## SGUARDO GENERALE ai metodi di ILLUMINAZIONE in MICROSCOPIA

Molti dei problemi riguardanti questo argomento possono essere riassunti analizzando la figura seguente.

In essa, la retta orizzontale "P" rappresenta il piano dell'oggetto, supposto per semplicità sottile e piano. "O" rappresenta il punto centrale di esso. Le due lunette "Obb" e "Cond" rappresentano l'obbiettivo ed il condensatore di un generico microscopio il cui asse ottico non è indicato, ma ovviamente è dato da una retta perpendicolare al piano P e passante per O.

Obbiettivo e condensatore sono schematizzati con una lente semplice piano-convessa, anche se in realtà si tratta di sistemi complessi.

Il cerchio a sfondo tratteggiato centrato su O rappresenta in sezione tutto lo spazio attorno all'oggetto O; il semicerchio A-B-A rappresenta il semispazio SOPRA il piano dell'oggetto P; il semicerchio C-D-C è lo spazio SOTTO l'oggetto.

Per semplicità, supponiamo che condensatore ed obbiettivo abbiano la stessa apertura<sup>1</sup>, come risulta dai due settori (non tratteggiati) col vertice in O e con base sul contorno dell'obbiettivo e del condensatore. A queste condizioni, tutto il fascio emergente dal condensatore viene accettato dell'obbiettivo.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Nel nostro campo, dato un fascio conico, "apertura" indica l'angolo fra l'asse ed una generatrice del cono, ovvero la massima inclinazione, rispetto all'asse, fra tutti i raggi costituenti il fascio. Tale angolo si indica di solito colla lettera greca  $\alpha$  o "alfa" (a minuscola).

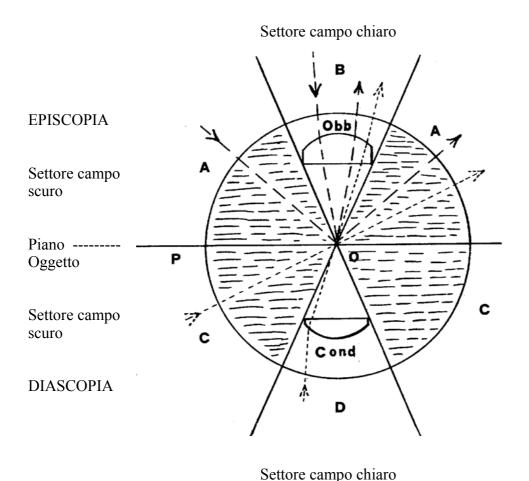


Fig. 1 – Schema di tutti i possibili modi di illuminare l'oggetto al microscopio.

Ragioniamo ora su questo schema.

Dividiamo tutti gli oggetti che si possono osservare al microscopio in due grandi categorie: 1 - trasparenti e: 2. - opachi.

1 – **Oggetti trasparenti**. Gli oggetti trasparenti, tranne rari casi, sono di per sé o vengono trasformati in strato sottile o "sezione sottile" e pertanto possono venir illuminati "da dietro", in trasparenza, come si guarda una diapositiva rivolgendola verso una finestra. Anche oggetti che sembrano opachi in forti spessori (rocce, minerali, legno, plastica, ecc.) divengono trasparenti in spessori minori.

Allora, lo spazio inferiore C-D-C dello schema può essere utilizzato per illuminare un oggetto trasparente da sotto o, in gergo, "in diascopìa" o "luce trasmessa" o "in trasparenza".

1.1 - Dello spazio che circonda O, il settore D, che coincide col cono di apertura del condensatore, rappresenta lo spazio riservato all'illuminazione "in **campo chiaro**". Ecco cosa avviene: un fascio illuminante non proprio parallelo ("collimato"), ma comunque di piccola apertura, proviene dal basso, da una microlampada (freccia a tratteggio più fitto) e, emergendo dal condensatore, diviene convergente, spesso con forte apertura. Il punto di convergenza<sup>2</sup> giace nei pressi del secondo fuoco del condensatore. Focalizzando il condensatore (spostandolo verticalmente) si può fare in modo che quel punto di convergenza

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Si può parlare, con qualche approssimazione, di "punto" di convergenza solo nel caso ideale in cui il fascio illuminante provenga da una sorgente puntiforme; ma questo non avviene mai nei casi reali. Si tratta di una astrazione accettabile solo al fine di semplificare il discorso.

giaccia nel piano P, cioè coincida con O, se tutto è centrato. Oltre il piano P, il fascio illuminante diverge poiché ogni raggio prosegue in linea retta. Il punto O coincide (nel caso degli obbiettivi "a coniugata infinita") o si trova presso (negli obbiettivi "a coniugata finita") il primo fuoco dell'obbiettivo; solo in questo caso infatti l'immagine di O e dell'intero oggetto costituirà un "immagine intermedia" al posto giusto, cioè risulterà focalizzata. Il fascio illuminante allora, dopo aver transitato dal punto O, emergerà dall'obbiettivo come fascio parallelo o leggermente convergente.

In conclusione, tale fascio va a riempire tutta l'immagine intermedia e produce in essa un campo più o meno uniformemente illuminato: il cosiddetto "fondo chiaro" o "campo chiaro". Naturalmente, se nel piano P, a parte il punto O, vi è un oggetto costituito da parti più o meno trasparenti o colorate, la sua struttura si ritroverà, ingrandita, nel piano dell'immagine intermedia e l'oggetto apparirà, più o meno scuro o colorato, distaccandosi dal "fondo chiaro", che è privo di struttura. Qualcosa del genere avviene in un proiettore per diapositive o cinematografico.

1.2 – Ma stiamo considerando oggetti trasparenti. Quindi il fascio illuminante può provenire anche da una direzione esterna al settore D, purché da sotto rispetto al piano P, dunque all'interno del settore C – C (freccia a tratteggio medio). È ovvio che tale fascio non può essere fornito da un condensatore come quello indicato in figura, ma dovrà giungere sull'oggetto con una apertura (un'inclinazione) maggiore, in modo da trovarsi all'esterno del cono D, ma contenuto nel settore C - C. Occorrerà un condensatore di maggiore apertura.

Ma questa volta il fascio illuminante dovrà avere la forma di un cono cavo: dovrà essere tutto contenuto nel settore C senza invadere il cono D; se ciò avvenisse, una parte del fascio illuminante rientrerebbe nell'apertura utile dell'obbiettivo e si avrebbe di nuovo il campo chiaro.

Ecco dunque che l'oggetto è ancora illuminato per trasparenza, ma il fascio illuminante non penetra direttamente nell'obbiettivo; ne consegue che il fondo dell'immagine è scuro ("fondo nero" o "campo scuro"); però l'oggetto è chiaro in quanto diffonde almeno in parte la radiazione che l'attraversa ed una parte di questa radiazione diffusa penetra nell'obbiettivo e costruisce un'immagine più o meno brillante dell'oggetto, brillante, ma su uno sfondo scuro. In altre parole, l'obbiettivo può utilizzare per la formazione dell'immagine solo la radiazione che l'oggetto sottrae al fascio illuminante deviandola (per diffusione od altro) all'interno dell'apertura utile dell'obbiettivo stesso.

Il condensatore allora, oltre a produrre un fascio di apertura maggiore di quanto richiesto dal fondo chiaro (a parità di obbiettivo), dovrà produrre un fascio cavo con un'apertura minima ed una massima; la minima sarà superiore a quella massima dell'obbiettivo (perché nessun raggio vi cada dentro) e la massima, ovviamente, non superiore a 90°. In altre parole, il fascio illuminante deve convergere verso il centro del piano oggetto (O) ma con un'inclinazione così forte da non penetrare nell'obbiettivo; la parte centrale del fascio, corrispondente almeno all'apertura massima dell'obbiettivo, deve essere soppressa per non illuminare il fondo del campo.

Un condensatore con queste caratteristiche può essere costituito:

-- da un normale condensatore di forte apertura<sup>3</sup>, ma provvisto, presso il suo piano focale inferiore, di un dischetto opaco che obliteri la parte centrale del fascio per un'apertura almeno uguale a quella dell'obbiettivo (fig. 2);

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> più forte di quella dell'obbiettivo!

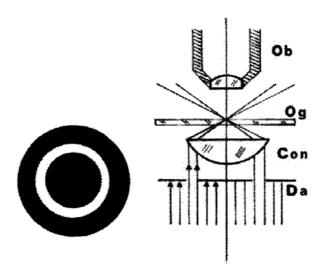
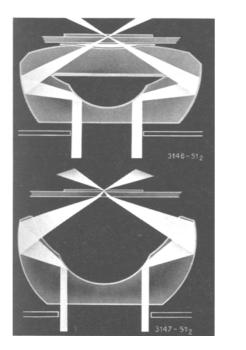


Fig. 2 — Condensatore diottrico semplice per campo scuro a secco. A sinistra, vista in pianta del diaframma anulare (Da) capace di creare il fascio illuminante a forma di cilindro cavo che incide sul condensatore (Con).

-- oppure da un condensatore speciale, generalmento costruito con specchi concavi o convessi.

La prima soluzione è valida per ingrandimenti piccoli e medi. Per gli obbiettivi più forti, di maggiore apertura, le aberrazioni del condensatore, anche se del tipo più "corretto" ("aplanatico-acromatico"), sono troppo forti ed il campo illuminato avrebbe contorni non definiti e con forti dominanti di colore. Per questo motivo, si preferiscono sistemi a soli specchi ("catottrici", fig. 3, sinistra) o con specchi e lenti ("cata-diottrici"). Poiché le leggi della riflessione sono indipendenti dalla lunghezza d'onda, un sistema catottrico è sempre esente dalle aberrazioni cromatiche.



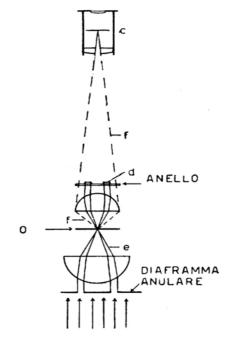


Fig. 3 — Condensatore catottrico per fondo scuro a secco (a sinistra in basso) e lo stesso ad immersione (in alto). Si noti che, a secco, il fascio emerge dal condensatore e giunge al vetrino attraversando uno spazio in aria; attraversando il vetrino, il fascio viene rifratto due volte. In immersione invece, dopo l'ultima riflessione, il

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> La "catottrica" si occupa dei sistemi riflettenti; la "diottrica" dei sistemi rifrangenti.

fascio deve viaggiare in vetro o in olio; al di là del vetrino, il fascio incontra ancora olio e poi la lente frontale dell'obbiettivo (non rappresentata). Al minimo strato d'aria, si avrebbe di nuovo rifrazione e perdita d'apertura. Schema del fondo scuro "centrale" (a destra) con anello opaco nella pupilla d'obbiettivo e diaframma anulare nel condensatore.

Da: E. LEITZ GMBH Wetzlar, Notice 55 – 20, XI/60/CX/L. 1960.

1.3 – Non si può chiudere questo paragrafo senza accennare ad un modo originale di ottenere il fondo scuro, realizzato in passato da qualche costruttore (Zeiss Jena): il **campo scuro centrale**. Il termine "centrale" sintetizza bene l'essenza del metodo. Il condensatore (normalissmo, per campo chiaro) contiene un diaframma anulare del tipo di fig. 2, ma con un diametro ridotto, tale che il fascio illuminante conico<sup>5</sup> emergente dal condensatore (e in figura 3) è sempre meno "aperto" dell'obbiettivo (si cambia diaframma quando si cambia obbiettivo, come si fa in contrasto di fase, vedi la fig. 3 a destra). Il fascio illuminante penetra quindi sempre per intero nell'obbiettivo. Ma qui nasce l'originalità: in ogni obbiettivo (o addirittura in un piano coniugato colla pupilla d'obbiettivo, in modo da poter utilizzare obbiettivi normali) si trova un anello simile ad un anello di fase ma totalmente assorbente (d, fig. 3 destra). Il fascio illuminante viene quindi soppresso e l'immagine (c) appare col fondo scuro poiché è formata solo dalla radiazione diffusa o diffratta dall'oggetto (f, fig. 3).

Il vantaggio sta nel fatto che il fascio illuminante ha sempre un'apertura minore di quella dell'obbiettivo e, sia il condensatore sia l'obbiettivo, sono normali e non vi sono limiti per quelli ad immersione.

Lo svantaggio di questa tecnica è che il fascio illuminante penetra per intero nell'obbiettivo e qui, inevitabilmente, si crea un fascio riflesso per ogni superficie e quindi una certa quantità di radiazione diffusa, con riduzione del contrasto (il fondo immagine non è mai del tutto nero).

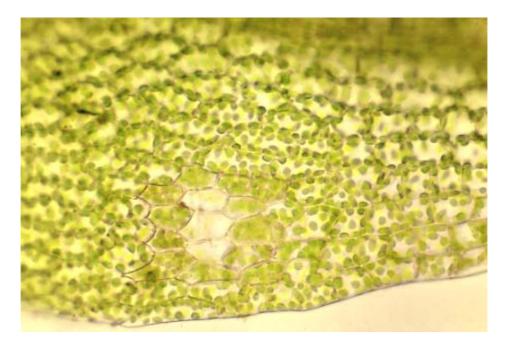


Fig.  $4 - Brium\ capillare\ Hedw\ (Muschi)$ . Fondo chiaro, 100:1 sulla pellicola  $24\times36$ . In genere, le foglioline dei muschi sono formate da un unico strato di cellule.sostenuto da un'unica nervatura (visibile in alto a destra, benché sfuocata).

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Si tratta ovviamente di un cono cavo: un fascio limitato da due superfici coniche concentriche col vertice e con l'asse in comune.

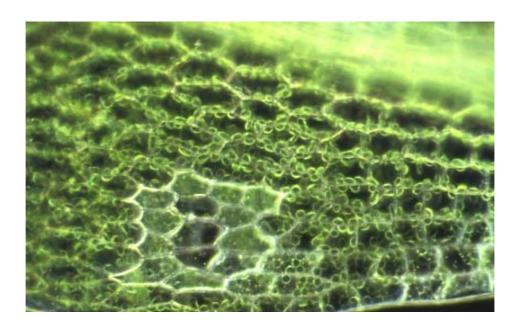


Fig. 5 – Stesso oggetto della figura precedente. Fondo scuro a secco. Sono meglio evidenziati i cloroplasti, tutti addossati alle pareti delle cellule per sfuggire all'intensa illuminazione del microscopio. Un po' in basso a sinistra, un gruppo di cellule morte, più evidenti che non in campo chiaro; le tre centrali del tutto svuotate.

Ma qui occorrono alcune precisazioni.

--- Poiché in fondo scuro l'oggetto appare chiaro su un campo nero, mentre in campo chiaro lo sfondo è chiaro e su di esso l'oggetto appare più scuro o colorato, si potrebbe dedurre che l'immagine in fondo scuro non è che il negativo fotografico di quella in fondo chiaro. Non è così poiché il meccanismo di formazione dell'immagine è diverso.

Infatti, in fondo chiaro l'oggetto risalta rispetto al fondo per la sua diversa "densità ottica6" o per il suo diverso colore, mentre in fondo scuro l'immagine si forma dalla luce diffusa dall'oggetto, e "diffusa" può significare riflessa, rifratta o diffratta. Ma questi ultimi fenomeni sono legati non alla trasmissione dell'oggetto ma, essenzialmente, al suo indice7: i dettagli che vengono messi in evidenza in fondo chiaro non sono gli stessi del fondo scuro. Per es., una normale cellula immersa in acqua è visibile in fondo chiaro solo se è opportunamente colorata; in fondo scuro sono sempre visibili i suoi contorni, il nucleo, ecc. per via del diverso indice.

--- Il contrasto nell'immagine non è lo stesso nei due casi. Se l'illuminazione in un'immagine varia da un valore minimo  $I_{min}$  ad uno massimo  $I_{max}$ , il contrasto (C) si esprime come:

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}$$

Ebbene, in campo chiaro  $I_{min}$  raramente diventa pari a zero (qualche frammento metallico, ad es.) poiché molti corpi opachi divengono relativamente trasparenti se tagliati in fette sottili. Perciò  $I_{max}$  -  $I_{min}$  è sempre minore di  $I_{max}$  +  $I_{min}$  e qindi il contrasto C è sempre < 1.

In campo scuro invece  $I_{min}$  può diventare quasi nullo ed allora  $I_{max}$  -  $I_{min}$  è simile a  $I_{max}$  +  $I_{min}$  e C diviene simile ad 1, che è il massimo valore teorico possibile. In poche parole, in un buon fondo scuro, in cui non vi siano sorgenti indesiderate di "luce diffusa" che

 $<sup>^6</sup>$  La densità ottica è D = Log 1 /  $\tau$  , in cui  $\tau$  è la "trasmissione pura" che ignora le perdite per riflessione alle superfici dell'oggetto. La trasmissione è il rapporto fra energia emergente dall'oggetto ed energia incidente su di esso.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> "Indice" significa qui "indice di rifrazione".

rischiarino il fondo, il contrasto è sempre elevatissimo, indipendentemente dall'intensità dell'illuminazione.

--- Ripensando alla fig. 1, supponiamo che, invece di un'obbiettivo di modesta apertura come quello schematizzato, si voglia usare un obbiettivo ad immersione. Si sa che un tale obbiettivo è in genere progettato per ottenere la massima apertura concretamente possibile, e l'immersione serve proprio ad introdurre nel valore dell'apertura "numerica"

$$NA = n \operatorname{sen} \alpha$$

il fattore **n**, l'indice, che di solito (nella "immersiome omogenea") è pari a 1,51.

Ma si è detto sopra che, per avere il fondo nero, occorre che l'apertura MINIMA del fascio illuminante sia superiore alla MASSIMA dell'obbiettivo. Ma, visto che l'obbiettivo ad immersione possiede già la massima apertura possibile, è impossibile che il condensatore, comunque concepito, possa fare di più.

Un primo rimedio consiste nell'usare un condensatore ad immersione: si ha così la "doppia immersione" secondo la quale l'olio da immersione si pone sia fra obbiettivo ed oggetto, sia fra oggetto (superficie inferiore del vetrino) e condensatore. Anche per il condensatore l'apertura raggiunge così il massimo valore pratico<sup>8</sup>, ma rimane il fatto che essa non può superare quella dei forti obbiettivi ad immersione.

A questo punto, non rimane che ridurre l'apertura dell'obbiettivo ad immersione, ed i mezzi sono due: introdurre dall'alto nell'obbiettivo un diaframma fisso sotto forma di "cilindretto limitatore", come era in uso presso alcuni costruttori del passato (Galileo, ad es.), oppure utilizzare appositi "obbiettivi ad iride" o "iris" in cui è predisposto un diaframma regolabile presso il secondo fuoco, manovrabile dall'esterno, che consente di ridurne l'apertura.

In genere, gli obbiettivi "iris" vengono regolati per un'apertura massima pari a: NA = 1,0. A questo punto, il condensatore per campo scuro (ad immersione) dovrà fornire un fascio illuminante di apertura compresa fa circa 1,1 (un po' superiore a quella dell'obbiettivo) ed il massimo possibile, circa 1,4.

Gli obbiettivi "iris" sono pericolosi poiché, tranne il caso del fondo scuro, debbono lavorare a piena apertura: se il diaframma viene parzialmente chiuso, anche solo per averlo inavvertitamente sfiorato colla mano, si rischia di lavorare per lungo tempo ad apertura ridotta, col risultato di perdere luminosità e risoluzione.

A questo punto è ovvio che, se il fondo scuro è utilizzato per obbiettivi deboli e medi, presumibilmente "a secco", anche il condensatore può essere a secco. Per le più forti aperture, come detto, occorre l'immersione. Ma con un limite in più: un condensatore ad immersione può produrre (ed in genere è così) un fascio di apertura superiore ad 1 e, se venisse usato senza olio, quando il fascio illuminante raggiunge la superficie superiore dell'ultimo elemento in vetro che lo costituisce, verrebbe riflesso verso il basso per "riflessione interna totale", senza poter raggiungere il vetrino: dal condensatore non potrebbe uscire alcuna radiazione. Solo la presenza dell'olio consente al fascio illuminante di non venire riflesso "totalmente" all'ingiù e di proseguire verso l'oggetto.

--- Poiché il condensatore per fondo scuro rappresenta pur sempre un sistema convergente a forte apertura e corta focale, lo schema di illuminazione più diffuso, quello secondo A. Köhler, può essere realizzato senza troppi limiti anche in fondo scuro. In pratica, potrà accadere che qualche residuo di aberrazioni del condensatore (sferica soprattutto) non dia un'immagine molto nitida del diaframma di campo, per cui il campo illuminato non sarà perfettamente delimitato.

Ma le manovre essenziali per la messa a punto dell'illuminazione sec. Köhler saranno ancora valide.

--- Nel campo scuro in diascopia che abbiamo descritto finora, con riferimento alla figura 1, settore C-C, si opera generalmente con un fascio illuminante che è simmetrico rispetto

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Un condensatore ad immersione, a differenza di quelli a secco, deve terminare verso l'alto con un elemento in vetro, non tanto per sostenere la goccia d'olio, ma poiché altrimenti non si introdurrebbe il fattore **n** (l'indice dell'aria è pari ad 1).

all'asse ottico, nel senso che il fascio stesso incide sull'oggetto da tutte le parti con la stessa inclinazione e la stessa intensità. L'oggetto appare così illuminato da tutte le parti, senza "ombre" (fig. 6 a destra). Ma, comunque sia costituito il condensatore, è possibile obliterare una parte del fascio in modo che esso incida sull'oggetto da una parte sola: si ha il "campo scuro unilaterale", capace di fornire immagini con uno spiccato effetto di rilievo, una specie di ombreggiatura (fig. 6 a sinistra).

Obiezioni a questa tecnica: 1 - si perde molta luce; 2 - l'effetto di rilievo non è dovuto alla forma dell'oggetto ma alle sue variazioni di indice, per cui si possono avere false interpretazioni sulla struttura dell'oggetto.

--- L'illuminazione unilaterale appena descritta si può effettuare anche in campo chiaro: basta obliterare parzialmente la pupilla d'ingresso del condensatore; in certi condensatori di vecchia fabbricazione era previsto a questo fine un diaframma d'apertura decentrabile con una piccola cremagliera, ma è molto più semplice ed anche più efficace un semplice cartoncino infilato di lato sotto il condensatore, magari poggiato sul porta-filtri. Non si avrà il fondo scuro, a meno che l'inclinazione del fascio rimanente sia maggiore di quella accettata dall'obbiettivo (obbiettivi deboli), ma l'effetto di rilievo e l'aumento di contrasto possono essere stupefacenti. Questa tecnica era largamente usata quando non esistevano le "tecniche di contrasto" come il contrasto di fase, ma attualmente nessun costruttore la propone, forse solo perché è troppo economica. Per questa tecnica si usa il termine "illuminazione obliqua", da non confondere col fondo scuro unilaterale poiché non dà il fondo scuro.

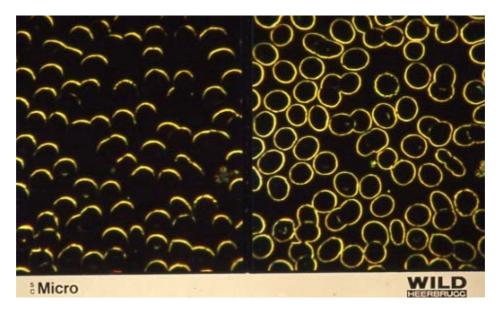


Fig. 6 – Striscio di sangue umano. Campo scuro unilaterale (sinistra) e omnilaterale (destra). Da: WILD Heerbrugg, *Diapositives pour l'enseignement de la Microscopie*, 5 C. 342 Rl/lt, 1965.

2 – **Oggetti opachi**. Riflettiamo ora su cosa succede quando l'oggetto è opaco, oppure trasparente ma di forte spessore: non si può illuminarlo per trasparenza ("luce trasmessa") e se ne può esaminare solo la superficie superiore. Anche il fascio illuminante dovrà provenire da sopra. Siamo nel campo della "luce riflessa" o "incidente"; si parla di "illuminazione verticale" o "per riflessione" o "**episcopìa**". Una volta si diceva "opaco-illuminazione".

Nella figura 1 interessa ora solo la metà superiore: il piano P rappresenta la superficie dell'oggetto opaco ed il fascio illuminante deve provenire da qualche direzione del semispazio che si trova sopra al piano P.

Dobbiamo anche qui distinguere gli oggetti opachi in due categorie: lucidi e diffondenti.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> In inglese, "verticale" viene spesso usato come sinonimo di "perpendicolare", che è tutt'altra cosa.

2.1 – Oggetti a **superficie lucida**, più o meno speculare. Si può trattare di campioni di rocce, carboni, provini metallici, materiali ceramici, ecc. I campioni vengono tagliati in modo da ricavarne una superficie piana che viene poi lucidata con abrasivi sempre più fini. Durante l'osservazione, si cerca di tenere la superficie dell'oggetto il più possibile perpendicolare all'asse ottico, se non altro per poterla osservare tutta quanta a fuoco.

A questo punto, si può ripetere molto di quanto detto per la diascopìa in quanto tutto è simmetrico rispetto al piano oggetto P; ma con una variante: se il condensatore e l'obbiettivo sono simmetricamente disposti rispetto al piano P¹0, è facile in diascopia illuminare l'oggetto da sotto ed osservarlo da sopra. Ma ora consideriamo oggetti opachi; e allora, per avere un fondo chiaro, come si fa ad illuminare la loro superficie con un cono simmetrico di quello utilizzato in diascopia (D) se tale cono simmetrico (B) è occupato dall'obbiettivo? Questo problema si pone se vogliamo che il fascio accettato dell'obbiettivo all'interno della sua apertura utile (B, appunto) provenga da una riflessione alla superficie dell'oggetto, che abbiamo supposto speculare. Il solo modo possibile di risolvere il problema è illuminare l'oggetto proprio attraverso l'obbiettivo (freccia sub-verticale a tratteggio largo in fig. 1, settore B).

2.1.1 – **Campo chiaro** - Cominciamo allora col dire che l'obbiettivo, essendo simmetrico rispetto al condensatore, ed avendo caratteristiche simili, ne può svolgere le funzioni. Infatti, nulla vieta di immaginare, sopra l'obbiettivo, una micro-lampada qualunque, anche del tipo di Köhler. Una tale microlampada, in diascopia, proietta un'immagine del filamento nella pupilla d'ingresso del condensatore<sup>11</sup>; qui si tratterà della pupilla<sup>12</sup> d'uscita dell'obbiettivo. Abbiamo detto "d'uscita" poiché tale è dal punto di vista del fascio che emerge dall'obbiettivo per formare l'immagine intermedia, ma si tratta per noi di una pupilla d'ingresso dal punto di vista del fascio illuminante. Dunque il fascio illuminante non è TRASMESSO dal condensatore verso l'obbiettivo ma RIFLESSO dall'oggetto, provenendo dall'obbiettivo stesso, che in quel momento funge da condensatore.

Ma c'è un problema: dove mettere la microlampada? Se la si pone semplicemente sopra l'obbiettivo, essa farà ombra ed assorbirà il fascio formatore d'immagine. E allora?

• Soluzione 1: uno specchio o un prisma a riflessione totale è posto eccentricamente nella pupilla d'obbiettivo (fig. 7, a sinistra).

A parte la correzione delle aberrazioni ed altri dettagli costruttivi, obbiettivo e condensatore sono simili in quanto a focale, apertura, ecc.

<sup>11</sup> Tale pupilla coincide spesso col primo piano focale ed ivi dovrebbe stare il diaframma d'apertura.

<sup>12</sup> Ricordiamo che la pupilla d'ingresso (o d'uscita) di un sistema ottico è il diaframma (o la sua immagine virtuale) quale appare guardando nel sistema stesso dal piano oggetto (o immagine).

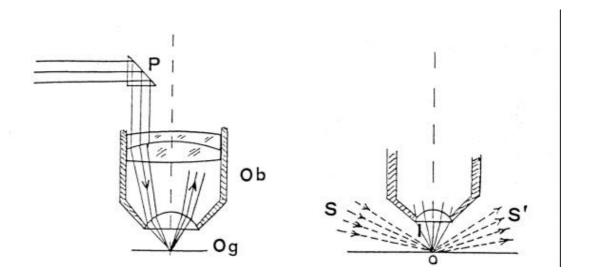


Fig. 7 – Illuminazione episcopica a fondo chiaro con prisma, a sinistra (Soluzione 1). Idem in campo oscuro (unilaterale), a destra.

Il vantaggio di questa soluzione è che la massima parte della pupilla d'obbiettivo rimane libera da ostruzioni, ma vi sono almeno due svantaggi. Prima di tutto, la parte utile della pupilla non è più circolare, e questo altera la forma dell'immagine di diffrazione corrispondente ad ogni singolo punto dell'oggetto. In secondo luogo, il fascio illuminante incide sull'oggetto con leggera obliquità, e questo rende il contrasto non omogeneo, nel senso che è maggiore nel piano meridiano passante per il prisma e minore nel piano perpendicolare a questo: si ha una leggera ombreggiatura ed una apparenza di rilievo. Questo effetto può essere utile in molti casi, ma comunque non è eliminabile.

•• Soluzione 2: un prisma composto, con superficie diagonale interna semi-riflettente<sup>13</sup> (P in fig. 8).

Vantaggi: la pupilla d'obbiettivo è libera da ostruzioni e rimane circolare. Sia il fascio illuminante (1 e 3 in fig. 8) sia il fascio riflesso dall'oggetto (4 e 6) trovano la pupilla intera.

Svantaggi: il fascio illuminante che proviene dalla sorgente S (1) si divide in due parti; quella trasmessa (2) va perduta (viene assorbita dalle pareti della montatura). Il fascio riflesso dall'oggetto O (4) viene anch'esso suddiviso in due parti, di cui una viene di nuovo riflessa (5) e torna alla sorgente, inutilizzata. Si hanno così due perdite consecutive. Qual'è la condizione che rende minime le perdite?

<sup>13</sup> Un tale elemento viene designato in inglese col termine "splitter".

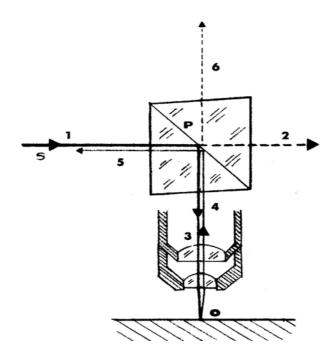


Fig. 8 – Illuminazione episcopica in fondo chiaro a prisma semiriflettente (Soluzione 2). Le linee orizzontali e poi verticali provenienti dalla sorgente S rappresentano il fascio illuminante riflesso prima dalla superficie semiriflettente P e poi dall'oggetto. Nel cammino di ritorno, verso l'alto, questo fascio (prima disegnato a linea intera e poi a tratteggio fine) viene di nuovo suddiviso in due parti dal semiriflettente. Quest'ultimo fascio rappresenta la radiazione riflessa dall'oggetto.

Fino a circa la metà del 1900, le superfici semi-riflettenti venivano realizzate con strati metallici sottili depositati per evaporazione sottovuoto. Queste strutture assorbono circa un terzo della radiazione incidente e quindi, a parte la perdita fotometrica, si scaldano molto. Nel dopoguerra, si sono rapidamente diffusi i semiriflettenti di tipo interferenziale: un sistema di stati sottili trasparenti crea una serie di riflessioni multiple le quali, sfruttando il principio dell'interferometro di Pérot e Fabry, consentono di suddividere il fascio incidente in una parte trasmessa ed una riflessa, rendendo trascurabile (teoricamente nulla) la parte assorbita.

A parte questi miglioramenti tecnici, si può dimostrare sul piano teorico che il miglior rendimento fotometrico si ottiene quando il fascio riflesso e quello trasmesso dalla superficie semiriflettente P hanno pari intensità, che si avvicina al 50% del fascio incidente nel caso dei sistemi interferenziali. Quindi, anche ignorando eventuali perdite, il miglior rendimento di un semiriflettente è pari a  $50\% \times 50\% = 25\%$ .

Altro svantaggio del prisma composto: il fascio formatore d'immagine, prima di raggiungere il piano dell'immagine intermedia, attraversa il prisma, cioè una lamina a facce piane e parallele. Se una tale lamina si introduce in un fascio convergente, come avviene negli obbiettivi classici "a coniugata finita", insorge un leggero astigmatismo nell'immagine. Questo inconveniente si aggira in due modi: •• introducendo prima del prisma una debole lente divergente e dopo di esso una debole convergente, in modo che, all'interno del prisma, il fascio (corrispondente ad ogni singolo punto dell'oggetto) abbia un decorso parallelo; è questo il sistema "Telan", poco diffuso; •• utilizzando obbiettivi "a coniugata infinita" che producono comunque, sempre per ogni singolo punto dell'oggetto, un fascio parallelo. Con l'uso di un fascio parallelo, l'astigmatismo non si presenta.

Ultimo svantaggio: sia il fascio illuminante che quello formatore d'immagine attraversano il prisma due volte e, ad ogni superficie aria-vetro, producono un fascio riflesso, per quanto debole. Tali fasci globalmente si sparpagliano nel sistema e creano un velo di luce diffusa che abbassa il contrasto. Anche per questo svantaggio c'è un rimedio: si ponga fra

sorgente e prisma un filtro polarizzante<sup>14</sup>; sopra il prisma, un secondo filtro con la direzione principale incrociata col precedente. Tutta la radiazione (polarizzata) riflessa dalle superfici del prisma, come pure dell'obbiettivo, viene "estinta" a livello del secondo polarizzatore e non si perde contrasto. Ma anche questo rimedio ha uno svantaggio: se l'oggetto possiede una superficie lucida e quindi riflettente, anche questo riflesso viene estinto: nell'oggetto si vedono solo le strutture diffondenti, che sono sempre più o meno depolarizzanti. Il metodo dei polarizzatori quindi funziona bene solo con oggetti diffondenti. Può d'altra parte accadere che certe microstrutture (scagliette di farfalle, coleotteri, ditteri, ecc., microfratture all'interno di minerali e pietre dure, inclusi in tessuti viventi, ecc.) creino dei fenomeni particolari in radiazione polarizzata, col risultato di produrre immagini molto gradevoli e comunque ricche di dettagli altrimenti invisibili; bisognerà poi interpretare correttamente queste immagini, il che non è mai semplice.

Un altro rimedio, parziale, al problema dei riflessi e della perdita di contrasto è costituito dall'accorgimento di disporre le superfici superiore ed inferiore del prisma di fig. 8, cioè le superfici attraversate dal fascio formatore d'immagine, un poco obliquamente rispetto all'asse ottico, come si può notare nella figura 8: i fasci riflessi da queste superfici saranno inclinati rispetto all'asse e si perderanno all'interno dello strumento senza danno. A parte il fatto che rimangono i riflessi sulle lenti dell'obbiettivo, anche qui c'è un piccolo inconveniente: proprio la non perpendicolarità delle superfici citate introduce nell'immagine un lievissimo astigmatismo; questo svantaggio però è normalmente tollerabile.

Il problema del cattivo contrasto rimane in ogni caso il più grave dell'episcopia.

Soluzione 3 (fig. 9): la superficie semiriflettente (E) non è ricavata sulla superficie diagonale interna di un doppio prisma ma dalla superficie di una sottile lamina trasparente a facce piane e parallele. Su una delle due facce della lamina è depositata la superficie riflettente, ormai sempre del tipo interferenziale, sempre con un rapporto del 50% fra fascio trasmesso e riflesso per le ragioni già dette.

La lamina di supporto può essere costituita da una lamina di vetro dello spessore intorno al millimetro; in questo caso c'è il vantaggio della robustezza e della possibilità di una normale pulizia con panno morbido, ma la lamina inclinata crea un debole astigmatismo, più forte di quello citato sopra a causa della maggiore inclinazione delle superfici (45°). Per evitare il problema dell'astigmatismo, certi costruttori usano una sottile pellicola plastica ben tesa in una montatura, ma la pulizia di un tale elemento è quasi impossibile e comunque rischiosa.

La lamina inclinata elimina le due superfici d'ingresso e d'uscita del prisma con i relativi riflessi.

12

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> con la direzione del vettore elettrico disposta orizzontalmente per sfruttare il maggior potere riflettente che la superficie P presenta in queste condizioni.

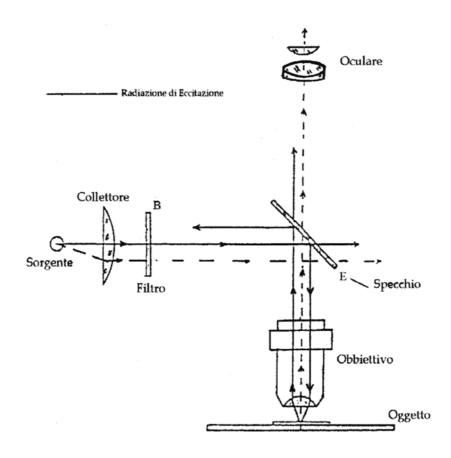


Fig. 9 – Schema di episcopia in fondo chiaro con specchio semiriflettente (E)(Soluzione 3). B è un filtro anticalorifico.

Anche nella Soluzione 3, per gli stessi motivi appena discussi, il rendimento massimo teorico è del 25%. Non è un gran ché, e si sono versati fiumi d'inchiostro per decidere se sia meglio il sistema a prisma totalmente riflettente (Soluzione 1) o quello a lamina semiriflettente (Soluzione 3), ma alla fine tutte le soluzioni sono valide, e lo dimostra il fatto che sono ancora tutte presenti sul mercato.

2.1.2 – **Campo scuro** - Tutto quanto detto finora si applica all'episcopia in fondo chiaro: tutto il fascio illuminante penetra nell'obbiettivo e nell'immagine il fondo è chiaro, salvo qualche eccezione quando si usano il filtri polarizzatori. Il fascio, in linea di massima, è simmetrico rispetto all'asse ottico: si può parlare di "**fondo chiaro centrale**". Ma, anche qui, si può rendere il fascio illuminante asimmetrico e realizzare l'**illuminazione obliqua**, come si è fatto per la diascopia.

Un primo esempio è quello della Soluzione 1 sopra descritta: un piccolo prisma eccentrico sopra l'obbiettivo. Qualcosa di meglio si può fare nel caso sottodescritto, quando una "lente relé" consente l'uso di un diaframma d'apertura PRIMA dell'obbiettivo: si viene a disporre di un diaframma reale in un piano coniugato con la pupilla d'obbiettivo, che in questo caso funziona da pupilla d'ingresso del condensatore. Nel caso della diascopia, si è visto che si realizza la illuminazione obliqua obliterando parzialmente e da un lato solo la pupilla d'ingresso del condensatore: basta porre un cartoncino sotto il diaframma d'apertura. In episcopìa, si può fare la stessa cosa se il piano del diaframma d'apertura è accessibile dall'esterno, per es. tramite una slitta porta-filtri.

Questa soluzione però è poco usata poiché generalmente l'illuminazione nel piano immagine non risulta omogenea; andrebbe comunque tentata sempre, ove possibile, poiché migliora molto il contrasto.

Ma, anche qui, come in diascopia, si può pensare ad un fascio illuminante così obliquo da non penetrare nell'obbiettivo, dunque, al **fondo scuro**; si ritorni alla fig. 7, a destra. È schematizzato con linee tratteggiate convergenti un fascio illuminante (S) che converge verso il centro del piano oggetto (O); poiché stiamo ancora trattando di oggetti piani a superficie speculare, il fascio illuminante S sarà riflesso dal piano oggetto e, teoricamente, produrrà un fascio riflesso simmetrico di quello incidente (S'), naturalmente divergente al di là del punto O. Questo schema è applicabile sia ad obbiettivi a secco che ad immersione ma, nel secondo caso, il fascio illuminante dovrà pervenire attraverso lo strato d'olio. Vedremo come. Rimane l'esigenza, come si è visto in diascopia, che il condensatore capace di creare un fascio illuminante così "aperto" deve possedere un'apertura MINIMA maggiore della MASSIMA dell'obbiettivo. Occorrerà anche, come in diascopia, limitare l'apertura degli obbiettivi ad immersione.

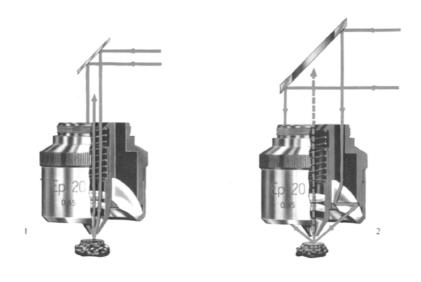


Fig. 10 – Obbiettivo episcopico per campo chiaro (1) e scuro (2). Il condensatore anulare per il fondo scuro è del tipo "catadiottrico".

Da: WILD Heerbrugg, Catalogo Mi 653 f – X.60 (1960).

L'illuminazione episcopica in **fondo scuro**, ancora a somiglianza della diascopia, può essere **unilaterale** o **omnilaterale** (simmetrica, rispetto all'asse ottico). In linea di principio, si può ottenere quella unilaterale, come adombrato dalla fig. 7 (destra), con una microlampada a fascio concentrato che faccia convergere un fascio sul punto O da una direzione unica. Ciò non è facile con gli obbiettivi forti per via della loro piccola distanza di lavoro e solo pochi costruttori hanno costruito obbiettivi "a montatura appuntita" i quali mostrano una forma generale esterna appuntita che facilita proprio questo tipo di illuminazione (in fig. 13 si vede un oggetto a forte rilievo, nel quale l'illuminazione unilaterale accentua molto le ombre). Ma generalmente si crea un fascio illuminante a forma di cono cavo, come si è visto per la diascopia (vedi la fig. 2) per avere un'illuminazione simmetrica.

La differenza rispetto alla diascopia sta nel fatto che il "cono cavo" illuminante sta sopra al piano oggetto invece che sotto. Ma allora occorre che il condensatore, naturalmente con apertura maggiore dell'obbiettivo, stia sopra all'oggetto, dalla stessa parte dell'obbiettivo.

In episcopia a campo chiaro, si è visto, l'obbiettivo svolge ANCHE la funzione di condensatore, e lo fa benissimo poiché ha la stessa focale, la stessa apertura ed ottime correzioni; non solo ma, quando si cambia obbiettivo, automaticamente si cambia il condensatore che avrà sempre la focale e l'apertura corrispondente a quella dell'obbiettivo;

bella forza: lo stesso organo fa da Marta e Maria.

Ma in fondo scuro il condensatore non può essere sostituito dall'obbiettivo, se non altro perché deve avere per forza un'apertura maggiore.

E allora? Come compenetrare obbiettivo e condensatore a forte apertura?

La soluzione è unica: alloggiare l'obbiettivo AL CENTRO di un condensatore anulare che lo abbraccia come una cintura di salvataggio. Come per la diascopia, il condensatore episcopico a fondo scuro potrà essere del tipo diottrico (sole lenti) o, più spesso, catottrico (soli specchi) o misto (cata-diottrico). In ogni caso, l'obbiettivo è doppio: al centro, il normale obbiettivo episcopico; intorno, il condensatore anulare. In fig. 10 si vede lo spaccato di un tale accessorio. In dettaglio: a sinistra, si vede sopra l'obbiettivo la lamina semiriflettente (Soluzione 3, vedi sopra) per il fondo chiaro; viene interessato solo il sistema ottico centrale, cioè l'obbiettivo vero e proprio; le frecce orizzontali dirette a sinistra indicano il fascio illuminante per il fondo chiaro; la freccia verticale diretta in alto rappresenta la luce riflessa dall'oggetto. A destra, le frecce orizzontali dirette a sinistra (fascio illuminante) sono distanziate fra loro poiché si trovano in posizione diametralmente opposta rispetto ad un fascio cilindrico, fornito dalla microlampada; tale fascio viene riflesso integralmente verso il basso e trasformato in cilindro cavo da uno specchio anulare piano, di forma ellittica<sup>15</sup>; tale specchio non è semiriflettente poiché il fascio diffuso dall'oggetto (freccia verticale tratteggiata) attraversa senza intoppi il foro centrale dello specchio anulare. Qui abbiamo una separazione completa del fascio illuminante (specchio anulare, condensatore anulare) dal fascio formatore d'immagine, che traversa il sistema ottico centrale. Anche qui, se l'oggetto è del tutto piano e speculare, e perpendicolare all'asse, il fascio illuminante viene riflesso FUORI dall'apertura utile dell'obbiettivo ed il fondo immagine appare scuro; l'immagine dell'oggetto è data da tutta la radiazione che le irregolarità dell'oggetto riflettono o diffondono entro il cono di apertura dell'obbiettivo.

In fig. 12 si vede la differenza fra i risultati delle due tecniche.

Il complesso del sistema è visibile nella fig. 11: in alto, è disegnato il percorso del fascio illuminante per fondo chiaro, la lamina semiriflettente ed il sistema ottico dell'obbiettivo vero e proprio. In basso, è mostrato lo specchio anulare ed il condensatore anulare per fondo scuro. In ogni caso è indicata la microlampada con collettore e diaframma di campo.

Tutto il complesso è racchiuso o all'interno del braccio orizzontale che porta il revolver, come avviene negli strumenti dedicati all'episcopia o, come in figura 11, dentro un contenitore che si può interporre fra braccio e tubo bioculare di uno strumento per usi generici.

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Un cilindro tagliato obliquamente disegna un'ellisse.

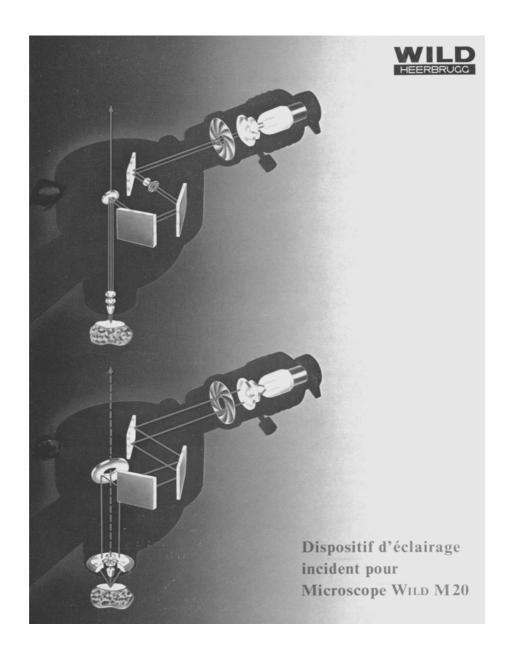


Fig. 11 — Sistema illuminante completo per episcopia in fondo chiaro e fondo scuro. Solo nella figura di sotto è rappresentato il condensatore anulare attorno all'obbiettivo. Da: WILD Heerbrugg, Catalogo Mi 653 f — X.60 (1960).

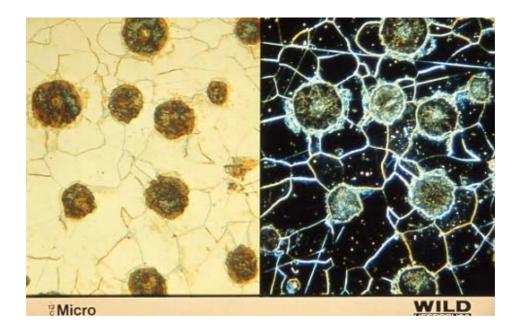


Fig. 12 - Ghisa, superficie lucidata. Episcopia (a sinistra: fondo chiaro a lamina; a destra: fondo scuro omnilaterale). Il fondo scuro mette più in evidenza le irregolarità della superficie dell'oggetto, mentre il fondo chiaro mostra meglio le differenze di assorbimento e di colore.

Da: WILD Heerbrugg, Diapositives pour l'enseignement de la Microscopie, 12 C. 342 Rl/lt, 1965.

Per quanto si è detto sopra, un sistema illuminante episcopico, rispetto al piano oggetto, è simmetrico di quello diascopico. Naturalmente, qualche differenza rispetto alla diascopia c'è.

- -- Intanto, in base ai semplici discorsi fatti finora, non sembrerebbe possibile introdurre in questo sistema un diaframma d'apertura: bisognerebbe diaframmare l'obbiettivo stesso, con i noti inconvenienti a carico di luminosità, risoluzione, ecc. Ma a questo c'è rimedio: i migliori costruttori usano nella microlampada un sistema convergente forte (collettore) che crea un'immagine reale del filamento molti centimetri PRIMA dell'obbiettivo, qui si può disporre un diaframma d'apertura senza interferire coll'obbiettivo. Un secondo sistema convergente ("lente relé" ad ingrandimento circa unitario) trasporta questo piano, contenente l'immagine del filamento ed il diaframma, nella pupilla d'obbiettivo. Così si può diaframmare il fascio illuminante<sup>16</sup> senza interessare il fascio formatore d'immagine.
- -- La resa fotometrica è sempre scarsa<sup>17</sup>. Già si è detto come, in campo chiaro, al massimo ¼ del fascio illuminante viene utilizzato nell'immagine finale. In secondo luogo, anche un provino lucidato non è sempre un buono specchio e può assorbire molto (certi minerali e metalli, carboni, ecc.), mentre in diascopia un normale vetrino è generalmente assai trasparente. In terzo luogo, se l'oggetto è almeno parzialmente diffondente, diffonde in tutto il semispazio sopra di lui e l'obbiettivo non può che perdere buona parte di questa radiazione.

In fondo scuro, quasi niente del fascio illuminante concorre nell'immagine finale, ma questo è comune alla diascopia.

-- Abbiamo detto che in episcopia la funzione di condensatore è svolta in pieno dall'obbiettivo. Ciò, una volta tanto, ha una conseguenza utile: i due sistemi coincidono e

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> La diaframmatura del fascio illuminante ha effetti simili a quelli che si presentano in diascopia.

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> Per "resa fotometrica" intendiamo il rapporto fra la luminosità nel piano dell'immagine finale e quella nel piano della sorgente.

pertanto hanno sempre la stessa focale. Pertanto, quando si è regolato bene il diaframma di campo illuminato per un dato obbiettivo, esso andrà bene per qualunque altro: cambiando obbiettivo, il campo illuminato ed il campo oggetto dell'obbiettivo stesso cambiano diametro nella stessa misura poiché la focale di condensatore ed obbiettivo coincidono. La regolazione del diaframma di campo, obbligatoria ad ogni cambio d'obbiettivo secondo le regole di Köhler, si esegue una volta per tutte e poi diviene superflua.

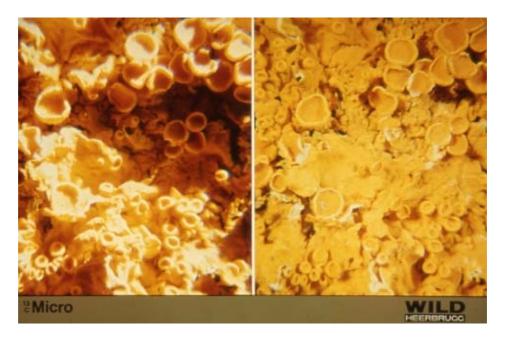


Fig. 13 - *Xantoria* sp. (Licheni crostosi su roccia con corpi sporigeni (apoteci)). Episcopia. A sinistra, campo scuro unilaterale con formazione di ombre e contrasti eccessivi; a destra, campo scuro omnilaterale. Da: WILD Heerbrugg, *Diapositives pour l'enseignement de la Microscopie*, 13 C. 342 Rl/lt, 1965.

2.2 – **Oggetti diffondenti** – Se ora invece pensiamo ad un oggetto opaco dalla superficie irregolare, ruvida, come capita spesso in campo naturalistico, non si può più parlare di superficie lucida e riflettente, né di fascio illuminante riflesso dall'oggetto verso l'obbiettivo, né di specularità fra condensatore ed obbiettivo. Il sistema illuminante serve solo a concentrare sull'oggetto tutto quello che può di flusso ottico<sup>18</sup>, senza troppo riguardo all'apertura. Basta che il campo illuminato sia grande almeno quanto il campo oggetto (quello visibile negli oculari). L'immagine dell'oggetto sarà allora formata, comunque, solo dalla radiazione diffusa dall'oggetto stesso.

In queste condizioni, anche la distinzione fra fondo chiaro e fondo scuro diviene sfumata. Semmai, può avere senso pensare ad un'illuminazione unilaterale che accentua le ombre. La fig. 13 dimostra bene questo concetto.

Però ... vi sono casi ...

Capita in campo naturalistico di osservare al microscopio episcopico oggetti con una superficie lucida, anche se non piana, che delimita uno strato trasparente poco strutturato al di sotto del quale si trova la struttura interessante. Si pensi alla cuticola (chitinosa) degli insetti, alla cuticola (cutinica) delle foglie, alla superficie lucida di una pietra dura o una

Nel linguaggio comune si dice "radiazione luminosa", "fascio" o "raggio luminoso" e simili. Ma né la radiazione né un raggio sono "luminosi" (si tratta di astrazioni fisiche o geometriche che non emettono luce). Solo un oggetto è "luminoso" quando irradia un po' di radiazione ottica. Lo stesso termine "luce" è equivoco in quanto indica una sensazione, una rappresentazione mentale. Nel mondo fisico esiste solo la radiazione elettromagnetica che, all'interno dello spettro cui è sensibile il nostro occhio ("spettro ottico", con  $\lambda$  fra 0,4 e 0,75  $\mu$ ), si può chiamare "radiazione ottica".

roccia. In questi casi vi è uno strato lucido più o meno trasparente, che "fa specchio" ed una massa sottostante più o meno diffondente, che può essere la più interessante per l'osservazione.

Con l'osservazione in fondo scuro si può evitare il riflesso della prima superficie lucida, almeno nel caso che essa sia relativamente piana. In campo chiaro, il riflesso speculare dà un fondo chiaro che nasconde la struttura sottostante.

È in questi casi che diventa prezioso il metodo sopradescritto dei due filtri polarizzanti "incrociati", uno nel sistema illuminante, prima della superficie semiriflettente, ed uno nel cammino formatore d'immagine, sopra la stessa superficie. Il riflesso indesiderato può scomparire completamente ed appare d'incanto tutto ciò che sta sotto. Ruotando (meglio ancora togliendo) uno dei polarizzatori attorno all'asse ottico, si può passare dall'osservazione della superficie lucida, quando i filtri sono "paralleli", all'osservazione di ciò che essa nasconde, quando i filtri sono "incrociati".

Il metodo dei polarizzatori incrociati produce purtroppo immagini poco luminose poiché esse sono formate solo dalla radiazione che l'oggetto riesce a depolarizzare; questa radiazione deve poi traversare il secondo filtro ed ogni polarizzatore, si sa, assorbe almeno metà della radiazione disponibile.

Solo l'esperienza e la pazienza potranno volta per volta, suggerire la soluzione più idonea per ogni particolare oggetto.

3 - Per finire, citiamo gli strumenti episcopici "**rovesciati**" secondo il principio di Le Chatelier, destinati all'osservazione di campioni di grandi dimensioni, generalmente provini metallici.

L'oggetto viene poggiato sul tavolino colla faccia lucidata, da esaminare, voltata in giù. Mentre il tavolino di un microscopio episcopico è generalmente privo del foro centrale in quanto non è prevista un'illuminazione per trasparenza, in un microscopio rovesciato il tavolino deve essere forato poiché l'oggetto viene esaminato da sotto. Ovviamente, sotto il foro del tavolino, si trova l'obbiettivo che guarda all'insù. Ancora sotto, si trova uno specchio od un prisma che riporta l'asse ottico verso l'alto e consente all'osservatore di guardare all'ingiù stando seduto, senza doversi sdraiare sotto il microscopio.

Questi strumenti, a parte la diversa conformazione dell'asse ottico, sono in tutto simili a quelli normali, in particolare per quanto riguarda i metodi di illuminazione.

Esistono strumenti rovesciati anche per la diascopia: in alto la microlampada, sotto il condensatore, poi il tavolino (forato); sotto, ancora l'obbiettivo, ecc.

Anche qui, la somiglianza con gli strumenti diritti è forte ma, a parte la contorsione dell'asse ottico, si tratta di strumenti destinati all'osservazione di oggetti relativamente spessi: microacquari, scatole di Petri, cuvette, ecc. La disposizione rovesciata consente di osservare il fondo dei recipienti menzionati e quindi le cellule od i microrganismi che hanno la tendenza a depositarvisi.

Trattandosi però di oggetti spessi, il condensatore dovrà possedere una "distanza di lavoro" o "lunghezza frontale" elevata, quindi anche una focale più alta del solito e, per conseguenza, una minor apertura. Ciò rende difficile realizzare il fondo scuro ed il contrasto di fase con obbiettivi medio-forti.

Inoltre, il fondo delle cuvette, delle scatole di Petri, ecc. non è lavorato con tecniche ottiche ed è quindi irregolare in quanto a spessore, indice, ecc. Anche questo restringe l'osservazione del contenuto di quei recipienti a deboli aperture e quindi a deboli ingrandimenti.

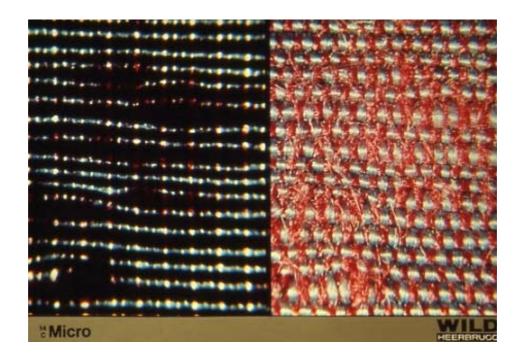


Fig. 14 - Tessuto in seta. Diascopia, fondo chiaro, a sinistra; episcopia, fondo chiaro, a destra. La diascopia mette in evidenza le piccole zone trasparenti, quasi invisibili in episcopia, ma non mostra l'aspetto della superficie dell'oggetto, che è quasi completamente opaco.

Da: WILD Heerbrugg, *Diapositives pour l'enseignement de la Microscopie*, 14 C. 342 Rl/lt, 1965.