

# La MICROSCOPIA OTTICA dall'OSSERVAZIONE alla MISURA

## SOMMARIO

1 -- LA LOCALIZZAZIONE.....	3
2 -- LA PREPARAZIONE PREVENTIVA DELL'OGGETTO .....	3
3 -- ANALISI MICRO-STRUTTURALE .....	5
<b>Intervento termico</b> .....	5
<b>Interventi chimici</b> .....	5
<b>Interventi meccanici (micurgia)</b> .....	6
<b>Interventi ottici</b> .....	6
4 -- LA CINEMATOGRAFIA E LA RIPRESA TELEVISIVA .....	7
5 -- LE MISURE .....	7
<b>Microanalisi</b> .....	8
<b>Micro-elettroforesi</b> .....	9
<b>Misure geometriche semplici</b> .....	10
<b>Misure geometriche statistiche</b> .....	12
<b>Misure su aggregati compatti</b> .....	15
<b>Analisi automatiche</b> .....	16
<b>Misure di durezza</b> .....	18
<b>Misure di viscosità</b> .....	19
<b>Microtermometria</b> .....	19
<b>Misura di grandezze fisiche in radiazione ottica ("visibile") non polarizzata</b> .....	19
A) Microrefrattometria .....	19
1) Linea di Becke .....	21
2) Campo scuro .....	21
3) Contrasto di fase.....	21
4) Illuminazione centrale.....	21
5) Metodi di Schlieren .....	21
6) Metodi interferenziali.....	22
7) La "immersione colorata" .....	22
B) Misura della <b>fluorescenza</b> .....	24
C) <b>Trasparenza, riflettanza e diffusione</b> .....	26
D) <b>Spettroscopia e spettrografia</b> .....	27
E) <b>Nefelometria e Turbidimetria</b> .....	27
<b>Misura di grandezze in radiazione ottica ("visibile") polarizzata</b> .....	27
<b>MISURE COL SOLO POLARIZZATORE</b> .....	28
A) Pleocroismo .....	28
B) Indice di rifrazione.....	28
<b>MISURE FRA POLARIZZATORI INCROCIATI</b> .....	29
C) Posizioni di estinzione .....	29
D) Birifrazione.....	29
E) Osservazioni in conosopia.....	29
F) Il carattere della birifrazione .....	30
G) Attività ottica.....	30
H) Anisotropia per riflessione.....	30
I) Fotoelasticità.....	31
<b>Misure in radiazione UV o IR</b> .....	31
6 - IL MICROSCOPIO OTTICO NELL'ESAME DI AGENTI AMBIENTALI NOCIVI.....	32
Ricerca dell' <b>amianto</b> .....	34
7 -- MISURE SULLE TRACCE DI RADIAZIONI IONIZZANTI.....	35
<b>Emulsioni fotografiche</b> .....	36
<b>Rivelatori solidi</b> .....	41
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	45

## La MICROSCOPIA OTTICA dall'OSSERVAZIONE alla MISURA

Oltre che come strumento d'osservazione, il microscopio ottico può essere utilizzato come strumento di misura. Infatti, con opportuni accessori, esso può fornire informazioni *quantitative* su varie proprietà fisiche e chimiche dell'oggetto: produce non solo immagini, ma anche valori di misura.

Ci limiteremo a dare una descrizione sommaria delle tecniche più classiche, accennando appena a quelle più moderne e tuttora in evoluzione, specialmente fluorescenza, scansione confocale (SOM), ecc. che trovano sempre maggiori applicazioni in campo biomedico, scienza dei materiali, ecc.

Non tratteremo le moderne tecniche non ottiche come l'AFM (scansione ad effetto tunnel, a forza atomica, ecc.), la microscopia elettronica, acustica, a raggi X, la diffrazione, ecc. Accenneremo però all'uso di radiazioni elettromagnetiche non ottiche ma vicine allo spettro ottico (IR o Infrarosso ed UV o ultravioletto).

Per brevità, supponiamo che il lettore interessato abbia già familiarità con i principi generali dell'ottica e della microscopia. Consigliamo la lettura del testo base e di vari articoli tecnici presenti sul medesimo sito (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia..." ecc.).

Nell'uso più diffuso, il microscopio è utilizzato per l'osservazione e quindi l'oculare (in questo caso sempre convergente) fornisce un'immagine virtuale, che si trova a distanza infinita se la messa a fuoco è corretta. Da quest'immagine ingrandita si può avere un apprezzamento *qualitativo* di molte sue caratteristiche:

+ Caratteristiche geometriche, come la forma, le dimensioni, la struttura interna, eventualmente lo spessore (direttamente con un microscopio stereoscopico; indirettamente, attraverso il movimento di focalizzazione, in qualunque strumento).

+ Caratteristiche ottiche, come la trasparenza (in diascopia), la riflettività (in episcopia), il colore, l'indice di rifrazione (indirettamente, attraverso il contrasto), ecc.

Con semplici mezzi (un paio di polarizzatori), si possono poi apprezzare alcune proprietà legate alla birifrazione: potere birifrattivo, biriflessione, pleocroismo, fotoelasticità, ecc. (vedi il capitolo "Misure di grandezze in radiazione...polarizzata", nonché il breve testo "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata", nel medesimo sito).

Vale la pena di notare a questo punto che la normale osservazione microscopica, specie con ingrandimenti medio-forti, differisce fortemente da quella diretta, ad occhio nudo, non per l'ingrandimento stesso, ma per le modalità essenziali:

-- osservazione in trasparenza – immersione ("montaggio") dell'oggetto non in aria, ma in un liquido, che può anche solidificare col tempo – osservazione non stereoscopica (tranne il caso dei microscopi stereoscopici) – osservazione a forte apertura, e quindi minima profondità di fuoco (anche meno di  $1\ \mu$ )<sup>1</sup> -- visione "globale" di un oggetto rotondeggiante, che abbraccia più della semplice proiezione di esso su un piano<sup>2</sup> – l'illuminazione avviene egualmente a forte apertura, in condizioni ben diverse dalle normali "ombreggiature" – nel caso di oggetti trasparenti, l'ingrandimento mette in primo piano fenomeni come la diffrazione e la riflessione interna (linea di Becke, ecc.), che si possono largamente ignorare

<sup>1</sup> In sostanza, si vede a fuoco solo un piano dell'oggetto ("sezione ottica").

<sup>2</sup> Questo fenomeno fa sì che la misura del diametro di un oggetto sferoidale al microscopio produca sempre un errore in eccesso, che può raggiungere il 100% con le massime aperture (ciò è raramente conosciuto dai praticanti).

nella visione ordinaria.

Non ci dilunghiamo su questi aspetti e rimandiamo al manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 28.

## 1 - LA LOCALIZZAZIONE

L’oggetto del microscopio si trova contenuto all’incirca in un “piano oggetto”. Nel campo visuale dell’oculare è visibile solo una parte del piano oggetto, e sarà questa parte il “campo oggetto” dell’obbiettivo e del microscopio. Se l’oggetto è più grande del campo oggetto, lo si può comunque esplorare tutto sfruttando i movimenti del guida-oggetti o del tavolino; si acquisisce così una visione assai ampia della struttura dell’oggetto.

Quando però l’oggetto è piccolo, fa parte di un gruppo d’oggetti o è inserito in una struttura più ampia, il microscopio permette non solo di osservare l’oggetto, ma di LOCALIZZARLO, cioè mostrarne la posizione o l’orientamento all’interno di un gruppo d’oggetti o di una struttura più ampia.

Ciò diviene prezioso nel caso di misure di un piccolo oggetto circondato da oggetti d’altra natura. Un esempio fra tutti: in un aggregato cristallino (roccia, lega metallica, ecc.) è possibile misurare singolarmente riflettività, durezza, ecc. in ogni granulo ed in tutti quelli che lo circondano ed inoltre si afferra a colpo d’occhio l’orientamento prevalente d’eventuali oggetti allungati, la forma prevalente, l’eventuale raggruppamento di oggetti che si differenziano per qualche caratteristica visibile, ecc.

## 2 – La PREPARAZIONE PREVENTIVA dell’oggetto

La “tecnica microscopica” ha per scopo di preparare l’oggetto PRIMA dell’osservazione, in modo che l’osservazione stessa fornisca la massima quantità d’informazione. Il fatto stesso, sopra accennato, del “montaggio” dell’oggetto, cioè l’immersione di esso in un liquido e la disposizione di esso fra due “vetrini” di spessore calibrato, è un esempio di preparazione ed ha lo scopo di includere l’oggetto in un mezzo otticamente omogeneo e trasparente, limitato da due superfici otticamente piane e parallele, perpendicolari all’asse ottico, e nello stesso tempo di ridurre le differenze d’indice fra oggetto e mezzo circostante: un oggetto piccolo e trasparente, immerso in aria, si comporta come una lente assai irregolare e di forte potenza (date le piccole dimensioni), producendo immagini anomale e di difficile interpretazione.

Si può variare la **trasparenza** e/o il **colore** di un oggetto o di certi suoi dettagli strutturali.

Esiste tutto un complesso di tecniche di **colorazione**, specie per gli oggetti biologici, che sfruttano le affinità chimiche fra l’oggetto ed un dato colorante: si sfruttano, in fondo, reazioni microchimiche, che migliorano la discriminazione fra l’oggetto e le strutture circostanti. La selettività di queste reazioni conferisce a molte colorazioni un valore diagnostico elevato. A volte, la colorazione vera e propria è preceduta da un trattamento “mordenzante” con una sostanza, anche incolore, destinata a legarsi poi elettivamente al colorante vero e proprio.

Caso particolare di colorazione è l’**impregnazione metallica**, vale a dire una tecnica che provoca la precipitazione di metalli<sup>3</sup> allo stato colloidale, quindi assai opachi, in regioni particolari dell’oggetto. Altro mezzo di esaltare selettivamente il contrasto nell’immagine dell’oggetto.

Data la piccola profondità di fuoco del microscopio, l’oggetto trasparente (tessuti viventi, ad es.) viene tagliato in fettine sottili dopo averlo indurito o “incluso” in materiali opportuni (paraffina, celloidina, ecc.), mentre l’oggetto opaco (rocce, metalli, carboni, ecc.) va sezionato e lucidato. **Sezione sottile** e **lucidatura** presuppongono tecniche complesse e delicate.

---

<sup>3</sup> Si parte in genere da sali d’argento, oro, osmio, molibdeno, ferro. Il deposito può avvenire all’interno dell’oggetto, alla sua superficie, negli spazi interposti, ecc. In biologia, è questa la tecnica d’elezione per le strutture nervose.

Nel caso di oggetti opachi, la superficie lucidata può in seguito essere trattata con vari aggressivi chimici in modo da avere una **corrosione differenziale** dei vari elementi.

Alla superficie di un oggetto è anche possibile applicare (per deposizione sotto vuoto) uno o più strati sottili trasparenti in modo da realizzare un interferometro di Fabry e Pérot (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 17.1.2, 22.1.3 e 23.1). La superficie dell’oggetto può apparire allora con contrasti e colori legati sia alle caratteristiche degli **strati sottili interferenziali**, sia a quelle dell’oggetto (indice, planeità, riflettività).

Se l’oggetto è sottile e trasparente, gli strati sottili si possono applicare ad entrambe le sue superfici ed in tal caso anche l’oggetto è parte dell’interferometro. Dallo studio delle figure d’interferenza che ne possono nascere si può misurare per lo meno il “cammino ottico” dell’oggetto<sup>4</sup>. In casi particolari, l’oggetto sottile può essere racchiuso fra due lamine semi-riflettenti (bastano due lamine di vetro, vedi il fenomeno degli “anelli di Newton”)(vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 19.5.1), realizzando anche in questo modo lo schema di Fabry e Pérot: l’interferogramma che si forma indica le perturbazioni introdotte dal cammino ottico dell’oggetto.

I limiti di precisione della microscopia degli strati interferenziali sono pari a  $\pm 5\%$  per le misure d’indice e  $\pm 2\%$  per le misure di livello negli oggetti opachi. Nel caso di misure di spessore, si può arrivare ad una risoluzione di qualche nm (o “nanometro” =  $10^{-9}$  m)(vedi Pepperhoff et al., 1970).

Altra tecnica di preparazione dell’oggetto è l’incinerazione (**microincinerazione**), utile per discriminare in un oggetto le componenti soggette a carbonizzazione ed ossidazione in composti volatili, dalle componenti che lasciano residui non volatili, cioè cenere (metalli, ecc.).

L’oggetto, in pochi minuti, viene portato a 500 – 600 °C. La distruzione delle componenti organiche volatili avviene in genere senza spostamento dei componenti non volatili; quindi, lo studio della disposizione delle ceneri fa riconoscere la disposizione dei componenti non volatili nell’oggetto, com’erano prima del trattamento. L’immagine dell’oggetto incinerito è detta **spodogramma**.

Nel caso di cellule o tessuti, può convenire di arrestare l’incinerazione ad un punto tale che alcune parti della cellula (per es. il citoplasma) vengono subito incinerite<sup>5</sup> e diventano di color chiaro, mentre altre, come i nuclei, rimangono allo stato di carbone, di color nero. L’immagine ottenuta si chiama in questo caso **antracogramma**.

La tecnica dello spodogramma si applica in genere ad oggetti tagliati in fette sottili e nessuno dei reagenti applicati ad esso deve lasciare residui non volatili durante l’incinerazione.

Se l’oggetto, di per sé volatile, ha una struttura eterogenea (fessure, pori, ecc.), si può impregnare l’oggetto con una sostanza capace di lasciare ceneri stabili (ad es., sali metallici). L’incinerazione successiva riproduce la distribuzione degli interstizi dell’oggetto. Questa tecnica è usata nello studio delle fibre tessili (vedi Policard et al., 1957).

È possibile preparare l’oggetto anche con la **centrifugazione**, che separa le parti di esso sulla base del loro peso specifico. La tecnica cerca di ottenere la massima accelerazione: sono normali valori fino a 5.000 g ma le ultracentrifughe usate in microscopia possono arrivare a  $10^6$  g.

Qualunque sospensione liquida o semiliquida si presta alla centrifugazione; è sufficiente che in essa si trovino fasi a diversa densità. Nel caso di materiali biologici, è possibile separare costituenti e microstrutture cellulari.

La centrifugazione non si può applicare a quantità di materiale inferiori a circa 1/50 di grammo. La tecnica è molto lenta, e può richiedere molte ore. Il campione viene frazionato in strati costituiti ognuno da componenti di pari densità; in questo modo un dato componente può venire altamente concentrato in un dato strato, anche se fortemente disperso all’origine, e

---

<sup>4</sup> Il cammino ottico di un oggetto trasparente è il prodotto del suo indice per il suo spessore. Noto un parametro, si ricava l’altro.

<sup>5</sup> “Incinerire” sarebbe forse da sostituire con “incinerare” o “incenerire”.

così può divenire facilmente reperibile (**arricchimento**).

Anche nel caso della centrifugazione, può essere necessario preparare l'oggetto separando meccanicamente gli elementi troppo legati fra loro. In questo senso può essere prezioso un trattamento ad ultrasuoni.

**L'auto-radiografia** consente di seguire la migrazione di particolari sostanze all'interno dell'oggetto. La tecnica si applica spesso a preparati biologici e consiste nel trattare l'oggetto, anche allo stato vivente, con una sostanza di cui si vuol conoscere l'assorbimento differenziale all'interno dell'oggetto. Dopo un certo tempo, quando la sostanza ha seguito il suo normale cammino, il campione viene fissato e sezionato in strato sottile. Sulla fettina si deposita uno strato di gelatina fotografica.

Il trucco sta nel trattare l'oggetto con la sostanza in questione dopo che in questa sono stati introdotti atomi radioattivi, isotopi degli atomi normalmente presenti in quella sostanza ("marcatura"). In breve tempo, l'emulsione fotografica viene impressionata dalla radioattività. Un normale sviluppo fotografico mostra come agglomerati di puntini neri le parti dell'oggetto dove il reagente in questione è stato maggiormente assorbito.

### 3 – ANALISI MICRO-STRUTTURALE

Si tratta di un'analisi di campioni su cui s'interviene DURANTE l'esame. Tecnica che si contrappone a quelle appena descritte, in cui l'oggetto viene preparato PRIMA dell'esame.

Ovviamente, durante e dopo l'intervento, si conduce l'esame dell'oggetto modificato e dei cambiamenti in esso verificatisi in seguito all'intervento.

Questo intervento può essere globale, cioè interessare tutto il campione, come nel caso di trattamenti termici o chimici, oppure essere strettamente localizzato, come avviene col micro-manipolatore o col micro-fascio (vedi oltre).

#### **Intervento termico**

Vi sono "tavolini riscaldanti" e "refrigeranti" che possono portare l'oggetto ad una temperatura, secondo i casi, fra - 20 ed oltre + 2.000° C.

La temperatura del tavolino e dell'oggetto si possono variare facendo circolare in apposite cavità interne un fluido caldo o freddo (liquidi, gas, gas liquefatti), o sfruttando il riscaldamento di una resistenza interna (effetto Joule) oppure l'effetto Peltier<sup>6</sup>.

Se l'oggetto non è omogeneo, si può avere un diverso comportamento delle differenti fasi di esso al variare della temperatura, una differenza nei punti di fusione, di cristallizzazione, di sublimazione, oppure differenti transizioni di fase solido-solido o liquido-liquido, formazioni di miscugli eutettici<sup>7</sup>, ecc.

Si possono contestualmente misurare le variazioni di taluni parametri fisici rispetto alla temperatura (durezza, birifrazione, indice, ecc.).

In certi miscugli è possibile con questa tecnica rivelare la presenza di minime impurezze: per es., in un miscuglio non eutettico che sta per fondere, una componente anche minima che fonde prima delle altre appare in luce polarizzata come priva di birifrazione<sup>8</sup> e rivela subito la sua presenza. Vedi anche McCrone (1957), McCrone et al. (1978), Kofler e Kofler (1954), Julian e McCrone (1971), ecc.

#### **Interventi chimici**

Tutto quello che si fa in un laboratorio chimico, si può ripetere sotto il microscopio, in campioni minutissimi, col vantaggio di poter osservare, durante la reazione, la struttura

---

<sup>6</sup> Jean Charles Athanase PELTIER (pron. Peltié), fisico francese (1785-1845). L'effetto Peltier consiste nel riscaldamento o nel raffreddamento di una saldatura fra metalli diversi, quando è percorsa da corrente elettrica.

<sup>7</sup> Un miscuglio è eutettico quando tutti i suoi componenti, qualunque siano le loro caratteristiche fisiche e chimiche, solidificano o fondono tutti alla stessa temperatura ("punto eutettico"), che è più bassa di quella dei singoli componenti. Un esempio è la lega stagno-piombo da saldare.

<sup>8</sup> Un solido che fonde perde immediatamente la sua eventuale birifrangenza e, nell'immagine, perde i caratteristici colori d'interferenza – vedi il testo "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata".

dell'oggetto, la distribuzione delle varie fasi componenti, le trasformazioni subite singolarmente da ogni elemento strutturale, ecc.

Se si dispone di un micro-manipolatore (vedi oltre) munito di micropipette, la reazione chimica può essere ristretta a singoli componenti dell'oggetto. Ne ripareremo.

#### **Interventi meccanici (micrurgia)**

Un micro-manipolatore o micro-dissettoire permette di usare utensili assai piccoli (aghi, ganci, pipette, ecc.) e di imporre ad essi movimenti micrometrici e controllati in tre direzioni dello spazio, all'interno del campo di lavoro del microscopio. Si può parlare di chirurgia a livello microscopico.

I movimenti dei bracci porta-utensili sono ottenuti con mezzi pneumatici (pressione variabile di fluidi) o termici (riscaldamento e quindi dilatazione variabile di barre metalliche), o meccanici (viti, demoltipliche, cremagliere, pantografi), il tutto riducendo a valori impercettibili i giochi, le isteresi, le trepidazioni, ecc.

Durante i movimenti degli utensili, se ne può verificare l'effetto, poiché può proseguire l'osservazione. Vedi De Fonbrune (1949) ed Otto (1954).

#### **Interventi ottici**

Sostanzialmente, si tratta di irradiare l'oggetto con un fascio concentrato di radiazione ottica e di osservarne gli effetti. L'irraggiamento viene contenuto in zone ristrette dell'oggetto, di dimensioni anche minori di  $1 \mu^2$ , e questa localizzazione offre la possibilità di esami su strutture minutissime all'interno di un oggetto composito.

La ristretta area d'intervento consente di definire questi esami come non distruttivi e non contaminanti. Le esigenze di preparazione preventiva dell'oggetto sono minime; anche la durata dell'esame è minima.

Il fascio irradiante, che si sovrappone al normale fascio illuminante, può giungere su un oggetto trasparente da sotto, attraverso il condensatore, oppure su un oggetto opaco da sopra, in episcopia, attraverso l'obbiettivo stesso. L'alto grado di correzione dell'obbiettivo consente di ottenere la minima sezione possibile del fascio irradiante.

Durante l'irraggiamento in episcopia, l'osservazione rimane possibile e consente di sapere sempre in quale punto dell'oggetto incide il fascio e quali ne sono gli effetti. Il cammino ottico d'osservazione e quello d'irraggiamento sono infatti distinti, almeno in parte, e vengono sovrapposti subito prima di incidere sull'oggetto, per mezzo di un semiriflettente (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.1).

In campo biologico, la tecnica prende il nome di **microfascio**: il fascio irradiante proviene da una forte lampada (spesso ad arco) o da un laser e può ricadere nello spettro ottico o in quello UV. Nel caso dell'UV, occorre naturalmente un sistema ottico illuminante che sia trasparente all'UV (obbiettivi catottrici o con lenti in silice).

Nella scienza dei materiali e nella metallurgia è invece più diffusa l'**analisi microspettrale**: il microfascio, proveniente in genere da un laser, viene concentrato tramite l'obbiettivo (in episcopia) sull'oggetto, ma con energia tale da provocare la vaporizzazione del materiale che fuoriesce da un "micro-crater" sotto forma di semi-plasma ionizzato e luminescente. Si provvede poi, attraverso un cammino ottico separato, ad analizzare la composizione spettrale della radiazione emessa e da ciò la composizione chimica del materiale irradiato.

Anche quest'esame, estremamente localizzato ed estremamente breve, si può considerare non distruttivo: l'area irradiata può limitarsi a pochi  $\mu^2$ , il tempo d'irraggiamento può essere inferiore a  $10^{-7}$  s, la massa interessata dell'oggetto inferiore ad  $1 \mu\text{g}$ , la densità di energia sull'oggetto superiore a  $10^8 \text{ W/cm}^2$ .

Se, fra l'oggetto e l'obbiettivo, si dispone una coppia di elettrodi collegati ad un condensatore elettrico carico, appena si forma la nubecola ("piuma") di quasi-plasma, che è elettricamente conduttrice, scocca fra gli elettrodi una scintilla che completa la ionizzazione dei vapori ed aumenta la loro emissione di radiazione (non solo in campo ottico). A questo punto, segue una normale analisi spettrografica dello spettro d'emissione dei vapori, che dà la

composizione chimica di una ristrettissima zona dell'oggetto<sup>9</sup>. L'intensità delle "righe spettrali" corrispondenti ad ogni singolo elemento consente anche di calcolare la concentrazione di quell'elemento.

Da questi "microanalizzatori spettrali a laser" è possibile anche ricavare uno spettro d'assorbimento<sup>10</sup> quando si raccoglie la radiazione a spettro continuo, prodotta dal microcratere incandescente, dopo che ha attraversato i vapori incandescenti della "piuma". Anche qui, dalle righe d'assorbimento, si ricava la composizione chimica dei vapori ionizzati. L'uso dello spettro d'assorbimento si presta meglio per elementi presenti in forte concentrazione. Invece, esaminando lo spettro d'emissione, si arriva a sensibilità di 10 ppm (parti per milione), pari a 10 milligrammi per Kg, con un margine d'errore inferiore a 10 %.

Poiché il laser utilizzato in questi esami irradia spesso nel campo IR (infrarosso), non è difficile, con opportuni specchi dicromatici interferenziali, separare il fascio d'irraggiamento da quello d'osservazione.

Vedere Moenke et al. (1968) e Quillfeld (1978).

#### **4 – LA CINEMATOGRAFIA e la ripresa TELEVISIVA**

L'applicazione di una telecamera od una cinepresa ad un microscopio non è difficile, sia con gli appositi raccordi forniti dai costruttori, sempre molto cari, sia con sistemi ad hoc che si possono costruire con componenti facilmente reperibili<sup>11</sup>. Si ha così, oltre alla documentazione fotografica, la registrazione d'immagini in movimento. Ciò è prezioso nel caso di oggetti che si modificano o si muovono con estrema lentezza (cellule in accrescimento, ad es.), come nel caso di fenomeni molto rapidi, non percepibili all'occhio. Si tratta insomma di estendere il normale campo d'applicazione della ripresa fotografica, cinematografica o televisiva al campo dei fenomeni molto lenti o molto rapidi, che non risultano visibili con le tecniche classiche. Stiamo parlando delle riprese accelerate o rallentate, che vanno poi osservate con una velocità diversa, più adatta alla percezione umana. Si estende al campo microscopico la possibilità di documentare l'evoluzione di un'immagine, anche a velocità vietate all'osservazione diretta.

La ripresa televisiva digitale consente poi una successiva elaborazione elettronica delle immagini: variazioni del contrasto e della luminosità, alterazioni della resa cromatica, ecc., col risultato che è possibile recuperare riprese che con altre tecniche o ad occhio nudo sarebbero inutilizzabili.

#### **5 – LE MISURE**

Su quest'argomento esiste una letteratura imponente (per es.: Barer e Cosslett (1966), Burrells (1694), Freund (1957-75), ecc. Vedi la bibliografia al termine di questo scritto).

Possiamo notare che, come premesso nel titolo, il microscopio diviene strumento di misura sfruttando tecniche già messe a punto in campo macroscopico (come la durometria) ed applicandole ad oggetti di sua pertinenza.

D'altro canto, sono gli stessi strumenti di misura classici, come lo spettrometro, che estendono il loro campo d'azione al dominio microscopico.

Ma non si tratta solo di eseguire una misura "alla cieca": al microscopio è possibile

---

<sup>9</sup> Dato un vapore incandescente, ogni elemento chimico in esso contenuto emette radiazione contenuta in ristrette "righe spettrali", vale a dire con lunghezza d'onda ben definita, e solo con quella.

<sup>10</sup> Lo spettro d'assorbimento si forma quando la radiazione "a spettro continuo", all'incirca bianca, emessa da un solido o un liquido incandescente, attraversa qualche vapore anch'esso incandescente, il quale assorbe da quello spettro continuo proprio quelle "righe" che lo stesso vapore è capace di emettere. Nello spettro continuo appaiono allora delle righe nere "di assorbimento". Ciò si riscontra anche nello spettro solare, che è formato dallo spettro continuo del nucleo liquido, dal quale i vapori dell'atmosfera solare assorbono particolari lunghezze d'onda ("righe di Fraunhofer").

<sup>11</sup> Vedi l'art. n° 13: "Fotomicrografia con fotocamere digitali".

durante la misura osservare l'oggetto e la sua localizzazione all'interno di una struttura più ampia, ed eseguire una data misura su uno solo dei suoi costituenti. Un esempio: un durometro<sup>12</sup> classico esegue una misura su un oggetto eterogeneo (roccia, lega metallica, ecc.) applicando ad esso un "penetratore", una punta durissima, con forza nota. Misurando le dimensioni dell'impronta, si determina la durezza del campione. Ma il penetratore ha dimensioni tali che l'impronta interessa spesso numerosi microcristalli di diversa natura, ed il valore misurato è una media. Solo al microscopio, con penetratori assai piccoli, è possibile eseguire misure su singoli microcristalli, osservando nello stesso tempo la localizzazione di ognuno di essi.

### **Microanalisi** (Behrens e Kley, 1969; Keune, 1967; Wallis, 1965)

Anche qui, si tratta di estendere le normali analisi chimiche, utilizzabili anche su quantità di reagenti inferiori al milligrammo, all'ambito microscopico.

Le analisi **citochimiche** ed **istochimiche** puntano alla dimostrazione ed alla titolazione d'elementi, gruppi funzionali e composti in singoli componenti cellulari ed in tessuti (Policard, Bessis e Locquin, 1957; passim). Le premesse sono: -- integrità strutturale e morfologica della cellula o del tessuto – blocco di qualunque alterazione chimica o fermentazione ("fissazione") – eliminazione di qualunque agente inquinante – arresto d'ogni decomposizione, soluzione o precipitazione che possa alterare il componente da analizzare.

A questo punto, rimane il rischio che, prima o durante l'analisi, il reagente che si cerca di identificare e localizzare possa diffondere o dislocarsi.

Metodi base dell'istochimica sono:

- colorazioni selettive
- misure di solubilità
- misure di pH<sup>13</sup>
- uso di reagenti specifici per la formazione di composti o precipitati facilmente riconoscibili<sup>14</sup>
- uso di reagenti fluorescenti (fluocromi) con affinità chimiche specifiche.

Uno dei campi d'applicazione di queste tecniche è l'**igiene del lavoro**. Ben noto è il problema istopatologico<sup>15</sup> del riconoscimento di particelle minerali in seno ai tessuti in caso di antracosi (causata da particelle di carbone), silicosi (quarzo), siderosi (ferro e suoi composti), asbestosi (amianto), ecc.

Le particelle di fuliggine si riconoscono per la forma sferica e le piccole dimensioni (anche < 1 μ), che le fanno confondere con granuli di melanina, il noto pigmento scuro della pelle. Invece, i granuli di carbone hanno forma irregolare, dimensioni maggiori e tendenza a formare piccoli ammassi. Non presentano birifrangenza (ne parleremo più avanti).

I frammenti di calcare si trovano raramente nei tessuti viventi, poiché vengono dissolti dai medesimi. Oltre alla forte birifrangenza, sono rivelati dal trattamento con ac. solforico, che forma cristallini aghiformi di gesso.

Le particelle di quarzo si rivelano in base alla birifrazione ed in seguito all'incinerazione, che lascia residui bianchi insolubili in ac. cloridrico. Lo stesso vale per la mica, il talco, il caolino, ecc. che però si riconoscono per la forte birifrangenza, la forma lamellare, le grandi dimensioni.

Per l'amianto, nelle sue diverse specie mineralogiche, rimandiamo ad un articolo specifico, presente nel medesimo sito (Art. n° 26: "Tecniche per la ricerca e l'identificazione dell'amianto") ed a qualche ulteriore notizia, in questo testo (Cap. 6, pag. 34).

Le particelle di ossidi di ferro (limonite, ematite, ecc.) appaiono nei tessuti polmonari dei minatori come masserelle sferoidali di dimensioni uniformi, di color giallo più o meno scuro, non birifrangenti. Dopo l'incinerazione, lasciano residui rosso vivo.

---

<sup>12</sup> Non è corretto il sinonimo "durimetro".

<sup>13</sup> Grado di acidità o basicità di una soluzione.

<sup>14</sup> Al termine di una reazione, un precipitato è un prodotto che, essendo insolubile, si concentra sul fondo del recipiente.

<sup>15</sup> In altre parole, riguardante le malattie (patologie) dei tessuti.

In campo **forense**, l'istochimica è applicata per la ricerca di sostanze tossiche, droghe, ecc. (Fulton, 1969).

Oltre alle tecniche istochimiche, la microanalisi ha molte applicazioni ed è preferita per la sua rapidità, la sicurezza, il basso costo e la semplicità. Certe proprietà degli oggetti, come l'abito dei granuli cristallini e molte proprietà ottiche altamente specifiche dei prodotti di reazione non si rivelano con nessun'altra tecnica.

In generale, la **microanalisi** consiste nel depositare su un vetrino una goccia di soluzione oppure di sospensione contenente le particelle da esaminare. Nei pressi si depone una goccia contenente uno o più reagenti specifici e la si fa incontrare colla prima. La reazione porta in genere a formare un precipitato specifico, spesso cristallino; le sue caratteristiche e la sua quantità possono bastare ad identificare una sostanza ed a valutarne la concentrazione. Non si esamina quindi la particella iniziale, ma il precipitato finale. Vedi Chamot e Mason (1959), Schaeffer (1966), Kenne (1967, passim).

In chimica inorganica, ogni elemento od ogni ione può essere rivelato da opportuni reagenti che producono un precipitato caratteristico.

In Crozier e Seely (1950), e Lodge e Fanzol (1954) si parla di una variante della tecnica, quella della **gelatina**. Come substrato per la microreazione si adopera uno strato di gelatina o un filtro "Millepore" o simili, adagiati su un vetrino. Questo substrato è impregnato colla soluzione di quel reagente che è specifico per lo ione che si cerca di dimostrare; sulla gelatina si fa cadere la particella in esame e così si forma un precipitato in forma di **alone**, molto più esteso della particella stessa. L'analisi può così avvenire anche su particelle al di sotto del potere risolutivo dello strumento, dove i caratteri morfologici o cristallografici non sarebbero rilevabili. Ponendo molte particelle sullo stesso substrato, in un colpo solo, è possibile controllare la natura delle singole particelle e quindi la percentuale delle particelle contenenti quel certo ione. Con opportune calibrazioni, in base alle dimensioni dell'alone, si può determinare anche la quantità dello ione presente in ogni singola particella.

Presupposto di questa tecnica è la solubilità della particella nella gelatina; nei casi difficili, tale solubilità si può accrescere aggiungendo acqua, ac. cloridrico, idrossido d'ammonio, ecc. (vedi Fairbain, 1943).

Con opportune varianti, la microanalisi si può applicare anche a certi composti organici (Fulton, 1969, passim; Behrens e Kley, 1922, passim).

La quantità di campione necessaria per questa tecnica è dell'ordine del milligrammo, ma può scendere al picogrammo ( $10^{-12}$  g) se, per l'esame dei prodotti della reazione, si adopera la diffrazione degli elettroni o un microscopio elettronico. Inoltre, si può evitare lo spargimento delle due gocce (soluzioni del campione e del reagente) spalmando il vetrino con olio o silicone (Benedetti - Pichler, 1964) o gel di silice.

### **Micro-elettroforesi**

Introducendo due elettrodi collegati ad un generatore di tensione in una sospensione colloidale, le particelle sospese (micelle) sono attratte o respinte dagli elettrodi secondo la loro carica.

In altre parole, l'elettroforesi, studiando la mobilità delle micelle sottoposte ad un campo elettrico, permette di ricavare informazioni sui sistemi colloidali: Al microscopio, oltre a poter operare su campioni minuti, si rendono visibili i movimenti delle singole micelle, magari usando l'illuminazione laterale o ultra-microscopia (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.2). In campo biomedico, la tecnica è usata per lo studio dei componenti cellulari, ma si applica anche a particelle minerali, che possono anch'esse possedere una carica elettrica.

Quando si conosca la differenza di potenziale fra gli elettrodi, la loro distanza, e la viscosità del liquido, e quando si misuri la velocità della micella, si può calcolare la sua carica. La velocità della micella si misura a metà strada fra gli elettrodi, nella zona d'equilibrio, dove i movimenti del liquido, provocati dal campo elettrico, si annullano.

Se la sospensione è mista, si possono studiare simultaneamente diversi tipi di particelle. Esistono strumenti dedicati a questo tipo di misure (il citofetometro di Zeiss, ad es.)(vedi

Neupert, 1966).

### Misure geometriche semplici

Su quest'argomento si veda intanto il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Capp. 12.1, 12.3 e 20.8.

#### Misure di lunghezza

Oltre a quanto descritto nel testo citato, ricordiamo alcune cause d'errore:

-- aberrazioni del piano, in particolare la distorsione, che produce un'immagine non geometricamente simile all'oggetto;

-- deformazioni elastiche e giochi nel sistema meccanico (stativo) che collega l'obbiettivo all'oggetto, deformazioni che possono spostare l'immagine durante la misura;

-- diffrazione, che rende incerti i contorni dell'oggetto;

-- deformazione della prospettiva, dovuto alla forte apertura dell'obbiettivo, come citato nella nota 2); dato che quest'errore dipende dall'apertura dell'obbiettivo e del condensatore, le misure eseguite con sistemi ottici diversi possono dare risultati discordanti e raramente l'analista annota l'apertura dei sistemi che adopera. Con particelle sferoidali di diametro  $< 10 \mu$ , l'errore (sempre in eccesso) può arrivare a 25%; con particelle  $< 1 \mu$ , l'errore può superare 50 %.

La misura di lunghezza si ottiene in genere confrontando l'immagine intermedia dell'oggetto con un reticolo o graduazione posta nell'oculare, graduazione che viene vista ingrandita assieme all'oggetto. È noto come si ottiene l'"equivalente micrometrico" della graduazione per ogni combinazione ottica, per mezzo di un "micrometro oggetto".

La sovrapposizione dell'immagine dell'oggetto col micrometro oculare può anche essere proiettata su uno schermo; un oculare regolabile consentirà la messa a fuoco del micrometro oculare sullo schermo. Altro modo di sovrapporre l'immagine dell'oggetto ad una graduazione è di sfruttare un tubo da disegno (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 27.7.2 e, verso la fine di quest'articolo, il paragrafo "Rivelatori solidi"). È il metodo più pratico, anche se poco noto.

Possiamo aggiungere che, per aumentare la precisione di misura, si facilita l'interpolazione fra i trattini del micrometro oculare usando graduazioni divise non con semplici trattini diritti, ma con figure a tratti inclinati, per es. una successione di quadratini opachi che si toccano per i vertici (fig. 1). Con questi micrometri, il singolo trattino non esiste più, e quindi non può nascondere i confini dell'oggetto, ma è sostituito dall'incontro di due vertici, che non ha spessore.

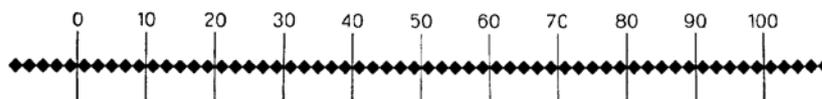


Fig. 1 – Micrometro oculare "a contrasto". Ogni divisione principale è suddivisa in 10 trattini a lati inclinati per facilitare l'interpolazione. (Da: Policard A., Bessis M. e Locquin M. – *Traité de microscopie* – Masson, Paris VI<sup>e</sup>, (1957), p. 122).

Ma è sempre grave il problema dell'interpolazione: quando il bordo dell'oggetto si trova fra due trattini del micrometro, occorre sempre valutare ad occhio la frazione d'intervallo occupata dall'oggetto. Per facilitare questo compito, si ricorre agli oculari "a tamburo" ("filar micrometer") nei quali, oltre ad una generica graduazione a passo largo, esiste un trattino mobile, che si comanda con una manopola laterale ("tamburo"); il trattino percorre la distanza fra due tratti della graduazione per un giro della manopola. A sua volta, il tamburo della manopola è graduato (in genere, 100 parti per giro) e consente quindi di leggere anche 1/100 della distanza fra due tratti (fig. 2).

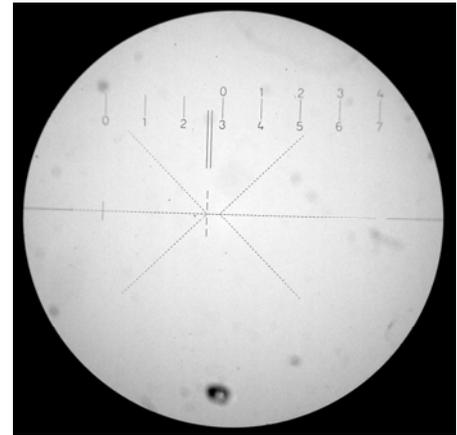


Fig. 2 – Oculare micrometrico “a tamburo” di costruzione Zeiss Jena; si notino, sull’orlo della porzione discoidale al centro, le due viti di centratura.

A destra, il campo visuale ed il relativo reticolo; la riga mobile è quella verticale tratteggiata al centro, solidale con quella doppia in alto e con le due tratteggiate inclinate che convergono da sinistra verso il centro (costruzione Zeiss Jena).

Un altro accorgimento è quello dello **“sdoppiamento d’immagine”**: a livello dell’immagine intermedia si pone un gioco di prismi con superfici semi-riflettenti che sdoppiano l’immagine dell’oggetto. Lo sdoppiamento è regolabile per mezzo di una vite graduata: si ruota la vite fino ad ottenere l’allontanamento delle due immagini al punto in cui si toccano appena gli estremi opposti di esse. A questo punto, la separazione delle due immagini è identica al diametro dell’oggetto. Si elimina il problema dell’interpolazione ed inoltre, poiché le due immagini (per mezzo di opportuni filtri) appaiono di colore complementare, un minimo errore di sovrapposizione di esse crea una zona nera, che consente di evitare le incertezze dovute alla diffrazione.

Le misure di lunghezza al microscopio riescono meglio nel campo da 1 a 100  $\mu$ ; ciò corrisponde, nel caso di particelle, ad un peso di  $10^{-12} - 10^{-6}$  g. Per lunghezze maggiori, si ricorre al microscopio stereoscopico o a strumenti metrologici d’officina, con campo visuale più grande.

E quando l’oggetto è più grande del campo visuale, che si fa? O si riduce l’ingrandimento o si sposta l’oggetto per mezzo del “tavolino”, che è generalmente mobile, ed i cui movimenti sono misurabili per mezzo di scale, generalmente munite di nonio (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 26.2 e 26.4). Si sposta l’oggetto in modo che gli estremi di un suo diametro coincidano uno dopo l’altro con un punto definito del micrometro oculare, si misura ogni volta la posizione del tavolino e poi si fa la differenza delle due misure. Il diametro misurato sarà parallelo alla direzione di movimento del tavolino. La precisione di queste misure non supera quella del nonio.

Per oggetti di grandi dimensioni, specialmente in campo meccanico, elettronico, ecc., esistono tavolini con movimenti fino a 500  $\times$  500 mm e per maggiori precisioni (fino ad 1  $\mu$ ) il movimento del tavolino è misurato con micrometri a tamburo, con metodi ottici (proiezione di scale graduate) o con codificatori elettro-ottici, lineari o rotativi.

A parte questi casi particolari, un oculare micrometrico può dare una precisione del 2 %. Se però la dimensione da misurare scende sotto i 10  $\mu$ , l’errore sale rapidamente, poiché aumenta l’ingrandimento e divengono non più trascurabili i fenomeni di diffrazione, che rendono indefiniti i contorni dell’immagine, e le flessibilità dello stativo. Si è già citato anche l’errore di prospettiva, che cresce col crescere dell’apertura dell’obbiettivo (vedi Charman, 1963).

#### Misure di superficie

(vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 12.3)

Quando la forma dell’oggetto è regolare, si può misurare la sua superficie (la sua

proiezione su di un piano perpendicolare all'asse) tramite la misura di due o più delle sue dimensioni lineari. Se è irregolare, si ricorre a metodi statistici o indiretti, come descritto sotto.

È anche possibile fotografare l'oggetto ed eseguire misure sulla stampa tramite un planimetro, tenuto conto dell'ingrandimento lineare dello strumento. Ma oggi sono largamente diffusi i metodi di misura elettronici, rapidissimi, basati su una ripresa televisiva e sull'elaborazione dell'immagine con apposito software.

#### Misure di volumi

Le misure dirette si riconducono ancora una volta a misure lineari; se l'oggetto è irregolare, si ricorre ancora a metodi statistici, per es. fotometrici.

Fotometria positiva: si rende l'oggetto fluorescente impregnandolo con opportuni fluorocromi e si misura il flusso emesso dall'oggetto colpito da opportuna radiazione d'eccitazione. Presupposti: l'oggetto è trasparente; può venir impregnato di fluorocromo in misura controllata; il rendimento della fluorescenza è quantitativamente riproducibile.

Fotometria negativa (misura di trasparenza): si misura il flusso assorbito dall'oggetto. Questa tecnica ha applicazioni più ampie della precedente, ma anche fonti d'errore più numerose: alla superficie dell'oggetto si possono avere perdite di flusso legate al salto d'indice fra oggetto e mezzo circostante (riflessione e rifrazione), alle asperità della superficie (diffusione), alle irregolarità interne dell'oggetto, ecc.

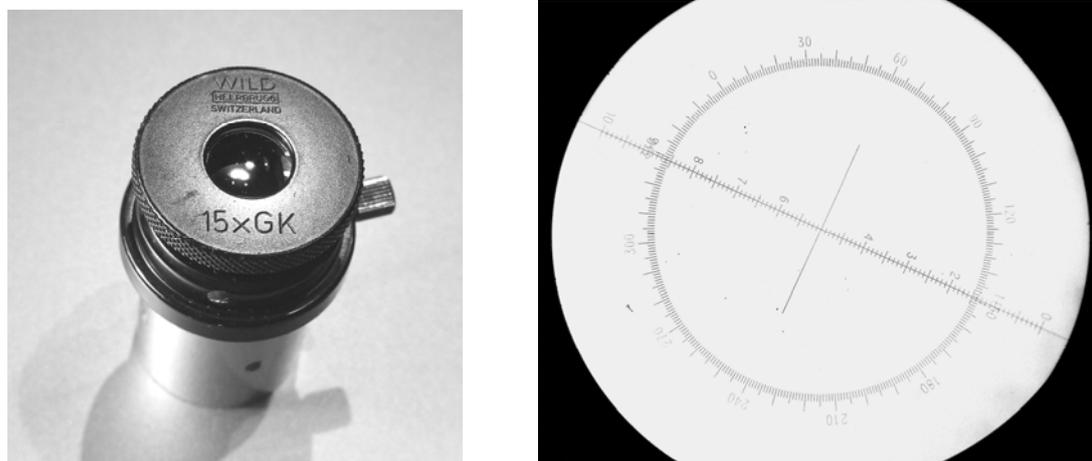


Fig. 3 –Un oculare goniometrico Wild (a sinistra) ed il suo reticolo (a destra), come appare ponendo l'occhio all'oculare. La linea diametrale graduata è girevole.

#### Misure di angoli

Oltre all'uso dell'oculare goniometrico (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 12.3 e la fig. 3), si può ruotare l'oggetto per mezzo di un tavolino girevole, come si usa nei microscopi polarizzatori (vedi il testo “Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata”, fig. 2): si fanno collimare prima l'uno poi l'altro dei due lati dell'angolo sotto misura con una linea disposta nell'oculare; si eseguono due misure separate e si calcola la loro differenza.

Un oculare goniometrico può dare una precisione di 10 – 20'; la scala di un tavolino girevole, in genere dotata di nonio, permette letture con la precisione di 3 – 10'.

Si possono eseguire misure anche sulla fotografia dell'oggetto: se il vertice dell'angolo è al centro del campo, non si devono temere gli effetti della distorsione; il valore misurato è indipendente dall'ingrandimento.

#### Misure geometriche statistiche

Si abbia un preparato contenente numerosi oggetti di varia forma e dimensioni, separati da spazi vuoti (polveri, ad es.), od a reciproco contatto (rocce, leghe, aggregati cristallini, tessuti animali o vegetali). Se, nel secondo caso, fra i granuli, esistono degli interstizi, essi possono essere considerati e misurati come uno dei componenti dell'aggregato.

Su questi oggetti si possono eseguire misure di lunghezze, superficie, ecc. ma, trattandosi d'elementi irregolari, i metodi di misura diretta sopra descritti non sono praticabili.

Si ricorre così a misure, singolarmente inesatte ma veloci, statisticamente confrontabili, sottoposte in un secondo tempo ad elaborazione matematica (Haas, 1967). I moderni sistemi di ripresa digitale e d'elaborazione elettronica rendono questi metodi facili e veloci. I migliori costruttori offrono sistemi completi di misura e calcolo, "chiavi in mano".

#### Misure su insiemi di particelle separate o polveri

Si cercherà di conoscere il diametro (o la superficie o il volume) medio dei vari componenti dell'insieme, oppure la distribuzione delle particelle in classi contigue di diametro crescente ("particle size distribution").

In altri campi (edilizia, geologia, studio dei terreni), queste misure di distribuzione si chiamano "**granulometria**". Il valore del diametro medio dei granuli e la sua distribuzione statistica hanno forti ripercussioni sulle caratteristiche globali del materiale. Se il materiale stesso è abbondante, la curva granulometrica si ricava dalla setacciatura con setacci a larghezza decrescente delle maglie. Nel caso d'elementi fini o di piccoli campioni, si ricorre all'esame microscopico misurando separatamente qualche parametro significativo di un gran numero di particelle.

Occorre individuare e ridurre il più possibile gli errori sistematici, oppure misurarli e tenerne conto. Invece, l'effetto degli errori casuali si riduce aumentando il numero delle misure, secondo la ben nota teoria degli errori. Si cerca caso per caso il miglior compromesso fra durata dell'esame ed errore massimo tollerato. Nella singola misura si può tollerare un errore (casuale) assai maggiore di quello ammissibile nella misura non statistica. Manualmente, si possono misurare in un'ora i diametri di 500 particelle, per ricavarne poi una distribuzione statistica. Con una ripresa digitale ed un'elaborazione elettronica, questi tempi si possono ridurre ad una frazione di secondo.

Generalmente, non si misurano tutte le particelle del campione, ma solo quelle capaci di fornire un errore statistico accettabile. Se i valori di diametro (o di altri parametri) sono molto dispersi, sarà necessario misurare molte particelle piccole (per es. alcune migliaia) per esser sicuri di aver misurato un numero significativo di quelle grandi. Se il campione si fa più omogeneo, si può scendere anche a 100 particelle.

Quando la particella ha una forma regolare, è facile definire il suo diametro, e da quello calcolare superficie e volume; se è irregolare, occorre definire una dimensione lineare che esprima la "grandezza" della particella.

Su quest'argomento esiste una ricchissima letteratura (Batel, 1960; Allen, 1968; Cadle, 1965; Draftz, 1968 e 1972; McCrone et al., 1978; Fairs, 1943; Schrag e Corn, 1970) e quindi diamo solo alcuni criteri abitualmente seguiti (fig. 4 A, B, C e D).

Come dimensione significativa di una particella si può considerare:

- massima larghezza della particella, considerata parallelamente ad una data direzione ("maximum horizontal intercept")(A);
- massima distanza fra due rette tangenti la particella, parallele fra loro e ad una data direzione (diametro di Feret); è quello che si misura con l'oculare a tamburo (B);
- larghezza (parallelamente alla direzione data) misurata in modo da dividere la particella in due parti d'eguale superficie (diametro di Martin)(C);
- diametro del cerchio equivalente (quello che ha la stessa superficie della proiezione della particella in esame)(D).

Il diametro indicato in fig. 4 A è a metà strada fra il diametro di Feret (B) e quello di Martin (C), o al massimo coincide con uno di essi. È il diametro che si misura con gli oculari a sdoppiamento d'immagine.

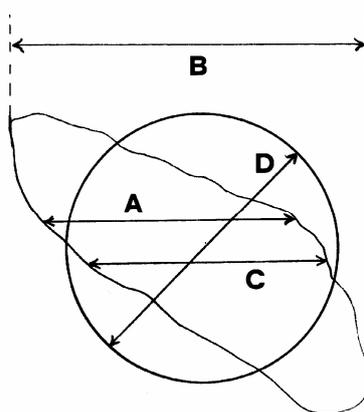


Fig. 4 – Vari diametri che si possono misurare a fini statistici in una particella irregolare. Il cerchio è tracciato in modo da avere la stessa superficie della particella (della sua proiezione nel piano oggetto).

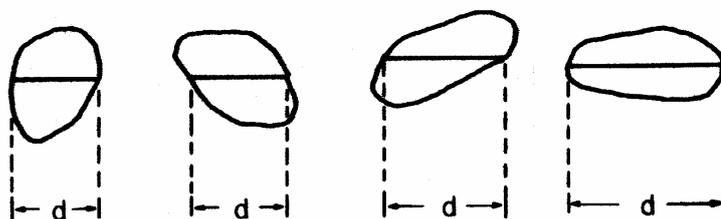


Fig. 5 – Il diametro secondo Martin, a parità di forma della particella, può dare risultati assai diversi secondo l'orientamento della particella.

Quando si osserva l'immagine della particella sovrapposta ad un reticolo oculare contenente cerchi di riferimento di vario diametro (fig. 6), si adocchia il cerchio subito più grande e quello subito più piccolo della particella in esame; il “diametro del cerchio equivalente” è la media aritmetica dei diametri di quei due cerchi.

È questo il metodo raccomandato dal British Standard 3406 (1963). Il reticolo oculare proposto contiene sette cerchi i cui diametri stanno fra loro in rapporto pari alla radice quadrata di 2 (1,41 ...). La suddivisione in classi di grandezza delle particelle dipenderà naturalmente dall'ingrandimento dell'obbiettivo. Occorre una calibrazione.

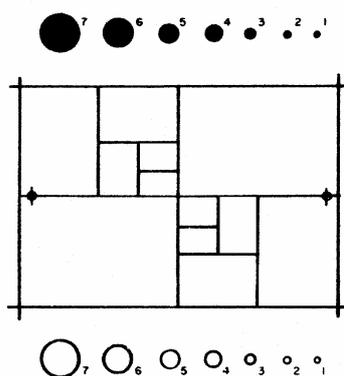


Fig. 6 – Il reticolo British Standard per la divisione delle particelle in classi di grandezza.

Il reticolo contiene anche una serie di rettangoli d'area diversa, secondo un rapporto 2 : 1, utili per correlare i vari ingrandimenti ed i campi-oggetto relativi. Altri reticoli sono discussi in Cadle (1965).

Tutti questi modi di considerare la “grandezza” di una particella vanno corretti di un opportuno fattore quando le particelle sono allungate o appiattite.

Prima dell'introduzione della fotografia/cinematografia digitale e del calcolo elettronico,

per la determinazione del diametro medio di un gran numero di particelle esistevano due metodi strettamente ottico-meccanici: 1) - muovere il tavolino secondo linee parallele in modo da portare nel campo visivo, una dopo l'altra, un certo numero di particelle, qual è imposto dall'errore tollerato<sup>16</sup> (vedi Delly, 1968); 2) - montare nell'oculare un reticolo contenente una quadrettatura e misurare, una dopo l'altra, le particelle contenute nelle successive maglie della quadrettatura; in questo caso, occorre ridurre l'ingrandimento affinché le particelle più grosse non escano troppo dalle maglie.

Sempre all'interno delle classiche tecniche ottiche, per misurare il diametro di una particella, comunque inteso, esistevano gli oculari "a numerazione", contenenti due righe mobili che si accostano all'immagine della particella per mezzo di un tamburo graduato: qualcosa di simile a quanto si fa con gli "oculari a tamburo" già citati. In questo modo, è facile misurare il diametro di Feret. Per la misura dell'area equivalente esisteva poi l'"oculare di Ehrlich"<sup>17</sup> contenente un diaframma quadrato a lati mobili, comandato dal solito tamburo graduato.

Sono stati anche costruiti apparecchi semiautomatici, come il Particle size Analyzer di Zeiss, che confrontano l'immagine della particella con un diaframma rotondo a diametro variabile; ciò può essere eseguito anche su fotografie (vedi Endter e Gebauer, 1956).

Oggi, sono largamente diffuse le misure automatiche su immagini digitali (fotografiche o televisive), che possono essere elaborate a livello statistico con un semplice PC.

Misure su aggregati compatti (leghe metalliche, rocce, miscugli solidi, sospensioni solide, materiali porosi, tessuti animali e vegetali)

Finora abbiamo accennato al problema della misura del diametro medio e della curva di distribuzione delle dimensioni di singoli elementi disposti in un campo vuoto. Ora poniamo il problema della distribuzione relativa dei volumi fra i vari componenti di un aggregato misto.

Supponendo che i vari componenti siano distinguibili per colore, trasparenza o simili, il postulato è: dato un aggregato a tre dimensioni di elementi appartenenti a due o più componenti, elementi con forma e dimensioni irregolari, supponendo di sezionare l'aggregato con un piano qualunque (sezione sottile, superficie di taglio levigata), le superfici totali, somma delle superfici degli elementi di quel piano appartenenti ai vari componenti, così come appaiono nell'immagine, stanno fra loro nello stesso rapporto dei volumi totali dei componenti stessi. Conoscendo il peso specifico dei vari componenti, è possibile calcolare anche il rapporto dei pesi.

Queste tecniche si possono applicare anche a polveri che vengano incluse in un liquido destinato a solidificare e poi ad essere sezionato.

Le superfici dei vari elementi della sezione possono essere misurate con i metodi accennati sopra, con vari tipi d'oculari e di reticoli (Delly, 1968), o con metodi automatici.

Per l'esame manuale è stata messa a punto una scienza statistica apposita, la **stereologia** (o micro-stereologia o "morfometria")(vedi Neuer, 1966; Underwood, 1969; Mertz, 1967; Haas, 1967; Freere, 1967; Schaefer, 1970; Glagolev, 1933; Weibel, 1966).

La stereologia si può definire come la tecnica per dedurre la struttura interna di un corpo eterogeneo a tre dimensioni in base allo studio (microscopico o non) di una sezione piana, a due dimensioni, che lo attraversa. I dati rilevati si basano sul conteggio di segmenti o punti, contenuti in apposito reticolo, che si sovrappongono all'immagine dei vari elementi contenuti nell'immagine microscopica; basterebbe un solo punto nel campo visuale ed un movimento ripetuto dell'oggetto ("dot count"), ma è più pratico ridurre i movimenti meccanici e disporre molti punti nell'oculare.

Caso semplice: reticolo con  $N$  punti disposti a caso; oggetto con elementi appartenenti a due diversi costituenti, A e B; si contano i punti  $N_A$  e  $N_B$  che cadono sui costituenti A e

---

<sup>16</sup> Com'è noto, l'errore dato dalla media di una serie di misure affette da errori casuali è (all'incirca) inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di misure effettuate.

<sup>17</sup> Paul EHRlich (1854 – 1915), ematologo ed istologo tedesco: si servì di quell'oculare per misure sulle cellule.

B; essendo  $N_A + N_B = N = \text{costante}$ , è sufficiente contare  $N_A$ . Dal rapporto  $N_A / N$  si ricava il rapporto della superficie del componente A rispetto al totale della sezione e questo rapporto, si suppone, è pari al rapporto dei rispettivi volumi.

Se il reticolo, oltre ai punti, contiene dei segmenti, si possono contare le intersezioni dei segmenti col perimetro degli elementi A e B (fig. 7)(vedi: Mertz, 1967).

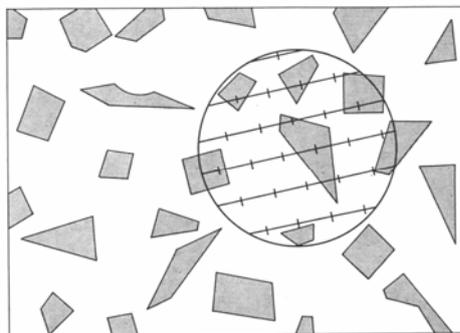


Fig. 7 – Reticolo stereologico sec. Weibel, come utilizzato nell'oculare integratore I di Zeiss  
Da: Zeiss Informazioni, 60 (1966), pag. 65.

Da questi conteggi si ricavano: rapporto in volume fra i vari componenti; rapporto fra la superficie di un componente e il volume del campione (“densità di superficie “); rapporto fra la superficie di quel componente ed il suo volume (“superficie specifica”); numero degli elementi; ecc.

Con criteri matematici si calcolano: numero minimo di punti da misurare al fine di contenere l'errore in un certo limite; numero ottimale di punti di misura e di componenti<sup>18</sup> da porre nel campo visuale.

Se gli elementi hanno forma molto irregolare e/o il loro orientamento non è casuale, occorrerà calcolare i fattori di correzione da introdurre.

Si vedano: Glagolev, 1933; Chayes, 1956; Weibel, 1966; ecc.

Altro metodo manuale per misure geometriche statistiche negli aggregati è quello dell'**integrazione**: in un oculare a tamburo, si sposta la riga mobile in modo da toccare, lungo una linea che traversa il campo, i confini dei successivi elementi a contatto e quindi misurare il loro diametro (di Feret); se i vari componenti dell'aggregato sono riconoscibili visivamente, si sommano separatamente i diametri dei vari componenti; si ha alla fine una serie di somme, ognuna delle quali rappresenta il totale delle intersezioni di un dato componente colla linea di riferimento. In pratica, si usano diversi tamburi che spostano tutti la riga mobile, un tamburo per ogni componente, in modo che ogni tamburo riporta una delle somme parziali. Sono stati costruiti degli “oculari integratori” a sei tamburi.

Invece della riga mobile nell'oculare, si può avere una riga fissa e muovere il tavolino con diversi tamburi (“tavolini integratori”).

### **Analisi automatiche**

Da anni, la trasduzione digitale delle immagini, e la loro elaborazione con calcolatori sempre più piccoli, rendono possibile la raccolta di gran numero di dati e la loro rapida analisi statistica.

In linea di principio, l'analisi dell'immagine può ancora essere compiuta:

1) per punti; 2) per linee; 3) per aree parziali; 4) su tutta l'immagine.

L'esplorazione del piano immagine può essere effettuata spostando il fascio illuminante, o l'oggetto o un punto sensibile nel piano immagine.

Come si è visto, nell'analisi stereologica manuale si procede in genere per punti; nella micro-fotometria (vedi sotto) si procede per aree; nell'analisi automatica si procede spesso per linee (le righe di un raster televisivo analogico) o per una trama di punti (i pixel di un sensore

<sup>18</sup> Quest'ultimo dipende, ovviamente, dall'ingrandimento.

digitale). In ogni modo, i vari componenti di un aggregato vengono distinti per una diversa densità ottica (livelli di grigio) o per un diverso colore, per una diversa forma, un diverso orientamento, per la presenza di inclusi o microstrutture o microfratture, ecc.

Nell'analisi automatica, ovviamente, non si ricorre alla capacità di discriminazione di un operatore umano; può quindi diventare più necessario aiutare la macchina a discriminare fra i vari elementi dell'immagine ricorrendo a colorazioni selettive, ad attacchi chimici ugualmente selettivi e simili. Con mezzi ottici è poi possibile tradurre in differenze di densità (ottica) o di colore certe proprietà fisiche o chimiche dei singoli elementi; per es. indice di rifrazione (con: contrasto di fase, contrasto interferenziale, dispersione colorata, ecc.), livello (con: contrasto di fase, contrasto interferenziale), birifrazione o biriflessione (in polarizzazione), ecc.

Inizialmente, i segnali, analogici o digitali, forniti dal sensore vengono "campionati" nel senso di ricavarne, punto per punto, le coordinate nel piano dell'immagine e la densità (o il colore). Da questi dati, si ricavano in secondo tempo i dati geometrici (forma, dimensioni, orientamento ... dei singoli elementi), i criteri per differenziare i vari componenti dell'aggregato, e così via.

Questi valori, generalmente in forma digitale, vengono elaborati matematicamente con appositi software ("programmi") in tempi brevissimi o addirittura "on line" (nel corso stesso del rilevamento). I risultati, anche sotto forma di valori statistici, vengono dall'associazione fra punti di pari densità (o colore) e punti di transizione fra elementi riconoscibili come diversi.

Alla fine del calcolo si ottengono valori di superficie, forma ed orientamento di singoli elementi, il numero assoluto o percentuale degli elementi attribuibili ai vari componenti dell'aggregato, la loro superficie totale, il loro perimetro, ecc.

Coi sistemi automatici si fa più grave il problema dell'insufficiente profondità di fuoco: nell'analisi manuale, l'operatore tiene sempre una mano sulla micrometrica e può compensare qualunque difetto di planarità dell'oggetto o di curvatura di campo dell'obbiettivo; nel cambiamento da un campo all'altro, può ripetere la messa a fuoco. Se l'analisi è automatica, invece, ci si deve rassegnare a perdere le misure in una parte del campo (per difetto di messa a fuoco) oppure l'intero campo. Sono divenuti così necessari i dispositivi di messa a fuoco automatica nei quali il sensore elettronico controlla il microcontrasto nell'immagine (che è massimo solo col miglior fuoco) o, in termini matematici, la derivata del segnale video, e cerca di massimizzarlo agendo, tramite apposito motorino, sul meccanismo di messa a fuoco.

Ciò rende la misura assai veloce, e parzialmente indipendente dall'operatore umano ma, se l'oggetto è trasparente e di spessore superiore alla profondità di fuoco dell'obbiettivo, non è detto che l'"autofocus" vada a fermarsi nel punto più significativo dello spessore dell'oggetto.

In campo biomedico, ricorre spesso il problema del conteggio d'elementi separati da spazi vuoti (cellule, batteri, microcristalli, ecc. in un campione d'urina o d'essudato; varie cellule in uno striscio di sangue, e così via). Previa diluizione con rapporto controllato, le tecniche manuali prevedevano l'uso d'oculari micrometrici con un **reticolo quadrettato**; l'immagine viene scomposta in questo modo in tanti quadratini, all'interno dei quali risulteranno contenuti pochi elementi, facilitando il conteggio. I singoli quadratini vengono esplorati uno dopo l'altro, per file successive, evitando di contare due volte lo stesso elemento. In qualche caso la quadrettatura, invece che su un micrometro-oculare, è incisa direttamente sul porta-oggetti. In questi casi, si usano anche vetrini speciali in cui la quadrettatura è incisa su una superficie (piana) ricavata al fondo di un'infossatura al centro del vetrino ("camere" o "celle di conteggio"). Deponendo nell'infossatura una goccia di sospensione e poi poggiando un copri-oggetto sull'orlo di essa, si determina un volume ben preciso di sospensione, nel quale si contano poi tutti gli elementi presenti, in modo da facilitare il calcolo del numero d'elementi per unità di volume.

Queste tecniche, semplici ed economiche, sono applicabili a qualunque problema di conteggio d'elementi sciolti, ma oggi sono universalmente soppiantate da sistemi automatici

che compensano la maggiore incidenza di errori casuali col minore errore statistico (per il maggior numero di conteggi). Rimane il problema degli errori sistematici, per i quali si richiedono correzioni più accurate.

D'altra parte, per il conteggio d'elementi separati in sospensione, esistono altri metodi di misura diretti<sup>19</sup>, che però esulano dal nostro tema, visto che non si basano sull'analisi di un'immagine fornita da un microscopio.

Oggi, ogni costruttore serio offre qualche sistema automatico di misura, spesso ottimizzato per una particolare applicazione. Oltre ad una manipolazione elettronica dell'immagine (ridurre gli effetti del cattivo contrasto nell'oggetto, delle variazioni di luminosità del fondo, ecc.), è possibile durante l'elaborazione digitale ignorare certi dettagli o elementi dell'immagine, introdurre fattori di correzione empirici, ecc.

### **Misure di durezza (micro-durometria<sup>20</sup>)**

Le misure di durezza in campo "macro" sono classiche:

Sclerometria: la superficie lucida del campione viene scalfita da una punta affilata (di solito, diamante). Il valore di durezza si calcola in base alla forza minima necessaria che va applicata alla punta per ottenere un'incisione apprezzabile del campione<sup>21</sup>. È questo il metodo di Seebeck. In altri casi (metodo Pfaff) si misura la quantità di polvere prodotta dall'incisione.

Durometria: sulla superficie del campione viene applicata una punta dura ("penetratore"), senza scorrimento. Nota la forza applicata, il valore di durezza del campione si ricava da una misura delle dimensioni dell'impronta lasciata dal penetratore. Quest'ultimo può avere forma di piramide a base quadrata (durometro Vickers) o rombica, con rapporto fra le diagonali pari a 1 : 7 (Knoop), o sferica (Brinell) o conica (Rockwell). In questi ultimi due casi si misura la profondità dell'impronta. La scelta del penetratore dipende dalle caratteristiche del campione.

Per materiali teneri, si misura la deformazione temporanea del provino, premuto da vari tipi di penetratori (durometro Shore).

La misura di durezza andrà poi eseguita nelle condizioni di temperatura in cui il materiale in esame è destinato a lavorare.

La misura di durezza in campo "micro" offre alcuni vantaggi rispetto al metodo classico:

- misurare la durezza dei singoli elementi strutturali ("es. i microcristalli di una lega od una roccia), con simultanea osservazione della loro localizzazione;
- definire con precisione il punto di misura (per es., sullo spigolo di taglio di un utensile);
- non lasciare segni visibili sul campione, data la piccolezza delle impronte, anche di pochi micron;
- possibilità di misure su strati sottili od oggetti appuntiti.

Il microdurometro può presentare un penetratore su un supporto meccanicamente compatibile con un obiettivo, che si porta in posizione di lavoro semplicemente ruotando il revolver, oppure un penetratore applicato sulla lente frontale dello stesso obiettivo usato per l'osservazione.

La misura dell'impronta si esegue con un normale oculare micrometrico (per la diagonale o il diametro) oppure con un dispositivo speciale, anche di tipo interferenziale (per la profondità). Vedi: Sini (1968), pagg. 69-72, contenente altra bibliografia sull'argomento.

La durometria si può applicare anche a materiali incoerenti, polveri e simili. Basta impregnare questi materiali con un liquido destinato ad indurire (resine epossidiche, per es.). Terminato l'indurimento, si seziona la massa, si lucida, e si applica la microdurimetria ai singoli granuli.

Sulla massa indurita si può anche eseguire una misura della **resistenza all'usura** dei singoli granuli: la lucidatura consuma di più i granuli più teneri (o la massa includente, di cui

---

<sup>19</sup> Per es., si fa passare la sospensione in un capillare, ai due estremi del quale vi sono due elettrodi che misurano la resistenza elettrica del liquido nel tratto interno al capillare. Ogni volta che un elemento non liquido s'infila nel capillare, la resistenza del liquido varia e ciò produce un segnale che può essere misurato e conteggiato.

<sup>20</sup> Meno corretto è "durimetria".

<sup>21</sup> Si fa riferimento ad una larghezza definita dell'incisione.

si suppone nota o misurata la durezza intrinseca) col risultato che la superficie lucidata mostra un piccolo gradino ad ogni confine granulo-massa o granulo-granulo. L'altezza del gradino si misura con vari metodi, anche interferometrici, e si può così misurare la differenza di durezza (o di resistenza all'usura) fra le due parti che si trovano ai lati del gradino.

Una migliore visibilità del gradino si può avere usando gli accorgimenti classici per l'osservazione della linea di Becke (sostanzialmente, riduzione dell'apertura del fascio illuminante) ma, trattandosi di materiali opachi, i meccanismi di formazione della linea sono diversi, e si parla di "linea di Schneiderhöhn" (vedi: Beyer e Riesenberg, 1988, pag. 306), la quale si sposta dalla parte del granulo più tenero quando si alza l'obbiettivo. Anche in questo caso, il contrasto di fase può migliorare la visibilità della linea.

### **Misure di viscosità**

Le tecniche per la misura di viscosità nei liquidi sfruttano principi molteplici: velocità di deflusso attraverso un capillare, velocità di caduta di una sfera pesante in seno al liquido, resistenza d'attrito alla rotazione di un disco immerso nel liquido stesso, ecc.

Queste tecniche non si applicano a campioni molto piccoli o a liquidi che impregnano le microcavità di un oggetto poroso; occorre ricorrere al microscopio, col risultato di poter eseguire misure su cellule, microrganismi, costituenti cellulari, ecc., utile cosa in campo biomedico.

La tecnica consiste nell'introdurre all'interno della masserella di liquido in esame una o più particelle di ferro dolce, di forma allungata. Attorno all'oggetto si dispongono i poli di due elettromagneti, orientati in modo da produrre campi magnetici fra loro ortogonali. Eccitando alternativamente i due magneti, la particella di ferro è sollecitata ad assumere due diversi orientamenti, reciprocamente perpendicolari. Il tempo impiegato per passare dall'uno all'altro orientamento dà una misura della viscosità del liquido che circonda la particella.

### **Microtermometria**

Una misura di temperatura a distanza, su di un corpo qualunque, è normalmente eseguita misurando l'emissione del corpo nel campo infrarosso (IR); il sensore è una termocoppia, un "array" a CCD o simili. Si tratta di una tecnica radiometrica.

In campo "micro" si usano tecniche simili, col vantaggio della maggior risoluzione, dell'osservazione e della localizzazione di un singolo elemento in un aggregato misto.

La radiazione del "corpo nero"<sup>22</sup> a temperatura ambiente ha un massimo d'emissione intorno a  $10 \mu$ ; di conseguenza, l'obbiettivo che proietta l'immagine dell'oggetto sulla termocoppia deve essere trasparente per quella lunghezza d'onda. Si possono usare sistemi catottrici (a soli specchi, esenti per ragioni di principio dall'aberrazione cromatica) oppure, sacrificando la correzione della cromatica e quindi la definizione, lenti trasparenti all'IR a base di alogenuri alcalini. Vedi Kirsten, 1968; Marks et al., 1965.

### **Misura di grandezze fisiche in radiazione ottica ("visibile") non polarizzata**

A) Microrefrattometria (misure d'indice di rifrazione e cammino ottico)(Seyfarth e Hahne, 1971)

È, questa, una delle tecniche più diffuse e che si realizza con più varianti. Essa ha applicazioni in molti campi; per es., nell'attività forense, la misura dell'indice consente di accertare che frammenti di vetro trovati nel luogo di un incidente siano identici al vetro di un fanale rotto di una vettura sospetta; più che il ricavare un valore di misura molto preciso, serve accertare l'identità di due campioni diversi.

Ecco il principio.

Quando una radiazione ottica traversa un mezzo qualunque non totalmente assorbente, emerge da esso con un certo ritardo di fase  $F$  che si può esprimere come un angolo, in gradi

---

<sup>22</sup> Il "corpo nero" è un radiatore integrale che emette sotto forma di radiazione elettromagnetica tutta l'energia che possiede. Molti corpi usuali si comportano all'incirca allo stesso modo.

o radianti. Questo ritardo si calcola rispetto alla fase che la medesima radiazione avrebbe se, invece del mezzo in esame, avesse attraversato un'eguale distanza nel vuoto (o, all'incirca, in aria). Il ritardo dipende dal fatto che, in qualunque mezzo, la velocità della radiazione è minore che nel vuoto: a parità di tempo impiegato, lo spazio percorso è minore. Questa differenza di spazio percorso, vale a dire di "cammino ottico" dell'oggetto rispetto al mezzo circostante, è una lunghezza esprimibile come

$$D = F \lambda / 2 \pi \quad (1)$$

Se  $n_o$  è l'indice di rifrazione dell'oggetto e  $n_i$  quello del mezzo circostante, si ha:

$$D = (n_o - n_i) t \quad (2)$$

in cui  $t$  è lo spessore dell'oggetto. Da qui si deduce che il cammino ottico è utile per calcolare l'indice  $n$ , che è uno dei parametri utili per l'identificazione dei corpi solidi o liquidi.

In campo "macro", la misura di  $n$  si basa su tre principi:

- a) Misura dell'angolo di minima deviazione di un prisma costituito dal materiale in esame;
- b) Misura dell'angolo limite, oltre il quale avviene la riflessione totale, quando un fascio passa da un mezzo ad indice noto (più alto) al mezzo in esame; è ciò che si fa nei normali rifrattometri.

NB: questi due metodi richiedono grandi quantità di materiale e quindi non si applicano al campo "micro".

- c) Misura del cammino ottico per mezzo di un interferometro, il quale provoca l'interferenza fra due onde coerenti, di cui una attraversa il campione in esame e l'altra un ugual spessore in aria. Da ciò si ricava il valore di  $D$ .

La tecnica interferometrica si applica al microscopio ottico in vari modi e rimandiamo a tre pubblicazioni (Gerzeli, 1962; Sini, 1968; Beyer H. e Riesenberg H., 1988) ed alla bibliografia presente in questi tre lavori.

La microinterferometria è una tecnica "diretta", che misura il cammino ottico direttamente sull'oggetto.

Vedremo che vi sono, assai più diffusi, i metodi indiretti o "per immersione"; ma torniamo alla formula (2):  $D = (n_o - n_i) t$ . L'interferometro fornisce il valore dello sfasamento  $F$  e quindi di  $D$  (vedi la (1)) ma, per ricavarne  $n_o$ , occorre conoscere  $n_i$  e  $t$ .

$n_i$  si può generalmente misurare con un rifrattometro e  $t$  è misurabile su campioni macroscopici, ed in questo caso il metodo rifrattometrico è il più preciso. Ma in campo microscopico  $t$  è difficilmente misurabile. Per risolvere l'equazione (2) occorre avere un sistema di due equazioni come la (2) in cui si varia  $n_i$  e quindi  $D$ , a parità di  $n_o$  e  $t$ .

Per variare  $n_i$  è sufficiente sostituire il liquido in cui l'oggetto è immerso con un altro di diverso indice<sup>23</sup>, ma in certi casi ciò può essere impraticabile. Allora si può sfruttare la dispersione dell'indice, vale a dire la sua variazione al variare della lunghezza d'onda  $\lambda$ , variazione che è forte per la maggioranza dei liquidi e trascurabile per la maggioranza dei solidi. Si eseguono così due misure senza toccare il preparato, a due lunghezze d'onda diverse<sup>24</sup> e, nota la dispersione del liquido, si ricavano le due equazioni per  $D$  con i due valori di  $n_i$ .

Si può anche sfruttare il coefficiente di temperatura dell'indice, cioè la variazione di  $n$  colla temperatura ( $\Delta n / \Delta T$ ), la quale è generalmente forte per i liquidi ed al solito trascurabile per i solidi. Servendosi di un tavolino riscaldatore, è possibile allora ricavare altre due misure di  $D$  e quindi due equazioni con due diversi valori di  $n_i$  (vedi: Gerzeli, 1962; McCrone et al., 1978). È anche possibile modificare simultaneamente entrambi i parametri, lunghezza d'onda e temperatura (Emmons, 1929).

Ma in microscopia si vanno sempre più affermando i metodi indiretti, i quali ricavano  $n_o$  dal valore di  $n_i$  per confronto; poiché  $n_i$  è noto o misurabile, basta per tentativi trovare un liquido con  $n_i = n_o$ .

<sup>23</sup> Vi sono varie tecniche per fissare le polveri al porta-oggetto ed agevolare la sostituzione del liquido. Vedi: Fairbain, 1943.

<sup>24</sup> Che si possono avere da una normale microlampada filtrandone il flusso con filtri interferenziali a banda stretta.

Sono questi i **metodi “per immersione”** in cui l’oggetto viene immerso in un liquido inerte che non scioglie né reagisce chimicamente con l’oggetto.

A questo punto, essendo possibile misurare con precisione  $n_i$ , occorre un metodo altrettanto preciso per rivelare l’eguaglianza di  $n_i$  e  $n_o$ , e qui vi sono vari metodi, tutti basati sulla rivelazione di fenomeni provocati dalla differenza d’indice, e quindi di fase, fra oggetto e liquido. Elenchiamo i principali; ci limitiamo ad un elenco, poiché la materia è ben trattata in alcuni dei testi citati qui sotto ed in bibliografia, nonché nell’articolo n° 26 dello stesso autore (“Ricerca ed identificazione dell’amianto...”), presente nel medesimo sito.

1) Linea di Becke (vedi: Beyer H. e Riesenberg H. (1988), cap. 6.1.2.8 e 6.1.4.3; McCrone W.C., McCrone L.B. e Delly J.G. (1978), ecc.). Si tratta di una linea chiara che circonda l’oggetto e nasce da complessi fenomeni di riflessione interna ed esterna, rifrazione e diffrazione che si verificano alla superficie di un granulo immerso in un liquido di diverso indice. La linea si sposta dalla parte di indice maggiore quando si alza l’obiettivo. La sensibilità del metodo nella misura dell’indice raggiunge  $\pm 0,001$ .

Quando la differenza d’indice è forte o quando l’oggetto ha forma di cuneo, la linea di Becke può dare risultati errati e ciò ha portato alle altre tecniche qui elencate.

2) Campo scuro. Gli stessi fenomeni che provocano la linea di Becke causano una certa diffusione, in tutte le direzioni, della luce che incide su una particella. In campo oscuro, la particella appare perciò luminosa e questa “luminosità” diviene minima (in teoria, nulla) quando la differenza d’indice si azzerava. La sensibilità del metodo è massima quando l’apertura del fascio illuminante è al limite dell’apertura dell’obiettivo (“**fondo scuro limite**”)(Radczewski, 1961; Schmidt e Heidermanns, 1958). Con questa tecnica è in genere difficile apprezzare la forma delle particelle, specie se piccole.

3) Contrasto di fase (vedi l’art. 25: “La formazione dell’alone nel contrasto di fase”, nel medesimo sito; Beyer, 1965; Heidermanns, 1959; Krause, 1965; Osterberg, 1950; Piller, 1952; Schmidt, 1955 e 1962; Schmidt e Heidermanns, 1959; Waldner, 1961).

Trattandosi di una “tecnica di contrasto” (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 30.4), essa è utile a rendere più evidente la linea di Becke e consente di raggiungere una precisione di  $\pm 0,0001$ , dieci volte maggiore. Inoltre, l’osservazione diretta della linea di Becke diviene difficile per particelle inferiori a  $10 \mu$ , mentre in contrasto di fase si può misurare l’indice di una particella fino ad  $1 \mu$ , almeno con precisione ridotta ( $\pm 0,01$ ), usando radiazione monocromatica (Krause, 1965).

Con i metodi del contrasto di fase colorato (Françon, 1954, Sini, 1965) o del contrasto interferenziale (Sini, 1968), è possibile distinguere a colpo d’occhio se un granulo è più o meno rifrangente del liquido che lo circonda.

In termini di fase, la sensibilità del contrasto di fase è di circa  $6^\circ$ . Per contro, il contrasto aumenta fino ad uno sfasamento di circa  $F = 26,5^\circ$  ma poi decresce fino ad annullarsi per  $F = 53^\circ$  e poi si inverte. Per particelle di forti dimensioni o rifrangenza, occorre quindi molta cautela.

4) Illuminazione centrale (vedi McCrone W.C., McCrone L.B. e Delly J.G., 1978).

Ogni oggetto circa rotondeggiante agisce come una lente, convergente o divergente a seconda che esso è più o meno rifrangente del mezzo. In centro ad esso si crea quindi una macchia chiara che si allarga o si stringe variando il fuoco, nello stesso senso della linea di Becke.

5) Metodi di Schlieren (= striature, in tedesco)

Queste tecniche derivano dal “coltello di Foucauld” (fig. 8): si tratta di tenere distinte le immagini dell’oggetto e della sorgente e nell’obliterare parzialmente quest’ultima con uno schermo opaco. Un obiettivo **f** (fig. 8) produce un’immagine reale dell’oggetto **c**; nello stesso tempo, il condensatore **b + d** produce sul piano **e**, prossimo a **f**, un’immagine della sorgente (più piccola possibile) **a**. Posizionando opportunamente uno schermo opaco ad orlo diritto nel piano **e**, si osservano in **g** tutte le inomogeneità di indice (di cammino ottico) dell’oggetto **c**.

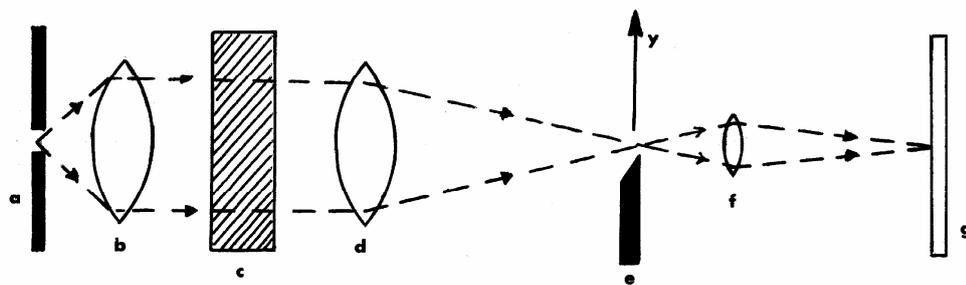


Fig. 8 – Schema generale illustrante le tecniche basate sul principio dello “schlieren”

In microscopia, la fenditura o lo schermo **a**, che funge da sorgente, si pone sotto il condensatore e lo schermo **e** fra obiettivo ed oculare.

A questo schema di base si richiamano:

-- il “fondo scuro limite” sopra citato: la sorgente **a** è rappresentata dal diaframma anulare nel condensatore e lo schermo **e** dal diaframma (montatura dell’ultima lente) dell’obiettivo; la lente **b** è il condensatore e la **d** è l’obiettivo; in **e** è il piano focale superiore dell’obiettivo;

-- il “contrasto a modulazione d’ampiezza” sec. Hoffman (vedi Hoffman, 1977)(vedi anche il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 30.3), che ricama sullo stesso tema con qualche sofisticazione in più;

-- la “illuminazione obliqua” sec. Schröder van der Kolk (McCrone et al., 1978), che sarebbe più scevra da errori della semplice linea di Becke: si oblitera metà del diaframma del condensatore con uno schermo opaco ad orlo diritto. Il campo visuale appare semi-ombreggiato e gli oggetti con indice diverso dal liquido appaiono con un bordo chiaro ed uno scuro, da una parte o dall’altra a seconda che la differenza di indice sia in un senso o nell’altro.

-- il “doppio diaframma” sec. Saylor (vedi ancora: McCrone et al., 1978) in cui, oltre al semi-diaframma nel condensatore, già previsto dallo schema precedente, si ha un identico diaframma che oblitera metà della pupilla d’uscita dell’obiettivo, dallo stesso lato. Poiché il fascio illuminante si incrocia a livello dell’oggetto, il fascio che traversa la metà libera del primo diaframma viene in buona parte obliterato dal semi-diaframma dell’obiettivo. Il campo appare più o meno scuro come nel “campo scuro con illuminazione obliqua” (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 30.2).

Sembra che il metodo di Saylor permetta misure di indice con precisioni di  $\pm 0,0001$ , senza i casi equivoci che abbiamo citato a proposito della linea di Becke e del contrasto di fase.

#### 6) Metodi interferenziali (Sini, 1968; Beyer 1 e 2, 1973)

Quando l’oggetto ed il mezzo d’inclusione hanno lo stesso indice, non vi è differenza di cammino ottico, e quindi di sfasamento, fra oggetto e fondo; il microinterferometro denuncia questa uguaglianza con un’eguaglianza di colore o di luminosità (tecnica del contrasto interferenziale), con assenza di deformazione delle frange (interferogramma) o con assenza di ombreggiature (tecnica dello sdoppiamento interferenziale o “shearing” o DIC). Non si tratta in questo caso di misurare uno sfasamento, ma di rivelare il punto in cui esso si annulla.

Il microinterferometro è certamente uno strumento complesso e costoso, ma è estremamente sensibile ed è forse l’unico metodo non influenzato dall’assorbimento o dal colore dell’oggetto.

Inoltre, durante l’esame di sostanze instabili, spesso non è possibile la sostituzione del liquido d’immersione né la variazione della temperatura; la tecnica interferenziale può allora diventare l’unica possibile poiché, se non si raggiunge l’uguaglianza di indice, consente di misurarne la differenza.

#### 7) La “immersione colorata” (“Optical staining” o “Dispersion staining”)

Vedi: McCrone, 1975 e 1978; McCrone et al., 1978; Julian et al., 1970; Goodman, 1970;

Sini, art. 26 “Tecniche per la ricerca dell’amianto”, in questo sito.

Data l’ampia letteratura esistente, brevità obbliga a riassumere l’argomento.

Questa tecnica, descritta nel 1884 da Christiansen, assai diffusa negli USA, non richiede strumenti costosi, è rapida e non è compromessa quando i granuli sono incrostatati di materiali estranei. Essa richiede però spesso la sostituzione del liquido d’immersione.

La dispersione dell’indice (variazione del suo valore in funzione di  $\lambda$ ) è piccola nella maggior parte di solidi, ma è fino a 100 volte maggiore nei liquidi. Ciò significa che, osservando con luce bianca l’oggetto solido (granulo) immerso in un liquido, per una certa  $\lambda$  (che si indica con  $\lambda_0$ ), si può avere uguaglianza di indice fra granulo e liquido e quindi l’oggetto “scompare”, non ha contrasto, ma per le altre lunghezze d’onda l’oggetto mostra un alone che è colorato poiché è formato solo da una porzione dello spettro ottico, per la quale l’oggetto influisce sul percorso della radiazione.

Per un dato liquido, con un certo valore di indice e di dispersione, un occhio esperto può valutare il colore degli aloni e l’indice del granulo. Naturalmente, si vanno a cercare nell’uso pratico liquidi da immersione speciali, con dispersione più elevata possibile.

Nell’osservazione in campo chiaro, gli aloni colorati sono pallidi poiché la “onda diretta”, quella che forma il fondo chiaro dell’immagine, sovrasta l’onda diffratta, creata dalle differenze di indice fra oggetto e liquido, la quale va a costituire gli aloni colorati.

Per separare l’onda diretta, attenuandola, dall’onda diffratta, vi sono varie tecniche, che riassumiamo poiché sono ben illustrate nella letteratura citata.

a) Campo scuro o, meglio, “campo scuro limite” (vedi sopra, par. 2). L’immagine dell’oggetto è formata solo o quasi dalla radiazione diffratta dal granulo, che è “bianca” ma privata delle radiazioni con  $\lambda$  nei pressi di  $\lambda_0$ . Il granulo appare con un “colore di sottrazione”, complementare della banda  $\lambda_0$ , che non è presente.

Sul piano quantitativo, la brillantezza dell’immagine di un granulo trasparente è proporzionale all’intensità dell’onda diffratta ( $I_d$ ), la quale dipende dallo sfasamento dell’onda che traversa l’oggetto:

$$I_d = 4 \sin^2(F/2) \quad (3)$$

L’oggetto è invisibile ( $I_d = 0$ ) per  $F = 0$  oppure  $F = n \cdot 360^\circ$  ( $n$  intero).  $I_d$  è massimo ( $I_d = 4$ ) per  $F = 180^\circ$ . Combinando la (1) e la (2) viste sopra, si ha:

$$F = (\mathbf{n}_o - \mathbf{n}_i) \mathbf{t} \cdot 2\pi/\lambda \quad (4)$$

Se sono costanti gli indici e lo spessore  $\mathbf{t}$ , si vede che  $F$  è inversamente proporzionale a  $\lambda$  per cui, se  $F_0$  è lo sfasamento introdotto dal granulo alla lunghezza d’onda di riferimento  $\lambda_0$ , si può scrivere:

$$F = F_0 \lambda_0/\lambda \quad (5)$$

Dunque, poiché  $I_d$  dipende da  $F$  ed  $F$  da  $\lambda$  (vedi la (3) e la (4)), la brillantezza dell’immagine dipende da  $\lambda$ , come anticipato qualitativamente, e l’oggetto appare colorato. Ma la (4) afferma che  $F$  (quindi  $I_d$ ) dipende anche da  $\mathbf{t}$ ; quindi l’oggetto appare con colori diversi, più o meno saturi, a seconda dello spessore dell’oggetto;  $\lambda_0$  non cambia, ma il valore di  $\mathbf{t}$  influisce su  $F$  ( $F_0$  non conta poiché  $\lambda_0$  è comunque soppressa) e quindi sulla brillantezza dell’oggetto alla lunghezza d’onda  $\lambda$ , quindi sulla distribuzione spettrale dell’onda diffratta.

Risultato: il colore dell’oggetto è complementare di  $\lambda_0$  solo per valori di  $F$  inferiori a  $90^\circ$ . Ne consegue che l’osservazione di particelle grandi o di grandezza variabile rende difficile l’apprezzamento del colore e quindi di  $\lambda_0$ . (Vedi: Beyer e Schöppe, 1969).

b) Diaframma centrale (“Central stop”)

Si tratta di un disco opaco al centro della pupilla d’uscita dell’obbiettivo: chiudendo il diaframma d’apertura del condensatore al punto che la sua immagine divenga appena più piccola del disco opaco, si ha il “campo scuro centrale”. Il fascio diretto è obliterato dal disco, mentre l’onda diffratta è quasi indisturbata.

c) Diaframma anulare (“annular stop”)

Si tratta di un vero diaframma d’apertura per l’obbiettivo: un disco opaco con un foro al centro (del diametro di  $1/3 - 1/4$  della pupilla d’uscita dell’obbiettivo). Anche il diaframma d’apertura del condensatore va molto chiuso. La situazione è inversa rispetto al caso precedente: l’onda diretta, anche se limitata in apertura, è indisturbata, mentre quella diffratta

è in buona parte bloccata.

Poiché l'obbiettivo risulta fortemente diaframmato, la risoluzione è assai ridotta, specie col diaframma anulare. D'altro canto, questa tecnica serve solo a misurare l'indice, non a risolvere strutture fini o a mostrare la forma delle particelle più fini.

La centratura dei due diaframmi d'apertura (del condensatore e dell'obbiettivo) è molto critica, e si consiglia quindi un condensatore centrabile: è sufficiente un piccolo errore di inclinazione del coprioggetto per dare al preparato una potenza prismatica e deviare l'immagine del diaframma del condensatore.

Questa tecnica è molto diffusa negli USA, e sono prodotti obbiettivi contenenti un piccolo disco girevole che consente sia il campo chiaro normale, sia il diaframma centrale, sia quello anulare (McCrone, 1978).

Ovviamente, queste ultime due tecniche forniscono immagini colorate solo se la curva di dispersione dell'indice del granulo e del liquido hanno un punto comune ( $\lambda_0$ ) compreso nello spettro ottico. Se  $\lambda_0$  giace fuori di tale spettro, tutte le lunghezze d'onda vengono diffratte dall'oggetto, il quale allora appare comunque bianco su fondo scuro (diaframma centrale) o scuro su fondo bianco (diaframma anulare); in questo caso, occorrerà cambiare liquido ma, per sapere se il nuovo liquido deve avere un indice maggiore o minore, bisognerà servirsi di altre tecniche, come la linea di Becke.

Col diaframma anulare, l'immagine è formata essenzialmente dal fascio diretto (vale a dire dal fascio illuminante (bianco) privato del fascio diffratto) ed in quello prevale  $\lambda_0$ ; i colori che appaiono sono "colori di addizione". Col diaframma centrale, l'immagine è data solo dal fascio diffratto, quindi appare di colore complementare rispetto al caso precedente, e si tratterà di colori "di sottrazione", cioè di definite bande dello spettro ottico poste ai lati di una banda attenuata, centrata su  $\lambda_0$ .

I colori saranno tanto più saturi quanto più forte è la dispersione del liquido.

Supponendo di conoscere la curva di dispersione del liquido, l'apprezzamento dei colori da dispersione permette dunque di valutare il valore di  $\lambda_0$  e quindi l'indice di ogni granulo (vedi: Forlini, 1969; McCrone e Delly, 1974 e 1978).

d) Illuminazione obliqua sec. Schröder van der Kolk o con doppio diaframma, secondo Saylor. Di queste tecniche si è già parlato sopra ma, nel caso dell'immersione colorata, usando liquidi ad alta dispersione, le ombreggiature e le bordature appaiono colorate o, da lati opposti del granulo, con colori complementari.

e) Contrasto di fase (vedi: Sini, "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.4; gli art. 25 e 26 in questo sito, nonché: Bertoldi, 1959).

Come è noto, l'onda diretta è attenuata e sfasata ad opera dell'anello di fase; quella diffratta è pressoché indisturbata. Rispetto al campo scuro, entrambe le onde partecipano alla formazione dell'immagine e l'apertura dell'obbiettivo è adoperata per intero.

Poiché non si osserva più il solo effetto dell'onda diffratta, i colori da dispersione che si originano sono diversi da quelli del campo scuro e meno saturi. Anche qui, il colore da dispersione dipende dalle dimensioni dell'oggetto.

Concludendo, il metodo dei colori da dispersione consente, con uno o due liquidi, di apprezzare rapidamente (e sommariamente) l'indice di molte particelle. Coi metodi precedenti, dell'annullamento della differenza di indice, il procedimento è più complesso, ma la precisione assai maggiore. L'immersione colorata, purtroppo, riduce anche la risoluzione e quindi la possibilità di valutare forma e dimensioni della particella; inoltre, bisogna ricordare che circa l'8% delle sostanze solide note possono avere una dispersione simile a quella dei liquidi, per cui occorre molta cautela nell'interpretare i risultati.

Per facilitare il compito, sono state compilate apposite tabelle che danno, per i più comuni costituenti delle polveri, il valore dell'indice (o degli indici se sono birifrangenti) e della dispersione in base al colore con cui appaiono in determinati liquidi.

B) Misura della **fluorescenza** spontanea (primaria o "autofluorescenza") ed indotta

(“secondaria”)(vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 30.6)

Alcune sostanze sono spontaneamente fluorescenti ed il loro spettro d'emissione può consentire la loro identificazione. Quando la fluorescenza è indotta in sostanze non di per sé fluorescenti dal trattamento con coloranti fluorescenti (“fluocromi”), il fenomeno può essere ugualmente indicativo se la reazione oggetto-fluocromo ha un minimo di specificità (vale a dire, se il fluocromo si lega specificamente a strutture dotate di una definita composizione chimica).

La fluorescenza aiuta a riconoscere anche minime quantità di una sostanza fluorescente disperse in una massa di materiale inerte poiché le particelle fluorescenti appaiono brillare su fondo nero ed il materiale inerte è invisibile.

Com'è noto, per l'eccitazione della fluorescenza si usa spesso radiazione UV, ma questo non va confuso con la microscopia in UV, che serve solo a fornire un'immagine finale in UV. In entrambi i casi, però, tutto il sistema illuminante fino all'oggetto deve in ogni caso essere trasparente all'UV, il che è solo parzialmente vero con i normali sistemi ottici e solo se si opera nel vicino UV (UV A = 320 – 400 nm). Rigore vorrebbe che fossero usate lenti speciali in silice o altri materiali trasparenti all'UV. D'altra parte, per l'eccitazione della fluorescenza si usano a volte lunghezze d'onda all'estremo inferiore dello spettro ottico ( $\lambda = 400 - 500$  nm), dove non vi sono problemi di trasparenza ed un normale microscopio può bastare (Sini, 1969).

La radiazione di fluorescenza si osserva normalmente nello spettro ottico, perciò il sistema formatore d'immagine del microscopio può essere normale; si preferiscono i sistemi a forte apertura e basso ingrandimento (vedi: Sini “La resa fotometrica nel microscopio ottico”, nel medesimo sito) per sfruttare al massimo la radiazione di fluorescenza. Si avrà anche cura di scegliere sistemi ottici speciali, privi di fluorescenza propria. Per separare ed isolare la radiazione “d'eccitazione” e quella di fluorescenza si scelgono poi, volta per volta, coppie di filtri adeguati alla banda d'assorbimento preferenziale dell'oggetto ed alle sue bande di emissione.

Anche il “mezzo d'inclusione” usato per il montaggio dell'oggetto e l'eventuale olio per l'immersione (dell'oggetto e dell'obbiettivo) devono essere privi di fluorescenza propria: il “balsamo del Canada” naturale ed i normali olii da immersione non sono adatti.

Com'è noto, l'eccitazione della fluorescenza, vale a dire il percorso del fascio illuminante, può essere praticata in diasopia col fondo chiaro o col fondo scuro classico, oppure con l'episcopia. La fluorescenza in episcopia è sempre più diffusa ed ha il vantaggio che, se l'oggetto è opaco, si osserva il lato di esso che è colpito dal fascio illuminante; in diasopia verrebbe osservato solo il suo contorno.

La radiazione di fluorescenza presenta in genere uno spettro a larghe bande e quindi la capacità diagnostica del metodo si accresce tramite un'analisi spettroscopica (“microspettroscopia”). Una sua valutazione fotometrica (microfotometria) consente di valutare la quantità di sostanza fluorescente presente nel campo di misura.

Interessante notare che la radiazione di fluorescenza è a volte polarizzata, almeno parzialmente, anche se si tratta di fluorescenza indotta; questo “dicroismo” di fluorescenza sta sempre ad indicare un'anisotropia strutturale dell'oggetto.

In campo biomedico, la fluorescenza, generalmente indotta, è largamente usata come strumento d'indagine, come “tracciante” per molte sostanze d'interesse biologico, data l'alta specificità del legame fra fluocromo e certi oggetti (o sostanze). Il campo della “immuno-fluorescenza” è in continua crescita e non possiamo addentrarci in esso.

Nella ricerca sulle polveri, occorre prestare attenzione al fatto che molti corpi presentano una fluorescenza spontanea legata non tanto alla composizione chimica “principale” dell'oggetto, ma alla presenza d'impurezze, anche in tracce minime. Ciò può provocare errori, ma offre la possibilità di riconoscere materiali (minerali soprattutto) provenienti da diverse miniere o industrie, proprio per la presenza d'impurezze caratteristiche. Molte le applicazioni in criminalistica (McCrone e Delly, 1978).

Come ultimo esempio d'applicazione, citiamo la dispersione di minerali fluorescenti polverizzati (es. Willemite) come traccianti per seguire il flusso sotterraneo di corsi d'acqua,

di scoli, ecc. Un solo granulo fluorescente che appare al microscopio come brillante su fondo scuro rivela l'origine della massa d'acqua in esame.

### C) Trasparenza, riflettanza e diffusione

Tutti i concetti ed i metodi sviluppati in fotometria ed in spettrofotometria sono applicabili alla microscopia.

Salvo casi particolari, non si usano in questo campo i fotometri diretti ("a confronto), ma quelli indiretti in cui, in previsione di luminosità molto basse (basti pensare alla fluorescenza), si ricorre ai trasduttori optoelettronici più sensibili, come i foto-moltiplicatori (PMT).

Mentre si osserva un campo visuale con molti elementi o granuli distinti, può essere necessario eseguire una misura fotometrica di un elemento singolo. Ciò si ottiene per mezzo di un diaframma posto nel piano dell'immagine finale, di varia forma ed eventualmente regolabile. L'area di misura delimitata da questo diaframma può corrispondere, nel piano oggetto, ad un'area di pochi  $\mu^2$ . All'interno del campo visuale, con qualche artificio, viene mostrata l'area del diaframma in modo da sapere sempre dove si misura.

Trattandosi di misura fotometrica, la sorgente che illumina l'oggetto deve essere particolarmente stabile; lo strumento dovrà poi tener conto dei rapporti fra curva d'emissione spettrale della sorgente, curva di trasmissione spettrale dell'oggetto e curva di sensibilità spettrale del trasduttore; in altre parole, tutte le grandezze misurate debbono essere considerate come funzioni di  $\lambda$ . Una radiazione monocromatica od a banda stretta si può ottenere da un monocromatore, da filtri interferenziali a banda stretta, ecc.

Per semplicità, il microspettrofotometro può essere sostituito da un "oculare spettroscopico" (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 20.8), che però ha molti limiti.

Le tecniche fotometriche si possono applicare a vari tipi di oggetti:

+ Oggetti trasparenti (sezioni sottili o granuli sparsi). Si misura la trasparenza (densità ottica) o in luce bianca o in funzione di  $\lambda$ . Poiché la misura della densità dipende dallo spessore attraversato, quindi dall'inclinazione del fascio illuminante, quindi dall'apertura del condensatore, la misura più precisa si ha con apertura ridotta.

+ Oggetti traslucidi (diffusione per trasparenza); l'oggetto viene illuminato di lato e si misura la radiazione diffusa da esso; la tecnica richiama il "campo oscuro unilaterale" o "illuminazione obliqua su fondo scuro" (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.2 e l'art. n° 2: "Sguardo generale ai metodi d'illuminazione", in questo sito).

+ Oggetti opachi a superficie speculare (riflessione speculare); si misura la riflettanza, ancora in luce bianca o in funzione di  $\lambda$ ; questa misura è sensibilissima al valore dell'angolo d'incidenza; perciò anche qui si opera a piccola apertura e su superfici perpendicolari all'asse ottico dell'obbiettivo. Il sistema ottico formatore d'immagine è quello di un normale opaco-illuminatore per fondo chiaro.

+ Oggetti opachi diffondenti (diffusione per riflessione); anche qui, il fascio illuminante giunge sull'oggetto obliquamente, in episcopia.

+ Negativi o stampe fotografiche (microdensitometria); la luminosità dell'oggetto è misurata indirettamente, con tutti gli errori che possono venire dalla curva di risposta del materiale fotografico.

Le tecniche fotometriche hanno molti campi d'applicazione:

+++ in radiazione polarizzata (vedi "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata", in questo sito) si può misurare il pleocroismo in trasmissione o in riflessione; fra Nicol incrociati, si possono misurare la biriflessione (vedi oltre), le posizioni d'estinzione, ecc.

+++ nella microinterferometria, si possono misurare le differenze di fase senza ricorrere ai compensatori (vedi: Sini, 1968);

+++ nello studio dei corpi opachi, quando i metodi normali per la misura dell'indice divengono impraticabili, si può immergere l'oggetto, da cui si sia ricavata una superficie lucida, in una serie di liquidi di diverso indice; quando la riflettanza raggiunge il valore

minimo, l'indice dell'oggetto è pari a quello del liquido;

+++ nello studio del punto isoelettrico delle proteine, la tecnica spettrofotometrica consente un miglior apprezzamento del viraggio del colore;

+++ in criminalistica o nel restauro e nella comparazione d'opere d'arte, la misura spettrofotometrica della diffusione fornisce una valutazione quantitativa del colore;

+++ in citologia ed istologia, la valutazione quantitativa delle colorazioni imposte all'oggetto con coloranti selettivi, permette una titolazione di alcuni componenti cellulari. Si parla così di una citofotometria ed un'istofotometria (vedi: Graumann e Neumann, 1958; Voss, 1965; ecc.).

#### **D) Spettroscopia e Spettrografia**

La spettrofotometria sopra descritta permette di ricavare la curva di trasmissione (o di riflessione, o di diffusione) di un oggetto a temperatura ambiente, in funzione di  $\lambda$ .

Ma lo spettro d'emissione o d'assorbimento di una sostanza presuppone che gli atomi di quella siano eccitati e possano emettere fotoni di lunghezza d'onda ben definita.

Se si tratta di spettri d'emissione di liquidi o solidi, questi vanno portati all'incandescenza; se si tratta di gas (spettri d'emissione o d'assorbimento), essi vanno ionizzati, vale a dire trasformati in plasma.

Queste tecniche si applicano male al microscopio; uno dei pochi casi in cui ciò ha dato risultati brillanti, è quello della microanalisi spettrale a laser, sopra descritta.

#### **E) Nefelometria e Turbidimetria**

Queste tecniche sono nate per studiare il potere di diffusione delle sospensioni<sup>25</sup> e delle emulsioni e, da questo potere, ricavare la concentrazione della sostanza sospesa nel solvente.

Un sistema illuminante invia sulla sospensione un fascio collimato. Trasversalmente, di solito ad angolo retto, un fotometro misura la radiazione diffusa. Se si misura anche la radiazione diretta, attenuata dal campione, si ha la turbidimetria in senso stretto.

Il pregio di questa tecnica è di rivelare anche minime quantità di sostanza sospesa nel liquido. In microscopia si dispone un illuminatore con asse perpendicolare a quello dell'obiettivo (micronefelometria). Si possono così eseguire misure a livello microscopico.

**Misura di grandezze in radiazione ottica (“visibile”) polarizzata** (vedi il lavoro introduttivo sulla microscopia in radiazione polarizzata: Sini, 2006)

Circa il 95% dei materiali inorganici che si trovano in natura e buona parte di quelli artificiali, come molti materiali d'origine organica, sono anisotropi, e cioè una o più delle loro proprietà fisiche o chimiche variano secondo la direzione in cui si misurano; intendiamo parlare delle proprietà vettoriali, come la durezza, che sarà, per es., diversa sulle varie facce di un cristallo anisotropo; le proprietà scalari, come il peso specifico, non possono essere riferite a nessuna direzione.

Di questo fatto occorre tener conto quando si esegue una misura di una grandezza vettoriale. Nel campo delle grandezze ottiche, esse sono quasi tutte vettoriali nei corpi anisotropi ma, oltre che con la direzione di propagazione, le grandezze ottiche vettoriali sono variabili anche a seconda della direzione di vibrazione del vettore elettrico.

Quindi, la misura di: - indice di rifrazione – fluorescenza – assorbimento per trasmissione o per riflessione (e quindi il colore), ecc. va eseguita tenendo conto di quelle due direzioni.

In più, i corpi anisotropi sdoppiano qualunque fascio incidente: poiché l'indice varia con la direzione di vibrazione, un fascio di radiazione ottica “naturale” (non polarizzata) che incide su un corpo anisotropo non porta ad infiniti raggi trasmessi, tutti uguali; anzi, per il principio di Fermat<sup>26</sup>, possono essere trasmessi solo due raggi, quello con velocità massima

<sup>25</sup> Sospensione è la dispersione di particelle solide in un liquido o un gas oppure di goccioline liquide in un gas. Emulsione è la dispersione di particelle liquide in un altro liquido, in condizioni di non miscibilità.

<sup>26</sup> Semplificando: il percorso della radiazione fra due punti può essere solo il più lungo ed il più corto possibile.

(minimo indice) e quello a velocità minima (massimo indice). Ne consegue che qualunque misura di colore, indice, ecc. va eseguita, per ogni direzione di propagazione, in due direzioni ortogonali fra loro e perpendicolari alla direzione di propagazione. È questa la birifrazione.

Anche la radiazione riflessa da un corpo anisotropo viene almeno in parte biriflessa, vale a dire sdoppiata in due fasci polarizzati vibranti in piani fra loro perpendicolari.

Va da sé che per queste misure si opera col classico “microscopio polarizzatore” dotato di Nicol, tavolino girevole, lente di Amici, ecc.

Qualunque fenomeno d’anisotropia rivela un’anisotropia di struttura dell’oggetto a livello microscopico (orientamento di micelle, ad es.) o ultramicroscopico (orientamento e disposizione d’atomi o molecole) e quindi lo studio in luce polarizzata fornisce indicazioni che solo tecniche assai più complesse (diffrazione di raggi X, ad es.) permettono di ottenere, e non in tutti i casi (specie in materiali biologici complessi, dove esistono spesso strutture birifrangenti isolate in un complesso di elementi inerti).

Poiché in maggioranza i minerali sono anisotropi, tutti questi fenomeni sono stati ben studiati dai mineralisti e dai cristallografi e rimandiamo quindi ai trattati di cristallografia ed all’imponente letteratura specialistica esistente: Falini, 1953; Bonatti e Franzini, 1984; Rinne e Berek, 1953; Essam, 1966; Bergner, 1957; Meyer, 1976; Bennet, 1978; Hyde e Azzam, 1979; Chayes, 1956; Hallimond, 1970; Hartshorne e Stuart, 1970; Wahlstrom, 1969; Leeder O. e Blankenburg H.J., 1989. Si può anzi affermare che questo è l’unico campo tecnico-scientifico in cui il microscopio ottico è stato sfruttato nel pieno delle sue possibilità teoriche e pratiche.

Elenchiamo così sommariamente le grandezze misurabili al microscopio polarizzatore.

#### MISURE COL SOLO POLARIZZATORE

##### A) Pleocroismo (dicroismo e tricroismo)

Si tratta di una variazione del coefficiente d’assorbimento, e spesso del colore, al variare della direzione di propagazione e di vibrazione della radiazione incidente. Queste misure possono diventare assai precise con l’uso di metodi fotometrici e spettrofotometrici ed il loro valore diagnostico è elevato in quanto, fra l’una e l’altra varietà di minerale, possono variare i colori di pleocroismo ma non il rapporto fra i poteri d’assorbimento nelle varie direzioni.

Come avviene per l’indice, occorrerà misurare molti granuli o cristalli diversamente orientati per essere sicuri di avvicinarsi ai valori massimo e minimo dell’assorbimento; i valori intermedi non hanno utilità. I valori estremi (due nei cristalli dimetrici, tre in quelli trimetrici) si presentano in direzioni caratteristiche, legate all’orientamento del reticolo cristallino.

##### B) Indice di rifrazione

Altra grandezza vettoriale da misurare in due o tre direzioni di vibrazione diverse. In pratica, come si è detto per il pleocroismo, occorre misurare in un aggregato compatto (roccia, ad es.) od incoerente (polveri) molti granuli fino ad individuare i valori limite, minimo e massimo, dell’indice. Tali valori saranno relativi al piano in cui giace la direzione principale del polarizzatore.

Poiché una grandezza vettoriale varia anche con la direzione di propagazione, occorre illuminare l’oggetto con un fascio il più possibile collimato (parallelo), il che è facile al microscopio: basta chiudere il diaframma d’apertura del condensatore (ortoscopia). Si escludono però in questo modo alcune tecniche che operano a forte apertura, come il contrasto di fase ed il campo scuro omnilaterale. La tecnica dell’immersione colorata invece è compatibile con l’ortoscopia, poiché può operare ad apertura ridotta.

Fra Nicol incrociati, può accadere che un granulo appaia sempre “estinto”, comunque si ruoti il tavolino: in questo caso, si sta osservando nella direzione di uno degli assi ottici. Se il cristallo è uniassico (sistemi cristallografici dimetrici), in quella direzione si misura l’indice “ordinario” ( $\omega$ ). Per le particelle non sempre estinte, invece, si ruota il tavolino e si misurano molte particelle alla ricerca dei valori massimo (cristalli positivi) o minimo (negativi) dell’indice. Sarà quello l’indice straordinario ( $\epsilon$ ). Se il cristallo è biassico, si cerca ancora un

granulo che rimane sempre estinto al ruotare del tavolino; in queste condizioni, si misura l'indice intermedio ( $\beta$ ). Nelle altre particelle, si cercheranno i valori estremi ( $\alpha$  e  $\gamma$ ).

Dalle misure degli indici si ricava il valore del potere biriffrattivo della particella, che può bastare all'identificazione.

Quando si misura l'indice col solo polarizzatore, il cristallo va sempre orientato in posizione d'estinzione.

#### MISURE FRA POLARIZZATORI INCROCIATI

C) Posizioni d'estinzione: si misura l'angolo ("di estinzione") fra le direzioni principali dei Nicol e qualche direzione caratteristica del cristallo (spigoli, direzioni di sfaldatura, ecc). Per la misura, si usa la graduazione del tavolino girevole; la posizione d'estinzione si può apprezzare ad occhio, ottimo strumento differenziale per l'apprezzamento della minima luminosità, oppure tramite fotometro. Per convenzione, l'angolo d'estinzione si suppone minore di  $45^\circ$ ; ciò è possibile poiché in un giro vi sono sempre quattro posizioni di estinzione a  $90^\circ$  fra loro.

D) Birifrazione: si tratta della massima differenza fra i due indici ( $n_2 - n_1$ ) relativi ai due raggi (birifratti) che si formano in un corpo anisotropo quando è traversato dalla radiazione. Questi indici assumono i valori estremi ( $\varepsilon$  ed  $\omega$  per i cristalli uniassici;  $\alpha - \beta$  oppure  $\beta - \gamma$  per i biassici) quando le direzioni di vibrazione sono orientate parallelamente agli assi della "indicatrice degli indici" del cristallo.

La misura della birifrazione è quindi legata all'orientamento del cristallo. In un aggregato casuale di granuli (roccia, polveri, ecc.) occorre eseguire quella misura su molti granuli finché non si trovano i valori massimi, che saranno uguali o poco inferiori al valore reale.

Oltre a misurare separatamente gli indici, si può misurare direttamente la differenza  $n_2 - n_1$  in base allo spessore  $t$  del cristallo ed alla differenza di cammino ottico  $D$  fra i due raggi birifratti:

$$D = (n_2 - n_1) t \quad (6)$$

Il valore di  $D$  si ricava in base al "colore d'interferenza" da apposite tabelle o dalla "carta di Michel-Lévy" oppure, con maggior precisione, da particolari compensatori (vedi: Sini, 2006, in questo sito, ecc.).

E) Osservazioni in conoscopia.

La conoscopia è l'osservazione del piano focale superiore dell'obbiettivo con un semplice sistema ottico (lenti di Amici-Bertrand, microscopio ausiliario, ecc.). Per utilizzare tutta l'apertura dell'obbiettivo sarà necessario utilizzare un condensatore di apertura uguale o superiore. Il diaframma d'apertura del condensatore deve essere aperto tutto o quasi; il fascio illuminante è fortemente conico, donde il nome di "conoscopia".

Ogni punto del piano focale dell'obbiettivo corrisponde ad una diversa direzione di propagazione nell'oggetto, quindi ad un diverso spessore attraversato nell'oggetto dalla radiazione, quindi ad un diverso sfasamento fra i raggi birifratti, quindi ad un diverso colore d'interferenza. Nel piano focale dell'obbiettivo si ha così una "figura d'interferenza" o "immagine assiale" attraversata da linee colorate (isocromatiche), luoghi dei punti per i quali lo sfasamento fra i due raggi è costante. Nella figura d'interferenza sono visibili le posizioni d'estinzione e la direzione dell'asse o degli assi ottici, riconoscibili come zone scure (isogire). Si riconosce facilmente il carattere uniassico o biassico e, con opportuni compensatori, positivo o negativo<sup>27</sup>.

Una diagnosi mineralogica può essere possibile anche solo con questi elementi.

In conoscopia è possibile misurare anche l'angolo fra gli assi ottici nei materiali biassi, semplicemente misurando la distanza fra i vertici delle curve nere a forma di iperbole e correggendola in base ad una calibrazione da effettuare per ogni obbiettivo.

La misura dell'angolo fra gli assi ottici è più precisa se si usa il "tavolino universale" sec. Fedoroff in osservazione ortoscopica: gli assi ottici si riconoscono poiché, quando uno di essi coincide con l'asse ottico, il cristallo rimane estinto durante la rotazione del tavolino.

<sup>27</sup> Un cristallo uniassico (dimetrico) è positivo se  $\varepsilon > \omega$ , negativo se  $\varepsilon < \omega$ . Un cristallo biassico (trimetrico) è positivo se la bisettrice acuta (dell'angolo acuto fra gli assi ottici) corrisponde a  $\gamma$  e negativo se corrisponde ad  $\alpha$ . Si suppone sempre  $\alpha < \beta < \gamma$ .

F) Il carattere della birifrazione col metodo dell'immersione colorata.

Si osserva a Nicol incrociati ogni componente di un aggregato incoerente (si suppone di poter discriminare le particelle appartenenti ai vari componenti sulla base di caratteristiche appariscenti). Se le particelle appaiono sempre estinte, si tratta di cristalli monorifrangenti (monometrici) o amorfi (vetrosi). Se ciò non avviene, si estrae l'analizzatore e si osserva con l'immersione colorata ruotando continuamente il tavolino. Si sostituisce il liquido, o si varia la lunghezza d'onda della sorgente, finché non scompaiono simultaneamente tutte le particelle della stessa natura, per le quali si ha uguaglianza di indice (fra particella e liquido), due volte per ogni giro, ogni  $180^\circ$ . Questa scomparsa deve avvenire indipendentemente dall'orientamento delle singole particelle. In queste condizioni, il cristallo è uniasse poiché solo in questo caso vi è un indice indipendente dalla direzione ( $\omega$ ) e la scomparsa del cristallo ogni  $180^\circ$  significa che in quel momento la direzione di  $\omega$  è parallela alla direzione principale del polarizzatore e l'indice del liquido è appunto uguale ad  $\omega$ . Se nessun indice del liquido è tale da dare la scomparsa di tutte le particelle (dello stesso componente) due volte ogni giro del tavolino, vuol dire che non vi è un indice indipendente dalla direzione, e quindi il cristallo è biasse.

G) Attività ottica o polarizzazione rotatoria

Si manifesta in alcuni materiali i quali, in direzione dell'asse ottico, ruotano il piano di vibrazione dell'eventuale radiazione linearmente polarizzata che li attraversa.

Nei cristalli il "potere rotatorio", cioè l'angolo di rotazione del piano di vibrazione, per unità di spessore e per propagazione parallela all'asse ottico, rappresenta un carattere diagnostico. Il potere rotatorio è funzione di  $\lambda$ , quindi subisce la dispersione.

Il fenomeno si rivela in ortoscopia perché l'estinzione in direzione dell'asse del cristallo non avviene a Nicol incrociati ma solo dopo rotazione dell'analizzatore. In conoscopia, si presenta una macchia chiara al centro della croce nera della figura d'interferenza.

Anche certe sostanze in soluzione presentano un potere rotatorio, e l'angolo di rotazione è proporzionale alla concentrazione. Questo fenomeno è sfruttato nei "saccarimetri", largamente usati per misurare la concentrazione delle soluzioni di saccarosio.

H) Anisotropia per riflessione

Fra le grandezze che si misurano illuminando l'oggetto per trasparenza, ve ne sono alcune che si possono misurare in riflessione su materiali opachi. L'anisotropia si può manifestare per riflessione su superfici lucide.

Naturalmente, il microscopio dovrà essere equipaggiato per l'episcopia, con un opaco-illuminatore (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.1 e l'art. n° 2: "Sguardo generale ai metodi illuminazione...", nel medesimo sito) ed un polarizzatore posto prima del semiriflettente. Ma occorreranno anche altri piccoli accorgimenti: il polarizzatore deve essere orientato in posizione fissa rispetto al semiriflettente in modo che le due direzioni principali siano parallele<sup>28</sup>; le ottiche vanno curate rispetto ai trattamenti anti-riflettenti, ecc.

Come avviene in trasmissione, si può avere **pleocroismo** per riflessione quando il potere riflettente varia con la direzione di vibrazione del fascio incidente; se varia anche con la lunghezza d'onda, si ha dispersione e l'oggetto appare colorato con colore variabile a seconda della direzione. La misura non si può eseguire ruotando il polarizzatore, che è fisso per le ragioni già dette, ma il tavolino. Per ottenere una maggior precisione, si usa un fotometro o uno spettrofotometro. Si troveranno due direzioni ortogonali ("linee neutre") lungo le quali il potere riflettente assume valori estremi.

Così l'anisotropia in trasmissione (birifrazione) ha il suo corrispettivo nella **biriflessione** in riflessione. È noto che una superficie non metallica polarizza parzialmente la radiazione riflessa e la polarizza totalmente quando l'angolo d'incidenza assume un particolare valore ("di Brewster"), legato all'indice del materiale. La biriflessione avviene anche con materiali isotropi e con liquidi.

Se il materiale è isotropo, la biriflessione scompare per incidenza normale, ma si conserva nei materiali anisotropi.

---

<sup>28</sup> Una superficie riflettente produce nel caso più generale una polarizzazione parziale o totale e si comporta quindi come un polarizzatore, sia pure parziale.

Anche per un fascio riflesso, ruotando l'oggetto attorno all'asse dell'obbiettivo, si osservano fra Nicol incrociati delle posizioni d'estinzione, almeno parziale, quattro per ogni giro, e tali posizioni definiscono le cosiddette "linee neutre". Anche questi fenomeni sono soggetti a dispersione.

I due raggi "biriflessi" sono, nel caso generale, sfasati fra loro, per cui il fascio riflesso è polarizzato ellitticamente; gli assi di questa ellisse formeranno un angolo specifico (G) con le linee neutre. L'ellitticità (E) è il rapporto fra gli assi di questa ellisse, che è in genere assai forte: l'ellisse è molto schiacciata.

La biriflessione è assai più complessa della birifrazione ed ha dato spazio ad una nuova scienza: l'**ellipsometria**. (Vedi: Beugnies, 1958 e 1970; Berek, 1947; Cameron, 1961; Ehrenberg, 1966.

#### I) Fotoelasticità o birifrazione indotta

I corpi isotropi naturali o artificiali possono divenire anisotropi e quindi birifrangenti se sottoposti a pressioni direzionali, non idrostatiche. Questa anisotropia ottica indotta dà la misura di un'anisotropia intima provocata da un orientamento preferenziale o da una densità anisotropa delle particelle costitutive (molecole, micelle, o simili).

Quando questo fenomeno scompare al cessare della pressione che l'ha provocato, ed ha quindi carattere elastico, si parla di "foto-elasticità".

Se però la pressione direzionale si esercita su un corpo fuso in via di solidificazione o di semplice raffreddamento, si possono creare delle tensioni interne permanenti, "congelate", e la birifrazione diviene anch'essa permanente ("foto-plasticità"). La causa delle pressioni interne può venire semplicemente dalla contrazione non isotropa del corpo in raffreddamento.

I fenomeni di fotoelasticità sono utilizzati, ad es., per studiare la distribuzione degli sforzi all'interno di modelli in plastica che riproducono strutture complesse altrimenti difficili da studiare (ponti, edifici, utensili meccanici, ecc., vedi la fig. 9). Scarse le applicazioni in microscopia.

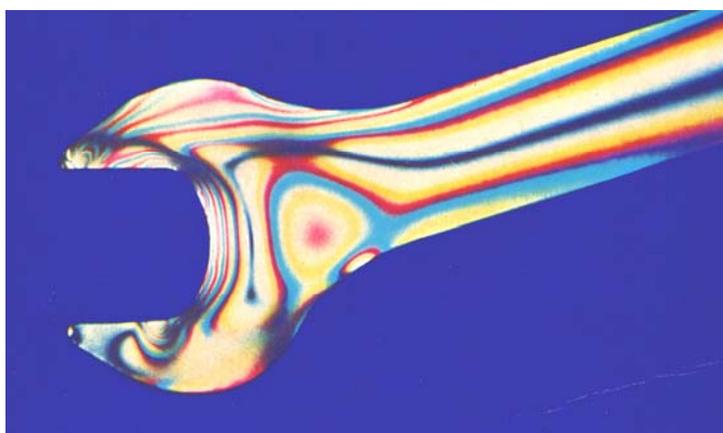


Fig. 9 – Modello in plastica di un utensile, sottoposto agli sforzi normalmente previsti per una chiave fissa. Le linee di ugual colore (isocromatiche) riuniscono i punti in cui la tensione interna del materiale è la stessa. Foto: H. Rohde, Berlino; da: Jena Review, 5 1965, p. 289.

La birifrazione indotta permanente invece è utile per rivelare tensioni interne nei vetri e la si sfrutta per selezionare i materiali destinati all'uso in radiazione polarizzata, per controllare l'omogeneità dei vetri ottici, ecc.

I campioni possono avere dimensioni anche inferiori ad  $1 \mu$ . L'esame va eseguito fra Nicol incrociati, magari inserendo un compensatore "tinta sensibile", possibilmente in "posizione sub-parallela" (vedi: Sini, 2006).

### Misure in radiazione UV o IR

Per l'osservazione con quelle radiazioni, esterne allo spettro ottico, occorre usare sistemi ottici costruiti con materiali trasparenti per esse (silice, fluorite, ecc.) o con specchi (sistemi

catottrici). Se ne è già accennato nel capitolo sulla fluorescenza. L'immagine costituita con radiazioni non ottiche si può fotografare<sup>29</sup> oppure osservare direttamente, dopo averla tradotta con appositi sensori che la ripresentano in campo ottico ("convertitori d'immagine").

Sono stati costruiti anche obbiettivi "monocromatici" corretti solo per l'UV a 275 nm, oppure "policromatici" (gli "Ultrafluor" di Zeiss) corretti per una lunghezza d'onda nell'UV ed una nel visibile. Questi ultimi consentono l'osservazione visuale mentre l'oggetto viene irradiato con radiazione mista UV-ottico.

La sorgente deve emettere una quantità sufficiente di energia nella banda desiderata. Poiché la maggior parte delle sorgenti emette su più righe o bande, o con spettro continuo, occorrerà un sistema di filtri con la massima trasparenza nella banda desiderata e la minima per tutte le altre.

Realizzate le condizioni appena descritte, tutte o quasi tutte le tecniche di misura descritte finora sono realizzabili in UV o in IR.

Si ricordi anche che molti corpi, opachi nello spettro ottico, sono più o meno trasparenti in UV o in IR; es. tipico la chitina e la cheratina che formano l'esoscheletro degli insetti o l'epidermide di molti animali, uomo compreso.

Viceversa, oggetti trasparenti nel visibile possono mostrare bande di assorbimento caratteristiche in UV o nell'IR: questo è il caso della basi puriniche e pirimidiniche che costituiscono il 25% in peso degli acidi nucleici<sup>30</sup>. Con l'uso di UV a 260 nm, Caspersson e la sua scuola hanno messo a punto una tecnica fotometrica per il dosaggio degli acidi nucleici.

## 6 - IL MICROSCOPIO OTTICO NELL'ESAME DI AGENTI AMBIENTALI NOCIVI

Si è visto dunque che il microscopio ottico consente di osservare ed eseguire misure di varie grandezze fisiche su fenomeni ed oggetti nel campo dimensionale fra circa 1  $\mu$  e qualche millimetro.

Accanto ai tradizionali campi di applicazione, scienze naturali, biologia, medicina, patologia, si trovano le analisi su agenti ambientali dannosi alla salute dell'uomo, le "nocività". Oltre alle tradizionali metodiche classiche in campo macroscopico, è possibile applicare al microscopio alcune tecniche esclusive, come l'analisi microspettrale a laser, già citata.

Le analisi di igiene ambientale si rivolgono spesso alle fasi di miscugli solidi incoerenti (polveri, detriti) e coerenti (terreni, rifiuti, scorie, metalli), nonché alle sospensioni liquide e solide (colloidi). Vedi: Seyfarth e Hahne, 1976.

Ecco alcuni esempi.

Il **terreno agrario** rappresenta un sistema complesso di esseri viventi, di resti organizzati non viventi, di composti organici ed inorganici. Su di esso hanno grande influenza i fattori ambientali naturali (clima, meteore) ed artificiali (rifiuti industriali ed urbani, fitofarmaci, concimi, ecc.).

Occorre quindi conoscere la composizione del terreno e la sua evoluzione nel tempo per poter prevedere e correggere gli effetti dannosi (sui prodotti agricoli e quindi, indirettamente, sull'uomo) di tanti agenti inquinanti.

Dal punto di vista della fertilità, componenti importanti e molto labili del terreno sono i componenti umici (da "humus"), cioè quei materiali colloidali contenenti svariati composti aromatici con carattere fenolico e chinonico.

Le fluttuazioni quantitative e qualitative di questi polimeri e le loro proporzioni relative nel terreno rappresentano un criterio sensibile e sicuro per la valutazione dei terreni, della loro evoluzione, dell'influsso di fattori inquinanti e di agenti atmosferici. Occorre quindi misurare

<sup>29</sup> Con emulsioni speciali, specie per l'IR.

<sup>30</sup> Da qui l'effetto mutageno dell'UV, quando irradia il DNA.

fenomeni come polimerizzazioni e depolimerizzazioni. Vedi: Pauli, 1966.

Una tecnica utilizzata in questo senso è la fluorescenza (vedi sopra). Quella primaria si può avere in residui organici non troppo alterati (cellulosa, pectina, emicellulosa, suberina, cutina, lignina); col procedere dell'umificazione si formano colloidali non fluorescenti che mascherano il fenomeno; la brillantezza stessa dell'immagine può dare una grossolana indicazione del rapporto fra componenti indecomposti ed umificati.

La fluorescenza secondaria può mettere in evidenza microrganismi vivi o morti, resti organici ed inorganici. Il tipo di fluorocromo da usare e la concentrazione ottimale dipendono dalle proprietà adsorbenti e quindi dal contenuto in colloidali del terreno.

Una misura fotometrica sulla radiazione di fluorescenza può fornire una determinazione quantitativa dei colloidali umici.

A volte, è utile abbinare l'osservazione in fluorescenza a quella in contrasto di fase.

In episcopia, la fluorescenza si può studiare su campioni compatti ed opachi.

Sempre a proposito del terreno, a volte occorre valutare gli enormi depositi di polveri e ceneri prodotti dalle centrali termiche (specialmente se alimentate a carbone o lignite), dalle fabbriche di cemento e materiali ceramici, ecc. Le **polveri** si depositano su ampie aree modificandone la composizione, il pH, ecc.

Non sempre questi depositi sono totalmente dannosi: il cemento può correggere l'eccessiva acidità di un terreno, la cenere può avere effetto fertilizzante, ecc.

Per l'analisi, si ricorre a tecniche microchimiche ed allo studio delle fasi, tecniche economiche e rapide, che consentono di seguire l'evoluzione di un terreno in tempi brevi. Si riesce spesso anche a correlare un dato agente inquinante con la sua provenienza. Ciò aiuta a risolvere molti problemi legali, responsabilità, risarcimenti, ecc. La provenienza della polvere prodotta da un altoforno o impianto termico, ad es., si riconosce in base alla forma e struttura delle perle di fusione, che dipende dal processo impiegato (vedi: McCrone, 1968; Hamilton e Jarvis, 1963; Seyfarth, 1969).

È possibile in genere esaminare un dato componente granulo per granulo, anche se in piccola percentuale e disperso in mezzo a molti altri componenti.

Per l'esame delle polveri di coke e lignite si misura il potere riflettente in episcopia e la fluorescenza.

Nel caso delle **scorie**, si usano tecniche petrografiche classiche in radiazione polarizzata, spesso in episcopia, infatti, la sezione e la lucidatura di un campione opaco sono più rapidamente ottenute della sezione sottile, e permettono l'esame di granuli assai piccoli che in sezione (lo spessore delle normali sezioni sottili difficilmente si spinge al di sotto di 20 – 30  $\mu$ ) sarebbero inevitabilmente sovrapposti con altri granuli (vedi: Schreiter, 1968 e Winchell e Winchell, 1964, 1 e 2).

Per quanto riguarda le polveri, si è già visto che i metodi mineralogici classici, l'immersione colorata, ecc. permettono diagnosi precise, anche se laboriose. Con i moderni sistemi di calcolo automatico, come già detto, è facile ricavare i dati sulle dimensioni delle particelle, la loro distribuzione in classi, ecc.

D'altra parte, vi sono parametri che solo il microscopio ottico rivela. Basta pensare ai materiali, come l'amianto<sup>31</sup> ed il vetro, che sono quasi innocui in forma granulare, ma possono diventare molto nocivi se in abito aciculare o fibroso. Le tecniche più sofisticate, come la diffrazione degli elettroni o dei raggi X non danno alcuna indicazione sull'abito morfologico del granulo.

Del resto, il microscopio ottico è più economico di molti altri strumenti di misura, non presenta pericoli ed è più facile da usare. Nel caso di aggregati compatti, il microscopio consente l'analisi senza disaggregazione del complesso poiché permette l'osservazione dei singoli granuli e del loro grado di concrenza.

Tornando alle polveri, il problema diviene sempre più grave in relazione all'inquinamento atmosferico ed allo smaltimento dei rifiuti solidi, specie di quelli industriali. Le polveri atmosferiche comprendono prodotti volutamente dispersi (fertilizzanti, disinfettanti,

---

<sup>31</sup> Vedi l'art. n° 26: "Tecniche per l'identificazione dell'amianto...", in questo sito.

insetticidi, erbicidi), prodotti di rifiuto industriali (fumi, ceneri, ecc.), rifiuti urbani, prodotti sfuggiti da impianti industriali durante le fasi di carico, scarico e trasporto, fumi da impianti di riscaldamento ed autoveicoli, polveri e sabbie di origine naturale, esseri viventi (microrganismi, pollini, spore, semi, cisti).

In molte **ceneri**, specie se provenienti da impianti termici a lignite, occorre determinare la percentuale di ferro poiché il suo recupero può diventare economicamente conveniente. La percentuale del ferro allo stato di elemento si può ricavare da normali analisi chimiche, ma è importante anche conoscere la configurazione dei composti di ferro; un'analisi chimica globale non sempre può fornire questi dati, mentre l'analisi microscopica consente di esaminare i singoli granuli e determinare la loro natura mineralogica. Un micro-manipolatore munito di aghi calamitati permette anche l'isolamento delle singole particelle ferrose e il loro arricchimento in seno ad un campione promiscuo. L'arricchimento si può anche effettuare attraverso il coprioggetto senza toccare il campione, poiché le particelle non magnetiche restano immobili.

In altri casi, le ceneri di lignite possono mostrare proprietà "idrauliche" (possono far presa anche sott'acqua, come i cementi pozzolanici) ed acquisire valore economico. Lo studio delle fasi al microscopio può dare indicazioni in merito. Altre precauzioni sono da prendere quando le ceneri vengono sparse su terreni agricoli: per evitare un eccessivo aumento dell'acidità del suolo, occorre verificare che la cenere contenga una quantità sufficiente di composti di calcio; anche ciò può essere fatto al microscopio ottico.

Nel caso dei **fumi**, gli impianti di depurazione a precipitazione elettrostatica sfruttano la carica elettrica delle particelle. Per il progetto di questi "precipitatori" è necessario conoscere la curva di distribuzione delle dimensioni delle particelle, la loro conduttività elettrica, e quindi la loro natura.

Le tecniche ottiche per il riconoscimento delle particelle, già elencate, consentono anche di studiare le loro migrazioni e trasformazioni nell'organismo di animali e vegetali e nel terreno, nonché i fenomeni di degenerazione indotti nei tessuti. Si ricordi che nelle piante, oltre agli effetti chimici, le particelle solide o liquide sospese nell'aria possono otturare gli stomi ed asfissiare la pianta.

Sugli edifici e materiali da costruzione, i fumi possono esercitare una qualche forma di corrosione riguardo ai granuli minerali, ai leganti, alle parti metalliche, ecc. L'osservazione al microscopio di campioni opportunamente preparati consente di riconoscere non solo i fenomeni di corrosione, ma anche le vie di penetrazione (fessure, porosità), i composti secondari che ne derivano, l'effetto protettivo di rivestimenti protettivi e vernici, ecc.

Per quanto riguarda i **rifiuti liquidi** con fasi solide o colloidali, le tecniche ottiche possono determinare la natura chimica, le caratteristiche geometriche delle fasi, il loro stato di aggregazione o di flocculazione, ecc.

#### Ricerca dell'**amianto**

Ci limitiamo a pochi cenni poiché esiste un'ampia letteratura in merito; si veda: Sini, "Tecniche per la ricerca dell'amianto...", art. n° 26 in questo sito; Zielhuis, 1977; Schmidt, 1960; Heidermanns, 1973; Spurny et al., 1976; Monkman, 1979; McCrone, 1980; Julian e McCrone, 1970.

Da molti anni sono chiariti i danni provocati nell'uomo dall'inalazione e dall'ingestione di polveri di amianto, almeno in abito fibrillare, e si stanno definendo le soglie massime tollerabili intese come esposizione media, nell'unità di tempo, della popolazione generale. La ricerca dell'amianto si compie quindi in aria, in acqua, nei cibi, nel terreno, in vari manufatti (come molti materiali isolanti termici ed acustici). Poiché i materiali isolanti contenenti amianto sono stati largamente usati in molti edifici per le ottime caratteristiche tecniche ed il basso costo, il contenzioso giuridico è ampio.

Non descriviamo le tecniche di campionatura, descritte altrove: filtrazione dell'aria con filtri a membrana, precipitazione elettrostatica, precipitazione termica, centrifugazione (nel caso di liquidi). Per avere una valutazione dell'esposizione totale subita da una persona in caso di morte per sospetta asbestosi, niente di meglio che dosare il deposito di amianto nei tessuti polmonari prelevati in sede di autopsia. Andrà in questo caso tenuto conto della

capacità di quei tessuti di eliminare le fibre più piccole con meccanismi biologici (fagocitosi); tale capacità non è trascurabile nel caso del crisotilo.

La ricerca dell'amianto deve fornire i dati sulla o sulle specie mineralogiche presenti (almeno sei diversi minerali rientrano nel gruppo dell'amianto), su altri materiali presenti, sulle dimensioni medie delle fibre e sulla curva di distribuzione delle dimensioni. Il campione va trattato in modo da eliminare o disaggregare i componenti estranei ed i leganti.

Fra le tecniche in uso, vi sono la diffrazione dei raggi X e degli elettroni, la microscopia elettronica, la spettroscopia in IR, ecc., ma la più diffusa, la più esauriente e la più economica è certamente la microscopia ottica, che è forse l'unica a consentire l'analisi su singole particelle. Inoltre, certe grandezze, come il pleocroismo e l'abito cristallino, si possono rilevare solo al microscopio ottico e con ciò stabilire se un dato minerale è dannoso (se fibroso) o inerte (se granulare). Anche le fibre in vetro sono difficili da rilevare con altri strumenti. Così pure le differenti varietà di uno stesso minerale, le componenti organiche, le fibre vegetali di qualunque tipo (spesso confuse con l'amianto se si usano tecniche semplificate).

Anche la curva di distribuzione delle dimensioni si può rilevare solo al microscopio ottico.

Come risulta dalla letteratura citata, le metodiche d'indagine ottiche sono molteplici, ognuna con vantaggi e svantaggi, spesso adatte ad un solo tipo di materiale. I differenti laboratori usano tecniche diverse, anche nello stesso paese, per cui i risultati raramente sono comparabili. Anche la legislazione in merito non è omogenea.

La scuola europea, che ha dietro di sé oltre un secolo di ricerca mineralogica e petrografica, punta sul pieno sfruttamento delle possibilità del microscopio polarizzatore, che fornisce dati assai esaurienti. La scuola americana invece punta tutto sulla misura degli indici con l'immersione colorata: tecnica più semplice, che non richiede all'operatore grande preparazione. Al microscopio polarizzatore si misura direttamente la birifrazione; con l'immersione colorata, si ricava la birifrazione dai valori degli indici. Anche il pleocroismo, il carattere positivo o negativo della birifrazione e l'angolo di estinzione si possono misurare con entrambe le tecniche, che fanno pur sempre uso di radiazione polarizzata.

In Italia, viene spesso usata una tecnica assai semplificata, basata sul contrasto di fase, che però produce gravi errori in eccesso in quanto non può discriminare fra amianto e materiali fibrosi innocui, assai diffusi, come la cellulosa in tutte le sue forme. Tale tecnica, inoltre, non consente di identificare le differenti specie mineralogiche di amianto.

Sulla misura degli indici (rifrattometria) si è già parlato e, per le applicazioni all'identificazione dell'amianto, vedi la letteratura citata sopra.

## 7 – MISURE SULLE TRACCE DI RADIAZIONI IONIZZANTI

La tecnologia nucleare si sta moltiplicando negli ambiti della ricerca, dell'industria e della medicina: ricerca in fisica nucleare, ricerca con o sui materiali radioattivi, ricerca farmacologica, terapie mediche con l'uso di radiazioni, diagnostica radiologica, produzione di energia nucleare, ecc. Tutto il personale addetto è soggetto ad esposizione a radiazioni ionizzanti.

Si può trattare di radiazioni elettromagnetiche (gamma, X, UV), di particelle cariche (alfa, beta, protoni, ecc.) o neutre (neutroni in un amplissimo intervallo di energia).

Tali radiazioni possono avere effetti nocivi sull'uomo e sugli animali, sia a breve termine (effetti somatici), sia a lungo termine (effetti stocastici, sia genetici che neoplastici).

Occorre quindi dare una valutazione quantitativa della intensità ed energia delle radiazioni, così come delle modalità di rilascio di quell'energia nei tessuti.

Di questi problemi si occupa la **dosimetria**, che si avvale di "rivelatori", strumenti o materiali in cui le radiazioni inducono qualche modificazione misurabile.

Accenniamo ai rivelatori suscettibili di un successivo esame al microscopio ottico. Si

tratta di lamine in cui è possibile evidenziare, dopo opportuno trattamento, la traiettoria di alcuni tipi di particelle in forma otticamente evidente. È questo un campo ampiamente trattato in letteratura (Bartlett et al., 1975; Castellucci, 1976; Cavallini, 1973; Fleischer e Price, 1963; Portal, 1963; ecc.).

Vediamo dunque i rivelatori che si possono esaminare al microscopio per valutare quantitativamente non le radiazioni stesse, ma i loro effetti sul rivelatore.

- Emulsioni fotografiche, generalmente di tipo speciale;
- Materiali naturali (minerali, come le miche)
- Materiali artificiali inorganici (vetri ai fosfati contenenti fosfati alcalini e metafosfato d'argento)
- Materiali artificiali organici: polimeri del tipo dell'acetato di cellulosa, nitrato di cellulosa, policarbonati (il ben noto CR 39), mylar (terefalato di polietilenglicole), ecc.

### **Emulsioni fotografiche**

I tipi di emulsioni dette “nucleari” differiscono da quelle usuali in B – N per un basso livello di “velo”, grana fine, bassa sensibilità alle radiazioni elettromagnetiche, ecc.

Sono adatte per piccole dosi di neutroni veloci e, con opportuni accorgimenti, di neutroni intermedi e termici. Il meccanismo di formazione delle tracce è complesso e non del tutto chiaro: ionizzazione, azione mediata di protoni di rinculo, ecc.

Dopo opportuno trattamento di sviluppo, ogni particella lascia nell'emulsione una “traccia”, una serie riconoscibile di granuli d'argento ma, purtroppo, il numero di tracce non dipende solo dal flusso di neutroni, ma anche dalla loro energia. Il rapporto fra numero di tracce e “dose” dipende da fattori non sempre quantizzabili: i corpi circostanti il rivelatore, il rivestimento, il corpo stesso della persona, insensibilità del rivelatore al di sotto di una certa soglia di energia, sensibilità ai raggi X, affievolimento delle tracce col tempo (“fading”), ecc.

Nella composizione della gelatina, dello spessore di 20 – 30  $\mu$ , entrano elementi speciali che mirano a modificare la risposta del sistema. La gelatina è deposta su un supporto in materiale plastico, di qualche decimo di mm di spessore, oppure in vetro.

Il diametro dei granuli d'argento metallico, perfettamente opachi, che si formano nell'emulsione oscilla fra 0,5 ed 1  $\mu$ , ben al di sopra del limite di percezione<sup>32</sup> (non di risoluzione) di un obiettivo a secco di media apertura.

Una traccia può essere costituita anche solo da due o tre granuli, ma in tal caso si confonde con un allineamento casuale, statisticamente possibile, di granuli. In pratica, si pone quindi un limite inferiore di cinque granuli, pochi  $\mu$  di lunghezza. Un allineamento di tre granuli corrisponderebbe alla traccia di un protone di 0,25 MeV; uno di quattro granuli a 0,425 MeV. Si può quindi affermare che la soglia di sensibilità di un'emulsione “nucleare” è dell'ordine di 0,5 Mev.

Il limite superiore per la lunghezza di una traccia è legato all'energia del neutrone incidente. Un protone di rinculo di 100 MeV può dare una traccia (spessore di emulsione permettendo) di oltre 20 mm. Dopo queste precisazioni, la densità delle tracce (numero di tracce per unità di superficie di emulsione) si può considerare abbastanza proporzionale alla dose.

Il “velo” di fondo dell'emulsione, dato dai granuli d'argento sparsi casualmente, è legato a varie cause. Lo si può ridurre con vari accorgimenti, ma mai eliminare.

Vi sono poi i graffi che si formano in vari momenti sulla superficie dell'emulsione, ma li si riconosce per non essere formati da granuli discreti e per giacere sulla superficie, ed essere quindi a fuoco per tutta la loro lunghezza. Allo stesso modo si riconoscono corpi estranei allungati, come fibre, peli, ecc.

Le caratteristiche del **microscopio** più adatto alla “lettura”, cioè al conteggio delle tracce, non sono molto stringenti. Va bene la normale osservazione in “campo chiaro” con obiettivi a secco medio-forti: il contrasto nell'oggetto è molto forte. Nonostante molti autori seguano

---

<sup>32</sup> Per un disco opaco su fondo chiaro, il limite di percezione è  $0,12 \lambda / NA$ , in cui NA può essere la media fra le aperture dell'obiettivo e del condensatore. In quelle condizioni, il limite di risoluzione sarebbe circa pari a  $0,6 \lambda / NA$ .

strade diverse, non sono necessari né obbiettivi ad immersione, né obbiettivi planari. Semmai, lavorando a secco con obbiettivi forti, non è possibile osservare direttamente l'emulsione poiché i normali obbiettivi sono progettati per lavorare con un coprioggetto dello spessore standard di  $d = 0,17$  mm. L'omissione del coprioggetto significa l'introduzione di una forte aberrazione sferica e quindi perdita di definizione. Il problema si risolve appoggiando sul rivelatore un semplice copri-oggetto<sup>33</sup> oppure usando obbiettivi per episcopia, calcolati appunto per lavorare senza coprioggetto (contrassegnati con la sigla  $d = 0$  oppure O.D. ("Ohne Deckglas" = senza coprioggetto, in tedesco)).

L'uso di **obbiettivi** a secco elimina l'uso dell'olio "da immersione". Si tenga conto che un obiettivo ad immersione fornisce il massimo delle sue prestazioni, in particolare della risoluzione, solo se l'immersione è "doppia", cioè si realizza una continuità ottica fra obiettivo e condensatore; in parole povere, occorre mettere olio in tutte le intercapedini: obiettivo-rivelatore, rivelatore-eventuale piastra di appoggio (vetro o plastica), piastra-condensatore. Se non si pone l'olio fra oggetto e condensatore, l'apertura utile del condensatore non può superare 0,95 (si tratta del seno di un angolo) e la risoluzione massima dell'obiettivo ad immersione non può essere raggiunta: cose ben trattate in letteratura (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Capp. 16 e 21.5). L'omissione della doppia immersione fa perdere in parte i vantaggi dell'immersione dell'obiettivo.

L'ingrandimento ottimale dell'obiettivo può essere 40:1. Anche se la traccia è percettibile con minori ingrandimenti, come detto sopra, è bene che il potere risolutivo dell'obiettivo sia simile al diametro minimo dei granuli d'argento (0,5  $\mu$ m), il che richiede un'apertura di circa  $NA = 0,6$ . Ciò consente all'operatore di riconoscere la struttura delle tracce e lo facilita, se è affetto da qualche limitazione di visus.

Molti autori tendono ad usare ingrandimenti maggiori, ma si ricordi: la brillantezza dell'immagine diminuisce – si ha minore profondità di fuoco – minore superficie del campo visuale (quindi, necessità di esplorare un maggior numero di campi<sup>34</sup>) – maggiore instabilità laterale dell'immagine in seguito a vibrazioni dello stativo – minore "distanza di lavoro" fra obiettivo ed oggetto - minore diametro della pupilla d'uscita dell'oculare, e quindi maggiore contrasto per ogni difetto delle lenti (polvere) o dell'occhio ("mosche volanti", vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 9). Un ingrandimento maggiore può essere utile quando la densità delle tracce ed il "velo" sono forti.

Per quanto riguarda il tipo di correzione degli obbiettivi, non si tratta di un fattore decisivo; ovviamente, gli obbiettivi più corretti hanno in genere una maggiore apertura, e ciò comporta una maggiore risoluzione, ma diminuisce la profondità di fuoco, e ciò rende più difficile riconoscere le tracce molto inclinate: al limite, una traccia quasi parallela all'asse ottico viene vista come un semplice puntino.

Gli **oculari** dovranno essere del tipo compensatore per gli obbiettivi classici, acromatici forti ed apocromatici, di tipo acromatico per i moderni obbiettivi CF. L'ingrandimento più utile è  $10 \times$  o  $15 \times$ . Il tubo bioculare è da preferire poiché consente la fusione psichica di due immagini retiniche, ma non è privo di inconvenienti, fra cui la necessità di ulteriori regolazioni: distanza inter-pupillare e correzione diottrica separata per i due occhi.

L'osservazione con gli oculari viene a volte sconsigliata per tre motivi: 1) obbliga l'operatore a stare per ore con una posizione fissa del capo; la pupilla d'uscita dell'oculare ha un diametro anche inferiore ad 1 mm, e lì deve stare la pupilla dell'occhio; 2) le piccole dimensioni della pupilla rendono più evidenti le "mosche volanti" (vedi sopra); 3) molte persone tendono a focalizzare per un'immagine virtuale ravvicinata e quindi ad "accomodare" inutilmente ("effetto del tubo", vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 4.2 e 24.1.2); ciò crea spesso forti cefalee.

Per evitare gli oculari, si può proiettare l'immagine su uno schermo diffondente, ma la brillantezza dell'immagine sarà sempre insufficiente. Maggiore brillantezza si ottiene proiettando l'immagine da dietro, su un schermo traslucido, del tipo del vetro smerigliato; questa

<sup>33</sup> Si curi che il coprioggetto abbia lo spessore nominale (di solito 0,17 mm, corrispondente al  $n^\circ 1 \frac{1}{2}$ ), con una tolleranza di  $\pm 0,01$  mm per gli obbiettivi più forti.

<sup>34</sup> Per es., passando da un obiettivo 63:1 ad un 100:1, il rapporto fra le superfici dei campi visuali è 1:2,5.

soluzione ha l'inconveniente di mostrare sovrapposta all'immagine la "grana" del vetro smerigliato, e per evitare questo fastidio vari costruttori sono ricorsi a soluzioni più complicate e costose (schermi oscillanti o rotanti). Il vetro smerigliato è in genere accoppiato con una lente di Fresnel convergente, al fine di assicurare una brillantezza omogenea su tutta la superficie dello schermo.

Per quanto riguarda il **condensatore**, è consigliabile un tipo "corretto" (acromatico-aplanatico), anche se più costoso. Un condensatore normale produce un'immagine del diaframma di campo affetta da aberrazioni che, dato il forte ingrandimento, producono luce diffusa e perdita di contrasto (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 21.7). La focale del condensatore deve essere abbastanza piccola affinché l'immagine del diaframma di campo non sia più grande del campo visuale; in caso contrario, altra luce diffusa e perdita di contrasto (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 21.1); parallelamente, si avrebbe anche una perdita di luminosità (vedi l'art. n° 5 in questo sito: "La resa fotometrica...").

Quando si rinuncia alla doppia immersione, cioè sempre, è bene che il condensatore sia calcolato per lavorare a secco, con apertura più grande possibile.

Utile sarà introdurre in un punto qualunque del sistema illuminante un filtro anticalorifico: l'osservazione è sempre prolungata e l'emulsione non è indifferente al riscaldamento. Vi sono ottimi filtri in vetro (come il classico KG 1 della Schott) ma quelli interferenziali si scaldano meno.

Per ragioni di costo e di praticità, la **sorgente** più usata è ad incandescenza. Per l'osservazione visuale può bastare una potenza di 20 W, ma con gli schermi smerigliati occorrono almeno 50 W.

Uno dei problemi nell'osservazione delle emulsioni nucleari è dato dal fatto che le tracce sono spesso non parallele alla superficie dell'emulsione. Supponendo un'inclinazione media di  $45^\circ$  ed una lunghezza media della traccia di  $10 \mu$ , lo sviluppo in profondità della traccia media è di  $7 \mu$ . Gli obbiettivi forti usati nel nostro caso hanno una profondità di fuoco di meno di  $1 \mu$ , e la traccia risulterà in buona parte sfocata. Per vederla a fuoco in tutta la sua lunghezza, vi sono vari espedienti.

-- Muovere di continuo la micrometrica; l'operatore deve controllare di continuo tutto il campo per identificare gli aggruppamenti di granuli che si spostano lateralmente durante a focalizzazione, rivelando di essere allineati e quindi di appartenere alla stessa traccia.

-- Variare meccanicamente il fuoco in modo periodico, con vari espedienti meccanici od elettro-meccanici (Bartlett et al., 1975); l'operatore ha le mani libere.

-- Sfruttare l'aberrazione cromatica (Courtney e Pratt, 1973). Si usano obbiettivi speciali provvisti ad arte di una forte cromatica longitudinale. Un granulo d'argento a fuoco, ad es. per il "rosso", sarà sfocato per il resto dello spettro ottico ed apparirà con un alone bluastrò: una traccia inclinata per un notevole spessore appare con un colore che varia lungo di essa.

-- Montare il rivelatore su un sopra-tavolino inclinato, che scorre nella direzione dell'inclinazione con moto regolare. Il piano di miglior fuoco (MF in fig. 10) taglia buona parte dello spessore dell'emulsione (E); se quest'ultima si muove nella direzione della freccia, nell'immagine appare l'intero spessore dell'emulsione, il piano MF esplora per piani successivi un intero volume all'interno dell'emulsione. Durante l'esplorazione, la messa a fuoco non viene alterata, ma l'operatore deve tener d'occhio tutto il campo visuale: se si concentra su una traccia (che si muove lungo la direzione di movimento del rivelatore) può non vedere un'altra traccia che sta scomparendo in un'altra parte del campo. Con questa tecnica, è poco pratico l'uso dell'immersione e del coprioggetto; conviene usare obbiettivi episcopici, senza lamella. Vedi: Cooke, 1958; Portal, 1963.

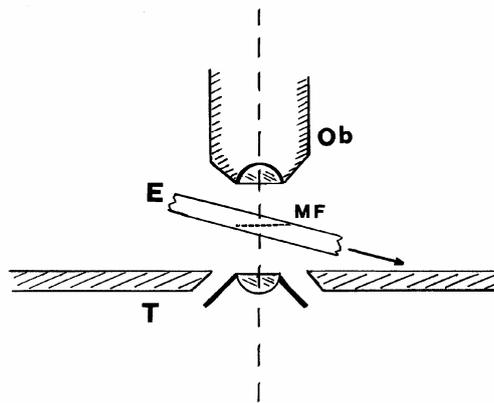


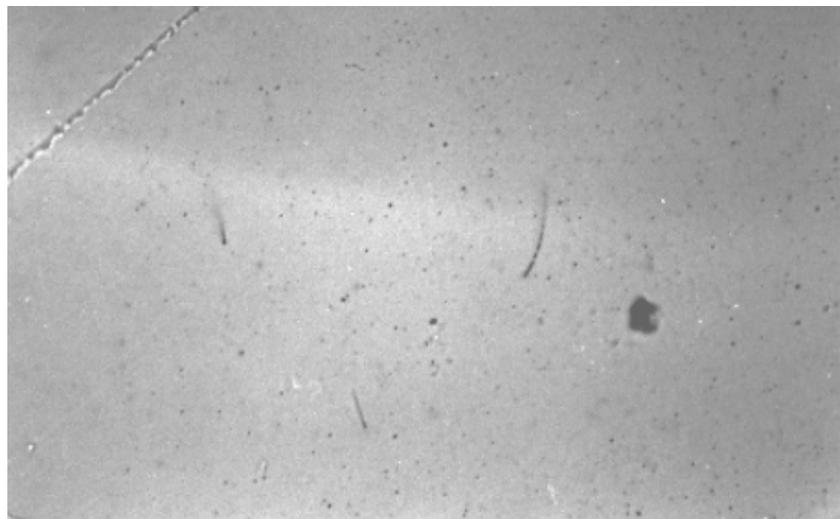
Fig. 10 – Schema del sistema a tavolino inclinato per l'osservazione dell'intero spessore di un'emulsione fotografica. Ob è l'obiettivo; T è il tavolino.

-- Chiudere il diaframma d'apertura del condensatore; come è noto, ciò abbassa luminosità e risoluzione. Meglio è inserire nel condensatore un diaframma anulare, del tipo per contrasto di fase; la risoluzione, in linea di principio, può leggermente aumentare<sup>35</sup> ed il contrasto diminuire, ma comunque si perde luminosità.

Per aumentare la visibilità delle tracce molto inclinate, qualche autore propone l'uso del fondo scuro. La ragione sarebbe questa: in campo chiaro, un granulo sfocato scompare appena è fuori fuoco poiché la sua immagine perde rapidamente contrasto. Invece, in fondo scuro, un granulo rimane visibile anche se molto sfocato poiché è pur sempre chiaro su fondo scuro.

Purtroppo, fra la teoria e la pratica c'è di mezzo il mare, e le immagini che seguono consentiranno al lettore di capire da solo come vanno le cose.

745



<sup>35</sup> A causa di un'alterazione della figura di diffrazione.

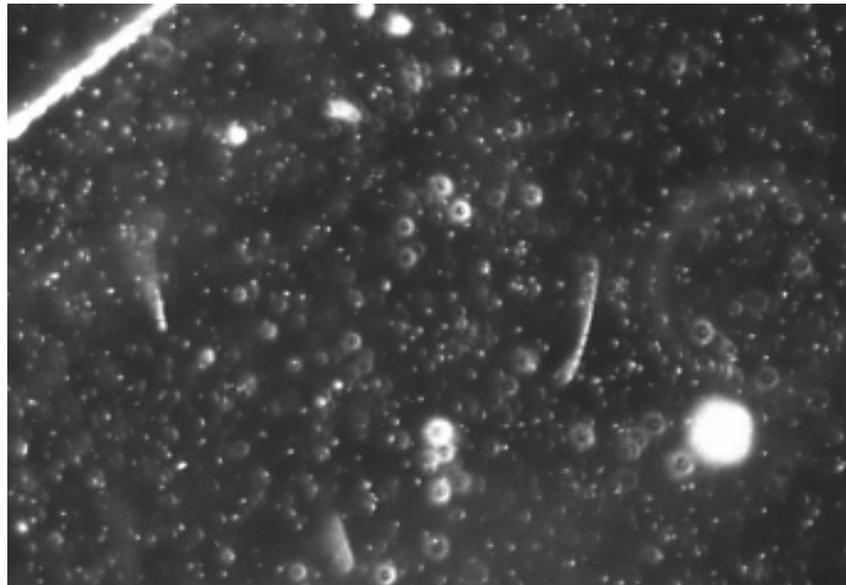


Fig. 11 - Emulsione per neutroni veloci tipo NTA, osservata in campo chiaro e scuro. Si può confrontare nei due casi la visibilità di due tracce oblique, entrambe con una profondità di  $20 \mu$ . Obb. 40:1; ocul.  $6 \times K$ . 360:1 sul negativo  $24 \times 36$

Altro problema è quello di esplorare la massima superficie possibile del rivelatore. Una facilitazione per l'operatore è il movimento elettricamente comandato o interamente automatico del tavolino. Lo stativo può essere concepito per dare incrementi costanti ad una coordinata del tavolino e, al termine della traslazione in quella direzione, dare un incremento in direzione ortogonale ed invertire il senso nella prima direzione; l'oggetto può così essere esplorato per linee parallele equidistanti. L'elettronica di comando può fornire spostamenti di varia lunghezza ad intervalli di tempo variabili entro ampi limiti, su un'estensione variabile del campo. Vi possono essere arresti automatici, che bloccano il tavolino quando è stata esplorata una data superficie di emulsione.

Un contatore, manuale o a pedale, può aiutare l'operatore a memorizzare il numero di tracce riconosciute.

Sono stati progettati anche sistemi totalmente automatici di riconoscimento e conteggio delle tracce. Ma i problemi sono molti:

- la traccia non è una linea continua, è formata da granuli che si possono confondere col velo, specie se non sono perfettamente allineati;
- la densità dei granuli non è costante lungo la traccia, ma aumenta via via che la particella perde energia;
- la traccia può essere inclinata in tutti i modi possibili e, come già detto, solo una parte di essa può risultare a fuoco;
- per rivelare tutte le tracce è necessario esplorare tutto lo spessore dell'emulsione.

Per il riconoscimento automatico delle tracce sono state battute varie strade:

- ++ esplorazione meccanica dell'immagine con un sistema di specchi girevoli (Douglas, 1969);
- ++ esplorazione ottica (tecnica del "flying spot"): il piano dell'oggetto viene esplorato da un fascio fortemente concentrato ("spot") per linee parallele, come in un "raster" televisivo; occorre una successiva elaborazione digitale dei segnali;
- ++ esplorazione elettronica analogica o digitale con tecniche televisive e successiva elaborazione elettronica dei dati; è forse la strada più promettente.

Il risultato di tutti i tentativi in direzione dell'automazione è che gli errori sistematici rimangono elevati.

### Rivelatori solidi

A partire dal 1962, dati i forti svantaggi dell'emulsione fotografica, la lentezza dell'analisi manuale e l'imprecisione dell'analisi automatica, si è introdotto un rivelatore-dosimetro costituito da materiale trasparente (mica, vetri speciali, resine sintetiche polimerizzate come il policarbonato CR 39, assai usato in ottica) di spessore fra 0,1 ed 1 mm.

Il passaggio di certe particelle in questi materiali provoca nella struttura chimico-fisica alcuni danni, che un successivo attacco chimico rende evidenti sotto forma di fossette di varia forma e dimensioni, come si vede in fig. 12, 15 e 16 (Price e Walker, 1962; Rustichelli, 1976, ecc.).

781

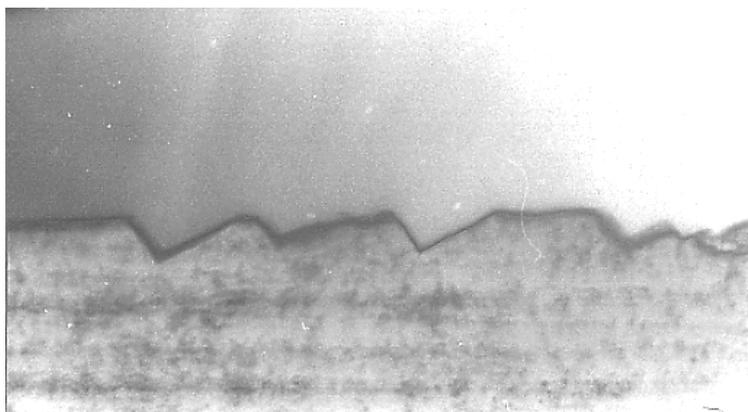


Fig. 12 – Rivelatore in CR 39 bombardato con particelle a bassa penetrazione. Si vede una sezione del rivelatore; la linea mediana della figura rappresenta la superficie superiore di esso; le intaccature triangolari in questa linea rappresentano la sezione di fossette coniche; l'asse del cono è inclinato poiché le particelle provenivano dall'alto a destra; il cono ha forte apertura poiché la particella ha perduto rapidamente energia ed è penetrata poco nel rivelatore. Viste dall'alto, queste fossette avrebbero un contorno ellittico (sezione non retta di un cono).

I rivelatori solidi sono insensibili alle radiazioni elettromagnetiche (ottiche, X,  $\gamma$ , ecc.), non sono soggetti al “fading”, ecc. Le tracce, dopo l'attacco chimico, hanno dimensioni di 2 – 20  $\mu$  e quindi si possono osservare a basso ingrandimento, a secco, con un obiettivo 20:1; esse mostrano un forte contrasto e, formandosi alla superficie della lastrina, si possono vedere tutte simultaneamente a fuoco: il conteggio automatico è assai facilitato (Amayr e Gais, 1977; Azimi-Garakani, 1977; Di Liberto e Ginobbi, 1977; Douglas, 1969; Schott et al., 1977).

Per l'esame visuale, come già detto, basta un obiettivo debole; un 20:1/0,45 normale dovrebbe lavorare con una lamella standard dello spessore  $d = 0,17$  mm. Per semplificare le operazioni e non avere le note perdite di risoluzione, è bene quindi usare obiettivi episcopici ( $d = 0$ ). Poiché le tracce sono disposte su un piano, è utile un sistema planare.

Come condensatore, può andar bene il classico modello “di Abbe”, privato della lente frontale.

Il diaframma di campo sarà aperto a metà strada e ciò può rendere non omogeneo il campo illuminato<sup>36</sup>; in questo caso, può bastare un filtro smerigliato, possibilmente posto sotto il condensatore. La microlampada può essere del tipo normale, con ampolla “al quarzo-iodio” o “ad alogeni”, da 10 o 20 W.

Come tecnica d'osservazione, può essere sufficiente il campo chiaro (figg. 15 e 16). Piesch (1971) consiglia il contrasto interferenziale, che può essere ottenuto in vari modi e produce contrasti forti, anche a colori (Sini, 1968).

Semmai, può essere difficile discriminare fra tracce poco profonde e granulosità della superficie del rivelatore. Una discriminazione si può avere da un semplice apprezzamento della profondità delle fossette, anche senza una misura precisa. Ciò si può avere dalla manovra della micrometrica (mettere a fuoco prima l'orlo e poi il fondo della fossetta) oppure con metodi interferenziali (le differenze di livello si possono tradurre in differenze di colore). Anche il fondo scuro unilaterale o l'illuminazione obliqua (vedi il manuale “Problemi tecnici

<sup>36</sup> Ciò può dipendere da una cattiva correzione del collettore.

della microscopia...”, Cap. 30.2 e l’art. n° 2: “Sguardo generale ai metodi d’illuminazione...”, in questo sito) possono dare ottimi risultati con mezzi semplici ed economici: basta disporre di un condensatore con apertura massima superiore a quella dell’obbiettivo, come un normale condensatore di Abbe.

Sarebbe da escludere il contrasto di fase poiché non dà la sensazione del rilievo.

Il conteggio delle tracce può essere ottenuto manualmente con metodi semplici, come si fa per la conta dei globuli del sangue (vedi sopra, il paragrafo “Analisi automatiche”) o dei granuli di polvere, e cioè con oculari muniti di reticolo quadrettato. Il conteggio automatico è possibile con uno dei molti apparecchi oggi presenti sul mercato, che contengono ovviamente anche un’elaborazione elettronica dei dati.

Anche la misura delle dimensioni delle fossette ed il rilevamento della curva di distribuzione delle dimensioni può essere ottenuto manualmente, con metodi classici, o per via automatica. Dalla curva di distribuzione è possibile a volte discriminare fra tracce vere e “fondo”, almeno quando la distribuzione statistica delle dimensioni delle due categorie di oggetti è differente.

Per la misura manuale dei diametri delle fossette, come per ogni altra misura geometrica su qualunque oggetto, è praticissimo l’uso di un **tubo da disegno**. Ne abbiamo accennato nel paragrafo “Misure di lunghezza”, ma vale la pena di entrare in qualche dettaglio.

Un tubo da disegno classico (fig. 13; vedi anche il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 27.7.2) consta di un accessorio che si interpone fra tubo di osservazione e revolver o braccio. Il “corpo” (a destra in figura 13) si interpone quindi fra obbiettivo ed oculare; esso contiene uno specchio semiriflettente a 45° sull’asse; all’estremità libera, a sinistra, si trova uno specchio, sempre a 45°.

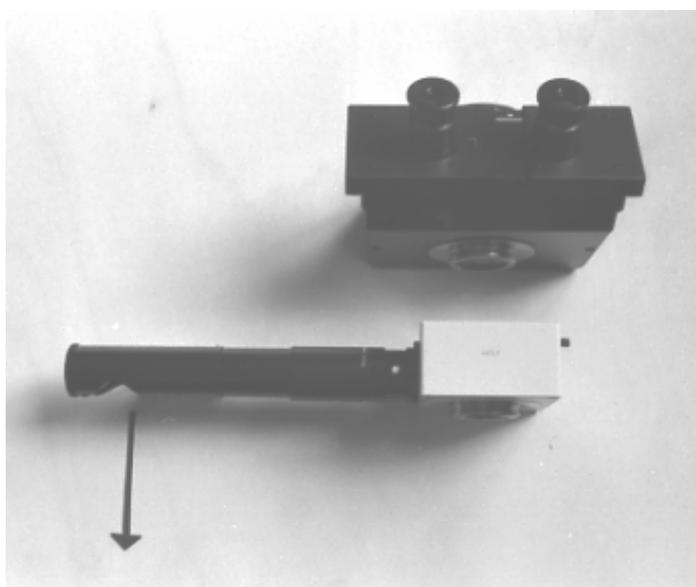
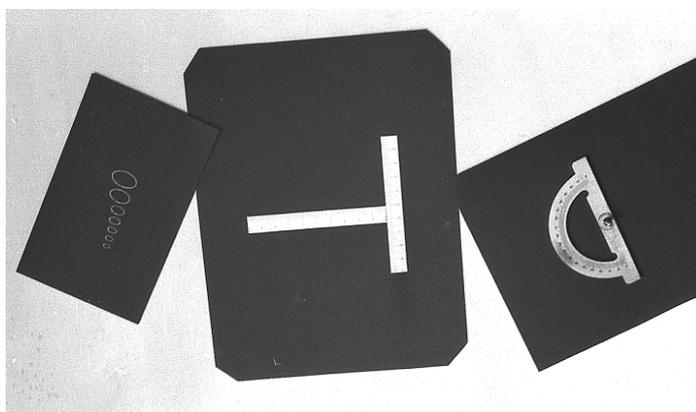


Fig. 13 – Tubo da disegno Leitz; inferiormente, il corpo del tubo (scatola chiara a destra) presenta una coda di rondine per il fissaggio al braccio del microscopio; sopra, il tubo reca l’alloggiamento della testata bioculare.

Il tutto strutturato in modo che, guardando negli oculari, si vede l’oggetto ma, sovrapposto ad esso, appare il piano del tavolo; il tubo da disegno “guarda” verso il basso attraverso l’estremità libera, secondo la freccia nera a sinistra di fig. 13.

Fig. 14: Alcune sagome su cartoncino nero da porre sotto il tubo da disegno. Neg. 775-778



Supponiamo ora di porre sul tavolo, sotto il tubo, una graduazione, un goniometro, una serie di sagome disegnate ad hoc (fig. 14). Queste graduazioni o queste sagome si vedranno sovrapposte all’oggetto; dopo opportuna calibrazione, le graduazioni permetteranno di eseguire misure di lunghezze, angoli o superfici (per gli angoli, a dire il vero, non occorre calibrazione, come per gli oculari

goniometrici).

Disponendo di disegni “di confronto” (figure irregolari, profili speciali, ecc.) è possibile controllare la corrispondenza del profilo di un oggetto con una sagoma di riferimento (controllo di filetti, di minuterie meccaniche, ecc.).

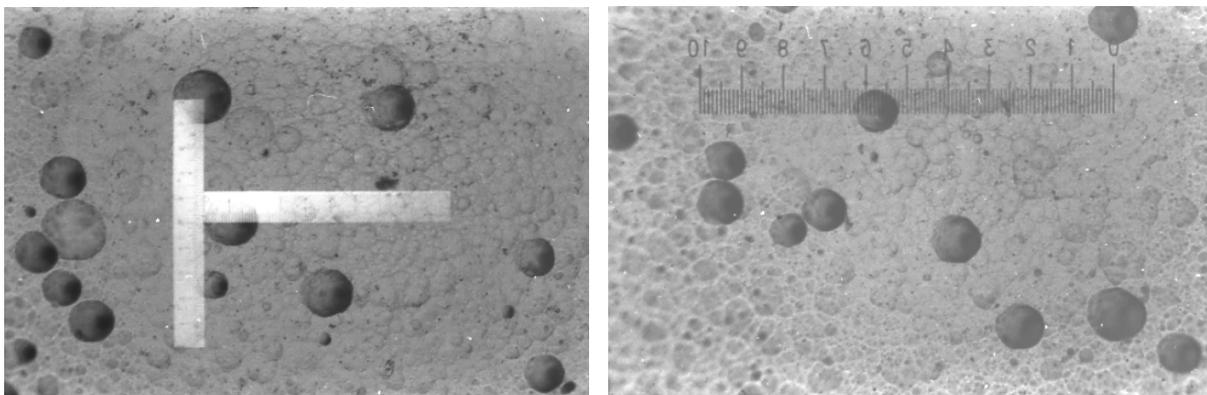


Fig. 15 e 16 – Rivelatori in CR 39, come in fig. 12, osservati da sopra, dalla parte da cui proveniva il fascio di particelle. Le macchie circolari rappresentano l’orlo della fossetta conica.

A sinistra, l’osservazione avviene attraverso un tubo da disegno; sovrapposto all’oggetto, si vede una doppia graduazione poggiata sul piano del tavolo, che si può spostare a mano.

A destra: lo stesso oggetto osservato attraverso un normale oculare micrometrico. La graduazione è fissa e l’oggetto si deve spostare a mezzo del tavolino per portarlo a sovrapporsi alla graduazione.

Questa possibilità di confronto è preziosa per classificare particelle in gruppi dimensionali, senza una misura esatta: dovendo valutare oggetti a sagoma ellittica, ad es., si può preparare un cartoncino con disegni di ellissi della stessa orlatura e confrontare ogni particolare oggetto con una delle sagome di dimensioni crescenti (fig. 14, cartoncino a sinistra). Le dimensioni assolute corrispondenti ad ogni sagoma si stabiliranno con una normale calibrazione, come si fa cogli oculari micrometrici.

A questo punto, si potrebbe osservare che tutto si svolge come in un normale oculare micrometrico: si sovrappone una graduazione od una sagoma all’immagine dell’oggetto.

Ma il tubo da disegno offre alcuni fondamentali vantaggi:

++ la graduazione si trova sul tavolo e si può spostare a mano fino a farla sovrapporre esattamente all’oggetto, curando che un lato dell’oggetto coincida con una divisione principale della graduazione. In un oculare micrometrico, occorre ogni volta spostare il tavolino, con due diverse manopole, per avere la stessa coincidenza. A forte ingrandimento, questa manovra è ostacolata dalle irregolarità dei movimenti, dai giochi, dalle isteresi, ecc.

++ se l’oggetto è ovale o irregolare, occorre ruotare l’oculare micrometrico o il tavolino finché la graduazione risulta parallela ai diversi diametri che si devono misurare. Una graduazione sul tavolo si muove a mano come si vuole, e non occorre muovere l’oggetto; con due graduazioni in croce (cartoncino centrale in fig. 14) non occorre neppure ruotare la graduazione per misurare due dimensioni fra loro ortogonali;

++ qualunque sia il problema (graduazioni semplici, quadrettature per il conteggio di particelle, angoli, sagome speciali per classificazione dimensionale rapida o per confronto di profili, ecc.), è possibile in pochi minuti costruirsi la figura più opportuna.

Ovviamente, per prevenire una perdita di contrasto, occorre poggiare le graduazioni (un doppio decimetro, un piccolo goniometro, ecc.), oppure disegnare le sagome speciali, su cartoncino nero. Le graduazioni andranno illuminate in modo tale (può bastare l’illuminazione ambiente) da non nascondere l’immagine dell’oggetto.

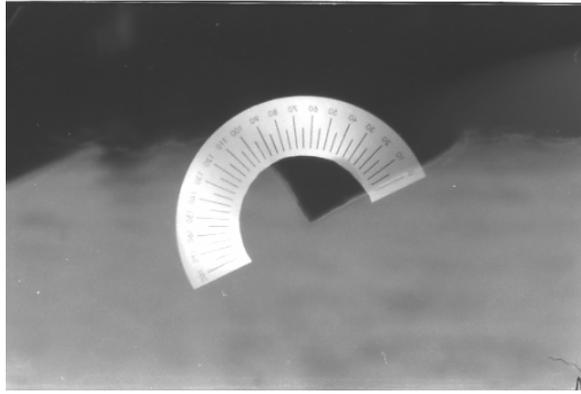


Fig. 17 – Lo stesso oggetto di fig. 12, osservato in campo scuro attraverso un tubo da disegno; sul piano del tavolo è poggiato un comune goniometro che consente misure di angoli.

## BIBLIOGRAFIA

Per una rassegna ampia e rigorosa di tutti i campi della microscopia, rimandiamo al seguente compendio ed alla ricca bibliografia in esso presente:

BEYER H. e RIESENBERG H. – Handbuch der Mikroskopie, 488 pagg. – Veb Verlag Technik, Berlin (1988). In particolare i capp. 9 e 10.

ABMAYR W., GAIS P. et al. – Real time automatic evaluation of solid state nuclear track detectors with on-line TV device – Nucl. Instrum. Methods, 147 (1), p. 79 (1977)

ALLEN T. – Particle size measurement – Chapman and Hall, London (1968)

AZIMI-GARAKANI D. e WILLIAMS J.G. – Automatic fission track counting using the Quantimet 720 – Nuclear Instrum. Methods, 147 (1), p. 69 (1977)

BARER R. e COSSLETT V.E. – Advances in optical and electron microscopy – Academic Press, N.Y. (1966).

BARTLETT D.T. et al. – A study of the NRPB fast neutron Personal Monitoring Service – NRPB – R 40 – Harwell Oxon OX 11 ORQ (1975)

BATEL W. – Korngrossen messtechnik – Stringer Verlag (1960).

BEHRENS T.H. e KLEY P. – Organische Mikrochemische Analyse – L. Voss, Leipzig (1922). Tradotto in inglese da STEVENS R.: Microscope publications Ltd (1969).

BENEDETTI-PILCHER A.A. – Identification of materials via physical properties, chemical tests and microscopy – Academic Press, N.Y. (1964).

BENNETT J.M. e BENNETT H.E. – Polarisation (in “Handbook of optics”), Mc Graw-Hill Book Company, N.Y. (1978)

BEREK M. – Die anisotrope Aufhellung zwischen gekreuzten Nicols im Auflicht – Optik, 2, p. 332 (1947)

BERGNER J. – Optical axial angle measurements using the polarisation microscope – Feingerätetechnik, 6, p. 103 (1957)

BERTOLDI G. – Phase contrast in mineralogy as an aid to the determination of the refractive index by means of the immersion method – Neues Jh. Mineral. Mh., 10-18 (1959)

BEUGNIES A. – Phénomènes d'optique cristalline observables par réflexion convergente de la lumière sur les surfaces polies – Bull. Soc. Belge Geol., 67, p. 489 (1958)

BEUGNIES A. – Ellipsométrie par réflexion normale de la lumière sur les sections anisotropes – Leitz Informations, II, 1, p. 9 (1970)

BEYER H. – Equipment for microscopic refractometry – Jena Review, 1, p. 97 (1973)

BEYER H. – Interference-microscopic determination of refractive index and size of small grain refractions – Jena Review, 3, p. 176 (1973)

BONATTI S. e FRANZINI M. – Cristallografia mineralogica – Boringhieri, Torino (1984)

BURRELS W. – Industrial microscopy in practice – Morgan and Morgan, Hastings on-Hudson, N.Y. (1964).

CADLE R. D. – Particle size: theory and industrial applications – Reinhold, N.Y. (1965).

CAMERON E.N. – Rotation properties of certain anisotropic ore minerals – Ec. Geol., 56, p. 569 (1961)

CASTELLUCCI E. – Studio dei rivelatori a tracce e loro applicazione in un dosimetro ad albedo per neutroni – Tesi di laurea, Bologna (1976)

CAVALLINI A. – Nuclear emulsion for personal fast neutron dosimetry – CNEN, Bologna (1973)

CHAMOT E.M. e MASON C.W. – Handbook of Chemical Microscopy – Wiley, N.Y. (1959).

CHARMAN W.N. – Some experimental measurements of diffraction images in low resolution microscopy – Diffraction images of circular objects in high resolution microscopy – J. Opt: Soc. Am., 53, p. 410-419 (1963).

- CHAYES F. – Petrographic model analysis – John Wiley Inc., N.Y. (1956)
- COURTNEY-PRATT J.S. e GREGORY R.L. – Microscope with enhanced depth of field and 3 D capability – Appl. Opt., 12, p. 2509 (1973)
- CROZIER W.D. e SEELY B.K. – Proceedings of First National Air Pollution Symposium, p. 45 – Stanford, Calif. - Stanford Press (1950).
- DOUGLAS J.A. – Assessment of personal fast neutron doses using an automatic proton track counter – AERE, R 6220 (1969)
- DRAFTZ R. G. – The particle analyst – Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor Mich. (1968).
- DRAFTZ R. G. – Optical and Electron microscopy – in Handbook of Powder Technology – M.R. Jackson Marcel Dekker Inc., N.Y. (1972).
- DE FONBRUNE P. – Technique de micromanipulation – Masson, Paris VI<sup>e</sup> (1949).
- DELLY J.G. – Particle Analyst. 89 – Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Mich. (1968).
- DI LIBERTO S. e GINOBBI P. – Automatic device for measurements of heavy ion tracks in plastics – Nuclear Instrument. Methods. 147 (1), p. 75 (1977)
- EHRENBERG H. – Reflected light microscopy – in: H. FREUND – Applied ore microscopy – Mac Millan Comp., N.Y. (1966)
- EMMONS R.C.- The double variation method of refractive index determination – The American Mineralogist, 14, p. 414, (1929)
- ENDTER F. e GEBAUER H. – Optik, 13, p. 97 (1956).
- ESSAM E. EL-HINNAWI – Methods in chemical and mineral microscopy – Amsterdam, London, N.Y. (1966)
- FAIRBAIN H.W. – Gelatin coated slides for refractive index mounts – Amer. Mineral. 28 (1943).
- FAIRS G.L. – Use of the microscope in Particle size Analysis – Chemistry and Industry, 62, p. 374 – 378 (1943).
- FALINI F. – Il riconoscimento microscopico dei minerali – Ist. Poligrafico dello Stato (1953)
- FLEISCHER R.L. e PRICE P.B. – Tracks of charged particles in High Polymers – Science, 140, 1221 (1963)
- FRANÇON M. – Le microscope à contrastes de phase et le microscopoe interférentiel – CNRS, Paris (1954)
- FREERE R.H. – Stereologie techniques in Microscopy – Jour. Royal Microsc. Soc., 87, p. 25 (1967)
- FREUND H. – Handbuch der Mikroskopie in der Technik (8 voll.) – Umschau Verlag, Frankfurt/M. (1957-75).
- FULTON C.C. – Modern microcrystal tests for drugs – Wiley Interscience N.Y. (1969).
- GERZELI G. – Riflessi istochimici della microrefrattometria .- Rivista di Istochimica, (Dicembre 1962), p. 53 – 160.
- GLAGOLEV A.A. – On the geometrical Methods of quantitative mineralogic analysis of rocks – Trans. Inst. Econ. Min., 59, 1 (1933)
- GOODMAN R.A. – Expanded uses and applications of dispersion staining – Microscope, 18, p. 41-50 (1970)
- GRAUMANN W. e NEUMANN K. – Handb. Der Histochemie, Vol. I/1 – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1958)
- HAAS A. et al. – Morphologie mathématique et granulométries en place – Annales des mines, p. 39 (Dez. 1967)
- HALLIMOND A.F. – The polarizing Microscope – Vickers, York (1970)
- HAMILTON E.M. e JARVIS W.D. – Identification of atmospheric dust by use of the microscope – Central electricity generating Board, London (1963)
- HARTSHORNE N.H. e STUART A. – Crystals and the polarizing microscope – Edward Arnold, London (1970)
- HEIDERMANNS G. – On the technique of powder microscopy with the phase contrast microscope – Staub, 19, p. 104 (1959)

- HEIDERMANN G. – Asbestos content determination by optical, chemical, radiographic and infrared spectrographic analysis procedures – Staub, 33, 2, p. 67 (1973)
- HYDE W.L. e AZZAM R.M.A. – Polarized Light Instruments, Devices, Applications – Proceedings of the SPIE, Vol. 88 (1979)
- JULIAN Y. e Mc CRONE W.C. – Identification of asbestos fibres by microscopical dispersion staining – Microscope, 18, p. 1 (1970)
- JULIAN Y. e Mc CRONE W.C. – Accurate use of hot stages – Microscope, 19 (1971).
- KEUNE H. – Bilderatlas zur qualitativen anorganischem Mikroanalyse – VEB Deutscher Verlag für Grundstoff Industrie – Leipzig (1967).
- KIRSTEN C. – Equipment for measuring the surface temperature of microscopic specimens – Jena Review, 3, p. 178 (1968).
- KOFLER L. e KOFLER A. – Thermo-mikro-methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische – Wagner, Innsbruck (1954).
- KRAUSE W. – On the application of the phase contrast method in the investigation of minerals in dust preparations – Jena Review, 3, p. 185-189 (1965)
- LEEDER O. e BLANKENBURG H.J. - Polarisationsmikroskopie – VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1989)
- LODGE J.P. e FANZOL H.M. – Extension of the gelatin method for the detection of micron sized particles – Anal. Chem. 26 (1954).
- MARKS B. G. et al. – Infrared testing of microcircuits – Electro Technology, 76, p. 112 (1965)
- Mc CRONE W.C. – Fusion methods in chemical microscopy – Interscience, New York (1957).
- Mc CRONE W.C. – Particle Analyst – 49, Ann Arbor Science publishers (1968)
- Mc CRONE W.C. – Determination of  $n_F$ ,  $n_D$  and  $n_C$  by dispersion staining – Microscope, 23, n° 4 (1975)
- Mc CRONE W.C. – Dispersion staining – Microscope, 26 (1978)
- Mc CRONE W.C. – Evaluation of asbestos in insulation – International Laboratory. Genn.-Febbr. (1980), p. 35.
- Mc CRONE W.C. e DELLY J.G. – The particle Atlas – Michigan (Ann Arbor)(1978)
- Mc CRONE W.C., Mc CRONE L.B. e DELLY J.G. – Polarized light microscopy – Ann Arbor Science publ. – Ann Arbor, Mich. USA (1978).
- MERTZ W.A. – Die Streckenmessung an gerichteten strukturen im Mikroskop – Mikroskopie, Bd. 22, p. 132 (1967)
- MEYER K. – Physikalisch-chemische Kristallographie – VEB Deutscher Verlag für Grundstoff-industrie, Leipzig, 367 pagg. (1976)
- MOENKE H. e MOENKE-BLANKENBURG L. – Einführung in die Laser-mikroemission-spektralanalyse – 2<sup>a</sup> ediz. – Akad. Verlagsges., Leipzig (1968).
- MONKMAN L.J. – Procedure for the detection and identification of asbestos and other fibres in fibrous inorganic materials – Ann. Occup. Hyg., Vol. 00, p. 127-139 (1979)
- NEUER H. – Analisi quantitativa sotto il microscopio – Zeiss Informaz., 60, p. 65 (1966)
- NEUPERT H. – Citoferometro – Zeiss Informazioni, 60, pag 70 (1966).
- OSTERBERG H. – The measurement of unresolved single particles of uniform thickness by means of variable phase microscopy – J. Optic. Soc. Amer., 40, p. 64,73 (1950)
- OTTO L. – Der Mikromanipulator und seine Hilfsgeräte – VEB Verlag Technik, Berlin (1954).
- PAULI F. – Physico-chemical methods in modern humus research – Jena Review, 1, p. 3 (1966)
- PEPPERHOF W. e ETTWIG H.H. – Interferenzschichten-Mikroskopie – D. Steinkopf, Darmstadt, Scientific research Reports, Vol. 73 (1970).
- PIESCH E. – Applicazione della microscopia a contrasto interferenziale per la registrazione di tracce nucleari nei solidi – Zeiss Informazioni, 76, p. 58 (1971)
- PILLER H. – Die phasenkontrastmikroskopie als Hilfsmittel zur Bestimmung feinkörniger speziell dünner transparenter Minerale – Heidelberger Beitz. Z. Mineralog. und

Petrogr. – 3, p. 307 (1952)

POLICARD A., BESSIS M. e LOCQUIN M. – Traité de microscopie – Masson, Paris VI<sup>e</sup>, (1957).

PORTAL G. – Dosimetrie des neutrons rapides au moyen d'emulsion a protons de recul – ENEA, Symposium Madrid (1963)

PRICE P.B. e WALKER R.M. – Chemical Etching of charge-particle tracks in solids – J. Appl. Phys., 33, p. 3407 (1962)

QUILLFELD W. – Combined atomic absorption and emission performed with the Jena made Laser Microspectral Analyzer – Jena Review, 5 (1978), pagg. 226 – 229.

RADCZEWSKI O.E. – Die Unterscheidung von Mineralen durch optische Anfärbung im Grenzdunkelfeld – Ber. dtsh. Keram. Ges., 38, p. 381 (1961)

RINNE F. e BEREK M. – Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop – Schweizerhart, Stuttgart (1953)

RUSTICHELLI C. – Dosimetria neutronica ad albedo con rivelatori a tracce – Tesi di laurea, Bologna (1976)

SCHAEFER A. e GANDER R. – Les bases de la microstéréologie – Wild Heerbrugg, Mikroskopion, 18-19, p. 3-16 (1970)

SCHAEFFER H.F. – Microscopy for chemists – Dover Publ., N.Y. (1966).

SCHMIDT K.G. – Die Phasenkontrastmikroskopie in der Staubtechnik – Staub, 41, p. 31, 436 (1955)

SCHMIDT K.G. – Asbestorten, ihre Untersuchung mit optischen Mitteln und ihre Krankmachende Wirkung – Staub, 20, p. 173 (1960)

SCHMIDT K.G. – Phase contrast microscopy in the Dust laboratory – Staub, 22, 11, p.307 (1962)

SCHMIDT K.G. e HEIDERMANNS G. – Zur Technik der Staubmikroskopie mit Phasenkontrast und Grenzdunkelfeld – Staub, 18, p. 236-246 (1958)

SCHMIDT K.G. e HEIDERMANNS G. – Untersuchung von Staubproben mit den Phasenkontrastmikroskop insbesondere bei Verwendung von Membranfiltern – Staub, 19, Nr. 12, p. 413-416 (1959)

SCHOTT J.U., SCHOPPER E. e STAUDTE R. – A high precision video-electronic measuring system for use with solid state track detectors – Nuclear Instrum. Methods, 147 (1), p. 63 (1977)

SCHRAG K.R. e CORN M. – Comparison of Particle Size determined with the Coulter counter and by optical Microscopy – Amer. Ind. Hyg. Ass. J., 31, p. 446 – 453 (1970).

SCHREITER P. – Applied microscopy in slag research – Jena Review, 3, p. 174 (1968)

SEYFARTH H.H. – Zur Methodik des Phasenanalyse technischer Mischstäube – Luft und Kältetechnik, 5, p. 259 (1969)

SEYFARTH H.H. e HAHNE B. – Microscopic phase analysis of mixtures of solids by means of light refraction measurements – Jena Review, 4, p. 237-240 (1971)

SEYFARTH H.H. e HAHNE B. – Microscopic Methods of investigation in environmental control – Jena Review, 5, p. 238 (1976)

SINI G.P. – Il contrasto di fase interferenziale Wild-Varicolor – Atti Fondaz. G. Ronchi, XX, n 4, pagg. 374-393 (1965)

SINI G.P. – La fluorescenza con radiazione 400-500 nm nell'osservazione microscopica – Atti Fondaz. Ronchi, Firenze, 5, p. 545-574 (1966)

SINI G.P. - Microscopia interferenziale – Fondazione G. Ronchi, Firenze, XI, p. 69 – 72 (1968)

SINI G.P. – Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata – I.N.F.N., Bologna (2006), presente in questo sito.

SPURRI K.R., STOBBER W., OPIELLA H., WEISS G. – Microscopie et analyse des aerosols d'amianté en air atmosphérique – 2<sup>e</sup> Coll. Int. sur les atmosphères polluées, Paris (1976)

UNDERWOOD E.E. – Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures – J. of Microscopy, 89, p. 161 (1969)

- VOSS G.R. – Über Bauarten von Mikroskop-Photometern – Acta histochem, 22, p. 183 (1965)
- WALDNER F. – The accuracy of mineral determination with the phase contrast microscope – Tonind. Ztg. Keram. Rdsch., p. 179-184 (1961)
- WAHLSTROM E.E. – Optical Crystallography – J. Wiley, N.Y. (1969)
- WALLIS T.E. – Analytical microscopy – Little, Brown and Co., Boston (1965).
- WEIBEL E.R. et al. – Practical stereological methods for morphometric cytology – Journ. Cell Biology, 30, p. 23 (1966).
- WINCHELL A.N. e WINCHELL N. – Optical properties of artificial minerals – Academic Press, N.Y. e London (1964)
- WINCHELL A.N. e WINCHELL N. – The microscopical character of artificial inorganic solid substances – Academic Press, N.Y. e London (1964)
- ZIELHUIS R.L. – Public health risks of exposure to asbestos – Pergamon Press (1977)