

Art. n° 39 - GLI OBIETTIVI ZEISS JENA della serie 250 – CF

Il reparto di microscopia della casa Zeiss a Jena è stato fra i primi ad essere creato, quando la ditta divenne operativa nel 1846 ed avviò lo sviluppo dell'ottica industriale in Germania.

Un anno dopo, veniva commercializzato un microscopio semplice costituito da un doppietto acromatico. Dieci anni dopo, il primo microscopio composto.

Ancora nove anni dopo, nel 1866, il fondatore della casa, Carl Zeiss (Weimar, 1818, Jena, 1888¹), si rese conto che i processi di produzione, utilizzati fino allora, basati su metodi empirici ("prova e riprova"), non potevano più reggere; il suo grande merito fu di intuire l'importanza di un approccio fisico-matematico anche nella pratica industriale.

Riconoscendo i propri limiti, si recò umilmente all'università di Jena e si fece indicare il più promettente fisico del tempo. La scelta cadde su Ernst Abbe (Eisenach, 1840, Jena, 1905), divenuto titolare della cattedra di Fisica teorica all'età di 30 anni e direttore dell'Osservatorio astronomico della città. Benché di umili origini, Abbe dimostrò il suo valore anche di imprenditore: divenne comproprietario della Fondazione C. Zeiss, ristrutturò la ditta, introdusse fra i primi una specie di cassa malattie e pensioni. Sul piano tecnico e scientifico rivoluzionò l'ottica del tempo, chiari i fondamenti teorici della formazione delle immagini, inventò una serie interminabile di strumenti e dispositivi tecnici.

Nel 1879 la casa Zeiss perfezionò gli obiettivi ad immersione, su cui avevano lavorato a lungo gli italiani (G. B. Amici), i francesi (Chevalier, ecc.) e gli inglesi. Si arrivò così all'immersione omogenea.

Nel 1886, avendo riconosciuto i limiti delle classiche ricette degli obiettivi da microscopio, che poi vennero definiti "acromatici", E. Abbe calcolò e realizzò gli obiettivi "apocromatici": erano i migliori obiettivi dell'epoca, con estrema riduzione dell'aberrazione cromatica longitudinale e delle aberrazioni extra-assiali, ed i massimi valori di apertura e risoluzione.

In seguito, ad opera di August Köhler (1866-1948), anch'egli uscito dall'Università di Jena, e di altri, vennero introdotte varie innovazioni nell'ottica del microscopio.

Fin dal 1938, un altro dipendente della casa Zeiss, Böggehold, aveva progettato i "Planachromate", con ottima riduzione della curvatura di campo.

Nel frattempo, si erano susseguite numerose serie di modelli di microscopi e di obiettivi, ma rimaneva un problema: negli obiettivi forti di ogni categoria, basati quasi sempre sulla ricetta di G. B. Amici (con lente frontale semplice) sembrava ineliminabile un residuo di aberrazione cromatica laterale (Chromatische VergrosserungDifferenz = CVD). Per risolvere il problema, E. Abbe aveva introdotto gli oculari "compensatori", capaci di *compensare*, appunto, il residuo degli obiettivi. Per facilitare le cose, Abbe aveva progettato tutti i suoi obiettivi apocromatici, anche quelli deboli, con lo stesso residuo di CVD, in modo che un'unica serie di oculari (compensatori) si accoppiasse bene con qualunque obiettivo apocromatico.

Per gli obiettivi acromatici, rimaneva la necessità di oculari "compensatori" per gli obiettivi medio-forti, mentre i più deboli, potendo essere ben corretti da CVD, richiedevano oculari acromatici², come i più economici progettati secondo la ricetta di Huygens.

Ne derivava che, per un corredo misto di obiettivi, si richiedeva un doppio corredo di oculari: acromatici per gli obiettivi acromatici deboli, e compensatori per tutti gli altri.

La faccenda era scomoda, tanto più che i costruttori più ... economici offrono in genere,

¹ Prima di mettersi in proprio, C. Zeiss aveva lavorato come meccanico per l'Università di Jena.

² In generale, si chiama "acromatico" un sistema ottico corretto da cromatica longitudinale. Nel caso degli oculari, s'intende corretta anche la CVD, ma questa estensione non vale per gli obiettivi forti.

ancora oggi, una sola serie di oculari, adatti per alcuni obbiettivi, ma non per tutti.

Per semplificare le cose, dal 1968 la casa Zeiss a Jena ha introdotto obbiettivi sempre esenti da CVD, in modo che per tutti va usato un solo tipo di oculari, naturalmente acromatici (vedi la nota 2). Ciò ha complicato la ricetta e richiesto l'uso di vetri speciali, ma il mercato lo esige.

In seguito, vari costruttori hanno cercato di offrire obbiettivi con un campo immagine sempre più esteso (“grandangolari”) ed i tre perfezionamenti – correzione della CVD, correzione della curvatura di campo e campo grande – sono avanzati di pari passo.

Gli obbiettivi corretti da CVD sono ora assai diffusi, e vanno sotto il nome di “CF” (= color free) o simili.

I vantaggi degli obbiettivi **CF** sono essenzialmente quattro:

- come già detto, per tutti gli obbiettivi basta un solo tipo di oculare (acromatico);
- l'orlo del diaframma di campo visivo di un oculare acromatico appare neutro, senza frange colorate; negli oculari compensatori, invece, la CVD dell'oculare mostra il diaframma con un orlo rossastro (è questo un criterio generalmente valido per riconoscerli);
- i reticoli eventualmente presenti nell'oculare appaiono anch'essi neutri, per lo stesso motivo;
- l'immagine intermedia è libera da CVD e pertanto può essere utilizzata direttamente per scopo fotografico o ripresa TV. Ciò è particolarmente prezioso per gli attuali sensori elettronici, che sono assai più piccoli dei formati fotografici classici, e meglio rientrano nel diametro dell'immagine intermedia senza l'ulteriore ingrandimento dell'oculare.

Ne consegue che la ripresa TV o fotografica senza oculare è corretta solo se l'obbiettivo è acromatico debole o della serie CF.

Veniamo al punto. Nel 1982, la casa Zeiss Jena ha introdotto una nuova serie di stativi, con vari modelli “dedicati”, destinati ad applicazioni particolari. Tutti i modelli hanno un nome che inizia con “Jena” e termina con un suffisso che allude alla funzione prevalente: Jenaval per il modello-base (fig. 1), Jenavert per l'episcopico, Jenapol per il polarizzatore, Jenalumar per quello a fluorescenza, Jenatech per l'episcopico destinato ai circuiti integrati, ecc.

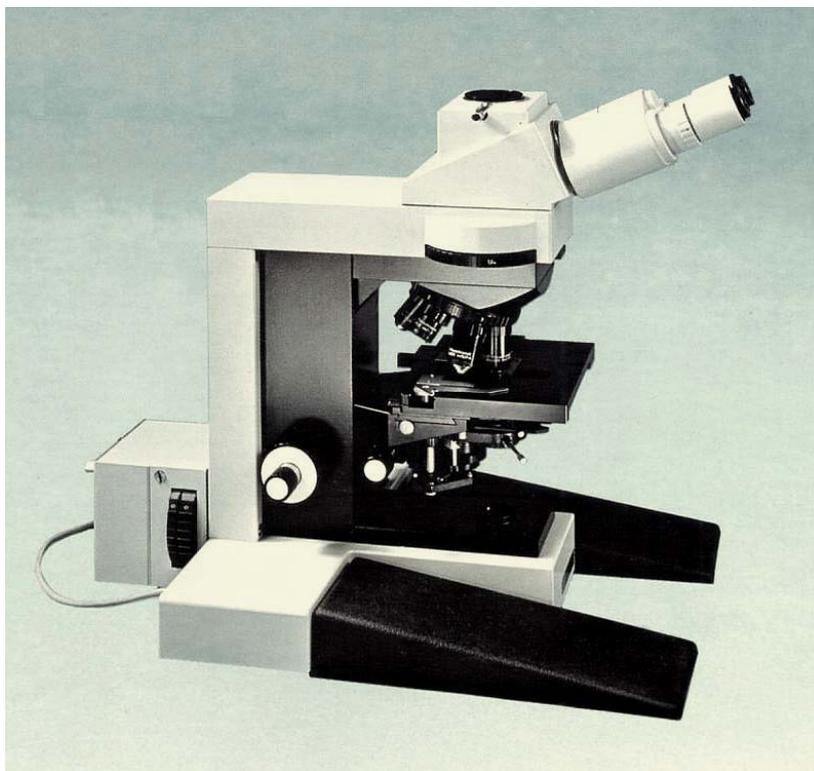


Fig. 1 – Lo stativo base della serie “250-CF, introdotta dalla Zeiss di Jena dopo il 1982.

Si chiamava “Jenaval”, ed accettava una lunga serie di accessori per la quasi totalità delle tecniche d'osservazione. Il tubo d'osservazione presentava una “terza uscita” per scopo fotografico, TV, ecc.

In questa serie, denominata “**250–CF**”, sono state introdotte alcune innovazioni meccaniche, come l’uso di un doppio braccio: un braccio superiore che porta il peso dei tubi ed altri accessori, un braccio inferiore che porta solo il revolver. Questa soluzione, quasi esclusiva di questa serie, evita che si perda il fuoco quando si opera o si toccano in qualunque modo gli oculari o tutti gli accessori collegati al tubo.

Ma non vogliamo qui descrivere le caratteristiche di un’ennesima serie di microscopi.

Vogliamo invece soffermarci sulle serie di obbiettivi che erano di corredo a questi stativi e che venivano appunto contrassegnati con la sigla **250–CF**. Il termine “250” si riferisce al diametro dell’immagine intermedia virtuale, quale si osserva focalizzandola alla “distanza convenzionale” di 250 mm, misurata a partire dalla pupilla d’uscita dell’oculare. Con un oculare 10×, questo implica un “indice di campo”³ dell’oculare pari a: $s' = 25 \text{ mm}^4$. Si trattava dunque di obbiettivi “grandangolari”, contrassegnati dal costruttore con la sigla **GF** (= Grossfeld) e da altri costruttori con **WF** (Wide field).

La sigla **CF** invece ci è già familiare ed indica la totale correzione della CVD.

Negli anni precedenti, la Zeiss Jena aveva già prodotto serie parziali di obbiettivi CF e “Plan”, con campi immagine sempre più estesi (vedi la bibliografia).

Con la serie 250–CF venne raggiunto uno standard solo difficilmente raggiunto da altri costruttori. La serie degli “Achromat”, a dire il vero, ricalcava ricette classiche non aggiornate e non era ben corretta da coma ed astigmatismo, ma la serie “GF–Planachromat”, per contro, presentava un campo immagine di 32 mm, un limite mai più raggiunto, magnificamente corretto da aberrazioni extra-assiali e curvatura. Il contrasto era insuperabile. Ed il loro prezzo di vendita era anche molto conveniente.

Per gli obbiettivi 250–CF era prevista una lente di tubo acromatica con focale di 250 mm ed una serie di oculari, ovviamente grandangolari, del diametro esterno di 30 mm. L’indice di campo di tali oculari era di 25 mm, almeno per il più comune 10×.

A questo punto, sorge la domanda: come si può sfruttare un’immagine intermedia di 32 mm con un oculare con indice di campo di 25 ?

Semplice: fra obiettivo ed oculare era previsto un sistema intermedio con vari fattori d’ingrandimento (Ft), fra cui un sistema con $Ft = 0,8 \times$. Così $32 \times 0,8 = 25,6 \text{ mm}$.

Ma perché prevedere un’immagine intermedia maggiorata di 32 mm per poi comprimerla a 25,6 ? Semplice anche questo: aumenta la risoluzione lato immagine o, se preferite, il contenuto d’informazione dell’immagine finale. Si veda in proposito in questo sito l’art. n° 4: “L’utilità del “Grande Campo ...”.

Nella serie 250–CF non erano previsti obbiettivi semi-apocromatici (a fluorite).

Purtroppo, con la caduta del muro di Berlino e la riunificazione delle “due Germanie” (1989-90), venne subito realizzata la fusione amministrativa delle due sedi degli stabilimenti Zeiss.

È noto che, alla fine della seconda guerra mondiale, con la divisione della Germania dell’ante-guerra, gli stabilimenti Zeiss di Jena furono parzialmente ricostruiti proprio a Jena (Germania Orientale) e proseguirono la fabbricazione di microscopi con il logo “aus Jena” (in Italia), o “Carl Zeiss” (nel Regno Unito, ecc.).

Una parte del personale invece emigrò nella Germania Occidentale e costruì ad Oberkochen, nel Baden–Württemberg una nuova Zeiss che commercializzava col logo “Carl Zeiss” (in Italia) e “Optar” (nel Regno Unito).

La differenza fra i due criteri di denominazione è dovuta al fatto che in Italia, dopo adeguato processo legale, si diede la preferenza alla sede legale della fondazione Zeiss, che si era trasferita

³ Per “indice di campo” s’intende il diametro equivalente (ignorando l’esistenza della lente di campo degli oculari negativi) dell’immagine intermedia realmente utilizzata dall’oculare. Gli autori inglesi lo chiamano “field number” (FN). Negli oculari positivi l’indice di campo coincide col diametro del diaframma di campo visivo poiché non esiste la lente di campo che “contrae” l’immagine intermedia.

⁴ Ciò corrisponde ad un campo angolare di: $2\alpha > 53^\circ$.

ad Oberkochen (Germania Ovest), mentre nel Regno Unito si era data la preferenza alla sede originaria della fondazione stessa (Jena, DDR).

Sta di fatto che le due Zeiss si facevano cordiale concorrenza, producendo modelli assai diversi.

Ecco perché, poche righe più sopra, abbiamo detto: “Purtroppo ... venne ... la fusione delle due sedi”. Il “Purtroppo” viene dal fatto che la Zeiss di Jena, dopo la riunificazione del 1989–90, chiuse di colpo il reparto microscopia, dedicandosi ad altri prodotti d’avanguardia; così la serie dei microscopi 250–CF scomparve dopo solo 8 anni di commercializzazione (tranne qualche modello esclusivo, come l’“Interphaco”).

Questo spiega perché la serie è poco diffusa e poco conosciuta a tutti i livelli.

Si potrebbe dire: “Poco male ... ci sono già tanti modelli in circolazione ...”. È vero, ma chi ha avuto modo di lavorare con gli obiettivi di quel periodo sa che difficilmente troverà l’eguale, specialmente nella serie “GF Planachromat”. Il contrasto e la definizione dell’immagine intermedia di quegli obiettivi non si dimenticano facilmente. L’elevata definizione veniva proprio da quanto abbiamo visto sopra: un campo dell’immagine intermedia di 32 mm viene “compressato” in un diametro di 25 mm (per i normali oculari) in modo che venga aumentato “il numero di linee per mm” nell’immagine finale. È quello che abbiamo chiamato un aumento “del contenuto d’informazione dell’immagine”.

Per queste considerazioni, cedendo ad un certo grado di nostalgia, può avere senso pubblicare qui sotto una traduzione ragionata di un testo che la Zeiss di Jena aveva diffuso durante gli anni ’80 per illustrare appunto gli obiettivi della serie 250–CF.

Non si tratta di una semplice elencazione di caratteristiche e pregi, ma di una rassegna generale di concetti concernenti l’ottica del microscopio, che possono essere utili a chi, a qualunque titolo, maneggia microscopi.

Fig. 2 – Gli obiettivi della serie 250–F della Zeiss di Jena (anni 1982–1990) avevano un diametro notevole, verniciatura nera, notazioni non incise ma serigrafate in bianco (in rosso per le serie “Pol” o in verde per le serie a contrasto di fase).

Il passo della vite di fissaggio era M 25 (25 mm × 0,75).

La seconda coniugata era infinita; lunghezza di parfocalità: $L_0 = 45$ mm, salvo qualche modello particolare (vedi il testo che segue).

Il revolver qui illustrato è a fori centrabili.



Fig. 3 - Sopra: gli oculari "a grande campo", con diametro esterno di 30 mm.

Sotto: obiettivi per polarizzazione, obiettivi GF plan-apocromatici e GF plan-acromatici.



Fig. 4 - Obiettivi GF HD plan-apocromatici e plan-acromatici per episcopia in campo chiaro e campo scuro.

Obiettivi HD plan-acromatici e planacromatici semplici (questi ultimi solo per campo chiaro).

(NB: HD = Hellfeld-Dunkelfeld = Campo chiaro e campo scuro).



L'USO DEGLI OBIETTIVI DA MICROSCOPIO

(Traduzione ragionata con annotazioni e figure del traduttore)

L'obiettivo è la parte più importante del microscopio, e le sue prestazioni sono decisive per il risultato finale.

Un obiettivo è definito dai seguenti parametri fondamentali:

1) Tipo di correzione cromatica

Riguardo allo spettro della radiazione ottica (detta di solito "visibile" ma impropriamente poiché la radiazione non si vede; essa rende semplicemente visibili gli oggetti), si distinguono queste classi di obiettivi:

Acromatici, con una struttura ottica più semplice delle altre categorie; la loro correzione ottimale sta nella regione giallo-verde dello spettro, dove l'occhio umano è più sensibile. Per contro, le immagini per le regioni "rosso" e "blu" dello spettro ottico (per cui l'occhio è meno sensibile) risultano spostate lungo l'asse ottico, a maggior distanza dall'obiettivo.

Apocromatici. Usando vetri speciali, si arriva a far coincidere le immagini per le regioni del "rosso", "blu" e "verde". Nelle regioni spettrali intermedie fra quelle tre, le deviazioni nella posizione dell'immagine sono così ridotte che si può considerare un'unica posizione per le immagini in tutto lo spettro ottico.

Per merito di queste migliori correzioni, gli apocromatici sono progettati per una maggiore apertura rispetto agli acromatici di pari ingrandimento.

Per queste proprietà, l'uso degli apocromatici si raccomanda per l'osservazione di strutture fini e colorate. Per la loro elevata trasmissione nello spettro ottico e nel prossimo UV, come per l'apertura comparativamente maggiore, questi obiettivi sono particolarmente adatti alle osservazioni in fluorescenza.

Obiettivi "a fluorite"

Non sono previsti attualmente nella produzione Jena e non ci soffermeremo su di essi. La loro struttura conserva la semplicità di quella degli acromatici, ma la loro correzione cromatica è a metà strada fra quella degli acromatici e quella degli apocromatici ("**semi-apocromatici**").

Essi sono offerti da altre case (Leitz, Zeiss Oberkochen, ecc.) per la microscopia in fluorescenza.

Il loro nome viene dal fatto che inizialmente, quando furono creati dalla casa milanese Koristka, si distinguevano per contenere lenti in fluorite naturale.

2) Planeità dell'immagine

La curvatura del piano immagine porta come conseguenza che, avendo messo a fuoco il centro del campo, l'immagine appare sempre più sfocata via via che ci si avvicina agli orli di esso. Per vedere nitida la periferia dell'immagine, occorre rimettere a fuoco.

L'eliminazione della curvatura di campo si ottiene con i "menischi spessi" (lenti di forte spessore con una faccia convessa ed una fortemente concava) e con lenti divergenti.

Gli obiettivi "planari" così ottenuti sono progettati con correzione acromatica o apocromatica.

Lo spianamento dell'immagine produce anche nell'osservazione un aumento dell'informazione⁵ presente nell'immagine stessa, ma nella fotografia è quasi una condizione irrinunciabile.

3) Dimensioni del campo immagine.

L'introduzione dei microscopi Jena della serie 250 - CF è stata collegata con l'impiego di una nuova generazione di sistemi ottici (obiettivi, oculari, proiettori). Caratteristica preminente di questa generazione è la dimensione dell'immagine, sia dell'obiettivo che dell'oculare, e lo

⁵ Per "aumento dell'informazione" s'intende qui che una maggior porzione dell'immagine finale è vista simultaneamente a fuoco e maggiori saranno i dettagli percepibili nell'immagine stessa.

spianamento dell'immagine anche per obiettivi a campo normale (diametro dell'immagine intermedia = indice di campo = $s' = 20$ o 25 mm).

I nuovi obiettivi della serie **GF** ("Grossfeld") sono corretti per **un campo $s' = 32$ mm** e producono in combinazione con oculari GF - Pw (Grossfeld-Weitfeld o Ultraweit feld) un'immagine virtuale del diametro di 250 mm (se portata a 250 mm dall'occhio):

$$2y'' = s' \cdot Vok$$

in cui: $2y'' =$ campo visuale apparente ed $s' =$ indice di campo; $Vok =$ ingrandimento visuale dell'oculare⁶.

Così si aumenta sensibilmente il contenuto d'informazione fornito dall'immagine.

Nel linguaggio tecnico, quando si parla di immagini a grande campo, s'intende un diametro apparente di almeno 175 mm (angolo di campo $2\alpha = 39^\circ$).

4) Correzione dell'aberrazione cromatica laterale (CVD)

Obiettivi forti corretti per quell'aberrazione furono offerti dal 1967/68.

Tale aberrazione consiste in una variazione dell'ingrandimento al variare della lunghezza d'onda (da cui il nome "differenza cromatica d'ingrandimento" = Chromatische Vergrößerungs-differenz = CVD).

La correzione di quest'aberrazione dell'obiettivo era finora affidata ad oculari "compensatori", dotati di un'aberrazione dello stesso valore e di segno opposto.

Il sistema della compensazione aveva dei limiti, specie nei sistemi a grande campo. Particolarmente dannosa è quell'aberrazione nell'oculare quando si osserva l'immagine di oggetti posti nel piano del diaframma dell'oculare, per es. micrometri: si formano orli colorati, più forti ai margini del campo visuale e sull'orlo del diaframma di campo visivo.

Queste considerazioni hanno fatto sì che, coll'introduzione della nuova serie di microscopi, venissero sviluppati sistemi privi di CVD.

Questo grado di correzione riguarda naturalmente tutte le componenti del sistema formatore d'immagine (obiettivo, oculare, proiettivi, sistemi intermedi); gli obiettivi di questa nuova serie sono contrassegnati dalla lettera **A** che segue la sigla dell'obiettivo. Al contrario, gli obiettivi "classici" affetti da CVD sono contrassegnati da una **C** ed esigono l'uso di oculari con effetto compensatore.

5) Ingrandimento e scala d'immagine

Si parla di "ingrandimento visuale" quando uno strumento ottico (lente d'ingrandimento, binocolo, ecc.) produce un'immagine virtuale. Nel caso della lente d'ingrandimento, si suppone che oggetto ed immagine si trovino, dall'occhio, alla distanza d'osservazione "convenzionale" di 250 mm. Anche nel caso di oggetto a grande distanza (come un cannocchiale), l'ingrandimento visuale s'intende come rapporto delle tangenti degli angoli sotto cui viene visto l'oggetto con e senza lo strumento. La cifra che esprime questo rapporto di angoli si fa seguire dal segno di moltiplicazione (\times).

Di "scala d'immagine" o "ingrandimento lineare trasversale" si parla in presenza di immagine reale; si tratta del rapporto fra la lunghezza di un segmento nel piano immagine (che si suppone perpendicolare all'asse ottico, donde l'attributo "trasversale") e la lunghezza del segmento corrispondente nel piano oggetto. Trattandosi del rapporto fra segmenti, si parla di ingrandimento "lineare" e si usa la notazione ordinaria della grafica: la cifra si fa seguire dal segno "**:1**".

Questa notazione è corretta per gli obiettivi con coniugata immagine finita, che producono direttamente un'immagine reale ("immagine intermedia") nel primo fuoco dell'oculare.

Per gli obiettivi corretti per una coniugata immagine infinita, poiché essi non danno direttamente un'immagine reale (a questo provvede la "lente di tubo" posta sopra l'obiettivo e

⁶ Come detto sopra, con un oculare $10\times$ il calcolo è valido se si suppone l'uso di un sistema intermedio con "fattore di tubo": $f_t = 0,8\times$.

che ha una focale di 250^7 mm), l'ingrandimento del complesso obiettivo + lente di tubo è misurato dal rapporto $250/f_0$ (in cui f_0 è la lunghezza focale dell'obiettivo) e come tale diventa numericamente uguale all'ingrandimento visuale che l'obiettivo avrebbe se fosse usato come lente d'ingrandimento. Si usa perciò ancora la notazione "×" dopo la cifra che indica l'ingrandimento.

Come si dirà in seguito, ingrandimento e risoluzione vanno distinti bene e le prestazioni fondamentali di un obiettivo stanno nel potere risolutivo.

I valori d'ingrandimento non vengono scelti ad arbitrio. E' usuale servirsi di valori che appartengono ad una serie normalizzata: il rapporto fra due valori contigui della serie ammonta ad un valore fisso, per es. 25 %. Questi valori si applicano all'ingrandimento di oculari, obiettivi, proiettori, cambiatori d'ingrandimento intermedi, ecc.

Per ogni decade, cioè per ogni potenza di 10, si ha questa successione:

1 / 1,25 / 1,6 / 2 / 2,5 / 3,2 / 4 / 5 / 6,3 / 8 oppure:

10 / 12,5 / 16 / 20 / 25 / 32, ecc.

Una serie completa di questi valori per gli obiettivi non è opportuna e neppure possibile. Perciò, per ogni categoria di obiettivi, si fa una scelta, in relazione all'apertura, al tipo di correzione, alla luminosità, alle particolari applicazioni.

Queste sono le varie serie di ingrandimenti scelti per le categorie attualmente prodotte dalla casa Jena :

Acromatici, lunghezza di tubo = 160 mm:

3,2 / 6,3 / 10 / 20 / 40 / 100 Idem per contrasto di fase: 10 / 20 / 40 / 100

Acromatici, coniugata immagine infinita:

5 / 10 / 20 / 40 / 50 / 100 Idem per contrasto di fase: 10 / 20 / 40 / 100

Idem per radiazione polarizzata: 10 / 20 / 50 / 100

Apocromatici, coniugata immagine infinita:

6,3 / 12,5 / 25 / 50 / 100 Idem per contrasto di fase: 25 / 50 / 100

Plan-acromatici, coniugata infinita:

2,5 / 5 / 10 / 20 / 50 / 100 Idem per HD (episcopia, fondo chiaro e scuro): 2,5 / 5 / 10 / 20 / 50

Idem per radiazione polarizzata: 2,5 / 10 / 20 / 50 / 100

Idem per contrasto di fase: 10 / 20 / 100

GF Plan-acromatici, coniugata infinita:

1 / 1,25 / 1,6 / 2,5 / 3,2 / 6,3 / 7,5 / 12,5 / 25 / 40 / 50 / 100

Idem per episcopia HD: 3,2 / 6,3 / 12,5 / 25

Idem per contrasto di fase: 12,5 / 25 / 40 / 100

Idem per radiazione polarizzata: 3,2/6,3/12,5/25/50

GF Plan-apocromatici, coniugata infinita:

25 / 50 / 100

Idem per HD: 25 / 50 / 100

Idem per radiazione polarizzata: 25 / 50 / 100

Acromatici "s", per segmenti sferici: 5 / 16 / 50

Obiettivi a grande distanza di lavoro (LD): 4 / 8 / 16 / 25 / 40

Le particolarità di ogni obiettivo o almeno di ogni categoria verranno trattate a parte.

6) Apertura numerica (A oppure NA per gli autori inglesi)

Un importante criterio di qualità di un obiettivo è la sua risoluzione, che è misurata dalla minima distanza (d) fra le strutture più fini dell'oggetto che possono ancora essere percepite come distinte. Per strutture allungate vale:

$$d = 0,5 \lambda / A \quad \text{in cui } \lambda = \text{lunghezza d'onda.}$$

⁷ Questo valeva nella prima teorizzazione di E. Abbe. Oggi ogni costruttore adotta un valore diverso, fra 165 e 250 mm ed oltre.

Si calcola: $A = n \sin \alpha$ in cui “n” è l’indice di rifrazione del mezzo ottico posto fra obiettivo ed oggetto ed “ α ” è il semi-angolo d’apertura dell’obiettivo lato oggetto.

Poiché la lunghezza d’onda deve essere compresa all’interno dello spettro ottico (400 - 780 nm), il fattore essenziale che determina il limite di risoluzione è l’apertura dell’obiettivo.

Se il mezzo esistente fra obiettivo ed oggetto è aria, con $n = 1$, si parla di obiettivi “a secco”; allora α è al massimo 90° ed $A = \sin \alpha = 1$; in pratica, A non supera 0,95. Un aumento del potere risolutivo dell’obiettivo è possibile solo se $n > 1$, cioè se fra oggetto e lente frontale dell’obiettivo (con $n = 1,515$) si trova un mezzo con $n > 1$. Tale mezzo, sempre liquido, è chiamato “liquido per immersione” e l’obiettivo è chiamato “ad immersione”. Ulteriori dettagli al punto seguente.

Il valore del limite⁸ di potere risolutivo, per oggetti puntiformi, indicato nelle tabelle è calcolato come:

$$d = 0.61 \lambda / A \quad \text{per } \lambda = 550 \text{ nm (baricentro dello spettro ottico).}$$

Questa formula è valida per coppie di punti chiari su fondo nero con illuminazione parzialmente coerente⁹.

Poiché si hanno delle differenze nel calcolo del limite di risoluzione in relazione al tipo di illuminazione e di oggetto, il valore sopra citato va considerato come un massimo teorico.

Si badi anche che il limite di risoluzione non corrisponde al limite di “percezione” o di visibilità: un oggetto molto piccolo può essere visto, cioè percepito, anche se non è risolto, cioè non se ne vede la forma o la struttura; la visibilità di un dischetto chiaro su fondo scuro dipende solo dalla sua intensità, cioè dal sistema illuminante usato.

Da E. Abbe è stato introdotto anche il concetto di “ingrandimento utile”, cioè di ingrandimento che è inutile superare perché non aumenterebbe l’informazione offerta all’occhio dell’osservatore: affinché l’occhio “medio” o “normale” veda ancora sicuramente distinti, cioè risolva, due punti nell’immagine, è necessario che esso li veda sotto un angolo di almeno $2' - 4'$. Per l’immagine microscopica, si dice che le strutture dell’oggetto, risolte nell’immagine intermedia fornita dall’obiettivo, debbono essere ingrandite dall’oculare al punto da apparire all’occhio sotto un angolo non inferiore al limite citato di $2' - 4'$.

In questo modo si può calcolare la gamma di ingrandimenti che il microscopio può utilmente fornire: da 500 a 1000 volte il valore dell’apertura A dell’obiettivo usato.

Con un ingrandimento inferiore a $500 \cdot A$, le prestazioni dell’obiettivo non saranno sfruttate appieno; con uno maggiore di $1000 \cdot A$, nessuna struttura più fine nell’oggetto osservato potrà venire risolta: si avrebbe un “ingrandimento a vuoto”.

7) Liquidi d’immersione

Come già detto, una possibilità di aumentare il potere risolutivo sta nell’uso di un fluido con $n > 1$ per l’immersione dell’obiettivo. Si usano quindi obiettivi ad immersione calcolati in modo da richiedere l’uso di un liquido, dalle caratteristiche ottiche ben definite, fra la lente frontale e l’oggetto.

I liquidi più usati sono:

– Olio per immersione (un tempo era estratto dal legno di cedro; attualmente è sintetico); $n = 1,515$.

– Miscela acqua-glicerina (10 % acqua); $n = 1,453$ circa.

– Acqua: $n = 1,333$.

Come si ricava dalla formula $A = n \sin \alpha$, i valori di apertura usuali degli obiettivi ad immersione corrispondono ai seguenti valori di semi-apertura angolare (α):

$$A = 1,25 \quad 1,30 \quad 1,35 \quad 1,40$$

$$\alpha = 56^\circ \quad 59^\circ \quad 63^\circ \quad 68^\circ$$

⁸ S’intende qui il potere risolutivo massimo teorico, quello che un obiettivo può presentare nelle condizioni ideali di funzionamento: nessun difetto costruttivo, illuminazione ottimale, messa a fuoco perfetta, ecc.

⁹ Come si realizza con apertura ridotta del condensatore.

Ma l'uso di obbiettivi ad immersione non è vantaggioso solo per la risoluzione: la radiazione riflessa dalla superficie superiore del copri-oggetto e dalla superficie inferiore della lente frontale viene quasi eliminata, evitando così una perdita fotometrica e la formazione di luce diffusa. La condizione ottimale si ha quando si ha l'eguaglianza dell'indice fra tutti i mezzi interposti fra oggetto ed obiettivo: mezzo di inclusione dell'oggetto (come il "balsamo del Canada" o altre resine) - copri-oggetto - olio d'immersione - lente frontale dell'obiettivo. In questo caso si parla di "immersione omogenea" (HI).

Se in generale le superfici aria-vetro sono causa di aberrazioni, nell'immersione HI si elimina il contributo della lente frontale all'aberrazione sferica.

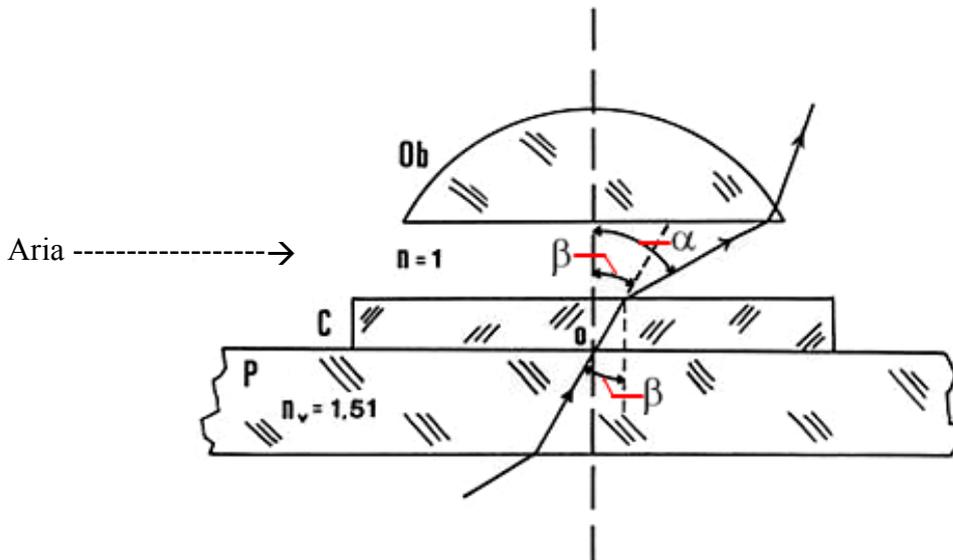


Fig. 5 - OBBIETTIVO a SECCO. Ob = obiettivo (schematizzato con la sola lente frontale); C = coprioggetto; P = portaoggetti; O = centro del campo-oggetto.

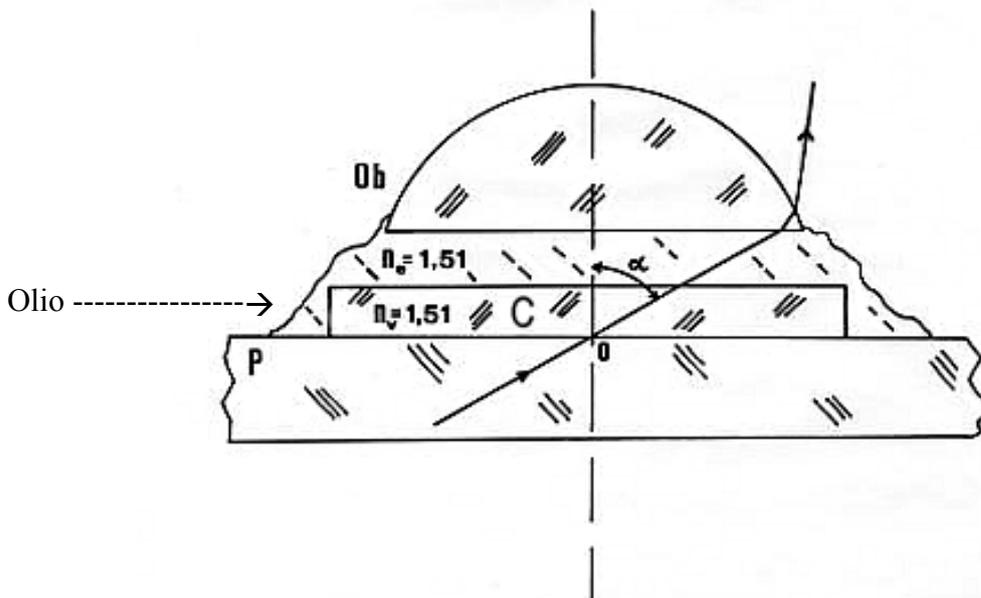


Fig. 6 - OBBIETTIVO ad IMMERSIONE. Stesse notazioni della figura precedente.

Con l'immersione, l'angolo di apertura (α) è effettivamente utilizzato dall'obiettivo; a secco, l'angolo utile è β , minore di α a causa della rifrazione che si verifica alla superficie del copri-oggetto (C) e della lente frontale (Ob).

Se il principio dell'immersione omogenea è applicato rigorosamente, non ha più importanza la presenza o l'assenza di copri-oggetto, ma si costruiscono ugualmente obbiettivi HI calcolati per oggetti con e senza copri-oggetto.

Infatti:

--- le distanze di lavoro sono diverse, per cui può essere impossibile mettere a fuoco un obbiettivo calcolato per oggetti non coperti su un vetrino munito di copri-oggetto;

--- le differenze nella dispersione fra olio d'immersione e vetro rendono necessario in casi particolari (produzione di un'immagine molto contrastata con oggetti al limite del potere risolutivo dell'obbiettivo) rispettare lo spessore indicato per il coprioggetto.

L'olio d'immersione va acquistato presso lo stesso fabbricante dell'obbiettivo poiché vi possono essere degli scarti nelle caratteristiche ottiche dell'olio proveniente da varie case.

D'altra parte l'olio non è sempre raccomandabile per tutti i casi pratici; per es. esso può danneggiare gli oggetti non coperti dal copri-oggetto o le loro colorazioni.

Spesso inoltre si scartano gli obbiettivi HI a causa della pulizia che essi richiedono dopo l'uso, oppure per l'odore del detergente (xilolo), o per il rischio della contaminazione da olio degli altri obbiettivi, conseguente alla rotazione del revolver.

In questi casi diventa augurabile e possibile impiegare come liquidi da immersione l'acqua, il miscuglio acqua-glicerina o la glicerina-tampone. I corrispondenti obbiettivi sono contrassegnati con "WI" (acqua) e "Glyc I" (glicerina).

Ultimamente sono divenuti disponibili obbiettivi utilizzabili per la cosiddetta "immersione variabile" (VI), cioè con vari liquidi (olio, acqua, glicerina o miscugli di essi).

Nell'uso di obbiettivi ad immersione, specie di quelli HI, si cerchi sempre di usare liquidi esenti da bolle d'aria e da impurezze. Si è dimostrato opportuno sfruttare la montatura molleggiata dell'obbiettivo per sollevare quest'ultimo, portarlo sopra la goccia di liquido precedentemente deposta sul vetrino, e poi lasciarlo scendere lentamente sulla goccia.

L'uso dell'olio da immersione dà lo spunto per raccogliere alcuni appunti sulla pulizia delle lenti, in generale.

La pulizia della lente frontale di un obbiettivo a secco si esegue con un pennello esente da polvere e sgrassato, o con un telo di lino che non sfilacci. In caso di necessità, si può inumidire il telo con acqua distillata. La superficie della lente frontale non viene danneggiata da una pulizia eseguita con opportune cautele.

La superficie superiore (emergente) dell'obbiettivo, accessibile dopo aver smontato l'obbiettivo medesimo, va sempre tenuta priva di polvere; vi si può soffiare sopra con una peretta di gomma. Ci si assicuri che l'obbiettivo è in ogni caso mantenuto avvitato sul revolver oppure conservato nell'apposita scatola con coperchio a vite.

L'uso dell'olio d'immersione richiede qualche altra attenzione. Per es., quando si ruota il revolver per passare da un obbiettivo HI ad uno a secco forte (con piccola distanza di lavoro), quest'ultimo può risultare imbrattato d'olio. Dopo l'uso, l'obbiettivo ad immersione va pulito con xilolo o benzina da smacchiare. Non si usi mai alcool o etere, poiché questi liquidi attaccano gli adesivi fra le lenti e danneggiano l'obbiettivo. Comunque, anche con i solventi consigliati, non si può insistere poiché ne risulterebbero rammolliti gli adesivi.

Se si hanno dubbi sulla pulizia di un obbiettivo ad immersione si controlli la lente frontale con una lente d'ingrandimento o un microscopio stereoscopico. Si potranno così vedere i rimasugli d'olio che tendono ad accumularsi lungo l'orlo della montatura.

In teoria, esiste la possibilità di usare liquidi d'immersione con indice maggiore di 1,515 e con ciò aumentare il potere risolutivo. Già Abbe aveva fatto dei tentativi col mono-bromo naftalene ($n = 1,66$). Naturalmente, è necessario con questi liquidi usare anche copri-oggetti e resine per l'inclusione dell'oggetto di pari indice. Per questa difficoltà, l'immersione ad elevato indice non si è diffusa nel lavoro in luce trasmessa. È più usata in episcopìa per altri motivi, indipendenti dalla risoluzione (vedi anche pag. 25).

8) Spessore del copri-oggetto o lamella (d) e ghiera di correzione

Su ogni obiettivo da microscopio è riportata una cifra che indica lo spessore di lamella per cui esso è corretto. Il tipo di oggetto determina l'opportunità o meno di coprirlo con una lamella: in linea di massima, si usa lasciare gli oggetti non coperti quando sono opachi e vanno osservati in episcopia ("luce riflessa"), mentre gli oggetti trasparenti si proteggono con una lamella e si osservano in diasopia ("luce trasmessa").

Le seguenti indicazioni incise sull'obiettivo si riferiscono alle sue esigenze riguardo allo spessore d della lamella:

■ “ - ”: l'obiettivo è insensibile alle variazioni di “ d ” fra 0 e 0,2 mm; può essere quindi usato con preparati con e senza lamella senza danno per la qualità d'immagine.

Queste condizioni si verificano per aperture inferiori a 0,3. Se l'apertura supera 0,3, la presenza della lamella è introdotta nei calcoli per la progettazione dell'obiettivo (specie per la correzione dell'aberrazione sferica e della cromatica); in altre parole, la lamella, in quanto lamina di vetro a facce piane e parallele, fa parte integrante del sistema ottico dell'obiettivo.

■ “0,17” : gli obiettivi con questa indicazione sono da usare con una lamella di spessore $d = 0,17$ mm. Quanto più alta è l'apertura del sistema, tanto più piccoli sono gli scarti nel valore di “ d ” capaci di produrre effetti deleteri sulla bontà dell'immagine (mancanza di nitidezza, perdita di contrasto). In casi estremi, poiché l'indice della resina che include l'oggetto e quello della lamella si somigliano, ha importanza anche lo spessore di resina che si interpone fra oggetto e lamella: esso va compreso nella misura di “ d ”.

TAB. 1 : TOLLERANZA nello SPESSORE della LAMELLA (Δd) in funzione dell'apertura di un obiettivo a secco. La tolleranza è calcolata in base al residuo accettabile dell'aberrazione sferica che è provocata da un errore di quello spessore.

A	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Δd (mm)	100	5	0,7	0,2	0,07	25 μ	15 μ	8 μ	4 μ

Gli obiettivi a secco di maggiore apertura, a causa della loro sensibilità allo spessore della lamella, sono forniti con una ghiera di correzione che permette loro di ottenere la miglior qualità d'immagine anche con lamelle di spessore errato. La rotazione di questo collare, che circonda la montatura dell'obiettivo, provoca una variazione della distanza fra le lenti inferiori e le superiori di esso e con ciò una compensazione dell'aberrazione sferica introdotta da un errato valore di “ d ”. Più precisamente, la regolazione va eseguita sullo spessore effettivo della lamella + lo spessore di resina esistente fra oggetto e superficie inferiore della lamella stessa. La corretta regolazione della ghiera comporta qualche difficoltà pratica; si ricordino queste possibilità:

— Si può misurare lo spessore effettivo lamella + resina nel caso che l'oggetto sia fissato al porta-oggetti: si misura con un micrometro lo spessore del vetrino in due punti: 1) in corrispondenza della lamella; 2) fuori della lamella (porta-oggetti ben pulito!). La differenza fra le due misure ci dà lo spessore totale lamella + resina, da riportare sulla ghiera.

— Se si vuole evitare questa misura, si cerchi nel preparato una struttura fine a basso contrasto; la regolazione della ghiera va effettuata osservando quella struttura e foccheggiando di continuo: si cerca la posizione della ghiera che dà il massimo contrasto.

— Si possono osservare dei granuli al centro dell'immagine, il più possibile piccoli e scuri; l'illuminazione deve essere obliqua (cartoncino forato disposto eccentricamente sul diaframma d'apertura lasciato tutto aperto). Si ruota la ghiera in modo che i contorni contrapposti dei granuli non mostrino bordature unilaterali, ma appaiano nitidi.

■ “ 0 ” : l'obiettivo è previsto per oggetti non coperti da lamella.

9) Protezione del preparato - Distanza libera di lavoro

Il termine “distanza libera di lavoro” (FAA = freier Arbeitsabstand o WD = Working

distance) indica la distanza fra la lente frontale dell'obbiettivo e la superficie della lamella (o dell'oggetto, se è scoperto). Essa diminuisce aumentando l'apertura dell'obbiettivo. Valori elevati di WD sono vantaggiosi dal punto di vista pratico, per es. quando si cambia vetrino.

Per certe applicazioni, le distanze di lavoro degli obbiettivi usuali non sono sufficienti, e si possono usare obbiettivi speciali con elevata WD (contrassegnati dalla sigla LD = Long distance; vedi oltre).

Quando la WD è inferiore a 1,5 mm, gli obbiettivi in generale sono costruiti con “protezione del preparato”, cioè con una montatura rientrante, molleggiata o “telescopica”: la montatura interna dell'obbiettivo, che porta il sistema ottico, può rientrare (comprimendo una molla interna) nella montatura esterna fissa. In questo modo, nessun urto fra obbiettivo e preparato è in grado di danneggiare l'una o l'altra parte.

10) Lunghezza di “pareggiamento” o “lunghezza meccanica” dell'obbiettivo¹⁰ (Lo)

Con questo termine si indica la distanza fra il piano oggetto e la spalla dell'obbiettivo, quella che va ad appoggiarsi sulla battuta del revolver. Essa si misura in aria, con oggetto scoperto. Con i preparati coperti di lamella, Lo è aumentata di una piccola quantità corrispondente allo spostamento dell'immagine dell'oggetto, che è provocato dalla lamella (circa 0,06 mm per $d = 0,17$ mm). Normalmente, Lo è pari a 45,00 mm per gli obbiettivi episcopici (calcolati per $d = 0$) e 45,06 mm per quelli normali (calcolati per $d = 0,17$).

Il valore $Lo = 45$ mm è molto diffuso presso molti costruttori. Fanno eccezione per es. gli obbiettivi LD di produzione Jena, per i quali $Lo = 75$ mm nella vecchia serie e 65 mm per la serie attuale. In passato si usavano valori più piccoli (33 mm per Zeiss, 36 per Meopta, 37 per Wild, ecc.).

Un valore unificato di Lo, per es. su 45 mm, e la messa a punto accurata che si richiede a questo scopo in sede di fabbricazione, garantiscono che la focalizzazione si conservi quando si passa da un obbiettivo debole, insensibile alla presenza di lamella, ad uno medio o forte. A questo fine non importa se l'obbiettivo forte è stato calcolato per lavorare con o senza lamella. Gli obbiettivi HI i quali, come si è detto, a parte certe eccezioni, possono essere usati con e senza lamella, sono forniti con un valore di Lo che corrisponde al loro impiego previsto.

Quando nelle tabelle si trova l'indicazione “0,17 (0)”, ciò indica che l'obbiettivo ha una $Lo = 45,06$ mm ed è calcolato per una lamella di spessore $d = 0,17$ mm, ma con qualche restrizione, può essere usato anche senza lamella; in questo caso esso non è esattamente eguagliato ad altri obbiettivi e richiede un ritocco di messa a fuoco.

Problemi di messa a fuoco possono sorgere quando si usano anelli di raccordo per compensare un diverso passo di vite fra obbiettivo e revolver.

La conservazione della messa a fuoco dopo il cambio dell'obbiettivo, cioè un valore costante di Lo, è chiamato “parfocalità”. Lo stesso termine può indicare la conservazione della messa a fuoco dopo il cambio dell'oculare o di qualche sistema intermedio (cambiatore d'ingrandimento, ecc.).

11) Lunghezza meccanica del tubo (Lm) - Passo di vite

L'intercambiabilità (e la parfocalità) degli obbiettivi sul microscopio porta ad una serie di esigenze costruttive.

Le grandezze geometriche fondamentali per un obbiettivo “a coniugata immagine infinita” o “finita” sono indicate nel disegno a pagina 15.

La “lunghezza ottica del tubo” (Δ = lettera greca delta maiuscola) è la distanza fra il fuoco superiore dell'obbiettivo ed il fuoco inferiore dell'oculare. La lunghezza meccanica del tubo (Lm) è invece la distanza fra la battuta d'arresto dell'obbiettivo (orlo del foro del revolver) e orlo superiore del tubo, supposto un tubo diritto senza parti intermedie. E' un valore fondamentale del calcolo.

¹⁰ detta anche “lunghezza di parfocalità” (“équilibrage”, in francese).

Specie in passato, i vari costruttori hanno usato valori di L_m assai vari: 160 mm (il più diffuso), 170 (Leitz, Meopta), 185 - 190 - 215 - 250 (modelli metallografici) – infinito (polarizzatori, metallografici).

Fino all'introduzione della nuova serie di modelli 250-CF, presso la casa Jena vi era una duplice strada riguardo alla lunghezza di tubo ed al tipo di obiettivi utilizzabili: i microscopi diascopici ("a luce trasmessa") erano costruiti per una lunghezza L_m di 160 mm, e questo era indicato su ogni obiettivo; quelli episcopici ("a luce riflessa") usavano obiettivi con coniugata immagine infinita.

Lo scambio fra obiettivi delle due categorie era impedito da un diverso passo di vite: gli obiettivi con coniugata finita avevano un attacco a vite col classico passo inglese (RMS) di $W\ 0,8'' \times 1/36''$; gli obiettivi con coniugata infinita avevano un passo metrico $M\ 19 \times 0,75$.

Per escludere scambi ed errate applicazioni, una diversità nella filettatura è tuttora conservata.

Il fatto stesso che la coniugata immagine ha valore infinito porta a dei vantaggi costruttivi. Si tratta, infatti, di progettare lo strumento in modo che l'oggetto stia nel primo fuoco dell'obiettivo e l'immagine fornita da questo, per la stessa definizione di fuoco, si formi a distanza infinita. Per riottenere un'immagine intermedia reale, cioè un'immagine da proiettare nel primo fuoco dell'oculare a distanza ragionevole, si pone sopra l'obiettivo una lente convergente ("lente di tubo", con focale di 250 mm^{11}).

Poiché quest'ultima riceve un'immagine "coniugata all'infinito", per definizione essa forma un'immagine reale nel suo secondo fuoco. In questo modo, fra obiettivo e lente di tubo si forma per ogni punto del piano oggetto un fascio di raggi paralleli; la distanza fra quei due sistemi può essere variata senza variare l'ingrandimento e senza introdurre aberrazioni: le coniugate ottiche dei due sistemi non variano.

Per questi motivi, a partire dal 1982, la casa Jena ha prodotto nuove serie di obiettivi a coniugata infinita; oltre a questa, le caratteristiche essenziali delle nuove serie sono la correzione totale dell'aberrazione cromatica laterale ed il campo visuale apparente di 250 mm di diametro (vedi pag. 6-7). Inoltre è garantita l'intercambiabilità totale di obiettivi ed oculari. Il passo di vite è generalmente $M\ 25 \times 0,75$. In questo modo è facile lavorare in diasopia su oggetti non coperti da lamella: gli obiettivi per episcopia ($d = 0$) sono intercambiabili con quelli normali ($d = 0,17\text{ mm}$), cosa finora impossibile.

Eccezioni riguardo al passo di vite si hanno in due casi, nella produzione Jena:

- gli obiettivi per episcopia in campo scuro i quali, disponendo di un condensatore anulare, continuano ad avere un diametro maggiore: $M\ 30 \times 0,75\text{ mm}$.

- gli obiettivi acromatici per coniugata finita ($L_m = 160\text{ mm}$), che hanno il passo di vite "inglese" classico (RMS).

- più avanti si parlerà di alcuni obiettivi speciali con passo $M\ 19$.

¹¹ Vedi la nota 7 a pag. 8.

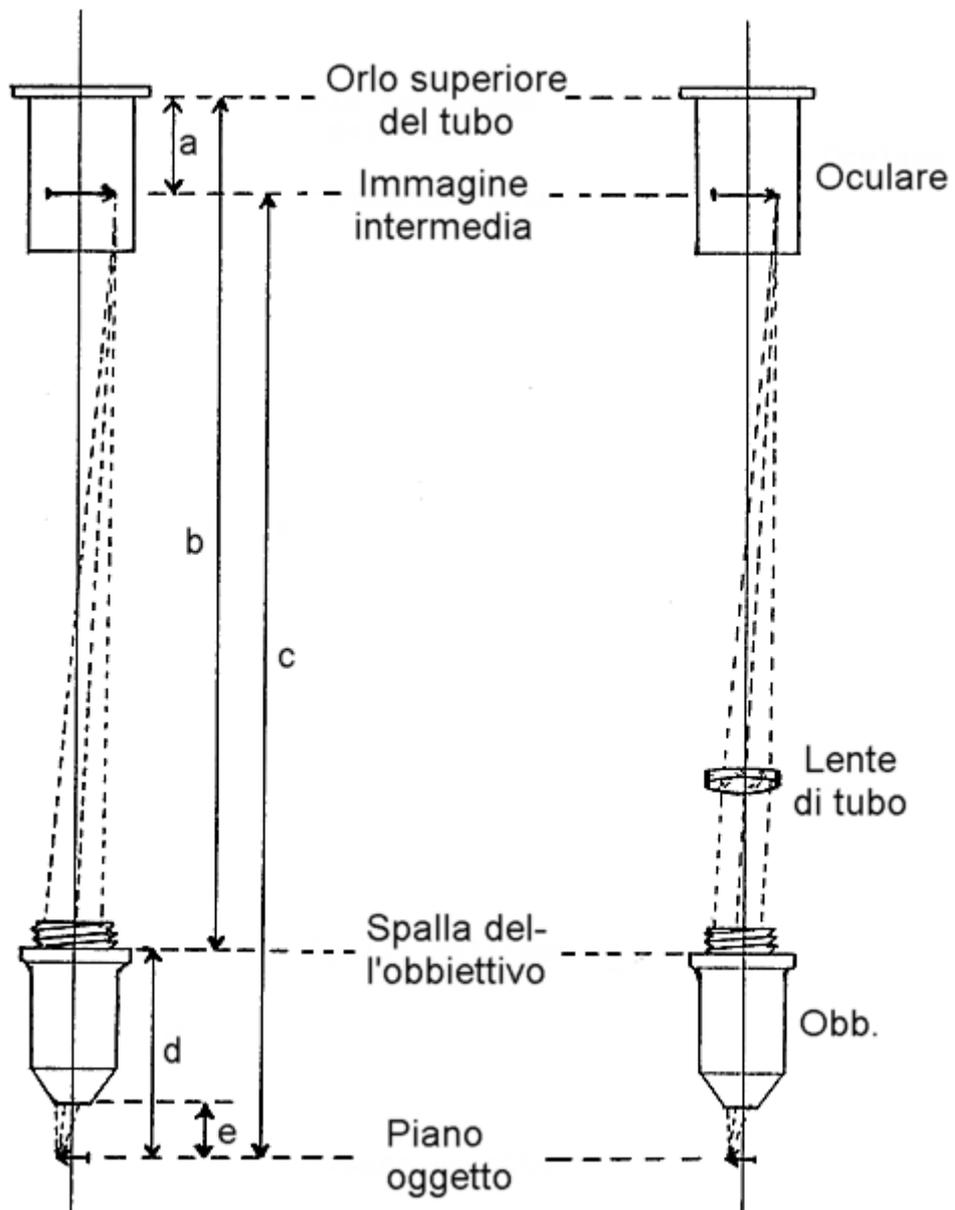


Fig. 7 – Dimensioni essenziali nel microscopio composto.

- a = altezza dell'immagine intermedia nell'oculare
- b = lunghezza meccanica del tubo (L_m)
- c = distanza oggetto-immagine (intermedia)
- d = lunghezza meccanica dell'obbiettivo (L_o)
- e = distanza libera di lavoro

A sinistra, obbiettivo "classico" a coniugata immagine finita.

A destra, obbiettivo a coniugata immagine infinita; fra esso e la lente di tubo il fascio originato da ogni punto dell'oggetto è parallelo; infiniti punti producono infiniti fasci del genere, tutti compresi entro un certo campo angolare.

12) Diaframma ad iride interno

Tranne il caso degli obbiettivi "per segmenti", cioè per tavolino universale Pol (vedi oltre), il diaframma è montato in alcuni obbiettivi HI d'ingrandimento 100.

Esso serve a ridurre l'apertura dell'obbiettivo, cosa necessaria quando si usa il condensatore a campo scuro con $A = 1,2$. Infatti, in campo scuro, la "luce diretta", cioè il fascio illuminante, non deve penetrare nell'obbiettivo; l'immagine dell'oggetto deve essere formata solo dalla

radiazione rifratta, diffratta o riflessa dall'oggetto; a questo fine, l'apertura massima dell'obiettivo deve essere minore dell'apertura minima del condensatore. E' ovvio che questa riduzione dell'apertura dell'obiettivo, che si ottiene chiudendo il diaframma, sia utile solo per il campo scuro; in tutti gli altri casi, il diaframma deve restare tutto aperto (attenzione alle manovre involontarie), pena la perdita di risoluzione e di luminosità.

13) Resistenza agli aggressivi chimici

In sede di costruzione, si provvede affinché la lente frontale sia realizzata con vetri chimicamente resistenti: il criterio di scelta è la resistenza ad una soluzione 0,1 N di acido nitrico a 25° C. Così pure si assicura la resistenza alla normale umidità.

14) Obiettivi per contrasto di fase (contrassegnati dalla scritta in verde negli obiettivi di produzione Jena).

Oggetti biologici viventi o comunque non colorati e certi oggetti sintetici si chiamano "oggetti di fase" poiché presentano un minimo assorbimento nello spettro ottico e nelle osservazioni normali; in campo chiaro, appaiono poco o punto contrastati. Essi alterano solo la fase dell'onda che li attraversa, ed a questo l'occhio non è sensibile.

Un primo approccio al problema di aumentare il contrasto in questi casi con una modifica del sistema ottico era stato tentato da tempo memorabile con una riduzione dell'apertura del fascio illuminante o con un fascio obliquo. Poi sono nati dei "sistemi di contrasto" veri e propri.

Nel 1932, F. Zernike introdusse il "contrasto di fase", in cui il piano focale posteriore dell'obiettivo porta uno strato ("piastrina" o "anello di fase") di materiale assorbente che altera la fase dell'onda che l'attraversa.

In questo modo, le parti dell'oggetto che hanno un diverso potere di ritardo di fase (cioè un diverso indice di rifrazione e/o un diverso spessore) appaiono con diversa luminosità.

La "luce diretta" (fascio illuminante) deve essere separata dalla radiazione diffratta dall'oggetto in base alla diversa fase dell'una rispetto all'altra. Una separazione completa non è possibile in pratica, per cui nell'immagine si mostrano degli effetti, delle strutture, che non corrispondono a strutture reali dell'oggetto: è il cosiddetto "alone" che si presenta come un bordo chiaro attorno ad un oggetto scuro o viceversa. Questo alone varia con le dimensioni dell'oggetto, colla differenza di indice fra oggetto e mezzo circostante, colla forma del diaframma di apertura e della piastrina di fase¹².

I dispositivi per il contrasto di fase, o altri sistemi di contrasto, possono essere realizzati con mezzi convenzionali (obiettivi speciali, filtri e diaframmi speciali, ecc.) oppure con sistemi intermedi, posti fra obiettivo ed oculare, nei quali si forma un'immagine intermedia supplementare, fuori dall'oculare, associati ad obiettivi normali (sistema "Contrast" di Jena¹²).

Nel contrasto di fase convenzionale gli speciali obiettivi, in corrispondenza del loro piano focale posteriore, recano un "anello di fase", cioè uno strato sfasante a forma di anello centrato.

A seconda delle dimensioni, della rotazione di fase e della trasparenza dell'anello, il contrasto di fase ed i relativi obiettivi possono presentarsi in varie forme:

++ Contrasto positivo: l'anello provoca un anticipo di fase di 90° ed un assorbimento del 75 % nell'onda diretta (fascio illuminante) che l'attraversa. Il contrasto è massimo con oggetti che provocano un piccolo sfasamento, cioè poco rifrangenti. È questa la versione normale.

++ Contrasto negativo: nella produzione Jena, questo si realizza solo con i sistemi intermedi ("Contrast" ed "Interphako"). Lo sfasamento prodotto dall'oggetto può essere più grande di quello corrispondente nel contrasto positivo prima che si presenti un'inversione del contrasto¹³. La trasmissione dell'anello di fase è minore di quella degli anelli "positivi".

++ Contrasto di fase rinforzato: la trasmissione dell'anello di fase è abbassata al 10 %; l'onda diretta è così attenuata da produrre una specie di campo scuro. La casa Jena offre questo

¹² Si veda in questo sito l'art. n° 25: "La formazione dell'alone ..." e l'art. n° 33: "Le tecniche di contrasto".

¹³ Ciò significa che si possono osservare oggetti più spessi e/o più rifrangenti. Si veda in questo sito l'art. n° 33: "Le tecniche di contrasto", pag. 15.

tipo di contrasto per l'obiettivo $12,5 \times$ e per un sistema intermedio ("Contrast").

++ Contrasto di fase variabile. Per adattare le prestazioni del sistema di contrasto alle caratteristiche dell'oggetto sono stati finora escogitati vari sistemi di contrasto variabile. Il sistema Jena (**Phv**) prevede un doppio anello di fase. Il senso di questi sistemi è di consentire una variazione dell'alone e rendere visibili strutture altrimenti nascoste dall'alone stesso. Si ha così un adattamento alle dimensioni dell'oggetto, che influiscono sulle caratteristiche dell'alone: per oggetti molto rifrangenti conviene usare entrambi gli anelli; per quelli piccoli, si chiude il diaframma d'apertura in modo da mettere fuori uso l'anello più grande.

Il doppio anello produce però qualche alterazione dell'immagine, come si può notare con gli attuali obiettivi ad elevata correzione: perdita di contrasto e definizione (almeno se usati in campo chiaro), doppi orli o strutture inesistenti ("artefizi" o "artefatti").

Se si hanno difficoltà nell'interpretare le immagini in contrasto di fase si può fare un confronto col sistema DIC (contrasto interferenziale differenziale), il che porta a risultati migliori del doppio anello.

++ Contrasto di fase ad anello unico (Ph). È il sistema normale. Nella produzione Jena, l'anello unico ha un diametro ed una larghezza intermedi fra quelli degli anelli doppi.

Il contrasto e la definizione sono migliori. L'applicazione prevalente è la ricerca su piccoli oggetti con piccolo sfasamento, cioè che hanno indice molto simile a quello del liquido circostante.

15) Obiettivi per ricerche quantitative in radiazione polarizzata (notazioni in rosso negli obiettivi di produzione Jena)

Gli oggetti otticamente anisotropi si studiano in radiazione polarizzata. I campi di applicazione tradizionali e moderni della microscopia "in polarizzazione" sono la geologia, l'ingegneria mineraria, la cristallografia, la mineralogia, la scienza dei carboni, la difesa ambientale, la tecnologia delle ceramiche, dei materiali da costruzione, dei polimeri, delle fibre tessili, la biologia e la medicina.

Per osservazioni qualitative in diasopia si possono usare obiettivi normali, fintanto che non si opera su oggetti con birifrazione molto debole. Misure quantitative esigono invece obiettivi speciali ("Pol"), che sono derivati da quelli normali, per campo chiaro, ma ricevono particolari cure (vetri raffreddati con cicli termici speciali, montature senza tensioni) in modo da non presentare sensibili anisotropie dovute a tensioni interne nei vetri. La loro birifrazione residua non deve portare ad una differenza di cammino ottico superiore a 0,5 nm. Tale residuo viene ulteriormente compensato adattando i singoli obiettivi ai diversi fori del revolver: obiettivi e fori sono numerati e nel manuale d'istruzioni di ogni strumento viene indicata la corrispondenza dei numeri da rispettare all'atto del montaggio degli obiettivi. In questo modo, lavorando a Nicol incrociati, l'obiettivo non porta a diminuire il grado di estinzione.

Con gli obiettivi "Pol" occorrono particolari attenzioni: per es., nell'avvitarli o svitarli si deve stringere solo la corona godronata superiore; qualunque superficie fra polarizzatore ed analizzatore deve essere molto pulita: infatti, la polvere è costituita in genere di frammenti minerali e vegetali birifrangenti i quali riducono il grado di estinzione; ogni superficie ottica del condensatore, dell'obiettivo e dei compensatori e filtri posti fra i Nicol può raccogliere polvere; sedi preferite per la polvere sono le superfici concave delle lenti frontali del condensatore e dell'obiettivo.

Si ricordi che la ricerca quantitativa in polarizzazione, specialmente in diasopia, richiede non solo obiettivi, ma anche condensatori di qualità "Pol".

L'uso di obiettivi Pol in episcopia trae vantaggio dalla "posizione fissa della pupilla": per tutti gli obiettivi è costante la distanza fra la spalla di appoggio ed il piano della pupilla d'uscita. In questo modo è garantita l'omogeneità¹⁴ del fascio polarizzato senza richiedere l'uso di un sistema regolabile per formare sempre a fuoco l'immagine del diaframma di apertura.

¹⁴ Probabilmente, l'autore intende che, quando si cambia obiettivo, non occorre focalizzare la lente di Amici.

Un'esigenza fondamentale per il lavoro in radiazione polarizzata è la possibilità di centrare i singoli obbiettivi sul revolver; in questo modo l'asse ottico dell'obiettivo viene portato a coincidere con l'asse di rotazione del tavolino. Cambiando obiettivo, l'immagine rimane centrata rispetto al campo visuale e questo centro non si sposta ruotando il tavolino.

Un revolver a fori centrabili si trova nella nuova serie di microscopi della casa Jena, tranne i modelli Jenaval, Jenalumar e Jenatech.

Nei casi più difficili di osservazione in trasparenza, per es. quando si cercano piastre metafasiche non colorate o fluocromate nella ricerca genetica, è sempre utile una buona centratura dell'obiettivo anche se i fori del revolver non sono centrabili. In questo caso il costruttore garantisce che, dopo il cambio dell'obiettivo, anche ripetuto più volte, il centro dell'immagine non esce dal campo visuale.

Gli obbiettivi d'ingrandimento crescente vanno avvitati sul revolver partendo dal foro contrassegnato con "1" e dall'obiettivo più debole.

16) Obbiettivi HD (per campo chiaro e campo scuro in episcopia)

Mentre in diascopea ("luce trasmessa") il campo scuro si può ottenere con obbiettivi per campo chiaro e condensatori speciali, in episcopia ("luce incidente") si ricorre ad obbiettivi speciali (HD) che consentono sia il campo chiaro che quello scuro.

La parte centrale di questi obbiettivi è un sistema formatore d'immagine identico a quello dei corrispondenti obbiettivi per campo chiaro. La parte periferica anulare costituisce il condensatore per campo scuro che permette di illuminare da ogni lato l'oggetto con apertura superiore a quella dell'obiettivo. Questo sistema convergente anulare è costituito negli obbiettivi deboli da elementi rifrangenti (lenti); negli obbiettivi medi e forti da specchi; negli obbiettivi ad immersione da sistemi misti.

L'illuminazione in campo scuro nei microscopi episcopici Neophot 30/32 e Jenavert giunge all'obiettivo attraverso una guida di luce a fibre di vetro; la superficie emergente di essa, che è anulare, si adatta al condensatore anulare dell'obiettivo.

Gli accessori per campo scuro in episcopia producono immagini molto contrastate poiché tutti i raggi regolarmente riflessi da un oggetto piano non entrano nell'obiettivo e non concorrono a formare l'immagine (da qui il fondo scuro). Essi invece producono luce diffusa quando incontrano le irregolarità dell'oggetto (fessure, pori, contorni di granuli).

I prodotti di ossidazione mostrano spesso in queste condizioni colori propri caratteristici.

17) L'episcopia (illuminazione "incidente" o "verticale" o "luce riflessa")

L'illuminazione in campo chiaro in episcopia, riguardo al contrasto, rappresenta il metodo più critico di tutti quelli usati in microscopia. Infatti, il fascio illuminante attraversa l'obiettivo e per ogni superficie di ogni lente si produce della luce riflessa.

Questa serie di "riflessi" rappresenta una frazione del fascio illuminante che non ha nulla a che vedere con l'immagine dell'oggetto e si sovrappone ad essa come un velo di luce diffusa che non contiene alcuna informazione ed abbassa il contrasto.

Nel quadro dello sviluppo dei nuovi obbiettivi per episcopia si è data molta importanza da un lato alla qualità dell'immagine, dall'altro alla riduzione dei riflessi sulle lenti. Questi ultimi dipendono dalla geometria del sistema ottico, dai rivestimenti ("trattamenti") anti-riflettenti, dal tipo di oggetto, dal diametro del campo immagine e dall'apertura del fascio illuminante. I migliori risultati (il più piccolo rapporto fra radiazione diffusa e radiazione del fascio illuminante) si hanno quando l'apertura per l'osservazione e quella per l'illuminazione coincidono. Ma in queste condizioni il contrasto è scarso per altri motivi, come avviene in diascopea. Una chiusura del diaframma di apertura a 2/3 del suo massimo diametro (riduzione dell'apertura del fascio illuminante) porta ad una perdita di contrasto con lieve aumento della percentuale di luce riflessa¹⁵.

¹⁵ L'occhio non si accorge di questa perdita di contrasto, anzi avverte un aumento, poiché viene ingannato dalla diminuzione della luminosità generale.

Nelle tabelle degli obiettivi Jena, quelli indicati con un “+” sono particolarmente adatti all’episcopia per via della loro struttura ottica e/o dei loro trattamenti antiriflettenti; per questi caratteri essi si distinguono dai normali sistemi diascopici. I “trattamenti” degli obiettivi episcopici sono costituiti da strati sottili trasparenti multipli che provocano interferenza negativa fra le onde riflesse e riducono la radiazione riflessa da ogni superficie aria-vetro. Essi però non sono adatti agli obiettivi “Pol” per il loro potere depolarizzante. Negli obiettivi Pol si usano perciò, per ridurre i riflessi, solo rivestimenti semplici “T”.

Le osservazioni in episcopia si eseguono in metallografia, chimica, industria ceramica, della carta, tessile, ed in molti campi industriali per il controllo dei materiali¹⁶.

La superficie da osservare deve essere liscia e perpendicolare all’asse ottico.

18) DIK o DIC (Contrasto interferenziale differenziale)

A partire dagli anni 1960, il DIC secondo Nomarski ha conquistato una solida posizione nella microscopia degli oggetti di fase (vedi pag. 16). Con questa tecnica, indipendentemente dalla presenza dell’oggetto, l’immagine viene sdoppiata in due parti coerenti, identiche, che portano ognuna l’informazione dell’oggetto; le due parti sono spostate lateralmente in forma “differenziale” (di una lunghezza di poco superiore alla risoluzione dell’obiettivo) ed alla fine vengono fatte interferire.

La parte fondamentale del dispositivo DIC è un prisma birifrangente di Wollaston modificato, disposto presso il piano focale posteriore dell’obiettivo. Esso produce uno sdoppiamento del fascio che lo attraversa, che è polarizzato, e quindi uno sdoppiamento laterale dell’immagine.

In diascopea, occorre un altro prisma nel sistema illuminante (sotto il condensatore) in modo da poter utilizzare la piena apertura di esso.

Da quanto si è detto, deriva uno dei vantaggi del DIC: esso può essere realizzato con obiettivi normali su uno stativo convenzionale.

Nell’immagine si vede distintamente il tipico contrasto del DIC, che produce un’apparenza di rilievo con ombreggiatura; l’ombreggiatura rappresenta il profilo di ogni variazione di cammino ottico nel piano oggetto. Il DIC presenta un buon contrasto quando il ritardo di fase operato dall’oggetto è elevato.

Il DIC è usato molto in diascopea, come completamento del contrasto di fase, ma lo è sempre più anche in episcopia. E’ fornibile per gli stativi a luce trasmessa come serie di coppie di “modulatori” (prismi per il lato illuminazione ed il lato immagine) adattate ognuna a ciascuno degli obiettivi in uso. Nella produzione Jena, sono previste le coppie per gli obiettivi Plan-acromatici a partire dal 10 ×; per i GF-Planacromatici a partire dal 12,5 ×.

Gli accessori per il DIC negli stativi episcopici Jenavert e Neophot sono rappresentati da slitte contenenti un prisma, ognuna adattata ad un particolare obiettivo. Sono utilizzabili col DIC gli obiettivi GF a partire dal 6,3 × ed i Plan-acromatici a campo normale a partire dal 5 ×.

Molto conveniente è la soluzione adottata per lo Jenatech, dove è necessario un solo prisma per tutti gli obiettivi.

Usando i sistemi DIC convenzionali si noti che, dopo aver avvitato il prisma lato immagine, la lunghezza meccanica L_0 di ogni obiettivo aumenta dell’altezza dell’anello intermedio che contiene il prisma. Ciò vale per Jenaval e Jenavert. E’ quindi necessario che gli altri obiettivi, che non devono lavorare in DIC, siano muniti di un anello intermedio vuoto della stessa altezza di quelli con prisma. In questo modo rimane l’intercambiabilità totale degli obiettivi.

¹⁶ Anche fra i costruttori viene ignorato il mondo sconfinato delle applicazioni dell’episcopia in campo naturalistico (vedi in questo sito gli articoli n° 8 (“L’osservazione in episcopia nel campo delle scienze naturali”) ed A4 (“Rocce e cortecce”).

Nelle tabelle seguenti sono compresi tutti gli obiettivi attualmente¹⁷ prodotti dalla casa Jena, quelli della nuova generazione, esclusi quelli a coniugata finita destinati ai modelli da routine.

Si richiamano anche alcuni obiettivi ancora in via di sviluppo, da cui risulta che i dati sono validi con riserva.

ACROMATICI per CONIUGATA IMMAGINE INFINITA (A)

Sono gli obiettivi più semplici della nuova generazione Jena, nei quali il rendimento è sostanzialmente migliorato rispetto alle serie classiche.

A confronto con gli obiettivi di pari ingrandimento delle altre serie, gli acromatici possiedono una minor apertura A, e quindi una minor risoluzione, ma una maggior distanza di lavoro (WD) ed una maggiore profondità di fuoco.

La costruzione più semplice di questi sistemi prevede un minor numero di lenti, il che spiega la miglior trasmissione degli acromatici rispetto ai plan-acromatici, specie nell'ultravioletto. Gli acromatici sono quindi idonei alle osservazioni di routine nella fluorescenza in episcopia.

Questi obiettivi sono previsti in generale per lavori didattici, di laboratorio e di routine.

APOCROMATICI (Apo)

In questi obiettivi, l'aberrazione cromatica è corretta per tre colori; per questa ragione, gli apocromatici vengono costruiti con aperture maggiori dei corrispondenti acromatici di pari ingrandimento. Per la maggiore apertura, questi obiettivi sono consigliati per il lavoro in fluorescenza poiché un sistema ottico "luminoso" è fondamentale per questa tecnica. Infatti, il valore dell'apertura dell'obiettivo influisce in funzione del suo quadrato sia sull'intensità del fascio illuminante (in episcopia) sia su quella dell'immagine.

Gli svantaggi di questi obiettivi, come la minor distanza di lavoro e la minor profondità di fuoco, che rendono il lavoro più difficile in pratica, vengono accettati in blocco.

Gli apocromatici hanno un campo immagine normale.

PLAN - ACROMATICI (PA)

Si tratta di obiettivi di categoria intermedia, con una correzione di tipo acromatico, ma con l'eliminazione della curvatura di campo. Essi quindi sono utilizzati dove la curvatura disturba, per es. in fotografia o nell'osservazione di oggetti sottili (strisci).

Sono disponibili sia i tipi per diascopea che per episcopia, adeguati ad una categoria di strumenti di prezzo intermedio. I termini della serie a minor ingrandimento si possono usare indifferentemente in diascopea ed episcopia.

Non è disponibile in questa categoria il grande campo degli obiettivi GF, corrispondente ad un'immagine intermedia di 32 mm di diametro. Si tratta invece di obiettivi a campo "normale", con diametro di 20 mm, ma possono essere utilizzati per campi fino a 25 mm. Fa eccezione l'obiettivo PA 2,5 ×, che si può utilizzare solo fino a 20 mm.

■ PA 50×/ 0,80 ∞/0 – È un obiettivo forte per preparati senza lamella. Oltre all'impiego in episcopia, è possibile l'osservazione diascopea di strisci non coperti, come si usano nei test citologici in grande serie. Al fine di smaltire razionalmente il gran numero di strisci, si evita l'uso della lamella; ma fra l'oggetto (cellula isolata, batterio) ed il mezzo circostante (aria) vi è una forte differenza di indice di rifrazione e ciò porta a forti contrasti, cioè a linee scure lungo i margini dell'oggetto; per evitare questo degrado dell'immagine, occorre coprire lo striscio con una vernice od uno spray trasparente.

¹⁷ "Attualmente", come già detto, si riferisce agli anni 1982–1990.

L'uso di preparati coperti o non coperti nelle ricerche di routine per la prevenzione dei tumori è legato a differenti abitudini proprie dei singoli istituti o dei singoli paesi.

■ PA (fl) 50×/100× – Gli obiettivi adatti alle osservazioni in fluorescenza vengono prodotti con particolare riguardo alla trasmissione nel prossimo ultra-violetto, al contrasto e ad un'elevata apertura.

Finora, per la microscopia in fluorescenza, sono stati preferiti gli obiettivi apocromatici per il loro elevato rapporto apertura/ingrandimento. Ma la radiazione di fluorescenza è quasi monocromatica, per cui la elevata correzione cromatica degli apocromatici è quasi inutile.

Gli obiettivi citati (PA fl 50 e 100) sono plan-acromatici corretti per un campo di 25 mm e quindi permettono osservazioni in fluorescenza a grande campo. Il loro rapporto apertura/ingrandimento è elevato e quindi forniscono immagini di elevata intensità.

Con l'obiettivo PA (fl) 50×/0,95 - ∞/0,17 è disponibile la massima apertura possibile in pratica per un sistema a secco. Elevate aperture sono necessarie in fluorescenza poiché la radiazione di fluorescenza viene emessa da tutti i lati, come un fascio sferico; quindi la luminosità dell'immagine dipende da quanta parte di questo fascio può essere accolta dall'obiettivo. E questa parte dipende solo dall'apertura numerica che, per un obiettivo a secco, è:

$$A = \text{sen } \alpha$$

cioè dipende solo dall'angolo di apertura α .

■ PA LDN 20×/0,45 - ∞/1,2 – Si tratta di un obiettivo con una forte distanza di lavoro WD (LD = long distance) ma con una lunghezza meccanica L_0 normale (N). Esso è insostituibile nei microscopi invertiti in diascopia, dove l'osservazione avviene attraverso il fondo di un recipiente in vetro o plastica. Una tipica applicazione è l'osservazione di oggetti all'interno di microcamere. Per lo spessore normale di questi recipienti, 1,2 mm, si ha la miglior qualità d'immagine, ma vanno previste differenze fra recipienti di diversi fabbricanti. Un diverso spessore della parete attraverso cui si osserva provoca l'insorgenza di aberrazione sferica; una compensazione è possibile in principio:

- con lamine aggiuntive (se lo spessore è insufficiente)
- con un diaframma che riduca l'apertura
- con una ghiera di correzione.

L'obiettivo LDN viene fornito con una lamina frontale in vetro che si può svitare in modo da adattare l'obiettivo ai vari possibili spessori della parete del recipiente. Tali spessori possono andare da 0,17 mm (normale lamella) a 1,6 mm a seconda dell'applicazione, come nel microscopio Sedival (idrobiologia, chimica, controlli alimentari, protezione ambientale, farmacologia, ematologia, immunologia, culture di cellule e tessuti).

Naturalmente, cambiando la lamina frontale, cambia anche la WD dell'obiettivo. In ogni caso, si può adattare il funzionamento dell'obiettivo allo spessore della parete del recipiente.

Indicazioni più precise (lamine frontali, ghiera di correzione, diaframma) non si possono dare circa lo stato attuale di sviluppo dell'obiettivo.

Esso è comunque adatto per il campo chiaro, il DIC e la fluorescenza, ma può essere prezioso, con la sua grande distanza di lavoro, anche per l'episcopia. Infatti, vi possono essere oggetti incavati oppure incastonati in montature sporgenti. Lo stesso vale nell'osservazione dei circuiti integrati: si può avere spazio sufficiente per manipolare l'oggetto (sistemazione di sonde, saldatura di reofori). E' possibile anche la tecnica delle pellicole, cioè degli strati protettivi depositi sui wafer, allo scopo di evitare la contaminazione durante le varie fasi della fabbricazione: l'osservazione può essere fatta attraverso la pellicola.

■ PA 50×/0,95 - ∞/0,17 Pol – Con quest'obiettivo si realizza la massima apertura possibile. Questo significa che in conoscopia si può osservare un angolo 2E fra gli assi di un cristallo biassico di circa 144°, circa 38° maggiore di quello che si può osservare con obiettivi di apertura 0,8 (106°). Si può così impostare un lavoro razionale, poiché quest'obiettivo a secco basta in molti casi, senza ricorrere all'immersione.

La ghiera di correzione di quest'obiettivo è utile in ortoscopia poiché permette di evitare il degrado dell'immagine causato da uno spessore non corretto dei mezzi trasparenti esistenti fra

oggetto ed obbiettivo (lamella, resina, strati dell'oggetto sopra al fuoco). Si forma così un'immagine ben contrastata anche di fini inclusioni o prodotti di trasformazione in granuli minerali.

■ Sistema panoramico 1,6 : 1 = E' un sistema integrato nello stativo Jenapol e si può usare solo in diascopea.

Le dimensioni del massimo campo oggetto rappresentato nell'immagine offrono sempre un criterio di qualità per un microscopio poiché esiste sempre la necessità di una visione orientativa della totalità dell'oggetto, indipendentemente dalla ricerca in corso (sezione istologica, sezione sottile di roccia, circuiti integrati).

Lo Jenapol col sistema panoramico 1,6:1 e l'oculare standard GF - P10× (20) permette di vedere un campo di 12,5 mm di diametro sotto un ingrandimento di 16×.

PLAN - ACROMATICI a GRANDE CAMPO (GF - PA)

Obbiettivi ad elevate prestazioni di correzione acromatica, a campo spianato. Loro caratteristica è la dimensione dell'immagine intermedia ("indice di campo"): 32 mm; in combinazione cogli oculari GF - Pw (a campo super-grande) e con un fattore di tubo di 0,8× (impostabile a volontà) questa immagine intermedia viene completamente sfruttata.

Con queste ottiche a grande campo aumenta sostanzialmente il contenuto d'informazione dell'immagine.

■ GF - PA 1×/0,03 - Spez/—

Come si è detto, il minimo ingrandimento disponibile è un criterio di qualità nel giudicare un microscopio. In pratica, la richiesta per una veduta d'assieme di grandi campi-oggetto proviene da tutti i campi d'applicazione. Tradizionale è questo problema nello studio di sezioni istologiche: prima di cercare le singole cellule, l'istologo deve avere una visione generale del tessuto o dell'organo. Tipico è anche lo studio di sezioni in serie, il giudizio su embrioni o feti nella ricerca di possibili danni nella formazione e nel differenziamento degli organi, come effetti secondari di medicinali, ed infine la diagnostica su materiale operatorio.

L'obbiettivo GF - PA 1×/0,03 è un sistema panoramico per la diascopea, che dà la possibilità di osservare un campo oggetto di 25 mm (larghezza di un porta-oggetto) con un ingrandimento totale da 6,3 × in su.

Poiché quest'obbiettivo è parfocale cogli altri, il passaggio agli ingrandimenti maggiori è immediato; esso è vantaggioso anche in quanto con esso si coprono valori d'ingrandimento che sarebbero riservati alla stereo-microscopia. Poiché la lunghezza focale di questo sistema è assai maggiore della lunghezza meccanica Lo degli altri obbiettivi, una parte del sistema si pone in luogo della lente di tubo, cosa resa possibile dalla struttura degli strumenti a coniugata infinita (da ciò la denominazione "Spez" = speciale).

Altra peculiarità di questo sistema è la sua possibilità di focalizzazione, che è necessaria per evitare difetti di parfocalità in seguito a difetti di potere convergente dell'osservatore o difetti di accomodazione anche in persone normali. Per conservare la parfocalità, occorre prima mettere a fuoco con la micrometrica su un obbiettivo medio e poi mettere a fuoco l'obbiettivo 1× colla sua ghiera. Questa seconda focalizzazione può essere diversa da una persona all'altra, ed è riproducibile.

La variante non foceggiabile di quest'obbiettivo, per le ragioni su esposte, non ha dato buona prova e veniva fornito solo come aggiunta su Jenaval.

■ GF PA 1,6×/0,045 - Spez/—

Si tratta di un sistema analogo al precedente, previsto per l'episcopia. Anch'esso è composto di due parti, cioè al posto della lente di tubo viene inserita la parte superiore del sistema panoramico 1,6×; con un oculare standard GF Pw 10× (25) si può osservare un campo oggetto di 16 mm con un ingrandimento complessivo di 16. Quest'obbiettivo è parfocale cogli altri ma, a differenza dell'obbiettivo 1×, va montato su una slitta, intercambiabile col revolver, che contiene uno degli specchi per l'illuminazione incidente.

- GF PA 1,25×/0,025 - ∞/- ; GF PA 2,5×/0,045 - ∞/-

Si tratta ancora di sistemi panoramici, utilizzabili solo sullo stativo Neophot 30/32 assieme ad un condensatore a grande campo. Essi non sono parfocali con gli altri obiettivi del Neophot: la lunghezza meccanica L_0 è pari a 165 mm.

- GF PA⁺ 3,2×/0,06 - ∞/- ; GF PA⁺ 12,5×/0,25 - ∞/-

Come già detto a pag. 18, l'episcopia in campo chiaro rappresenta, dal punto di vista del contrasto, il metodo d'illuminazione più difficile in tutto il campo della microscopia. Poiché il fascio illuminante, prima di giungere sull'oggetto, attraversa l'obiettivo, a causa della riflessione su ognuna delle superfici delle lenti si forma una certa frazione di luce diffusa. Questa luce diffusa si sovrappone a quella che è riflessa dall'oggetto e che forma l'immagine, cioè alla radiazione che porta le informazioni sulla struttura dell'oggetto. Gli obiettivi per episcopia debbono quindi essere ottimizzati riguardo alle riflessioni interne. In questo senso, la geometria del sistema ottico e gli strati anti-riflettenti sulle superfici delle lenti hanno grande parte.

Gli obiettivi contrassegnati come quelli citati sopra, cioè con un "+", sono ben studiati nel senso appena descritto e sono quindi molto adatti all'episcopia.

- GF PA 7,5×/0,15 ∞/-

Quest'obiettivo è stato studiato per consentire l'ingrandimento normale di 75×, necessario in metallografia, specialmente nelle ricerche sul rame. Esso può sostituire quello di ingrandimento 6,3× ed offre con gli altri obiettivi del Neophot 30/32 la serie normalizzata di ingrandimenti richiesta dai metallografi:

- 12,5× (ottenuto dall'obiettivo 1,25×)
- 25× (ottenuta dall'obiettivo 2,5× o dal 3,2× con fattore di tubo 0,8×)
- 50× (6,3 × 0,8 oppure 3,2 × 1,6)
- 75× (dal 7,5× di cui si sta parlando)
- 100× (12,5 × 0,8)
- 200× (25 × 0,8)
- 500× (dal 50×)
- 1000× (dal 100×).

- GF PA 100/0,90 - ∞/0

Un obiettivo a secco di forte ingrandimento è interessante per molti campi di applicazione, soprattutto dove il liquido d'immersione danneggia l'oggetto o comunque risulta inutilizzabile. Un obiettivo 100 a secco per l'episcopia era già disponibile per la generazione precedente di microscopi; ma in essi vi era una doppia serie di obiettivi (episcopici e diascopici) con diversa lunghezza di tubo e passo di vite, e quindi le due serie non erano intercambiabili ed il 100 a secco non si poteva usare in diascopea.

Le radicali modifiche relative alla nuova serie di microscopi Jena permettono ora l'intercambiabilità degli obiettivi da episcopia e da diascopea.

Uno dei problemi di routine nel laboratorio clinico è la discriminazione delle cosiddette immagini differenziali del sangue. A seconda degli standard di lavoro dei vari laboratori, si tratta spesso di strisci senza lamella i quali, per le dimensioni degli elementi figurati del sangue, vanno osservati con obiettivi di ingrandimento proprio 100×.

Dal punto di vista della razionalità del lavoro e davanti alla mole delle osservazioni da eseguire, l'obiettivo 100 a secco offre vantaggi effettivi. Ma la sua apertura di 0,90, in confronto con gli obiettivi HI, provoca un minor potere risolutivo. Quindi, nei casi difficili, occorre sempre prevedere l'uso di un obiettivo HI.

Comunque, se ci si decide per le ragioni di praticità sopra citate di usare un obiettivo a secco con strisci non coperti, si raccomanda di sfruttare la tecnica della verniciatura a spray (lacca di protezione). Con questo strato trasparente depositato sullo striscio, si elimina la differenza di indice fra oggetto ed aria e l'immagine migliora notevolmente. Di questo problema si è già parlato a pag. 20.

Poiché i clienti in molti casi non rinunciano all'obiettivo HI per i lavori su strisci,

l'obiettivo a secco 100×/0,90 viene offerto su richiesta, non come corredo standard.

■ GF PA HD

Gli obiettivi di questa serie costituiscono senza eccezione l'equipaggiamento standard del Neophot 30/32 ed in larga misura della variante GF HD del microscopio diritto Jenavert (per l'episcopia). Con essi, le alte prestazioni dei sistemi ottici a grande campo corretti di cromatica laterale divengono disponibili per la microscopia in episcopia a campo scuro.

Della struttura di questi obiettivi si è già parlato a pag. 18.

Quando il campo oggetto è grande, si presenta il problema dell'illuminazione omogenea di esso in campo scuro. Perciò i due obiettivi di minore ingrandimento (3,2× e 6,3×) hanno un diaframma frontale che può venire inserito nei casi critici. Se l'oggetto lo consente, eliminando il diaframma si ottiene una maggior distanza di lavoro (WD).

■ GF PA Pol

Questi obiettivi sono necessari sul Neophot 30/32 per i lavori in radiazione polarizzata; essi hanno un'immagine intermedia di diametro ridotto poiché in polarizzazione questo diametro (il cosiddetto indice di campo s') incontra dei limiti fisici: un diametro maggiore di 20 mm non è possibile poiché sulle superfici ricurve delle lenti si ha una parziale riflessione che ruota il piano di polarizzazione della radiazione incidente e ciò provoca alterazioni del contrasto e false interpretazioni.

PLAN - APOCROMATICI a GRANDE CAMPO (GF - PApo)

Sono obiettivi di elevate prestazioni con correzione apocromatica, risoluzione più elevata dei corrispondenti obiettivi di correzione acromatica (per via della maggiore apertura), e correzione della curvatura di campo fino ad un indice di campo s' di 32 mm.

Per queste loro caratteristiche, essi vengono impiegati per la ricerca delle strutture più fini con la massima purezza di colori in un campo grande. Nella fotografia, questi obiettivi sono da preferire a tutte le altre categorie.

I GF PApo, per il loro elevato costo di produzione, esistono a partire dall'ingrandimento 25×; perciò, nel corredo degli stativi Jenaval e Jenaval Contrast, essi sono integrati dai più deboli GF PA 3,2× e 12,5×.

I GF PApo hanno un'aberrazione cromatica ridottissima e sono ben adatti a soddisfare le richieste più spinte circa la resa dei colori.

Analoga è la situazione nelle corrispondenti versioni HD e Pol, ed anche qui si hanno serie miste con GF PA di minore ingrandimento.

OBIETTIVI ad IMMERSIONE (I)

Si può dare una lunga serie di argomenti a favore dell'uso degli obiettivi ad immersione deboli e medi. Perciò la Jena offre all'utilizzatore dell'immersione in olio una serie di obiettivi a partire dal VI 12,5×, al HI 25×, al HI 50×, fino al HI 100×.

Quando non si può rinunciare all'uso dell'obiettivo HI 100×, stando il pericolo di sporcare d'olio un qualunque obiettivo a secco forte montato sullo stesso revolver, diviene sensato lavorare esclusivamente con obiettivi HI della serie sopra citata.

E' possibile anche lavorare con immersione in acqua con gli obiettivi VI 12,5× ed il WI 50×.

Tutti gli obiettivi ad immersione hanno il miglior rapporto apertura/ingrandimento poiché l'immersione porta di per sé un aumento di apertura; perciò è possibile ottenere grandi campi con elevata risoluzione.

I campi di applicazione principali sono:

- Fluorescenza. Le maggiori aperture, in questo caso, rappresentano un vantaggio rispetto ai corrispondenti obiettivi a secco, così come la miglior trasmissione, cioè la riduzione dei riflessi sulla lente frontale e sulla lamella.

- Polarizzazione. Nel caso di oggetti di debole assorbimento osservati in episcopia, gli obiettivi ad immersione consentono una modificazione del potere riflettente che ha valore diagnostico. In parallelo, l'immagine visibile fra Nicol incrociati è più luminosa ma nasce un debole effetto di anisotropia, proporzionale al quadrato dell'indice del liquido d'immersione.

In questo modo il campo di applicazione nella diagnosi dei minerali metalliferi s'allarga.

L'obiettivo VI 12,5× può essere usato utilmente nell'identificazione di minerali molto simili fra loro in quanto possono venir utilizzati diversi liquidi per l'immersione.

- Episcopia. L'uso di obiettivi ad immersione risulta particolarmente vantaggioso nella microscopia dei carboni a causa di un aumento del contrasto quando si osservano oggetti debolmente riflettenti in episcopia a fondo chiaro; fra l'altro, si riducono i riflessi alla superficie della lente frontale.

Col liquido d'immersione, le piccole differenze d'indice nell'oggetto producono un contrasto più distinto che non coi corrispondenti sistemi a secco. Per questo motivo, certi costruttori offrono obiettivi ad immersione ad alto indice (per es. a ioduro di metile) per avere corrispondenza con l'elevato indice di certi minerali.

- Microscopia interferenziale. Con gli obiettivi ad immersione disponibili nelle varianti per campo chiaro è possibile applicare agli stativi Jenaval e Jenavert le tecniche interferenziali Interphako e Shearing, fra cui il DIC.

Come già detto, gli obiettivi ad immersione, con l'eccezione del WI 50×, hanno il vantaggio di essere insensibili allo spessore della lamella e sono quindi utilizzabili con e senza di essa.

Le indicazioni date per i singoli obiettivi HI ($\infty/0,17$ oppure $\infty/0$) non si riferiscono tanto alla necessità di usare o meno la lamella, ma al fatto che quel tale obiettivo è parfocale cogli altri solo se usato con o senza lamella. La differenza di lunghezza meccanica L_0 fra obiettivi HI del tipo "0,17" o "0" è dell'ordine di 60 μm .

■ Obiettivo ad immersione panoramico VI 12,5×/0,33 - $\infty/0,17$

La casa Jena offre un obiettivo che, dal punto di vista della qualità dell'immagine, è insensibile al tipo di liquido d'immersione, che sia olio ($n = 1,515$), glicerina ($n = 1,456$), olio di vaselina ($n = 1,46 - 1,48$) o acqua ($n = 1,333$).

Quest'obiettivo è molto utile in biologia e medicina, quando si osservano cellule o sezioni istologiche montate in una miscela tampone di glicerina: si può in quel caso omettere la lamella.

■ WI 50×/1,0 - $\infty/0,17$

Quest'obiettivo va usato quando l'uso dell'acqua al posto dell'olio risulti più semplice come liquido d'immersione. La pulizia del preparato e dell'obiettivo è più semplice e, quando si usa per l'immersione acqua distillata secondo le indicazioni del costruttore, anche i residui di liquido disseccato si puliscono meglio.

L'obiettivo WI 50× può lavorare con quello VI 12,5× al fine di offrire due ingrandimenti possibili in immersione in acqua.

OBIETTIVI per SEGMENTI (S)

Nelle osservazioni in radiazione polarizzata col tavolino universale, la superficie dell'oggetto viene inclinata rispetto all'asse ottico; per evitare forti aberrazioni, l'oggetto viene racchiuso fra due semisfere di vetro, una delle quali viene a trovarsi fra obiettivo ed oggetto; le semisfere sono dette "segmenti".

Le superfici sferiche dei segmenti sono concentriche al punto assiale dell'oggetto (quello che giace sull'asse ottico), a condizione che l'oggetto sia racchiuso fra una lamella ed un portaoggetti normali (con spessori $d = 0,17$ e $d = 1$ mm, rispettivamente).

Questi obiettivi, calcolati per lavorare con i segmenti in vetro, sono contrassegnati con una "S".

La coppia dei segmenti deve avere un indice n simile a quello dell'oggetto da studiare, e va quindi cambiata spesso. Il segmento inferiore è fissato da un anello al centro del tavolino e viene

portato in contatto ottico col preparato (appoggiato su di esso) a mezzo di una goccia di liquido d'immersione con indice corrispondente e privo di bolle d'aria. Il segmento superiore va ugualmente bagnato d'olio e fissato sopra il preparato.

I nuovi obbiettivi a segmenti sono acromatici a coniugata infinita, adatti all'uso con radiazione polarizzata. Dato l'uso previsto per questi obbiettivi, una correzione acromatica è sufficiente.

I valori indicati nelle tabelle per l'ingrandimento e l'apertura di questi obbiettivi sono validi per segmenti di indice medio ($n_D = 1,556$); valori leggermente diversi si hanno per gli altri segmenti in dotazione al tavolino universale ($n_D = 1,516$ e $n_D = 1,648$).

Data la presenza del segmento fra oggetto e condensatore, va usato un condensatore a lunga distanza frontale per garantire la piena illuminazione nel cammino diretto e indiretto¹⁸.

Gli obbiettivi "S" possono essere usati anche senza segmenti in modo da sfruttare la loro grande distanza di lavoro; in questo caso, apertura ed ingrandimento si abbassano di un fattore pari all'indice del segmento; però non muta la correzione dell'aberrazione sferica e quindi la qualità d'immagine. Per contro, si contrae il campo-immagine a 18 mm invece dei 20 mm che si hanno coi segmenti.

L'obbiettivo S più debole (5×) non può essere usato senza segmenti.

OBBIETTIVI « LD »

Le ricerche al microscopio ed i campi di applicazione per obbiettivi a grande distanza libera di lavoro o WD stanno aumentando. L'ideale sarebbero gli obbiettivi a grande WD, cioè gli "LD", con distanza di parafocalità L_0 normale (45 mm), adatti all'episcopia ed alla diascopea.

I primi obbiettivi a grande distanza WD corretti da aberrazione cromatica laterale, prodotti alla fine degli anni 1960, erano i cosiddetti obbiettivi "per camera", così chiamati perché il loro impiego principale erano le camere (tavolini) riscaldanti. La loro lunghezza meccanica era 75 mm ed il passo di vite M19.

I nuovi obbiettivi a lunga WD, chiamati LD (Long Distance), sono stati sviluppati in modo da conservare la grande distanza di lavoro, ma con una lunghezza meccanica ridotta a 65 mm.

Riguardo alla correzione, questi obbiettivi sono Plan-acromatici o Plan-apocromatici con un indice di campo $s' = 25$ mm.

Vanno ricordati questi punti:

- Nel calcolo di questi obbiettivi è contemplata una lamina frontale plan-parallela di silice (spessore 2 mm) o di vetro ottico BK 7 (1.97 mm). Quando questa lamina, che è fornita di corredo, è avvitata sull'obbiettivo, bisogna usare preparati non coperti. I valori dati per la distanza di lavoro vanno intesi con la lamina montata.

- Gli obbiettivi LD dal 4× al 16× (fino ad aperture di 0,2) possono venir usati anche senza lamina, con la perdita della parafocalità; in quelle condizioni, la distanza di lavoro si abbassa di circa 0,7 mm.

- Fa eccezione l'obbiettivo LD 25× che non può in alcun caso essere usato senza lamina frontale, se l'oggetto è scoperto. Ne nascerebbero residui di aberrazioni non trascurabili.

- Si è già detto che l'uso principale di questi obbiettivi è col tavolino riscaldante. In questo caso la lamina frontale va svitata poiché la sua funzione dal punto di vista ottico viene svolta dalla lamina di chiusura del tavolino, che è anche la finestra di osservazione. I valori indicati per WD, senza lamina, corrispondono alla distanza fra l'oggetto e l'orlo dell'obbiettivo che sta più vicino all'oggetto stesso, con la finestra interposta.

Per l'obbiettivo più sensibile dal punto di vista delle correzioni (quello a maggiore apertura), la tolleranza nello spessore della lamina plan-parallela da inserire nello spazio oggetto non supera $\pm 0,04$ mm; la perpendicolarità rispetto all'asse ottico deve essere rispettata entro 12'.

¹⁸ Il testo originale intende probabilmente parlare del fascio diretto e di quello diffratto dall'oggetto.

Gli obbiettivi più deboli invece sono sostanzialmente insensibili a questi valori.

Col termine “microscopia in cella” s’intende l’osservazione di oggetti che si trovano racchiusi in una cella o “camera” nella quale si realizzano temperature maggiori o minori di quella ambiente, o atmosfere umide o di gas particolari, o il vuoto, o basse pressioni, o ambienti liquidi.

Volendo usare le celle per osservazioni in radiazione polarizzata, si fa uso delle varianti Pol degli obbiettivi LD.

I campi di applicazione degli obbiettivi LD sono la chimica, il lavoro con micro-manipolatori, le misure in campo tecnico (grandezze fisiche, passaggi di fase, ecc.). Si è già parlato delle applicazioni in micro-elettronica, idrobiologia, immunologia, biotecnologia, ecc.

- PApo K 40×/0,5 - ∞/0 (2) L

Quest’obiettivo rappresenta il termine della serie degli obbiettivi LD. Esso è del tipo a specchi (catottrico) e può essere usato in microscopia come nella micro-analisi spettrale a laser (indicazione “L”). Esso si adatta colle sue misure geometriche alla vecchia serie di obbiettivi K ma, volendolo usare assieme agli attuali obbiettivi LD, si ricordi che la sua lunghezza meccanica è di 75 mm ed il passo di vite è M 19. Se esso va usato assieme ad altri della serie Mikroval, col passo M 19, vanno aggiunti i seguenti anelli di raccordo:

- per gli stativi della nuova serie: raccordo M 19 - M 25

- per gli stativi adatti agli obbiettivi HD: raccordo M 19 - M 30 (vedi Metaval HD, Epignost HD, Jenavert HD, Neophot).

Un raccordo M 25 - M 30 si usa per applicare obbiettivi a passo normale (M 25), come gli LD escluso il 40×, a stativi con fori M 30 (Neophot, Jenavert).

BIBLIOGRAFIA

Questo elenco, in ordine cronologico, illustra sommariamente la storia dello sviluppo degli obbiettivi 250-CF.

Horst RIESENBERG – New wide-field objectives for Jena-made microscopes – Jena Review 3 (1978), pag. 127-132.

Horst RIESENBERG – Chromatically corrected microscope objectives from Jena – Jena Review 4 (1980), pag. 158-163.

Klaus MUTZE – The new Jena-microscopes 250-CF – Jena Review 1 (1982), pag. 4-5.

Gerhard WEILAND – Peter DÖPEL – Hans TANDLER – 250-CF Jena microscopes – a new generation range of microscopes of Jenoptik Jena GmbH – Jena Review 1 (1982), pag. 6-11.

Horst RIESENBERG – Horst BRUCH – A new generation of microscope optical systems from Jena – Jena Review 1 (1982), pag. 33-39.

Horst RIESENBERG – Wide-field planapochromats and special-type objectives for the Jena-Microscope Series 250-CF – Jena Review 2 (1983), pag. 66-68.

Horst RIESENBERG – CF objectives for reflected-light microscopy – Jena Review 1 (1985), pag. 18-23.

Reimund FRENTZEL – Computer-aided design of microscope objectives – Jena Review 2 (1987), pag. 57-59.

H. BEYER e H. RIESENBERG - Handbuch der Mikroskopie - Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 - 455 pagg.