteriore dell'obbiettivo; $Q'_1 - Q'_2$ = secondo prisma di Wollaston modificato, posto dopo il piano focale dell'obbiettivo; O_c = oculare; α = analizzatore; P' = immagine intermedia dell'oggetto. (Stessa fonte di fig. 18).

Un difetto del sistema di Huxley è che il secondo prisma va posto nel piano focale dell'obbiettivo, e tale piano, nei sistemi forti, è inaccessibile perché posto all'interno del sistema di lenti.

Una elegante soluzione a questo problema è stata data da Nomarski (1952) il quale, dopo l'obbiettivo, usa un prisma di Wollaston modificato; uno dei cunei di questo prisma modificato è tagliato obliquamente rispetto all'asse ottico (Q'_1 in figura 23) di modo che i due raggi possono entrare nel prisma divergendo ma vengono egualmente riportati all'uscita in cammini coincidenti. Tale prisma si può allora porre dopo il piano focale dell'obbiettivo, in un punto dove i raggi resi convergenti dall'obbiettivo sono divenuti divergenti⁶.

Si possono anche usare due prismi di Wollaston modificati: rispetto ai prismi di Wollaston semplici, che vanno posti nei piani focali del condensatore e dell'obbiettivo, si usano prismi modificati, fuori dei medesimi piani focali.

Il sistema Nomarski richiede uno stativo modificato per la sistemazione dei prismi di Wollaston, ma permette un rapido passaggio ad altri metodi di osservazione (campo chiaro, contrasto di fase, ecc.). Taluni costruttori pongono infatti nel revolver sotto al condensatore sia i prismi di Wollaston, sia i diaframmi anulari del contrasto di fase.

Questo dispositivo richiede al solito una limitazione di apertura del condensatore per evitare

⁶ Parliamo dei raggi che formano l'immagine del diaframma d'apertura e convergono nel piano focale posteriore dell'obbiettivo (F' in fig. 23).

errori durante le misure di sfasamento, però non si ha riduzione sensibile di contrasto anche con aperture forti poiché i due prismi birifrangenti sono del tutto equivalenti e permettono la perfetta sovrapposizione delle due onde parziali a livello del secondo prisma: la coerenza fra le due onde interferenti è assicurata dal primo prisma (divisore) per qualunque valore dell'apertura. **Si può quindi sfruttare interamente l'apertura ed il potere risolutivo degli obbiettivi.**

Un simile vantaggio, in misura maggiore o minore, è comune a tutti i sistemi che sdoppiano il fascio prima dell'oggetto, compreso il sistema secondo Lebedeff sopra descritto. Di questo si parlerà nelle conclusioni.

Il dispositivo Nomarski provoca uno sdoppiamento laterale dell'immagine dell'oggetto, e viene generalmente usato col metodo differenziale, provocando le « ombreggiature » dell'immagine con un effetto di apparente rilievo (vedi le figg. da 12 a 14). Il secondo prisma birifrangente cioè sdoppia l'onda proveniente dall'oggetto, e lo sdoppiamento viene contenuto nei limiti del potere risolutivo dello strumento.

Il vantaggio essenziale del sistema è la semplicità e la sicurezza di funzionamento.

Introducendo sotto il primo prisma di Wollaston un compensatore birifrangente, per esempio il compensatore di Soleil a lamine di quarzo incrociate, capace di far variare la fase relativa del raggio ordinario e di quello straordinario in maniera continua, è possibile regolare il contrasto dell'immagine e adattarlo alle caratteristiche dell'oggetto: si varia cioè la fase fra le onde interferenti. Una tale regolazione è possibile anche spostando lateralmente il primo o il secondo prisma di Wollaston: si varia lo spessore di cristallo attraversato da ogni raggio come raggio ordinario e come straordinario, cioè lo sfasamento globale da esso subito. Si ricordi che ogni raggio incontra nel prisma di Wollaston due cunei incrociati, nei quali esso si propaga prima come ordinario e poi come straordinario o viceversa.

Questa regolazione del contrasto permette di apprezzare lo sfasamento introdotto dall'oggetto osservando le variazioni di contrasto dell'immagine durante la regolazione. In linea di principio è quindi possibile anche eseguire delle misure approssimate di cammino ottico.

Con un compensatore di Babinet, costituito da due cunei di quarzo incrociati, di cui uno spostabile, posto prima dell'oculare in corrispondenza dell'immagine intermedia del microscopio, è possibile inclinare fra loro i due fronti d'onda in modo da creare un interferogramma. Tale possibilità non è però sfruttata in pratica.

Come si vede, il principio di Nomarski ammette numerose varianti, e difatti i vari costruttori applicano il principio in maniera leggermente diversa. Il lettore interessato potrà rifarsi alle descrizioni dei singoli strumenti date dai costruttori.

Una variante semplificata dello stesso principio è stata poi introdotta dal Nomarski medesimo, ed è stata usata per la fabbricazione dalla casa Nacet (Parigi). Essa consiste nell'eliminare il primo prisma di Wollaston e porre un solo prisma di tipo normale *prima* del piano focale dell'obbiettivo. Questo è possibile solo con obbiettivi deboli, aventi il piano focale fuori dal sistema di lenti, ma usando il prisma di Wollaston modificato sopra descritto, si può porre il prisma lontano dal sistema di lenti e si possono quindi usare obbiettivi forti. In ogni caso, l'effetto del prisma è quello di sdoppiare il fascio emergente dall'obbiettivo, il quale forma l'immagine del diaframma del condensatore, prima dell'immagine stessa. Si hanno così due sdoppiamenti: prima di tutto uno sdoppiamento dell'immagine dell'oggetto, quale si ha in ogni caso (anche nel caso dei due prismi sopra discusso), con qualunque posizione del prisma; in secondo luogo uno sdoppiamento dell'immagine del diaframma, che non si verificava nello schema a due prismi essendo il secondo prisma posto proprio in corrispondenza di quell'immagine.

Una prima conseguenza, negativa, dell'avere un solo prisma, è quella di avere un'onda sola incoerente a livello della pupilla di uscita dell'obbiettivo; per avere l'interferenza occorre partire da un'onda coerente, cioè occorre che l'apertura del sistema condensatore-obbiettivo sia minima e che il fascio attraversante l'oggetto sia, di conseguenza, parallelo; in pratica, si pone nel piano focale anteriore del condensatore un diaframma a fenditura invece di uno ad iride.

Ma una seconda conseguenza, utile, deriva dal fatto di avere il prisma *prima* del piano focale dell'obbiettivo: nel piano focale stesso si vengono ad avere due immagini del diaframma del condensatore, cioè due fenditure immagini; queste due immagini producono due onde inclinate fra

loro le quali interferiscono a livello dell'immagine intermedia producendo un interferogramma.

Le due onde, oltre che inclinate fra loro, sono anche lateralmente spostate, per cui si produce la solita immagine a sdoppiamento laterale con frange, in cui le due onde interferenti sono entrambe perturbate dall'oggetto. Per rendere decifrabile lo spostamento delle frange, occorre che lo sdoppiamento sia totale, non differenziale.

Su tale immagine si può misurare lo spostamento laterale delle frange ed eseguire quindi il calcolo del cammino ottico dell'oggetto (vedi la fig. 7). Lo spostamento delle frange si può anche misurare a mezzo di un compensatore: poiché le due onde interferenti sono polarizzate in piani ortogonali fra loro, prima dell'analizzatore si può porre un qualunque compensatore birifrangente capace di variare con continuità lo sfasamento fra raggio ordinario e straordinario. Si varia quindi la fase relativa delle due onde interferenti e si sposta lateralmente il sistema di frange in maniera continua. Facendo coincidere una frangia non perturbata con un dato punto del campo visivo (un reticolo oculare, ed esempio), si esegue una lettura sul compensatore, che si ripete dopo aver portato nel medesimo punto una frangia perturbata dall'oggetto, corrispondente a quella sopra citata. La differenza delle due letture sul compensatore dà la distanza fra frangia perturbata e non, cioè lo sfasamento operato dall'oggetto.

Se poi si sposta lungo l'asse ottico il prisma di Wollaston, è ovvio che varierà lo sdoppiamento laterale del fascio uscente dall'obbiettivo (che è diviso in due dal prisma) e quindi varierà la distanza fra le due immagini della fenditura. Ciò varia l'inclinazione relativa delle due onde interferenti, e quindi la spaziatura delle frange.

Avvicinando sempre più il prisma al piano focale dell'obbiettivo, si avvicinano sempre più le due immagini della fenditura fino a farle coincidere. In queste condizioni si ricade nello schema precedente, quello a due prismi di Wollaston, in cui il secondo prisma era posto esattamente nel piano focale dell'obbiettivo (il prisma modificato è geometricamente lontano dal piano focale ma otticamente produce lo stesso effetto che se vi fosse): le due onde interferenti hanno la stessa inclinazione, cioè sono parallele, ed il campo immagine appare a tinta unita. Si ha allora il contrasto interferenziale; permane s'intende lo sdoppiamento dell'immagine, poiché il fascio che forma l'immagine dell'oggetto, l'onda diffratta, è unico e non polarizzato quando entra nel prisma di Wollaston e viene sdoppiato da quest'ultimo.

Anche nel caso della tinta unita si può usare il compensatore birifrangente regolabile sopra citato per sfruttare il metodo di misura per annerimento massimo nel campo immagine e nell'oggetto.

Rimane lo svantaggio di usare una fenditura nel condensatore, ma il dispositivo è semplice e versatile. Se il polarizzatore e l'analizzatore si incollano direttamente sul prisma di Wollaston (a 45° sui due assi ottici di quello ed a 90° fra loro), si ha un complesso assai compatto che può essere usato anche dopo l'oculare in quanto la pupilla d'uscita dell'oculare è coniugata di quella dell'obbiettivo. Si può allora servirsi di uno stativo normale, ma lo sdoppiamento sarà piccolo poiché un prisma posto dopo l'oculare dovrà essere molto sottile per la forte apertura del fascio emergente da quello.

Come si vede, il principio di Nomarski consiste essenzialmente nell'uso di un prisma di Wollaston modificato, equivalente ad un prisma normale, posto più avanti o più indietro lungo l'asse ottico dello strumento: col prisma modificato in posizione tale da equivalere ad un prisma normale nel piano focale dell'obbiettivo si sdoppia il fascio che forma l'immagine dell'oggetto, ma non l'immagine del diaframma del condensatore: si hanno da tale immagine onde parallele, cioè sdoppiamento laterale dell'immagine dell'oggetto con fondo a tinta unita. Col prisma prima del piano focale si ha sdoppiamento dell'immagine dell'oggetto e del diaframma, cioè onde interferenti inclinate, quindi immagine sdoppiata su fondo a frange.

Il fatto che prima del condensatore ci sia o no un altro prisma di Wollaston è secondario: se il prisma c'è, esso crea due raggi parziali coerenti da ogni raggio incidente, ed essi interferiscono quando sono ricombinati dal prisma dopo l'obbiettivo; si può dunque usare radiazione incoerente, cioè un fascio illuminante a forte apertura poiché la coerenza fra le due onde interferenti è assicurata dal primo prisma per qualunque valore dell'apertura.

Se invece il prisma prima del condensatore non c'è, occorre operare in radiazione coerente, quindi a livello del preparato il fascio deve essere parallelo. Si pone allora una fenditura nel condensatore. In altre parole, l'immagine del diaframma d'apertura nel piano focale dell'obbiettivo non deve essere estesa poiché, se lo fosse, si avrebbero in essa infiniti punti che agirebbero come sorgenti elementari incoerenti e non potrebbero interferire fra loro. L'onda che emerge dall'obbiettivo ed incide sull'unico prisma di Wollaston deve già essere coerente in modo che le due onde create dal prisma stesso per sdoppiamento possano interferire fra loro.

C) *L'«oculare Interferenziale» di M. Françon (1951)*

Cominciamo col dire che l'immagine intermedia di un microscopio, quella osservata dall'oculare, è coniugata dell'oggetto, e quindi, a meno delle limitazioni dell'obbiettivo, ne riporta fedelmente la struttura. Ogni variazione di cammino ottico nell'oggetto provoca una corrispondente variazione di fase nell'immagine intermedia. Le operazioni che si possono compiere sull'oggetto si potranno allora compiere anche sull'immagine intermedia. Dovendo porre in vicinanza dell'oggetto, cioè fra oggetto ed obbiettivo, un qualunque dispositivo ottico come quello che stiamo per descrivere, è ovvio che bisognerà fare i conti con la distanza frontale dell'obbiettivo, che si riduce a pochi decimi di millimetro con gli obbiettivi forti; sarà allora assai più comodo porre lo stesso dispositivo in prossimità dell'immagine intermedia, cioè nell'oculare, dove lo spazio disponibile è assai maggiore.

Il dispositivo di cui stiamo parlando si basa sull'uso di lamine birifrangenti tagliate obliquamente all'asse, come nel dispositivo di Jamin e Lebedeff sopra descritto. In quel caso però si aveva una lamina prima dell'oggetto ed una dopo, in modo che le due onde create per sdoppiamento dalla prima lamina fossero coerenti fra loro e potessero interferire nella seconda indipendentemente dal valore dell'apertura. Il fenomeno era dunque indipendente dal tipo di illuminazione usata, e cioè il preparato poteva venir illuminato da un fascio incoerente di apertura relativamente elevata (a parte le limitazioni imposte dalle precisioni di misura).

Eliminando la prima lamina, come nel dispositivo di Françon che stiamo descrivendo, il sistema deve operare con radiazione coerente: il fascio a livello del preparato risulterà parallelo poiché il diaframma nel condensatore avrà la forma di una fenditura.

Del resto, si è appena parlato del dispositivo di Normarski, che può funzionare a piena apertura quando si serve di due prismi di Wollaston, uno prima ed uno dopo l'oggetto, ed invece deve usare una fenditura nel condensatore se si elimina il primo prisma. Le ragioni di questa limitazione di apertura sono sempre le stesse.

Se nel condensatore del microscopio poniamo una fenditura, il fascio di radiazione fra condensatore ed obbiettivo si può considerare collimato (a raggi paralleli); nel piano focale posteriore dell'obbiettivo avremo un'immagine della fenditura e, se la lente di campo dell'oculare ha il suo primo fuoco in corrispondenza di quella immagine, avremo ancora raggi paralleli (per le immagini coniugate della sorgente) dopo la lente di campo, cioè in corrispondenza dell'immagine intermedia.

Dunque l'unica lamina birifrangente di Jamin che richiede un fascio di illuminazione (onda diretta) parallelo si può porre fra oggetto ed obbiettivo come fra lente di campo e lente oculare dell'oculare.

In pratica è stata seguita questa seconda soluzione, accoppiata naturalmente all'uso della fenditura nel condensatore.

Ovviamente, in queste condizioni, una lamina birifrangente tagliata obliquamente rispetto all'asse ottico produce uno sdoppiamento laterale dell'immagine. E ovviamente, la lamina deve ricevere radiazioni polarizzate (polarizzatore a 45° dalle direzioni principali del cristallo, posto in un punto qualunque prima della lamina) e deve essere seguita da un analizzatore, parallelo o incrociato rispetto al polarizzatore. Nell'analizzatore, i raggi ordinario e straordinario della lamina birifrangente vibrano nello stesso piano⁷ ed interferiscono, essendo coerenti fra loro.

⁷ Per meglio dire: ammettono componenti che vibrano nello stesso piano.

Un « oculare interferenziale » costruito secondo questi principi è stato prodotto dalle case O.P.L. (Optique et Précision de Levallois, Parigi) e B.B.T. (Barbier, Benard et Turenne, Parigi).

Presupponendo l'uso di una fenditura nel condensatore, esso fornisce sempre un'immagine con direzione preferenziale per il contrasto.

Ma ora occorre fare una considerazione: la lamina birifrangente sopra descritta produce uno sdoppiamento laterale fisso ed uno sfasamento relativo delle due onde parziali ancora fisso. Lo sfasamento è dovuto al diverso indice del raggio ordinario e straordinario ed al diverso percorso da essi seguito.

Per cambiare lo sdoppiamento laterale, il sistema più semplice è di cambiare lamina; poiché questo è egualmente scomodo, l'oculare interferenziale di Françon viene fabbricato per uno sdoppiamento laterale fisso molto piccolo, ai limiti del potere risolutivo dello strumento. Si usa quindi il dispositivo col metodo dello sdoppiamento differenziale, cioè dell'« ombreggiatura ». Ma naturalmente sarebbe possibile usare lamine a sdoppiamento laterale forte, cioè sfruttare il metodo dello sdoppiamento totale. In questo caso, essendo le due onde interferenti entrambe perturbate dall'oggetto, occorre al solito che l'oggetto sia piccolo ed isolato in un campo oggetto il più possibile libero.

In ogni caso, i colori dell'immagine o delle sue ombreggiature possono permettere di apprezzare lo sfasamento introdotto dall'oggetto, cioè il suo cammino ottico.

Per cambiare poi la relazione di fase fra i due fasci uscenti dalla lamina birifrangente, cioè fra le onde interferenti, anche in maniera continua, ci si può servire di uno dei compensatori più volte citati (quello di Soleil, ad esempio); in questo modo si avrà la possibilità di variare il colore o la luminosità di fondo del campo immagine. Se il colore di fondo è il magenta o rosso « di 1° ordine », si avrà come al solito la massima sensibilità del metodo.

Un modo più semplice di variare la fase relativa delle due onde parziali è di inclinare la lamina birifrangente, cioè cambiare i percorsi del raggio ordinario e straordinario in seno alla lamina stessa: una inclinazione di $\pm 2^\circ$ permette di raggiungere il terzo ordine di interferenza.

Se poi si accollano due lamine birifrangenti eguali, ma con gli assi ottici incrociati, si ha il «polariscopio di Savart», in cui un raggio, ordinario nella prima lamina, diviene straordinario nella seconda e viceversa. Lo sfasamento creato fra i due raggi dalla prima lamina viene esattamente compensato da uno sfasamento eguale ed opposto operato dalla seconda lamina, per cui i due raggi percorrono globalmente cammini eguali ed escono in fase; s'intende che lo spessore e l'inclinazione dell'asse ottico⁸ deve essere rigorosamente eguale per le due lamine.

Producendo due onde parziali in fase, questo polariscopio fornisce un campo bianco (in luce bianca) o con la massima luminosità (in radiazione monocromatica), cioè interferenza positiva.

Se l'analizzatore è incrociato col polarizzatore, le onde parziali vengono decomposte dall'analizzatore in due componenti in opposizione di fase, per cui si ha la condizione opposta a quella descritta, che presupponeva analizzatore parallelo col polarizzatore: si ha interferenza negativa e campo oscuro: è il caso di un classico microscopio polarizzatore, che dà il campo chiaro a Nicols paralleli ed il campo oscuro a Nicols incrociati.

Se al polariscopio di Savart si aggiunge un compensatore variabile, lo sfasamento fra le onde interferenti, inizialmente nullo, può essere portato ancora una volta al valore voluto.

Si noti che, nel polariscopio di Savart, lo sfasamento relativo dei due raggi emergenti viene annullato, ma lo spostamento laterale no: anzi, la prima lamina dà un certo spostamento in una direzione, la seconda dà un eguale spostamento in direzione ortogonale, poiché lo spostamento del raggio straordinario dipende dall'orientamento degli assi ottici, che sono incrociati nelle due lamine; alla fine, i due spostamenti si sommano vettorialmente.

Se poi si aggiunge al sistema un elemento birifrangente cuneiforme capace di dare una diversa inclinazione alle due onde, si arriva all'interferogramma, ma si è già detto che l'interferogramma accoppiato allo sdoppiamento differenziale è di scarsa utilità, per cui occorrerebbe tornare ad una lamina birifrangente forte, capace di dare lo sdoppiamento totale.

L'oculare interferenziale opera in radiazione polarizzata e quindi, osservando oggetti

⁸ Stiamo parlando di asse ottico non in senso geometrico ma cristallografico. Una lamina a facce piane non può avere un asse ottico geometrico.

birifrangenti, il risultato è influenzato dall'orientamento reciproco dell'indicatrice ottica dell'oggetto e del polarizzatore.

Vantaggio di tale oculare è di essere indipendente da tutto ciò che precede l'oculare: obiettivo, sistema di illuminazione, ecc. Esso può essere usato perciò anche nelle osservazioni in episcopia, nei microscopi metallografici, ecc.

In complesso il dispositivo non è versatile, poiché può essere usato solo con sdoppiamento totale o differenziale fissi, ed al massimo è possibile cambiare il colore di fondo del campo immagine.

D) I dispositivi a sdoppiamento assiale

Vogliamo ora descrivere due dispositivi, interessanti dal punto di vista teorico, in cui si usano elementi birifrangenti per ottenere due immagini dell'oggetto, ma non spostate lateralmente come si è visto finora, bensì longitudinalmente.

Essendo le due immagini su piani diversi, una di esse può essere messa a fuoco ed osservata, l'altra, necessariamente sfuocata, si allarga nel piano immagine e non disturba. L'interferenza si verifica fra l'immagine a fuoco (onda-oggetto) e quella sfuocata (onda di riferimento).

Le due onde interferenti sono, nei dispositivi a sdoppiamento assiale che stiamo per descrivere, entrambe perturbate dall'oggetto, per cui è molto difficile eseguire misure di sfasamento precise.

Le stesse onde, inoltre, sono parallele, per cui è possibile il solo metodo del contrasto interferenziale a tinta unita.

Il principio di Philpot (fig. 24) prevede una lente doppia di quarzo Q_1 posta fra la sorgente S ed il condensatore C . Tale lente è costituita da un elemento positivo (convergente) ed uno negativo (divergente) tali che le due superfici esterne del doppietto siano concentriche; i due elementi sono tagliati l'uno parallelamente all'asse ottico del cristallo, l'altro perpendicolarmente. Le radiazioni polarizzate dal polarizzatore P si sdoppiano in Q_1 dando un raggio ordinario, che si propaga col medesimo indice nei due elementi di Q_1 e quindi non viene deviato (Q_1 si comporta per questo raggio come una lamina plan-parallela), ed un raggio straordinario in un elemento ed ordinario nell'altro che viene deviato lateralmente alla superficie di separazione dei due elementi poiché qui esso incontra una variazione di indice; Q_1 viene ad avere per il raggio straordinario-ordinario una potenza di 2,5 diottrie.

Allora, dopo il condensatore, si formano due immagini a diversa altezza di S (indicate O ed E in figura). Ponendo dopo l'obiettivo un secondo elemento Q_2 con assi ottici a 90° rispetto a Q_1 , si ha l'effetto opposto: il raggio ordinario viene deviato, ma lo straordinario-ordinario rimane ordinario e non subisce spostamento: i raggi separati da Q_1 sono ricombinati da Q_2 . Q_1 si trova nel piano focale anteriore del condensatore e Q_2 nel piano focale posteriore dell'obiettivo, per cui i due elementi sono coniugati e si compensano a vicenda.

I raggi che attraversano l'oggetto O e ne formano poi l'immagine intermedia sono però in parte ordinari ed in parte straordinari, per cui in Q_2 vengono diversamente deviati e si hanno in P' due immagini dell'oggetto, su piani diversi. Sono l'immagine a fuoco e quella sfuocata di cui si è parlato sopra.

A parte la limitatezza delle applicazioni, questo dispositivo presuppone l'uso di radiazione monocromatica poiché gli elementi perpendicolari all'asse ottico contenuti in Q_1 e Q_2 introducono della dispersione rotatoria. Ricordiamo che certi corpi birifrangenti uniassici (cristalli, zuccheri in soluzione, ecc.), anche se attraversati da radiazione parallela all'asse ottico, producono una rotazione del piano di polarizzazione della radiazione. Tale "potere rotatorio" subisce una "dispersione", nel senso che il suo valore è funzione della lunghezza d'onda utilizzata.

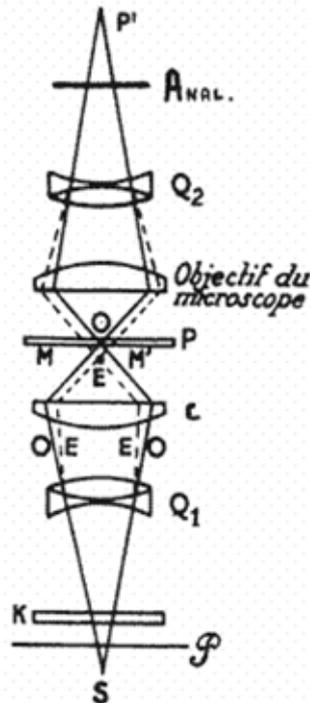


FIG. 24

Schema di principio del microscopio interferenziale a sdoppiamento assiale di Philpot, basato sull'uso di lenti birifrangenti doppie Q_1 e Q_2 . Spiegazione nel testo. (Stessa fonte di fig. 18).

Inoltre, l'oggetto viene attraversato da radiazioni polarizzate, con i noti inconvenienti.

Un compensatore K , del tipo di Babinet ad esempio, permette di variare la fase relativa dei raggi ordinario e straordinario, cioè delle due onde interferenti. Si può così variare con continuità la luminosità di fondo del campo immagine ed eseguire misure di sfasamento col metodo dell'annerimento massimo nell'oggetto e nel fondo. Il compensatore K non dà sdoppiamenti d'immagine.

Il dispositivo di Blaisse (1951) (fig. 25) presuppone un diaframma anulare D nel piano focale del condensatore C , come avviene nel contrasto di fase. La radiazione emergente da ogni punto di D è polarizzata dal polarizzatore P e trasformata in fascio parallelo da C . Tutti i fasci paralleli uscenti dal condensatore e attraversanti il preparato $A-P$ corrispondono all'apertura del diaframma anulare D e quindi hanno la stessa inclinazione. Il fatto di illuminare l'oggetto con un'apertura definita migliora la precisione delle misure, ma lo scopo del diaframma anulare è un altro: i fasci paralleli che escono dall'oggetto attraversano una lamina di calcite L , tagliata perpendicolarmente all'asse ottico del cristallo; ma i fasci hanno tutti una certa inclinazione, per cui attraversano la lamina birifrangente L obliquamente e vengono sdoppiati in un raggio ordinario ed uno straordinario. Questi raggi emergono dalla lamina L parallelamente alla direzione di incidenza e paralleli fra loro ma, poiché essi attraversano la lamina con diverso indice, vengono spostati lateralmente di una diversa lunghezza. Nell'obbiettivo O entrano dunque due onde, una ordinaria ed una straordinaria non concentriche, e quindi si formano dopo l'obbiettivo stesso due immagini dell'oggetto, « $A'e$ » straordinaria ed « $A'o$ » ordinaria, su piani diversi.

Ancora una volta, si hanno due immagini dell'oggetto a diversa altezza lungo l'asse ottico dello strumento, di cui una sola a fuoco; le onde corrispondenti sono parallele, interferiscono fra loro e producono una immagine con fondo a tinta unita.

Ancora una volta, l'onda di riferimento contiene un'immagine sfuocata dell'oggetto ed è quindi perturbata.

Lo sfasamento fra le due onde interferenti è legato in questo caso ai diversi cammini percorsi dai raggi ordinario e straordinario nella lamina di calcite. Questa differenza di cammini ottici è legata naturalmente all'angolo di incidenza: al limite, con incidenza normale alla lamina L , i due raggi si confondono ed hanno lo stesso cammino, poiché percorrono la lamina parallelamente

all'asse ottico del cristallo ed in queste condizioni il cristallo si comporta come monorifrangente.

Se dunque si varia l'apertura del diaframma anulare D , si varia l'angolo d'incidenza dei raggi su L , quindi lo sfasamento relativo delle due onde interferenti ed il colore (o la luminosità) del campo immagine.

Il difetto principale del sistema è la poca versatilità; esso però può operare in luce bianca.

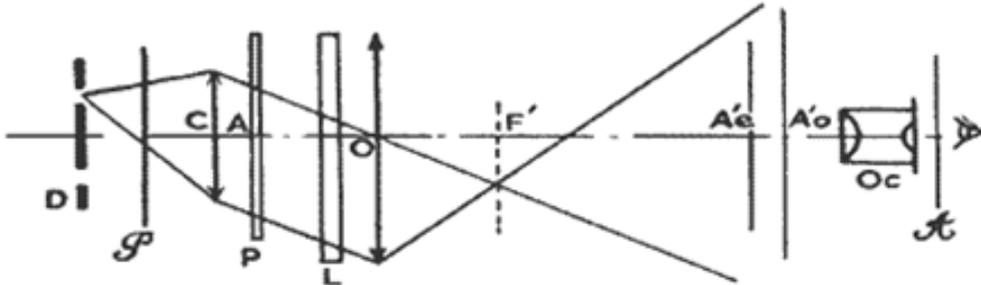


FIG. 25

Schema di principio del microscopio interferenziale a sdoppiamento assiale di Blaisse (1951) basato sull'uso di una lamina birifrangente uniasse L tagliata perpendicolarmente all'asse ottico. Spiegazione nel testo. (Stessa fonte di fig. 18).

Dal punto di vista costruttivo, si richiede una lamina di calcite di circa 1 mm di spessore; poiché la lamina deve stare fra obiettivo e preparato, occorre progettare obiettivi speciali con una distanza frontale molto grande e corretti per l'indice di rifrazione della calcite (1,66). La lamina di calcite può essere incollata sugli obiettivi. Il polarizzatore P può venir messo prima del condensatore; deve seguire naturalmente un analizzatore (A), incrociato col polarizzatore, da porsi dopo l'obiettivo.

I dispositivi di Philpot e di Blaisse a sdoppiamento assiale non risultano costruiti in serie da nessuna casa.

Prima di procedere con l'elenco dei vari microscopi interferenziali, vorremmo porre in rilievo il fatto che tutti i microscopi interferenziali a birifrangenza, sia con sdoppiamento laterale che con sdoppiamento assiale, sono in sostanza dei polariscopi, in cui un sistema di corpi birifrangenti viene posto fra due filtri polarizzatori incrociati o paralleli.

In tutti i polariscopi o microscopi polarizzatori esiste una coppia di filtri polarizzatori, all'ingresso ed all'uscita del sistema; in essi, si osserva in sostanza il risultato dell'interferenza fra il raggio ordinario ed il raggio straordinario prodotti dall'oggetto birifrangente. Nel microscopio interferenziale a birifrazione si ha ancora questo schema di funzionamento, ma l'oggetto birifrangente è fisso e fa parte del sistema ottico; esso produce un'interferenza di base fra raggio ordinario e straordinario (di valore costante in tutti i punti del campo visivo), cioè una immagine interferenziale di fondo, che può essere a tinta unita o a frange a seconda della natura dell'oggetto birifrangente.

Su questa immagine di fondo si sovrappone poi la perturbazione dell'oggetto (che può essere ed in genere è monorifrangente) che altera l'andamento di uno dei due raggi, ordinario o straordinario, del polariscopio, oppure di entrambi. Quei raggi costituiscono le onde interferenti dell'interferometro.

Introducendo uno sdoppiamento del fascio, il microscopio interferenziale a birifrazione permette di osservare un'immagine interferenziale di un oggetto isotropo in quanto l'oggetto perturba solo il raggio ordinario o solo lo straordinario oppure zone limitate di entrambi, cioè introduce uno sfasamento supplementare fra i due raggi pur non essendo birifrangente.

In tal senso, il microscopio interferenziale a polarizzazione estende l'uso del microscopio polarizzatore all'esame di oggetti isotropi, e ne rappresenta un naturale complemento.

GLI STRUMENTI PER OSSERVAZIONI IN RIFLESSIONE (EPISCOPIA)

Come si è detto nella presentazione, il primo microscopio interferenziale descritto, quello di Sagnac (1911), era un microscopio a riflessione.

Tali strumenti hanno lo scopo di analizzare le variazioni di fase di un'onda riflessa dall'oggetto. Poiché l'onda non attraversa l'oggetto, le sue variazioni di fase possono dipendere solo da variazioni di livello nell'oggetto, le quali riflettono l'onda in certi punti prima o dopo che in altri, e ne provocano anticipi o ritardi di fase.

Nelle osservazioni in trasparenza, in generale, si presentano tre casi possibili:

a) L'oggetto è un « oggetto di ampiezza », cioè da punto a punto varia il suo colore o la sua trasparenza. L'immagine data da un normale obiettivo (per « campo chiaro ») è direttamente osservabile essendo l'occhio o l'emulsione fotografica sensibile alle differenze di ampiezza o lunghezza d'onda delle radiazioni.

b) L'oggetto è trasparente, cioè non presenta differenze di assorbimento, ma solo di indice di rifrazione o di spessore. È un « oggetto di fase » che altera non l'ampiezza ma la fase dell'onda che l'attraversa.

Se le differenze di cammino ottico fra oggetto e campo sono forti, si creano ai bordi dell'oggetto fenomeni di rifrazione e diffrazione così vistosi che l'immagine in campo chiaro è ancora utilizzabile (formazione della “linea di Becke” e simili).

L'illuminazione con radiazioni oblique può migliorare il contrasto.

c) L'oggetto è ancora « di fase », ma con differenze così deboli di cammino ottico fra oggetto e campo che è necessario ricorrere a tecniche speciali per l'osservazione. Essenzialmente queste tecniche sono il campo oscuro, il contrasto di fase ed i metodi interferenziali (che essenzialmente si riducono alla tinta unita, allo sdoppiamento differenziale ed all'interferogramma).

Nell'osservazione per riflessione di corpi opachi si hanno ancora gli stessi tre casi:

a) L'oggetto riflettente presenta regioni di diverso potere riflettente o di diverso colore. Si ha ancora un « oggetto di ampiezza » la cui immagine è direttamente osservabile per le ragioni viste sopra.

b) L'oggetto riflettente presenta variazioni non di potere riflettente ma solo di livello; se queste variazioni sono forti, l'immagine normale, in campo chiaro, può metterle in evidenza (“linea di Schneiderhöhn”). L'osservazione in luce obliqua (campo oscuro) può migliorare la visibilità dell'oggetto provocando delle ombreggiature in corrispondenza delle variazioni di livello.

c) Se l'oggetto presenta solo lievi variazioni di livello, si fa ancora ricorso al contrasto di fase o ai metodi interferenziali.

Il parallelismo fra episcopia e diascopea è dunque molto stretto.

In episcopia interferenziale si presuppone però che l'oggetto venga illuminato da un fascio di radiazione più o meno perpendicolare alla sua superficie, e che esso rifletta tale fascio perturbandone la fase. Cioè si presuppone che l'oggetto sia piuttosto liscio e più o meno riflettente. Se l'oggetto fosse scabroso, diffondente, come avviene di solito in campo naturalistico, potrebbe venir osservato direttamente in campo chiaro, senza bisogno di ricorrere a strumenti interferenziali.

Ma gli oggetti a superfici lisce e speculari interessano solo settori limitati della scienza e della tecnica: la mineralogia (superfici di cristalli naturali), la chimica (cristalli artificiali), la petrografia (superfici di sezioni di campioni di rocce), la tecnologia dei materiali ceramici, delle materie plastiche, ecc. (superfici levigate di campioni) e soprattutto la metallurgia.

La grande maggioranza dei microscopi a riflessione, interferenziali o non, è infatti del tipo metallografico.

A) *Micro-interferometri a riflessione sul principio di Michelson.*

L'interferometro di Michelson si basa sull'uso di una lamina semi-riflettente (« G » in figura 26), la quale divide il fascio collimato proveniente dalla sorgente S e dal collimatore C in due fasci distinti e coerenti. I due specchi M_1 ed M_2 ricevono questi due fasci parziali e li riflettono verso la lamina G . In G il fascio proveniente da M_1 si divide in due metà di cui una torna verso C , e va perduta, l'altra prosegue verso A . Il fascio riflesso da M_2 si sdoppia anch'esso in G in un fascio trasmesso che prosegue verso C e va perduto, ed un fascio riflesso diretto verso A che percorre lo stesso cammino del fascio parziale proveniente da M_1 .

Fra G ed A si hanno dunque due fasci coerenti e paralleli che possono interferire.

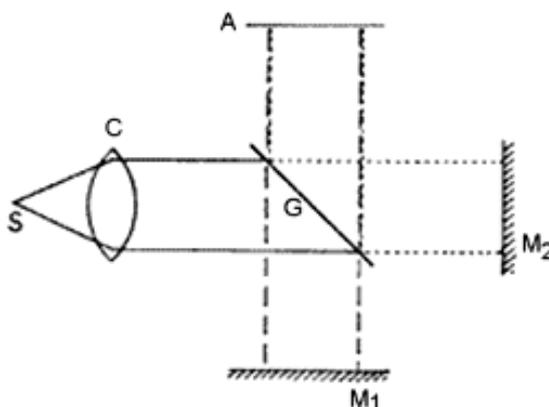


FIG. 26

Schema dell'interferometro di Michelson, con elemento semiriflettente G . Spiegazione nel testo.

Se in uno dei due cammini parziali fra G ed M_1 o G ed M_2 si ponesse un oggetto trasparente di fase, l'onda che percorre quel cammino verrebbe perturbata dall'oggetto e costituirebbe una «onda-oggetto». L'altra onda, imperturbata, potrebbe costituire l'onda di riferimento ed in A si potrebbe osservare l'immagine interferenziale dell'oggetto. Si avrebbe così un interferometro a due onde riflesse.

Ma in questo modo l'onda-oggetto attraverserebbe due volte l'oggetto per cui, guardando da A , si vedrebbero due immagini dell'oggetto su piani diversi. Questa soluzione non viene quindi adottata in pratica per oggetti trasparenti a causa della piccola profondità di campo degli obiettivi da microscopio, e si preferisce usare l'interferometro di Michelson per l'osservazione di oggetti opachi riflettenti: in luogo di uno dei due specchi M_1 ed M_2 si pone l'oggetto riflettente. L'altro specchio fornisce l'onda di riferimento.

Poiché l'onda-oggetto percorre due volte il cammino fra G e l'oggetto, un dislivello nell'oggetto pari ad una certa frazione di lunghezza d'onda provoca uno spostamento di fase dell'onda esattamente del doppio e si può quindi affermare che ciò corrisponde ad un aumento di sensibilità dello strumento.

Ovviamente, trattandosi di osservazioni di oggetti opachi, occorre che il microscopio accoppiato all'interferometro sia dotato di un opaco-illuminatore o illuminatore verticale, cioè di un dispositivo che illumina l'oggetto dall'alto, attraverso l'obiettivo.

L'interferometro vero e proprio, costituito dall'elemento semi-riflettente e dallo specchio di confronto, può essere sistemato in vario modo.

La prima soluzione, quella di Sagnac, prevedeva l'interferometro fuori del microscopio, fra obiettivo ed oggetto; l'onda proveniente dall'illuminatore verticale attraversava l'obiettivo e poi l'elemento semi-riflettente; infine incideva sull'oggetto. Di fianco all'elemento semi-riflettente, perpendicolarmente al piano dell'oggetto, era sistemato lo specchio di confronto.

Data la forte apertura di tutti gli obiettivi da microscopio, l'elemento semi-riflettente non poteva essere costituito da una lamina la quale, essendo inclinata sull'asse ottico, avrebbe provocato

dell'astigmatismo nell'immagine; si usava invece, e si usa ancora oggi in casi analoghi, un cubo tagliato secondo la diagonale. La faccia diagonale è quella semi-riflettente.

Ovviamente, un tale interferometro presenta un ingombro incompatibile con la piccola distanza frontale degli obiettivi forti, per cui il dispositivo non si può usare che con deboli ingrandimenti.

Non risulta che oggi la soluzione di Sagnac sia usata da alcun costruttore.

Nel 1933 Linnik migliorava il principio di Sagnac introducendo l'interferometro fra illuminatore verticale ed obiettivo (fig. 27).

Il condensatore (C) converge il fascio illuminante proveniente dalla sorgente (S) e dà una immagine di tale sorgente in S'_2 ; la lamina semi-riflettente (G) dà una seconda immagine parziale di S in S'_1 ; S'_2 ed S'_1 si trovano rispettivamente nel secondo fuoco di due obiettivi identici O_1 ed O_2 ; al di là di O_1 ed O_2 il fascio illuminante ha dunque un andamento parallelo. Dopo riflessione su M_1 (oggetto) ed M_2 (specchio di riferimento), il fascio illuminante è ancora parallelo e converge ancora in S'_1 ed S'_2 . L'onda diffratta (tratteggiata in figura), originata dal particolare P nel piano dell'oggetto, viene resa convergente da O_1 e concorre in P' a formare l'immagine dell'oggetto.

Σ_1 ed Σ_2 rappresentano rispettivamente l'onda-oggetto, perturbata, e l'onda di riferimento, piana.

Al solito, le due onde interferiscono dopo aver riattraversato gli obiettivi O_1 ed O_2 ed essersi sovrapposte in G . In P' vi è l'immagine interferenziale. Segue l'oculare.

Se G è dato da una lamina plan-parallela, occorre evitare che essa introduca astigmatismo nell'immagine e cioè sarebbe preferibile che il fascio-immagine avesse andamento parallelo a livello di G ; è sufficiente a tal fine porre l'oggetto M_1 (e lo specchio M_2) nel fuoco di O_1 (e rispettivamente O_2). L'immagine dell'oggetto è così coniugata all'infinito e dopo la lamina G occorre un sistema convergente ("lente di tubo") che riporti l'immagine dell'oggetto nel piano oggetto dell'oculare; gli obiettivi debbono naturalmente essere corretti per una seconda coniugata all'infinito.

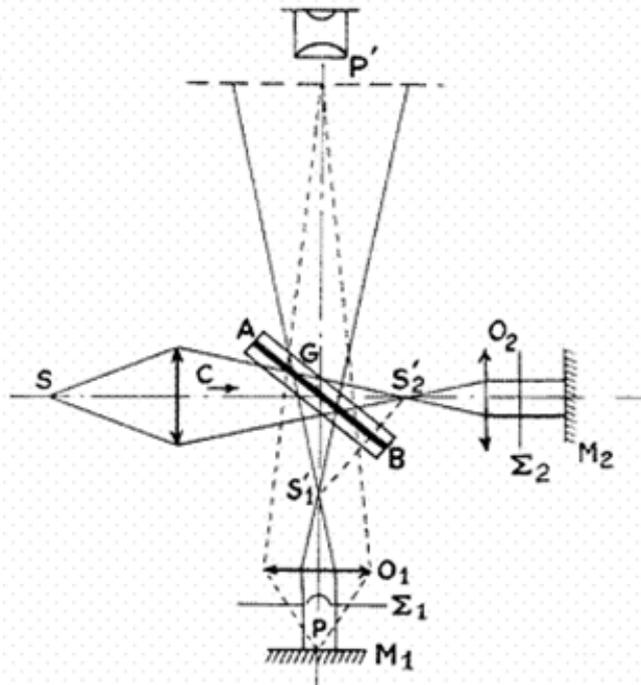


FIG. 27

Schema del microscopio interferenziale a riflessione di Linnik (1933) secondo lo schema dell'interferometro di Michelson. Spiegazione nel testo. (Stessa fonte della fig. 18).

Se invece G è costituito da un cubo di vetro tagliato secondo la diagonale, come si è detto sopra, non si provoca astigmatismo nell'immagine poiché l'onda immagine attraversa una lamina plan-parallela normale all'asse; occorrerebbe però che l'obiettivo fosse calcolato per questo spessore di vetro nello spazio immagine.

Un micro-interferometro come quello descritto non permette ovviamente di applicare il metodo

dello sdoppiamento dell'immagine. Però, spostando lo specchio di riferimento lungo l'asse ottico e mantenendolo parallelo a se stesso si può variare la fase dell'onda di riferimento e se nulla cambia dal lato oggetto si può variare in maniera continua la differenza di fase fra le onde interferenti; se tali onde sono parallele, si avrà allora il contrasto interferenziale con luminosità o colore del campo variabile.

Se poi si inclina lo specchio di riferimento o l'oggetto rispetto all'asse ottico, si varia l'inclinazione relativa delle due onde interferenti, e si produce un interferogramma; in esso si potrà variare la posizione della frangia di ordine zero spostando lo specchio di riferimento parallelamente a se stesso, come sopra detto.

Variando l'orientamento dello stesso specchio si potrà anche variare la direzione del sistema di frange.

Lo schema di Linnik contiene dunque un elemento semi-riflettente che svolge la duplice funzione di specchio dell'illuminatore verticale e di semiriflettente dell'interferometro. Questo schema è stato sfruttato dalla grande maggioranza dei costruttori (Zeiss, Leitz, Wild, ecc.), per cui quasi tutti i micro-interferometri a riflessione si assomigliano.

Essendo inutile descriverli tutti, ne descriveremo uno dei più versatili, a mo' di esempio, quello che fu costruito dalla casa Wild-Heerbrugg; altri strumenti del genere sono descritti nei lavori di R. Torge e di altri (vedi bibliografia).

Nello strumento Wild (fig. 28), l'elemento semi-riflettente è costituito da un cubo tagliato secondo la diagonale (*A*); l'obiettivo dal lato oggetto (*B*) è speciale, non calcolato per l'infinito. Esso è fornito di un condensatore anulare *E* che permette le osservazioni episcopiche in campo oscuro (luce obliqua omnilaterale).

Esistono gli obiettivi $4\times$, $10\times$ e $40\times$; l'obiettivo fa corpo coll'interferometro e quindi la sostituzione dell'obiettivo comporta la sostituzione di tutto l'interferometro. Non è conveniente fare diversamente poiché, quando si cambia l'obiettivo di osservazione *B*, è necessario cambiare anche l'obiettivo di riferimento *C* che si trova fra elemento semi-riflettente e specchio di riferimento *D*. I due obiettivi debbono sempre essere identici per assicurare l'eguaglianza dei due cammini ottici.

In complesso, l'interferometro è concepito come un'unità compatta che si sostituisce al posto del revolver di un normale microscopio da diascopia; l'unica condizione è che lo stesso strumento sia fornito di un illuminatore verticale, da porsi sopra l'interferometro, prima del tubo porta-oculari.

Per evitare sregolazioni in caso di sostituzione, l'interferometro comprende tutti gli elementi critici rigidamente collegati fra loro: il cubo semiriflettente, i due obiettivi e lo specchio di riferimento. Lo specchio obliquo dell'illuminatore verticale si trova invece più in alto, su una montatura a parte, ed è quindi distinto dal semi-riflettente dell'interferometro, a differenza dello schema originario di Linnik.

È prevista una regolazione dello specchio di riferimento (inclinazione e rotazione) e della posizione assiale dell'obiettivo (in aggiunta alla focalizzazione micrometrica normale). Con la prima si cambia l'inclinazione dell'onda di riferimento e quindi la larghezza delle frange; tale larghezza può essere aumentata fino ad aversi la tinta unita o contrasto interferenziale (onde parallele). La rotazione dello specchio di riferimento attorno all'asse ottico dell'obiettivo corrispondente provoca una rotazione del sistema di frange.

La seconda regolazione riguarda la fase relativa delle due onde interferenti, la quale si può regolare variando la distanza fra oggetto ed obiettivo di osservazione, cioè il cammino ottico dal lato oggetto. Ciò si ottiene colla regolazione fine della posizione assiale dell'obiettivo, sopra citata.

Si noti che anche la normale operazione di messa a fuoco fa variare la distanza fra obiettivo ed oggetto. Occorre quindi cominciare il lavoro con la messa a fuoco e poi, senza più toccare quel comando, regolare la fase dell'onda oggetto col movimento fine dell'obiettivo; la regolazione della fase avviene nell'ambito di spostamenti dell'obiettivo inferiori a qualche micron, e quindi non disturba la messa a fuoco poiché non esce dalla profondità di campo dell'obiettivo.

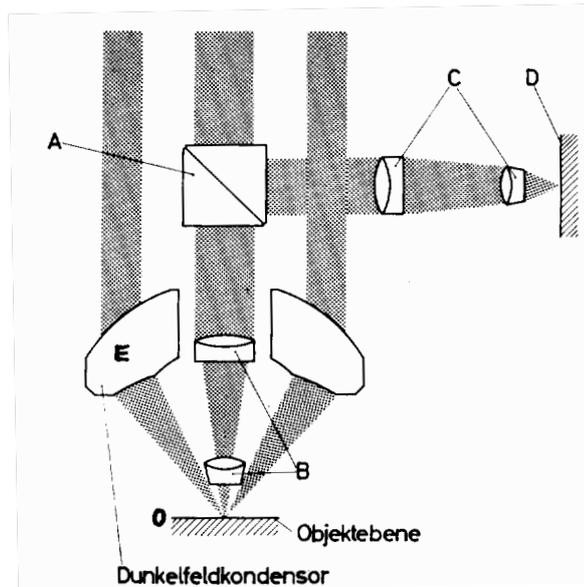


Fig. 28

Schema del dispositivo interferenziale per riflessione Wild-Heerbrugg, da applicare ad un microscopio dotato di illuminatore verticale (non rappresentato in figura). Spiegazione nel testo. È indicato anche il fascio illuminante per il fondo scuro. (Da: M. Uhlig, Ein neues Auflicht-Interferenzmikroskop, Mikroskopie, 20 7/8, 1965).

Il tavolino del microscopio si può munire di un secondo tavolino capace di variare l'inclinazione dell'oggetto in tutti i sensi. In questo modo si può variare in tutti i sensi l'inclinazione dell'onda perturbata e cioè si ha un effetto analogo all'inclinazione dello specchio di riferimento: si varia la larghezza e l'orientamento delle frange. Il movimento del tavolino è però più grossolano di quello dello specchio.

Si possono dunque eseguire con questo strumento osservazioni in contrasto interferenziale o in interferogramma. Si possono applicare allo strumento vari tipi di lampade in modo da operare in radiazione monocromatica o in luce bianca. Nelle figure 29, 30, 31, 32 e 33 alcuni esempi di applicazione.

Lo specchio di riferimento è montato su di un disco a revolver assieme ad altri tre specchi in modo da poter rapidamente cambiare lo specchio. I quattro specchi sono tutti piani, e differiscono solo per il potere riflettente, che può essere del 4%, 30%, 60%, e 90%. Il cambiamento di specchio permette di adattare rapidamente il potere riflettente dello specchio a quello dell'oggetto; da un oggetto all'altro, infatti, si possono avere differenze sensibili di potere riflettente, ed il contrasto più forte si ha solo quando le due onde interferenti hanno la stessa intensità, cioè quando si sono eguagliati i poteri riflettenti delle due superfici (oggetto e specchio).

I quattro specchi intercambiabili sono muniti di regolazioni di inclinazione individuali.

Per finire, è possibile con apposita lampada illuminare una scala micrometrica trasparente incisa su uno degli specchi di riferimento. Poiché lo specchio di riferimento è equivalente otticamente all'oggetto, l'immagine osservata nell'oculare è la somma dell'immagine dell'oggetto e di quella dello specchio; se lo specchio contiene qualche elemento eterogeneo, come appunto la scala micrometrica illuminata da dietro, l'immagine della scala si sovrappone all'immagine dell'oggetto. In condizioni normali, lo specchio di riferimento è otticamente « vuoto », cioè riflette un'onda senza alterarla e non disturba l'immagine dell'oggetto.

Una tale scala, trovandosi in un piano coniugato col piano oggetto, dà una misura assoluta delle lunghezze nel piano stesso; tale misura cioè è indipendente dall'ingrandimento dell'obbiettivo, dell'oculare e dei mezzi ottici interposti: la scala è ingrandita allo stesso modo dell'oggetto (fig. 33).

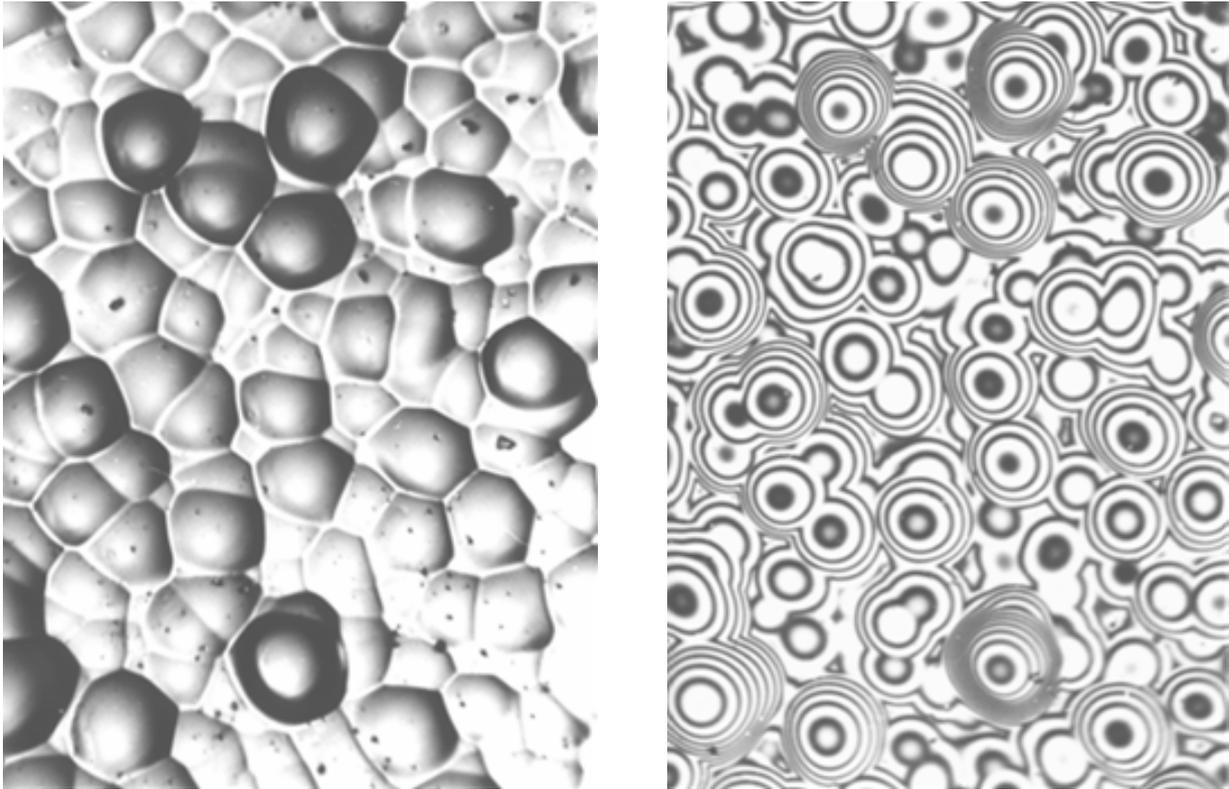


FIG. 29

Superficie di cristallo di germanio da un transistor sovraccaricato: a sinistra: Immagine in episcopia in campo chiaro; a destra: lo stesso oggetto in contrasto interferenziale a tinta unita per riflessione; si noti qui il sistema di frange creato dalle variazioni di livello della superficie dell'oggetto; le frange hanno lo stesso significato, anche se una origine ben diversa, delle isoipse di una carta topografica e ne hanno tutto l'aspetto. In luce bianca, le frange corrispondenti allo stesso dislivello hanno lo stesso colore e si possono facilmente riconoscere. (Stessa fonte della fig. 28).

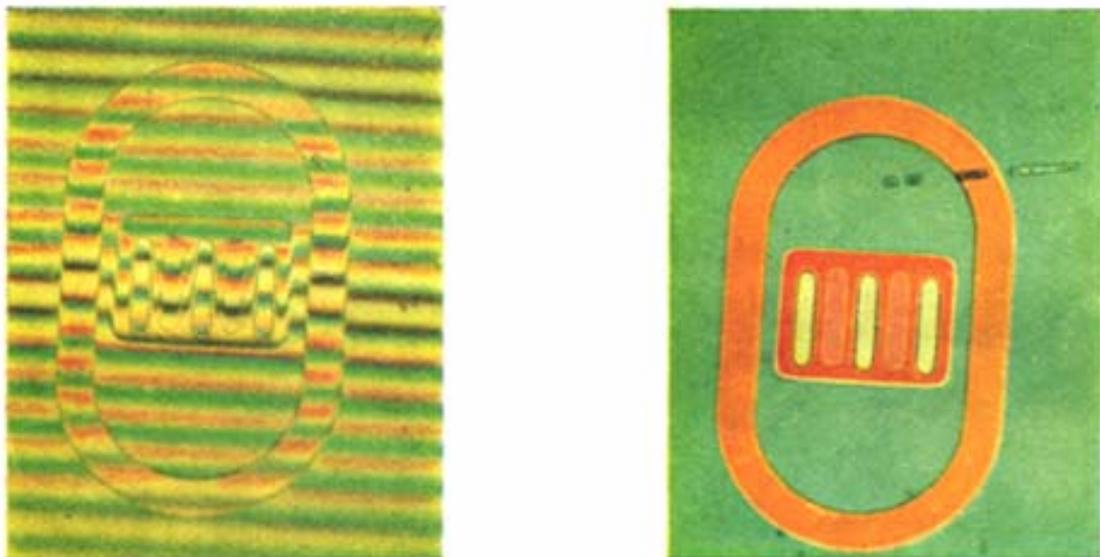


FIG. 30

Micro-circuito depositato per evaporazione sotto vuoto, osservato in episcopia; a sinistra in interferogramma in luce bianca: le differenze di livello sono rivelate dagli spostamenti laterali delle frange; a destra in contrasto interferenziale in tinta unita: le differenze di livello provocano differenze di luminosità (o di colore). (Stessa fonte della fig. 28).

La scala può dunque servire come un micrometro-oggetto qualunque per misure lineari

sull'oggetto, ma la sua applicazione principale è di facilitare la misura dell'interdistanza e dello spostamento delle frange, cioè la misura dello sfasamento introdotto dall'oggetto. Lo sfasamento, espresso in lunghezze d'onda e diviso per 2 per le ragioni viste sopra, dà immediatamente il dislivello fra l'oggetto ed il campo circostante.

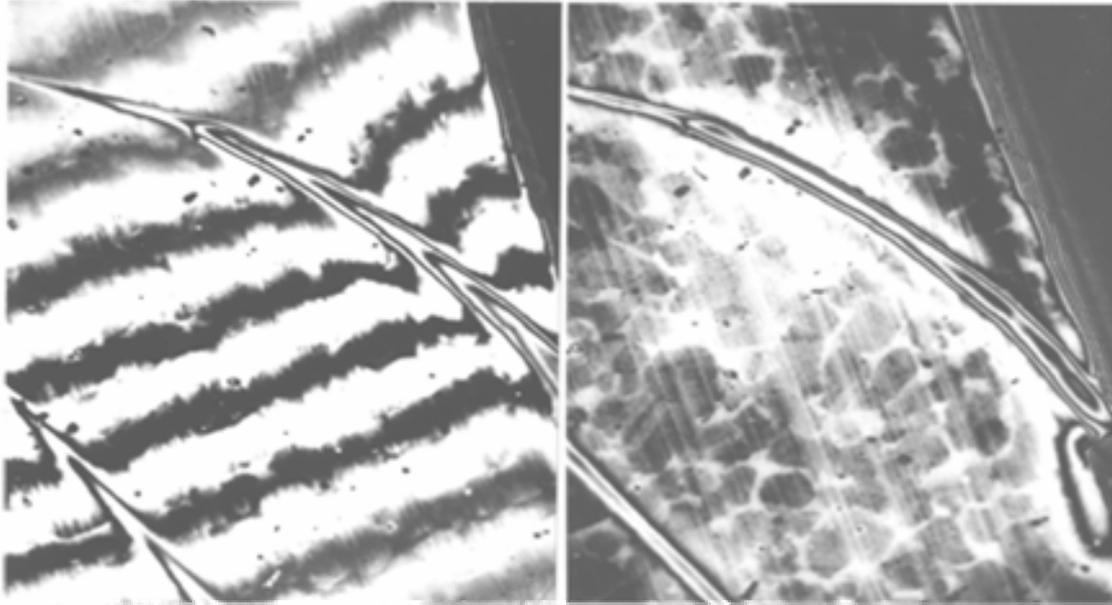


FIG. 31

Superficie di parte meccanica in ottone levigata, con striature. A destra: contrasto interferenziale in episcopia; i dislivelli sono rivelati da sistemi di frange simili a curve di livello topografiche; confronta con la fig. 29. A sinistra: interferogramma in episcopia. I dislivelli provocano spostamento di frange. (Da: M. Uhlig, *Microskopion* N. 7, 1966, edito da Wild, Heerbugg).



FIG. 32

Impronta di durezza ottenuta alla superficie di un pezzo di alluminio col metodo Vickers. Osservazione episcopica in contrasto interferenziale. Si noti la piccola larghezza delle frange (quasi invisibili in figura, all'interno dell'impronta quadrata) che denuncia la forte pendenza dei fianchi dell'impronta e la deformazione della superficie del pezzo, ai lati dell'impronta medesima. (Stessa fonte della fig. 19).

Va notato che per i micro-interferometri a riflessione secondo il principio di Michelson esiste sempre la necessità di limitare l'apertura del fascio illuminante per evitare errori di misura. Maggiori dettagli su questo problema si trovano nei lavori di R. Torge, Hansen e Kinder, Mykura, Schulz (vedi Bibliografia), ma possiamo riassumere le conclusioni di quegli autori dicendo che i risultati delle misure di dislivello vanno moltiplicati per un fattore di correzione K dato da:

$$(14) \quad K = 1 + (u^2 / 4)$$

in cui « u » indica l'angolo di apertura del fascio illuminante.



FIG. 33

Interferogramma in radiazione monocromatica ottenuto con il micro-interferometro a riflessione Wild. L'oggetto osservato è l'impronta di una sfera di acciaio su un piano metallico. Si noti la scala di riferimento, a destra. (Stessa fonte di fig. 31).

B) *Micro-interferometri a riflessione per birifrangenza.*

Di tutti i microscopi interferenziali a riflessione, ci risulta che solo un tipo si basi sui fenomeni di birifrazione.

Si tratta di uno schema ottico derivato direttamente dal principio di Nomarski, descritto sopra fra i micro-interferometri a trasparenza, e adattato alle osservazioni in episcopia.

Questo principio ha ispirato la realizzazione pratica di strumenti da parte delle case Reichert (Vienna), Nacet (Parigi), Zeiss (Oberkochen) ed altri.

Se consideriamo un microscopio a riflessione del tipo invertito (fig. 34), possiamo trovare uno stretto parallelismo con un microscopio a trasparenza: la lamina semiriflettente G dell'illuminatore verticale equivale allo specchietto sotto al condensatore; l'obiettivo O fa le veci di condensatore; segue l'oggetto riflettente A , il vero obiettivo O e l'oculare (non descritto in figura).

Qualunque elemento ottico introdotto fra specchio G ed obiettivo O del microscopio episcopico equivale a due elementi identici introdotti fra specchio e condensatore e fra obiettivo ed oculare di un microscopio diascopico.

Se dunque si volesse applicare al microscopio episcopico il dispositivo semplificato di Nomarski, che contempla un solo prisma di Wollaston dopo l'obiettivo, non sarebbe possibile: introducendo un prisma fra specchio semi-riflettente G ed obiettivo O si ottiene uno schema analogo al primitivo schema di Nomarski a due prismi.

Non è possibile neppure introdurre il prisma fra specchio G ed oculare poiché ci si troverebbe troppo lontani dal piano focale dell'obiettivo.

Consideriamo dunque lo schema di fig. 34 con un prisma di Wollaston Q fra illuminatore verticale ed obiettivo.

È evidente che va ripetuto qui tutto ciò che si è detto del microscopio interferenziale a trasparenza con due prismi di Wollaston:

-- il fascio illuminante viene sdoppiato dal primo prisma e ricombinato dal secondo. Si ha dunque la compensazione reciproca dei due prismi. I due fasci sdoppiati, creati dal primo prisma,

sono coerenti fra loro ed interferiscono quando vengono ricongiunti dal secondo. Si può usare allora radiazione illuminante incoerente, cioè un condensatore a piena apertura poiché il fenomeno è indipendente dall'apertura. Si noti che la dicitura «primo prisma» indica l'unico prisma del microscopio interferenziale episcopico quando è attraversato dal fascio illuminante; la dicitura «secondo prisma» indica lo stesso elemento quando è attraversato dal fascio riflesso dall'oggetto;

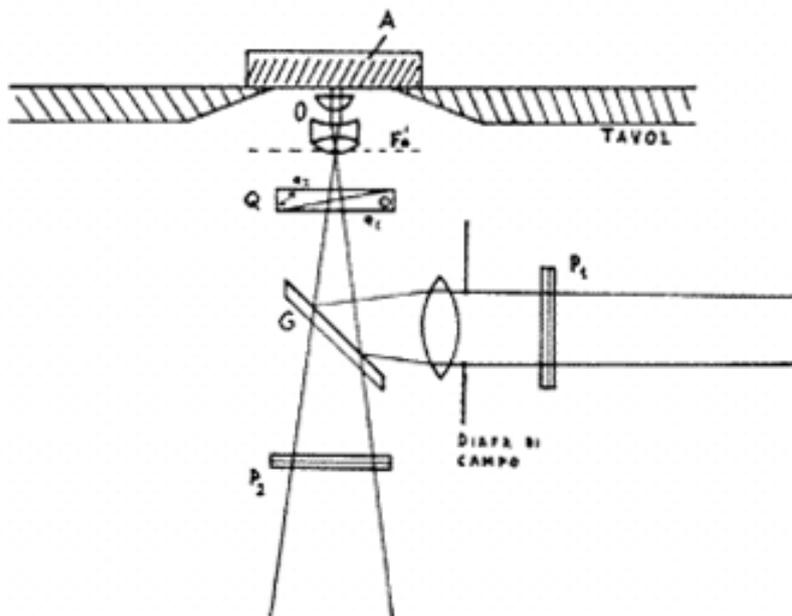


FIG. 34

Schema di principio del microscopio interferenziale a riflessione di Nomarski con prisma di Wollaston (Q) posto fra elemento semiriflettente dell'illuminatore verticale (G) ed obiettivo (O). Spiegazione nel testo.

-- l'onda immagine è sdoppiata dal secondo prisma per cui si viene ad applicare necessariamente il metodo dello sdoppiamento laterale. Lo sdoppiamento può essere totale o differenziale a seconda della deviazione operata dal prisma, cioè a seconda del materiale costituente il prisma ed a seconda dell'angolo dei due cunei incollati;

-- se il prisma si trova nel piano focale posteriore dell'obiettivo, le due onde immagini create da esso sono parallele ed il campo immagine appare a tinta unita. Se il prisma si trova prima del piano focale, le onde sono inclinate ed il campo visivo appare solcato da frange;

-- se il piano focale dell'obiettivo è inaccessibile, si può fare ricorso al prisma modificato di Nomarski, in cui uno dei due cunei è tagliato obliquamente rispetto all'asse ottico. È così possibile usare obiettivi della massima potenza;

-- al cambiare dell'obiettivo, si sposta assialmente il prisma in modo da riportarlo sempre nella stessa posizione rispetto al piano focale dell'obiettivo. Lo spostamento assiale può essere ottenuto a mezzo di appositi raccordi;

-- per variare il contrasto, cioè la fase relativa delle due onde interferenti, si può introdurre un compensatore (di Soleil, di Babinet, ecc.) capace di variare con continuità la fase relativa del raggio ordinario e straordinario; in maniera più semplice si può spostare lateralmente il prisma di Wollaston, in direzione perpendicolare allo spigolo del cuneo; variano così in senso opposto i cammini percorsi dai due raggi biriffratti.

La possibilità di variare la fase relativa delle onde interferenti permette di eseguire misure di cammino ottico (di dislivello) nell'oggetto col metodo dell'annerimento massimo nell'oggetto e nel campo circostante.

Per l'osservazione visiva, si ha al solito la massima sensibilità portando il campo immagine al color magenta o "rosso di 1° ordine".

Potendo lavorare con sfasamenti minimi, è possibile usare luce bianca per l'illuminazione.

Poiché il prisma di Wollaston va posto fra polarizzatori incrociati, si pone il primo polarizzatore nell'illuminatore verticale (P_1 in fig. 34) e l'analizzatore dopo lo specchio semi-riflettente (P_2).

Le due onde interferenti sono entrambe perturbate dall'oggetto; in caso di oggetti estesi, si hanno sovrapposizioni delle due immagini dell'oggetto, quindi difficoltà di misura e di interpretazione.

In sostanza, dunque, il micro-interferometro a riflessione secondo Nomarski permette di usare il metodo dello sdoppiamento d'immagine (totale o differenziale a seconda del tipo di prisma montato nello strumento) e permette di passare con continuità dalla tinta unita all'interferogramma variando la posizione assiale del prisma di Wollaston. Esso è quindi abbastanza versatile, ed inoltre permette di usare la piena apertura del condensatore e tutto il potere risolutivo dell'obbiettivo.

Non si può dire però che questo dispositivo a birifrazione sia più semplice, più versatile e più razionale del sistema descritto sopra secondo il principio di Michelson.

Inoltre esso illumina l'oggetto con radiazione polarizzata e questo può complicare le cose quando l'oggetto presenta una riflessione di tipo non metallico (sostanze cristalline, ad esempio); in questo caso infatti si verifica un fenomeno analogo alla birifrazione in oggetti trasparenti: la biriflessione; il raggio incidente è sdoppiato in due raggi riflessi polarizzati in piani perpendicolari fra loro.

Un oggetto biriflettente produrrà immagini interferenziali variabili a seconda dell'orientamento reciproco dell'oggetto e del prisma di Wollaston.

C) *Micro-interferometri a riflessione sul principio di Fabry e Pérot.*

Il principio di questi strumenti è molto semplice: dato un normale microscopio episcopico, fornito di illuminatore verticale, si applica sull'obbiettivo (che può essere del tutto normale) un supporto contenente una lamina di vetro plan-parallela semi-riflettente.

Avvicinando opportunamente la lamina alla superficie del campione, si forma un semplice interferometro di Fabry-Pérot il cui sistema di frange sarà direttamente osservato dal microscopio sovrastante, che è del tutto normale.

Poiché una delle superfici riflettenti dell'interferometro è costituita dall'oggetto, il sistema di frange sarà perturbato da ogni irregolarità della superficie da studiare che altera il cammino ottico fra le due superfici dell'interferometro. Lo spostamento delle frange fornirà al solito la misura dei dislivelli nell'oggetto.

Il passo e la direzione delle frange sono legati allora alla posizione della lamina semi-riflettente rispetto all'oggetto; tale posizione sarà regolabile con appositi comandi.

Uno strumento su questo principio è costruito dalla casa E. Leitz (Wetzlar) e Zeiss (Jena), quest'ultimo secondo i lavori di Tolansky.

Lo strumento Leitz prevede tutta una serie di lamine semi-riflettenti intercambiabili, con diverso potere riflettente, per poter adattare lo strumento al potere riflettente dell'oggetto, e con diversa forma per modificare l'andamento delle frange in relazione alla forma dell'oggetto.

Il vantaggio dello strumento rispetto ad altri epi-microscopi che sfruttano il principio di Michelson è di presentare un sistema di frange più sottili e più nitide, a parità di passo fra le frange. Questa è una particolarità dell'interferometro di Fabry-Pérot legata a ragioni teoriche che non elenchiamo in questa sede.

Le frange più fini si ottengono con oggetti fortemente riflettenti, con piccola distanza fra l'oggetto e la lamina semi-riflettente, e naturalmente con radiazione monocromatica.

Difetto dello strumento, derivante dal principio usato, è che l'interferenza avviene per riflessione multipla sull'oggetto, e quindi le irregolarità di esso disturbano rapidamente l'andamento delle frange. È possibile osservare solo oggetti molto lisci.

Lo strumento Leitz è previsto anche per funzionare secondo lo schema di Michelson, con poche e semplici modifiche. In questo senso, esso rientra nella categoria sopra descritta, e non ci sembra necessario dilungarci sui particolari.

CONCLUSIONI

A differenza di altri lavori, che descrivono solo un particolare strumento (esaltandone i pregi e tacendone i difetti), si è voluto presentare qui una rassegna comparativa delle tecniche e dei microscopi interferenziali.

In particolare, si sono descritti nelle pagine che precedono i principi di funzionamento dei vari microscopi interferenziali finora ideati, anche se commercialmente mai costruiti o non più costruiti.

In base al principio su cui si basano, si sono classificati gli strumenti in varie categorie: ad ogni categoria di microscopi interferenziali corrisponde un interferometro classico: quello di Mach-Zehnder, quello di Fabry-Pérot, quello di Jamin, quello di Michelson, senza contare i dispositivi studiati espressamente per la microscopia: di Nomarski, di Françon, ecc.

Ma ora possiamo tentare una diversa classificazione: in una prima categoria di micro-interferometri possiamo porre quelli in cui avviene uno sdoppiamento dell'onda (incoerente) proveniente dalla sorgente PRIMA dell'oggetto; dopo l'oggetto le due onde saranno ricombinate ad opera di un elemento analogo a quello che ha operato la separazione.

La presenza di due elementi identici prima e dopo l'oggetto permette di ottenere l'interferenza fra le due onde parziali quale che sia l'apertura dell'onda incidente. Infatti, le due onde create dall'elemento separatore sono coerenti fra loro ed interferiscono sempre nell'elemento ricombinatore. In altre parole, la fase delle due onde al momento di interferire non varia al variare dell'apertura.

Gli strumenti di questa prima categoria possono dunque lavorare a « piena apertura ».

Il termine « piena apertura » non indica un'apertura grande a volontà poiché, si è visto, al variare dell'apertura varia il cammino percorso nell'oggetto da un raggio generico, e quindi varia lo sfasamento subito da quel raggio⁹. Per evitare errori di misura, molti strumenti non possono usufruire di una apertura dal lato condensatore superiore a 0,4. Ma in ogni caso il diaframma del condensatore presenta una finestra estesa.

Nella categoria a « piena apertura » possiamo porre il micro-interferometro secondo Mach-Zehnder della casa Leitz, il dispositivo di Nomarski a due prismi di Wollaston, il dispositivo secondo Jamin e Lebedeff, il dispositivo Dyson, il dispositivo a sdoppiamento assiale di Philpot.

In una seconda categoria possiamo porre invece i micro-interferometri in cui lo sdoppiamento dell'onda avviene DOPO l'oggetto.

Per avere l'interferenza fra le due onde, occorre che l'onda incidente sull'unico elemento di sdoppiamento sia coerente: solo così saranno coerenti fra loro anche le due onde sdoppiate.

Ebbene, se l'elemento che opera lo sdoppiamento si trova dopo l'obbiettivo, l'onda incidente su di esso proviene dal piano focale posteriore dell'obbiettivo, cioè dall'immagine del diaframma del condensatore; se tale onda deve essere coerente, la sorgente di essa (diaframma del condensatore) non può essere estesa, come nella prima categoria di strumenti sopra vista, ma puntiforme oppure, in pratica, a fessura.

Questa seconda categoria di strumenti prevede quindi l'uso di una fenditura nel condensatore con tre conseguenze negative:

— il flusso ottico disponibile si riduce di molto per la piccola superficie dell'apertura del diaframma;

— la risoluzione dell'obbiettivo non viene completamente sfruttata (piccola apertura utile del condensatore);

— l'immagine presenta una direzione privilegiata di massimo contrasto, perpendicolare alla fenditura, ed una direzione di minimo contrasto, parallela alla medesima.

Alla seconda categoria di micro-interferometri possiamo assegnare il dispositivo secondo Mach-Zehnder della casa Zeiss di Jena (quando opera con sdoppiamento di immagine), il dispositivo semplificato di Nomarski con un solo prisma di Wollaston, l'oculare interferenziale di Françon.

⁹ Stiamo parlando di diascopea.

Da questa classificazione rimangono esclusi solo pochi strumenti, che formano classi a sé stanti: il dispositivo « Interphaco » della casa Zeiss di Jena, in cui la separazione fra onda-oggetto ed onda di riferimento è operata da un diaframma anulare, i dispositivi ad onde multiple secondo il principio di Fabry-Pérot, il dispositivo a sdoppiamento assiale di Blaisse.

Ma un'altra considerazione è possibile fare: nel campo dei micro-interferometri a riflessione, una soluzione si è imposta sopra tutte: quella secondo il principio di Michelson. Essa è semplice, sicura, poco ingombrante, non usa radiazione polarizzata, opera a « piena apertura ».

Si può dire che, per osservazioni episcopiche, il metodo interferenziale secondo Michelson sta soppiantando il metodo del contrasto di fase. Fanno eccezione pochi strumenti del tipo a birifrangenza (Reichert, Nachet), generalmente secondo lo schema di Nomarski, o a riflessione multipla (Leitz, ecc.) secondo lo schema di Fabry e Pérot.

Invece, nel campo dei microscopi interferenziali a trasmissione, i principi di funzionamento e le soluzioni pratiche sono molte e tutte diverse. Quando, ad un certo problema, vengono date dieci (ad esempio) diverse soluzioni pratiche, si può essere certi che almeno nove sono insoddisfacenti. E la stessa presenza di tante soluzioni diverse indica che non esiste un motivo serio per dire che una è molto migliore delle altre: che, se così fosse, le altre non esisterebbero. Si può infatti affermare che nessun microscopio a trasparenza finora studiato nel campo interferenziale è esente da gravi difetti. Si va dallo strumento complesso, costoso ed ingombrante (Micro-interferometro Leitz) a quello pieno di limitazioni (oculare interferenziale di Françon); da quello sofisticato e complicato («Interphaco», Jena) a quello instabile e poco pratico (Dyson).

Insomma, le tecniche come la micro-interferometria a riflessione secondo Michelson o il contrasto di fase sono risolte allo stesso modo dalla grande maggioranza dei costruttori, e dimostrano di avere ormai raggiunto un optimum di prestazioni; invece la micro-interferometria a trasparenza viene risolta da ogni costruttore in maniera diversa, dimostrando così che ognuna delle altre soluzioni è sembrata insoddisfacente. La microscopia interferenziale in diascopia è dunque ancora in cerca di assestamento, e non si può più sperare che venga trovata una soluzione ideale, soddisfacente sotto tutti i punti di vista.

NOTA

Non si è fatta distinzione in questo lavoro fra il termine « microscopio interferenziale », che indicherebbe uno strumento di osservazione qualitativa, ed il termine « micro-interferometro », che indicherebbe uno strumento di misura.

La ragione è che ogni microscopio interferenziale, anche il più semplice, permette almeno l'apprezzamento, se non la misura, del cammino ottico nell'oggetto, e cioè si tratta in ogni caso di uno strumento di misura. A rigore, occorrerebbe quindi usare il solo termine di « micro-interferometro ».

In secondo luogo, si sono sfiorati nel testo molti problemi inerenti alla microscopia in generale ed ai fenomeni delle radiazioni polarizzate in particolare; si presuppone che il lettore sia ben addentro in questo campo o che abbia la pazienza di sfogliare la bibliografia, eventualmente gli altri testi offerti nello stesso sito; certi argomenti non sono stati quindi sviluppati per evitare divagazioni.

BIBLIOGRAFIA

LAVORI A CARATTERE GENERALE

- (1) P. BARCHEWITZ, *Étude sur l'interféromètre à rayons polarisés de Jamin*, Revue d'Optique, 13, 167 (1934).
- (2) R. BARER, *A comprehensive theory of phase contrast and interference microscopy*, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique (1952).
- (3) R. BARER, *Interference microscopy and Mass determination*, Nature, 169, 366 (1952).
- (4) R. BARER, *A vector theory of phase contrast and interference contrast*, Journ. Roy. Micr. Soc. LXXII, S. 10-30, S. 81-98 (1952), LXXIII, S. 30-39 (1953); S. 206-215 (1954); LXXV, S. 23-37 (1955).
- (5) R. BARER, *Phase contrast, Interference contrast and polarizing microscopy*, In: R.C. Mellors, Analytical Cytology, McGraw Hill, New York (1955).
- (6) P. BARTELS, *The new Leitz interference microscope*, E. Leitz Wetzlar International Report 1/62/1000.
- (7) H. BEYER and G. SCHÖPPE, *Interference Equipment for transmitted Light microscopy*, Jena Review I, p. 99-105 (1965).
- (8) B. S. BLAISIE, *Polarized beam interferometer*.- J. Opt. Soc. Amer. 46, 950-952 (1956).
- (9) W. BOGUTH e F. HABERMALZ, Z. wiss. Mikrosk. 64, 395 (1960).
- (10) C. BURRI, *Das Polarisationsmikroskop*, Basel, 1950.
- (11) A. COSSLETT, *Some applications of the ultra-violet and interference microscopes in electron microscopy*, J. Roy. Microsc. Soc. 79, 263-271 (1960).
- (12) A. COTTON, *L'interféromètre de Jamin à faisceaux polarisés*, Revue d'Optique, 153-166 (1954).
- (13) J. DYSON, *An interferometer microscope*, Proc. Roy. Soc. 2, 204-170 (1950).
- (14) J. DYSON, *Some considerations affecting the design of interference microscopes*.- J. Opt. Soc. Am. 47, S. 557-562 (1957).
- (15) R. C. FAUST, *Multiple-beam interference microscopy*, Proc. Roy. Soc. A. 211-240, (1952).
- (16) J. FLÜGGE, *Praxis der geometrischen Optik*, Vandenhoeck e Ruprecht, Göttingen, 1962.
- (17) M. FRANÇON, *Observation des objets transparents par la méthode de Tolansky*, Revue d'Optique, t. 30, N. 5, 221. (1951).
- (18) M. FRANÇON, *Nouvelle méthode d'observation des objets transparents*, C.R.A.S. t. 233, p. 1776 et: Revue d'Optique, t. 31, N. 2, 65 (1952).
- (19) M. FRANÇON, *Interférences par double réfraction en lumière blanche*, Rev. d'Optique, 31, S. 65-85 (1952).
- (20) M. FRANÇON, *Application des lames uniaxes à l'observation des objets transparents isotropes en microscopie*, C.R.A.S., t. 234, 520, Revue d'Optique, Avril (1952).
- (21) M. FRANÇON, *Le Microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*, Editions C.N.R.S., Paris, 1954.
- (22) J. GAHM, *Durchlicht-Interferenzeinrichtungen nach Jamin-Lebedef.* - Zeiss Mitteilungen 2 (1962), 10. Heft und 3 (1963), 1. Heft.
- (23) J. GAHM, *Quantitative polarisationsoptische Messungen mit Kompensatoren*, Zeiss Mitteilungen 3 (1964), 5. Heft.
- (24) J. GAHM, *Die Polarisations-mikroskopie und Zweistrahl-interferenzmikroskopie im durchlicht*, Sonderdruck aus Zeiss Informationen Nr. 61 (1966), pp. 89-94.
- (25) G. HANSEN, *Die Sichtbarkeit der Interferenzen beim Twyman-Interferometer*, Z. angew. Phys. 6, S. 203-205 (1954).
- (26) G. HANSEN e W. KINDER, *Abhängigkeit des Kontrastes der Fizeau-Streifen im Michelson-Interferometer von Durchmesser der Aperturblende*, Optik, 15, 560-564 (1958).
- (27) W. HORN, *Mikro-Interferenz*, Jahrbuch für Optik und Feinmechanik. N. 3, 4, 5, 6 (1956, 1957, 1958, 1959).

- (28) E. INGELSTAM and L. P. JOHANSSON, *Correction due to aperture in transmission interference microscopes*, J. Sci. Instr. 35, 15, (1958).
- (29) M. J. JAMIN, *Sur un réfracteur différentiel pour la lumière polarisée construit par Lutz*. Comptes Rend. de l'Académie des Sciences, 67 (1868), 814-816. Ref. Fortschr. Phys. XXIV, 382-383, (1868).
- (30) A. KASTLER, *Un dispositif de contraste de phase réalisé en 1868, l'interféromètre à polarisation de Jamin*, Le Journal de Physique et le Radium, 11, 38-39 (1950).
- (31) W. KINDER, *Ein Mikrointerferometer nach W. Linnik*, Zeiss-Nachr. 2/3 (1937).
- (32) A. KOHAUT, *Das Interferenzmikroskop, ein vielseitiges Messgerät*, Zeitschr. Für angew. Physik. 1 (1948).
- (33) A. KOHAUT, *Genauigkeitsfragen in der technischen Interferenzmikroskopie*, Werkstatt und Betrieb, 90 (1957).
- (34) W. KRUG und E. LAU, *Die Äquidensitometrie, ein neues Messverfahren für Wissenschaft und Technik*, Feingerätetechnik 1 (1952).
- (35) W. KRUG, T. RIENITZ und G. SCHULZ, *Beiträge zur Interferenz-Mikroskopie*, Akademie Verlag, Berlin (1961).
- (36) W. LAU und W. KRUG, *Die Äquidensitometrie*, Akademie Verlag, Berlin (1957).
- (37) A.A. LEBEDEF, *Interféromètre à Polarisation et ses applications*, Rev. d'Optique 9, 385-413 (1930). Ref. Z. f. Instrum. Kunde, 51, 275 (1931).
- (38) E. LEITZ, *Micro-Interferometro Leitz per luce trasmessa*, Catal. n. 52, 23/ital. Wetzlar.
- (39) E. LEITZ, *Microscope interférentiel pour lumière incidente*, Notice 86, 6b. Wetzlar.
- (40) E. LEITZ, *Microscope interférentiel pour lumière réfléchie*, Notice 860, 6d/frz. Wetzlar.
- (41) W. LINNIK, *Ein Apparat für mikroskopisch-interferometrische Untersuchungen reflektierender Objekte*, (Mikrointerferometer), C.R. Acad. Sci. Urss. 1, 21-23 (1933).
- (42) E. MENZEL, *Optische Verfahren der Dickenmessung III, Weitere Methoden der Interferenzoptik. ATM, V, 1124-1129* (1959).
- (43) Sir T. MERTON, *On a method of increasing contrast in microscopes*, Proc. Roy. Soc. A. 189-309 (1947).
- (44) Sir T. MERTON, *On interference microscopy*, Proc. Roy. Soc. A. 191-1 (1950).
- (45) K. MICHEL, *Interference Microscopy with transmitted light*, Zeiss, Oberkochen, 40-560 notice.
- (46) H. MYKURA e G. E. RHEAD, *Errors in surface topography measurements with high aperture interference microscopes*, J. Sci. Instrum. 40, 313-315 (1963).
- (47) M. G. NOMARSKI, *Micromicrointerféromètre pour l'étude des surfaces (interféromètre à polarisation)*, C.N.R.S., Inv. 45-95, Paris.
- (48) M. G. NOMARSKI, *Micromicrorefractomètre interférentiel (interféromètre à polarisation)*, C.N.R.S., Inv. 45-95, Paris.
- (49) M. G. NOMARSKI, *Microscope à contraste interférentiel pour l'observation des objets transparents*, C.N.R.S., Inv. 45-95, Paris.
- (50) M. G. NOMARSKI, *Utilisation simultanée du contraste de phase et des interférences à ondes multiples*, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique, 1952.
- (51) M. G. NOMARSKI, Brevet français N. 1059-124, C.N.R.S. du 14 Mai 1952.
- (52) M. G. NOMARSKI, *Micromicrointerféromètre différentiel à ondes polarisées*, J. Physique et le Radium, 16, S. 9-13 (1955).
- (53) H. OSTERBERG, *Phase and Interference Microscopy*, In: G. Oster and A. W. Pollister: Physical Techniques in Biological Research, Vol. I, 128, Academic Press, New York (1955).
- (54) J. St. L. PHILPOT, *Colloque sur le contraste de phase et le contraste interférentiel*, Éditions de la Revue d'Optique (1952).
- (55) H. PILLER, *Durchlicht-Interferenzmikroskopie nach dem Jamin-Lebedeff-Prinzip*, Zeiss Mitteilungen, 2, 8 Heft (1962).
- (56) A. POLICARD, M. BESSIS, M. LOCQUIN, *Traité de microscopie*, Mason et Cie, Paris, s. 91-95 (1957).
- (57) K. RÄNTSCH, *Grundsätzliches zur Interferenzmikroskopie*, Werkstatttechnik und

Maschinenbau 42 Jg, H. 10 (1952).

- (58) REICHERT WERK, WIEN, *Interference contrast equipment after Nomarski*, Notice K-I-III-E, 3,63.
- (59) G. G. ROSE, *Time-lapse cinematography with the interference microscope*, Research Film, vol. 3, N. 5, 267 (1960).
- (60) G. W. ROSENBERG, *Die Interferenzmikroskopie*, Erfolge der Physik, Moskau, 50, 271 (1963).
- (61) M. SAGNAC, *Strioscopie interférentielle*, Journal du Radium, (1911).
- (62) H. G. SCHIEMER, *Farbige Interferenzmikroskopie*, Acta Histochem. 9, 218-215 (1960).
- (63) G. SCHULZ, *Über Interferenzen gleicher Dicke und Längenmessung mit Lichtwellen*, Ann. d. Physik, 14, 6. Folge, 177-187 (1954).
- (64) F. H. SMITH, Research, 8, 385 (1956).
- (65) R. TORGE, *Il microscopio ad interferenza per riflessione*, Informazioni Zeiss, N. 61, pagg. 100-103 (1966).
- (66) M. UHLIG, *Das Interferenzmikroskop in der Praxis*, Zeiss-Werkzeitschr. 6, 70-77 (1958).
- (67) M. UHLIG, *Ein neues Auflicht-Interferenzmikroskop*, Mikroskopie, band 20, pag. 175-188 (1965).
- (68) M. UHLIG, *Le nouveau dispositif pour observation par interférences, adaptable au microscope WILD M 20*, Mikroskopion N. 7, Édito da WILD-Heerbugg (1966).
- (69) F. WALTER, *Leitz-Mitt. f. Wiss. u. Technik*, 2, 41 (1962 a); *ibidem*, 2, 77 (1962 b).

APPLICAZIONI DELLA MICROSCOPIA INTERFERENZIALE ALLA BIOLOGIA ED ALLA MEDICINA

- (70) R. D. ALLEN, *Structure and organization of the living mitotic spindle of Haemanthus Endosperm*, Science, Vol. 151, N. 3710, pp. 572-574 (1966).
- (71) R. BARER, *Determination of dry mass, thickness, solid and water concentration in living cells*, Nature, 172, 1098 (1953).
- (72) R. BARER, *Phase contrast and interference microscopy in cytology*, In: G. Oster and W. Pollister, Techniques in Biological Research, Vol. III, Cells and Tissues, Acad. Press Inc. New York, 1956.'
- (73) R. BARER, *Refractometry and Interferometry of living cells*, J. Optic. Soc. Amer., 47, 545-556 (1957).
- (74) R. BARER, J. F. DANIELLI and H. G. DAVIES, *A quantitative cytochemical method for estimating alkaline phosphatase activity*, Proc. Roy. Soc. B. 144, 412 (1955).
- (75) R. BARER and D. A. T. DICK, *Mass concentration and thickness of living cells in tissue culture*, J. Physiol. 128, 25 (1955).
- (76) R. BARER and D. A. T. DICK, *Interferometry and refractometry of cells in tissue culture*, In: Cytochemical Methods with quantitative aims. Experimental cell research. Supplement 4, 103-135, Academic Press Inc. New York, (1957).
- (77) R. BARER, J. B. HOWIE, K. F. A. ROSS and K. S. THACZY, *Applications of refractometry in haematology*, J. Physiol. 120, 67 (1953).
- (78) R. BARER and S. JOSEPH, *Refractometry of living cells*, I, Quart. J. Microsc. Sci. **95**, 399 (1954).
- (79) R. BARER and S. JOSEPH, *Refractometry of living cells*, II, Quart. J. Microsc. Sci. **96**, 1 (1955).
- (80) R. BARER and S. JOSEPH, *Refractometry of living cells*, III, Quart. J. Microsc. Sci. **96**, 423 (1955).
- (81) R. BARER and K. F. A. ROSS, *Refractometry of living cells*, J. Physiol. **118**, 38 (1952).
- (82) M. BESSIS, *La méthode de l'ombrage appliquée aux frottis de sang (mise en évidence du relief cellulaire, de certains organites intra-cellulaires et des mitochondries. Coloration des hémataxies)*, Rev. d'Hématologie, 4, 95-110 (1949).

- (83) M. BESSIS et J. P. THIÉRE, *Les cellules du sang vues au microscope à interférence (système Nomarski)*, Revue d'Hématologie, extrait du tome 12, N. 4, pp. 518-528 (1957).
- (84) G. B. DAVID, *Cytoplasmic networks in neurons*, Comparative neurochemistry, Austria 10-15, printed by Charles Birchall and Sons Ltd, Liverpool and London (June 1962).
- (85) H. G. DAVIES, *The determination of mass and concentration by microscope interferometry*, In: J. F. Danielli, General cytochemical methods, Academic Press Inc., New York, (1958)
- (86) H. G. DAVIES e A. ENGSTRÖM, *Interferometric and X-ray absorption studies of bone tissue*, Exp. Cell. Res. 7, 243 (1954).
- (87) H. G. DAVIES, A. ENGSTRÖM and BL. LINSTRÖN, *A comparison between the X-ray absorption and optical interference methods for the mass determination of biological structures*, Nature, 172 (1953).
- (88) H. G. DAVIES e M. F. H. WILKINS, *Physical aspects of Cytochemical methods*, Nature, 169, 541 (1952).
- (89) H. G. DAVIES, M. F. H. WILKINS, L. CHAYES and H. LA COUR, *The use of the interference microscope to determine dry mass in living cells and as a quantitative cytochemical method*, Quart. J. Microsc. Sci. 95, 271 (1953).
- (90) A. M. FREDERIKSE, Acta brev. neerl. Physiol. 3-8 (1933).
- (91) J. GREHN, Acta histochem. 9, 204 (1960).
- (92) H. HAGER e H. PEHLAND, *Interferenzmikroskopische Massenbestimmungen an biologischen Objekten mit einer Zweiwellenlängenmethode*, Naturw. 45, 1-2 (1958).
- (93) A. J. HALE, *A quantitative study of the colloid in the Thyroid gland of the Guinea Pig*, Exp. Cell Reser. 10, 132 (1956).
- (94) A. J. HALE, *The interference microscope in biological research*, Livingston Ltd, Edimburgh and London (1958).
- (95) H. H. HEUNERT, *Die interferenzmikroskopische Methode bei bakteriologischen Filmaufnahmen*, Research Film 3, N. 3, 154 (1959).
- (96) A. HUXLEY, *Das Interferenzmikroskop und seine Anwendung in der biologischen Forschung*, Naturw. 44, 189-196 (1957).
- (97) W. KINDER, *Anwendung des Mikrointerferometers nach W. Linnik zur Bestimmung der Gestalt einzelner Erythrozyten*, Zeiss-Nachr. 2/3 (1937) b.
- (98) R. C. MELLORS e J. HLINKA, *Interferometric Measurements of the dry weight of genetic materials in sperm nuclei*, Exp. Cell. Res., 9, 128 (1955).
- (99) R. C. MELLORS, A. KUPFER and A. HOLLANDER, *Quantitative Cytology and Cytopathology*, Cancer, 6, 572 (1953).
- (100) R. C. MELLORS, A. STOHOLSKI e H. BEYER, *Measurement of the organic mass of sets of chromosomes in germinal cells of the mouse*, Cancer, 7, 813 (1954).
- (101) J. M. MITCHISON e M. M. SWANN, *Measurements on Sea Urchin Eggs with an interference microscope*, Quart. J. Microsc. Sci. 94, 381 (1953).
- (102) D. MULLER, W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER e K. ENDRES, *Rontgenhistoradiographische Untersuchungen und interferenzmikroskopische Trockengewichtsuntersuchungen an Zellausstrichen*, Histochemie, 1, 438-444 (1959).
- (103) H. PEHLAND and H. HAGER, *Zur Theorie des interferenzmikroskopischen Trockengewichts, Bestimmung an biologischen Objekten*, Z. wiss. Mikrosk. 64, 271-285 (1959).
- (104) K. F. A. ROSS, *Measurement of the refractive index of cytoplasmic inclusions in living cells by the interference microscope*, Nature, 174, 836 (1954).
- (105) K. F. A. ROSS, *A critical method for measuring the diameter of living bacteria with the interference microscope*, Nature, 176, 1076, (1955).
- (106) W. SANDRITTER, *Advantages and disadvantages of the interference microscopic cytology*, Acta Cytologia, II, 321-323 (1958).
- (107) W. SANDRITTER, H. FISCHER, K. SÜSSENBERGER e H. G. SCHIEMER, *Quantitative histochemische Untersuchungen zum Nachweis der Protaminspeicherung von Mäuseascitestumorzellen*, Exp. Cell. Res. 17, 197-204 (1959).
- (108) W. SANDRITTER, K. D. GROSSER e H. G. SCHIEMER, *Trockengewichtsbestimmungen an*

- normalen und pathologischen Herzmuskelfasern*, Verh. dtsch. Ges. Path. 44 Tag. München (1960).
- (109) W. SANDRITTER e G. KIEFER, *Acta histochemica*, Supplementary volume 6, Jena (Proceedings of the Society for Histochemistry at the 9th Symposium in Giessen)(1965).
- (110) W. SANDRITTER e D. MÜLLER, *Vergleichende röntgenhistoradiographische und interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen*, Exp. 15, 158-161 (1959).
- (111) W. SANDRITTER, D. MÜLLER e H. G. SCHIEMER, *Über den Nukleinsäuregehalt und das Trockengewicht haploider und diploider zellen*, Anat. Anz. **105**, 146-156 (1958).
- (112) W. SANDRITTER e H. G. SCHIEMER, *Histochemische Untersuchungen an HeLa-Zellen*, Verh. Dtsch. Ges. Path. 42 Tag, 449-458 (1958).
- (113) W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER e W. ALT, *Das Interferenzmikroskop im Dienste der Cytologie und Krebsforschung*, Klin. Wschr. 12, 590-595 (1960).
- (114) W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER, W. ALT, P. MÜLLER e E. BETROUZI, *Histochemie von Sputumzellen III. Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen*, Frankf. Z. f. Path. 69, 167-193 (1958).
- (115) W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER, H. KRAUS e U. DÖRRIEN, *Interferenz-mikroskopie Untersuchungen über das Wachstum von Einzelzellen (HeLa-Zellen) in der Gewebekultur*, Frankf. Z. f. Path., 70, 271-299 (1960).
- (116) W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER, H. KRAUS und U. DÖRRIEN, *Das Wachstum von Einzelzellen in der Gewebekultur. Interferenzmikroskopische Untersuchungen an HeLa-Zellen*, J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 579-582 (1960).
- (117) W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER e H. UHLIG, *Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen an haploiden und diploiden Zellen*, Acta Histochem. 1960.
- (118) W. SANDRITTER e M. SCHREIBER, *Histochemie von Sputumzellen I. Qualitative histochemische Untersuchungen*, Frankf. Z. f. Pathologie, 68, 693-709 (1958).
- (119) H. G. SCHIEMER, *Beschreibung einer Zellkammer und Durchströmungseinrichtung zur untersuchung von Gewebekulturen mit dem Interferenzmikroskop und UV-Mikrospektrographen*, Mikroskopie, 14, 91-99 (1959).
- (120) H. G. SCHIEMER, *Vergleichende Trockengewichtsbestimmungen an Kern und Citoplasma verschiedener Karzinome*, Verh. Dtsch. Ges. Path. 43 Tag, 359-365 (1959).
- (121) H. G. SCHIEMER, *Das Interferenzmikroskop zum Nachweis von Fermenten und anderen Substanzen in der Histochemie*, Acta Histochem. 2, (1960).
- (122) H. G. SCHIEMER, *Interferenzmikroskopie in der Histochemie*, In: W. Graumann und K. Neumann; Handbuch der Histochemie I/III, Fischer Stuttgart (1960).
- (123) H. G. SCHIEMER, W. ALT e W. SANDRITTER, *Acta Histochem. (Jena)* 4, 325 (1957).
- (124) F. WALTER, *Interferenzmikroskopie und hämatologische Forschung*, Blut, band IX, seite 297-314 (1963); In: Ernst Leitz, Wetzlar, Gmbh (Nr. 92-52-106).

APPLICAZIONI DELLA MICROSCOPIA INTERFERENZIALE ALLA MINERALOGIA ED ALLA PETROGRAFIA

- (125) N. BARAKAT, *Interferenzmikroskopische Beobachtungen und Messungen an Wachstumsvorgängen auf Kristalloberflächen*, Zeiss-Mitteilungen 2, 230-235 (1961).
- (126) M. FOLLENIUS e S. GOLDSZTAUB, *Les méthodes interférentielles appliquées à l'étude de la croissance des cristaux*, Bull. Micr. app. 7, 8-13 (1957).
- (127) J. GAHM, *Die Untersuchung anisotroper Präparate mit der Interferenzanordnung nach Jamin-Lebedeff*, Zeiss Mitteilungen, 2, Nr. 10 (1962).
- (128) F. KORNDER, *Brechungsindex-Messungen mittels einer einfachen Interferenz-Einrichtung mit Kristallstrahlenteiler*, Fortschr. Min. und Petr. 37, S. 80-81 (1959).
- (129) J. RODER, *Antike Gesteinsoberflächen unter dem Interferenzmikroskop*, Zeiss-Werkzeitschrift **9**, 89-91, N. 42 (1961).
- (130) H. C. SORBY, *On some hitherto undescribed optical properties of doubly refracting crystals*, Proc. Roy. Soc. London, 26, S. 384-386 (1878).
- (131) S. TOLANSKY, *The topography of crystal faces*, Proc. Roy. Soc. A. 184, 41 et 51 (1945).

- (132) S. TOLANSKY, *Études interférométriques sur le mica*, Proc. Roy. Soc. A. 186-261 (1946)
 (133) S. TOLANSKY, *Interference studies of diamond faces*, Proc. Roy. Soc. A. 191-182 (1947)

APPLICAZIONI DELLA MICROSCOPIA INTERFERENZIALE ALLA TECNOLOGIA

- (134) C. ATTINGER, J. BÉGUIN e H. E. HINTERMANN, *Contrôle du polissage de la surface des pierres d'horlogerie*, Berichte des Internat. Kongresses G. Chronometrie, Lausanne, pag. 1153-1163 (Giugno 1964).
 (135) M. BRILLOUIN, *Mesure de très petits angles de rotation*, C.R.A.S., 137-786 (1903).
 (136) H. DETERMANN, *Auswertung von Verschleissuntersuchungen mit der Vierkugel-Apparat mit hilfe des Interferenzmikroskops*, Zeitschr. Erdöl und Koble, **10** (1957).
 (137) G. ELSSNER, *Die zerstörungsfreie Bestimmung der Dicken anodischer Schichten mit dem Interferenzmikroskop*, Zeitschr. Aluminium, **35**, 202-204 (1959).
 (138) A. E. FEUERSANGER, *Interference microscopy of thin films and semiconductor structures*, Solid state design, 4, 29-32 (1963).
 (139) J. GREHN, *Leitz Mitt. f. Wiss. und Techn.* 1, 35 (1959).
 (140) A. N. J. HEYN, *The interference microscope in fiber research*, Text. Res. J., 449 (1957).
 (141) U. HOOMANN, *Die Bestimmung der Verschleissbeständigkeit glasierter oberflächen*, Ber. Dtsch. Keram. Ges. 41, 240-246 (1964).
 (142) W. ILLIG, *Oberflächenprüfung mit dem Interferenzmikroskop*, Zeitschr. Metalloberfläche 7/7 (1953).
 (143) W. ILLIG, *Die messung von anodisch auf Aluminium erzeugten Schichten*, Metalloberfläche, 13, 33-35 (1959).
 (144) W. KINDER, *Der Ebenkeitsprüfer und die Interferenzgeräte zur Oberflächenprüfung*, Zeiss-Informationen 13, N. 58, 136-140 (1965).
 (145) A. KOHAUT, *Zur Praxis der Oberflächenmessung mit dem Interferenzmikroskop*, Werkstatt und Betrieb, 86, (1953).
 (146) D. KOSSEL, *Moderne interferometrische Methoden der Feinwerktechnik*, Maschinenmarkt, nr. 97 (1963)(E. Leitz Wetzlar, nr. 92-86-111).
 (147) J. M. KROLL, *Die Interferenzmikroskopie bei der Beurteilung moderner Kraftfahrzeuglackierungen*, Metall-Reinigung + Vorbehandlung, 14, 69-72 (1965).
 (148) W. KRUG, *Bessere Wiedergabe der Oberflächenstruktur durch Zweistrahl- als durch Mehrstrahl-Interferenzen*, Feingerätetechnik, **4**, (1935).
 (149) G. KRUGER, *Eine einfache Vorrichtung zur Messung der Längen magnetostraktion*, Schweizer Archiv f. angew. Wissenschaft und Technik, 25, 307-309 (1959).
 (150) G. KRUGER, *Das Interferenzmikroskop als Beobachtungsinstrument für metallographische Schliffe im Farbkontrastverfahren*, Schweizer Archiv f. angew. Wissenschaft und Technik, 25, 309-310 (1959).
 (151) P. LANGUE, *À propos de l'usure des extrémités de pivot.*, Ann. Francaises de Chronométrie: Fascicolo speciale (1958).
 (152) M. G. NOMARSKI, *Microscope métallographique pour l'observation en contraste interférentiel*, C.N.R.S. Inv. 45-95, Paris.
 (153) M. G. NOMARSKI e A. R. WEILL, *Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées*, Revue de Metallurgie, *LII*, 121-134 (1955).
 (154) F. M. POHL, *Bruchfreie Ritzspuren auf Silikatglas und einigen Thermoplasten*, Z. f. angew. Physik, 18, 203-205 (1964).
 (155) K. RÄNTSCH, *Optische Verfahren zur Oberflächenprüfung*, Zeiss-Nachr, 5/6 (1945).
 (156) E. ZEHENDER, *Ein Interferenzverfahren zur Untersuchung rauher Oberflächen*, VDI, Zeitschrift, **94**, (1952).

INDICE

PRESENTAZIONE	Pag.3
CARATTERI GENERALI DELLA MICROSCOPIA INTERFERENZIALE	3
Lo scopo	3
Il principio	4
A) <i>Contrasto interferenziale semplice (« Tinta unita »)</i>	4
B) <i>Metodo delle frange (« Interferogramma »)</i>	8
C) <i>Lo sdoppiamento laterale (« Shearing method »)</i>	10
I vantaggi del microscopio interferenziale.....	14
Gli svantaggi del microscopio interferenziale	16
GLI STRUMENTI PER OSSERVAZIONI IN TRASPARENZA	
Micro-interferometri del tipo Mach-Zehnder	19
A) <i>Micro-interferometro Leitz</i>	19
B) <i>Il sistema « Interphaco » Zeiss di Jena</i>	22
C) <i>Micro-interferometri a immagini simmetriche</i>	25
D) <i>Il dispositivo di Dyson (1950)</i>	26
Micro-interferometri del tipo Fabry-Pérot.....	27
Micro-interferometri a birifrangenza	31
A) <i>Il principio di Jamin e Lebedeff</i>	31
B) <i>Il principio di Nomarski (DIC)(1952)</i>	34
C) <i>L'«oculare interferenziale» di M. Françon (1951)</i>	38
D) <i>I dispositivi a sdoppiamento assiale</i>	40
GLI STRUMENTI PER OSSERVAZIONI IN RIFLESSIONE (EPISCOPIA)	43
A) <i>Micro-interferometri a riflessione sul principio di Michelson</i>	44
B) <i>Micro-interferometri a riflessione per birifrangenza</i>	50
C) <i>Micro-interferometri a riflessione sul principio di Fabry-Pérot</i>	52
CONCLUSIONI.....	53
NOTA.....	54
BIBLIOGRAFIA	55