

La RESA FOTOMETRICA nel MICROSCOPIO OTTICO

Vogliamo qui considerare la “quantità di luce” che concorre nell’immagine finale prodotta dal microscopio, che si tratti dell’immagine virtuale destinata all’osservazione o dell’immagine finale reale destinata alla ripresa fotografica, televisiva, ecc.

Supponendo noti i principi generali della microscopia (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia ottica”, disponibile nel medesimo sito), cominciamo col distinguere il sistema ottico di un microscopio in due parti: quella essenziale, “formatrice d’immagine”, (obbiettivo, oculare e mezzi ausiliari) e quella “illuminante” (microlampada, condensatore ed accessori). Poi esamineremo i fattori che influiscono sulla suddetta “quantità di luce”.

Prima di procedere, è bene definire cos’è la fotometria (la scienza che definisce e misura il trasporto dell’energia radiante in campo ottico) e quali sono le grandezze fotometriche essenziali con le loro unità di misura.

La tabella seguente contiene i nomi delle grandezze con eventuali sinonimi e con il termine corrispondente in altre lingue. Essa si riferisce al campo dell’ottica, cioè delle radiazioni elettromagnetiche cui è sensibile l’occhio umano medio¹. Le grandezze corrispondenti nel campo radiometrico, cioè nel campo delle radiazioni elettromagnetiche in generale (IR, UV, raggi X, ecc.) sono simili, ed in genere basta sostituire all’aggettivo “ottico” quello di “radiante”. Casi particolari: la “Luminanza” diviene “Radianza”; l’“Illuminamento” diviene “Irraggiamento”.

Due parole di chiarimento.

Il flusso (ottico) Φ indica la quantità di energia radiante (in campo ottico) che viene emessa da una sorgente (o incide su un oggetto) in un secondo. Viene misurato in **lumen** (col simbolo: **lm**; che corrisponde a 0,001464 W). Se invece teniamo conto del tempo (**t**, espresso in secondi) durante il quale questa energia viene emessa od assorbita, abbiamo una misura dell’energia totale emessa (**Q**) e la si misura in Talbot. $Q = \text{flusso} \times \text{tempo} = \Phi \times t = \text{lumen} \times \text{secondi} = \text{lm} \times \text{s}$. Un talbot corrisponde a 0,001464 Joule.

Va chiarito ora il concetto di angolo solido, normalmente misurato in “steradiani”.

Prendiamo un angolo (piano), come quello indicato con α in fig. 1. Se poniamo il suo vertice al centro di un cerchio, i suoi lati taglieranno un porzione della circonferenza. La lunghezza totale della circonferenza, si sa, è pari al suo diametro ($d = 2 r$, essendo r il raggio) moltiplicato per π ($= 31415 \dots$)². Una circonferenza è pari quindi a $2 \pi r = \text{circa } 6,28 r$. Ovviamente, vi è proporzionalità fra apertura α dell’angolo e porzione di circonferenza tagliata dai suoi lati. Un angolo che taglia una porzione di circonferenza di lunghezza pari ad r si può assumere come unità di misura e questa prende il nome di “radiante” (simbolo: rad oppure rd). Un angolo giro corrisponde allora a $2 \pi r$ e misura $2 \pi \text{ rad} = \text{circa } 6,28 \text{ rad}$. Un angolo piatto sarà pari a $\pi r = \pi \text{ rad} = \text{circa } 3,14 \text{ rad}$. Un angolo retto è pari a $\pi/2 \text{ rad}$.

¹ In particolare, l’equivalenza fra energia totale ed energia otticamente utile si basa sulla sensibilità di un “occhio medio” e si prende come riferimento una lunghezza d’onda (λ) pari a 555 nm, il che corrisponde al centro dello spettro ottico, alla regione del “verde”. Se l’unità di misura dell’energia è il Joule (J) = 0,10197 Kgm, in campo ottico essa è rappresentata dal Talbot, sotto descritto.

² La lettera π è la **pi** minuscola dell’alfabeto greco e si chiama “pi greco”. Così λ è la **elle** minuscola (lambda), α è la **a** minuscola (alfa) e Φ la **effe** maiuscola (fi).

ITALIANO	INGLESE	FRANCESE	TEDESCO	Sim-bolo	UNITÀ DI MIS.	DIMEN-SIONE
ENERGIA OTTICA (LUMINOSA)	QUANTITY of LIGHT	QUANTITÉ de LUMIÈRE	LICHT MENGE	Q	LUMEN · sec (Talbot)	0,001464 J con $\lambda = 555 \text{ nm}$
FLUSSO OTTICO (POTENZA LUMINOSA)	LUMINOUS FLUX or LUMINOUS POWER	FLUX LUMINEUX (PUISSANCE LUMINEUSE)	LICHTSTROM oder LICHT LEISTUNG	Φ (F)	LUMEN (lm)	0,001464 W con $\lambda = 555 \text{ nm}$
INTENSITÀ OTTICA (“LUMINOSA”)	LUMINOUS INTENSITY (Candle-power, se espresso in cd)	INTENSITÉ LUMINEUSE	LICHT STÄRKE	I	CANDE-LA (cd)	1 lm / sr
EMETTENZA OTTICA (“LUMINOSA”)	LUMINOUS EXITANCE (EMITTANCE)	EXITANCE (ÉMITTANCE) LUMINEUSE	SPEZIFISCHE LICHTAUS STRAHLUNG	M (L)	Apostilb (asb) Lambert	1 lm / m ² 1 lm / cm ²
LUMINANZA (BRILLANZA)	LUMINANCE (BRIGHTNESS)	LUMINANCE VISUELLE (BRILLANCE)	LEUCHDICHTE (LICHT-AUSSTRAHLUNG)	L (B)	Nit (nt) Stilb (sb)	1 lm / sr / m ² 1 lm / sr / cm ²
ILLUMINA-MENTO (ILLUMI-NAZIONE)	ILLUMINANCE (ILLUMINATION)	ÉCLAIREMENT LUMINEUX	BELEUCHTUNGS-STÄRKE-	E	Lux (lx) Phot (ph)	1 lm / m ² 1 lm / cm ²

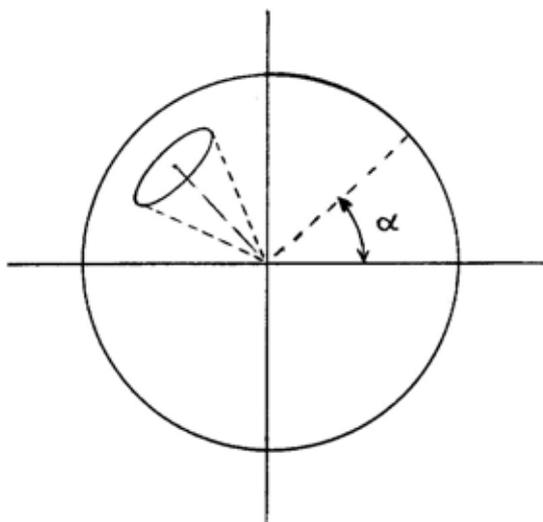


Fig. 1 – Schema illustrante il concetto di angolo piano (a destra) e di angolo solido (a sinistra).

In fig. 1 supponiamo ora che il cerchio corrisponda ad una sezione mediana (cerchio massimo) di una sfera. Bene. Supponiamo di tracciare sulla superficie sferica un cerchio, che delimita una “calotta”. Dal centro della sfera tracciamo un cono col vertice nel centro della sfera stessa e con la base appoggiata sulla circonferenza della calotta.

Come l’angolo piano α occupa una parte del piano che circonda il suo vertice, con lo stesso criterio si può dire che il cono sopra descritto occupa una parte dello “spazio” attorno al centro della sfera. Si parla di “angolo solido” o “sterangolo”³. Se la superficie della calotta che fa da base al cono è pari ad r^2 (essendo r il raggio della sfera), si può assumere questo sterangolo come unità di misura degli angoli solidi e tale unità si chiama “steradiante”⁴ ed ha

³ Se la base del cono non è una calotta sferica ma un poligono sferico, il cono diventa una piramide e lo sterangolo si chiama “angoloide”. Un poligono sferico è una porzione di superficie sferica limitata da archi di cerchi massimi.

⁴ In greco “stereron” significa solido, cioè a tre dimensioni. Ciò spiega perché “stereofonico” o “stereoscopico” si indicano colla sigla 3 D : l’audizione o l’osservazione danno la sensazione di profondità, di terza dimensione.

come simbolo str oppure sr . Ma la superficie di una sfera è pari a $4\pi r^2$ e quindi l'angolo solido che riempie tutto lo spazio sarà pari a $4\pi \text{ str}$. Una semisfera misura $2\pi \text{ str}$. Un ottante di sfera è pari a $\pi/2 \text{ str}$.

Torniamo alle sorgenti ottiche. Nell'indicare le loro caratteristiche, dobbiamo precisare quanta energia emettono in una data porzione dello spazio, per esempio in un angolo solido pari ad 1 str , indipendentemente dalle loro dimensioni. Misuriamo cioè il flusso emesso nell'unità di angolo solido e lo chiamiamo "**intensità**" avente simbolo **I**: $I = \Phi / \text{sterangolo}$. L'intensità si misura in $\text{lumen/str} = \text{candela (cd)}$.

Se invece si considera la superficie radiante (anzi, luminosa), indipendentemente dalla direzione in cui è emesso il flusso, useremo la grandezza **emettanza** (**M**) e la misureremo in **apostilb** (**asb**) pari ad $1 \text{ lumen per metro}^2 : 1 \text{ asb} = 1 \text{ lm/m}^2$.

Ma generalmente una sorgente non emette omogeneamente in tutte le direzioni, per cui conviene tener conto sia della superficie che della direzione. Per caratterizzare una sorgente si usa allora spesso la grandezza **brillanza** o **luminanza** (**B** o **L**), avente come unità di misura il **nit** (**nt**) pari ad $1 \text{ lumen / str / m}^2$ oppure lo **stilb** (**sb**) pari a $1 \text{ lm / str / cm}^2$.

In molte applicazioni interessa infine il flusso incidente su una data superficie. Questa grandezza equivale alla "emettanza" sopra definita e si chiama **illuminamento** (**E**). La differenza fra emettanza ed illuminamento sta nel considerare l'energia irradiata oppure quella incidente. L'unità di misura si chiama **lux** (**lx**) ma corrisponde sempre ad $1 \text{ lumen / metro}^2$: $1 \text{ lx} = 1 \text{ lm/m}^2$.

In un microscopio, i parametri di partenza sono la brillantezza della sorgente **B** e le sue dimensioni e quello di arrivo è l'illuminamento **E** nel piano dell'immagine finale, quella che si forma sulla retina dell'occhio o sull'emulsione fotografica. In mezzo c'è un sistema ottico che può provocare molte perdite.

Consideriamo dapprima il sistema formatore d'immagine ed in particolare uno schema di sistema ingrandente (fig. 2), come potrebbe essere un obiettivo da microscopio. Nella figura, dS potrebbe essere l'oggetto e dS'' la sua immagine (immagine intermedia). L'ingrandimento **M**, calcolabile dal rapporto delle coniugate (r'/r) è, nella figura, circa 2:1. Allora l'immagine dS'' ha una superficie quadrupla dell'oggetto dS . Il flusso raccolto dalla lente è lo stesso che incide sull'immagine dS'' o su qualunque altro schermo posto oltre dS'' ad una qualunque distanza r'' , ma esso si distribuisce in dS'' su una superficie quattro volte maggiore e l'illuminamento **E** sarà circa $1/4$ dell'emettanza **M** dell'oggetto dS . Poiché l'ingrandimento, il rapporto fra i lati di dS'' e dS , è pari al rapporto r'/r , l'illuminamento in dS'' sarà inversamente proporzionale alla superficie di dS'' , cioè al quadrato dell'ingrandimento lineare.

Ecco una prima conclusione utile: l'illuminamento⁵ nell'immagine finale è inversamente proporzionale al quadrato dell'ingrandimento. Ciò vale per l'obiettivo, l'oculare ed eventuali sistemi interposti: l'ingrandimento totale è il prodotto dei fattori d'ingrandimento relativi ai tre sistemi appena citati.

Si ricordi ancora che l'apertura dell'obiettivo, lato immagine (ω'' in fig. 2), è minore dell'apertura lato oggetto se l'ingrandimento è > 1 : il rapporto delle due aperture è l'inverso dell'ingrandimento lineare **M**. Lungo il cammino ottico quindi, se variano le dimensioni lineari di un elemento (per es., il lato di dS diviene il lato di dS''), variano in ragione inversa le aperture del fascio che emerge o incide sugli stessi elementi. Poiché la brillantezza tiene conto sia dell'angolo solido (l'apertura è un angolo solido)⁶, sia della superficie, si conclude che, nei vari piani considerati in un sistema ottico la brillantezza è costante. Ciò può sembrare in contrasto con quanto detto sopra ("l'illuminamento è inversamente proporzionale al quadrato

⁵ Come dovrebbe essere ormai chiaro, il termine "luminosità dell'immagine" non è corretto (l'immagine non è "luminosa", non emette luce) ed andrebbe sostituito da "illuminamento" o "illuminazione".

⁶ Stiamo semplificando troppo: l'apertura è un angolo piano, mentre l'angolo solido dipende dal quadrato dell'angolo piano che lo sottende. Diciamo che, al variare dell'ingrandimento, variano in ragione diretta del suo quadrato le superfici dei piani coniugati ed in ragione inversa del quadrato gli angoli solidi. Ecco perché il prodotto dei due è costante.

dell'ingrandimento”), ma dipende dal fatto che la brillantezza si calcola (anche) in base al flusso per unità di angolo solido, mentre dal punto di vista fotografico e visuale conta solo il flusso per unità di superficie. In altre parole, un'emulsione fotografica o un sensore televisivo se ne infischiano da che parte arriva la luce; basta che arrivi ...

D'altra parte, a parità di ingrandimento, un sistema ottico raccoglie tanto più flusso quanto più grande è l'angolo solido di radiazione (con vertice in un punto della sorgente o dell'oggetto) che esso raccoglie. Ma tale angolo solido è circa proporzionale al quadrato della sua apertura numerica (che è funzione di un angolo piano). Si ha così la conclusione finale che, supposte costanti le perdite, supposta nota la brillantezza dell'oggetto, l'illuminamento nell'immagine cresce col quadrato dell'apertura e diminuisce col quadrato dell'ingrandimento.

Tutto questo discorso vale se si considerano piani perpendicolari all'asse ottico del sistema ed inoltre non vengono considerate le inevitabili perdite per riflessione alle superfici aria-vetro, le perdite per assorbimento nei vetri, le perdite per diffusione in impurità varie, ecc. Inoltre, si suppone che non vi siano diaframmi o vignettature che possano obliterare in parte il fascio e ridurre l'apertura di uno o più sistemi.

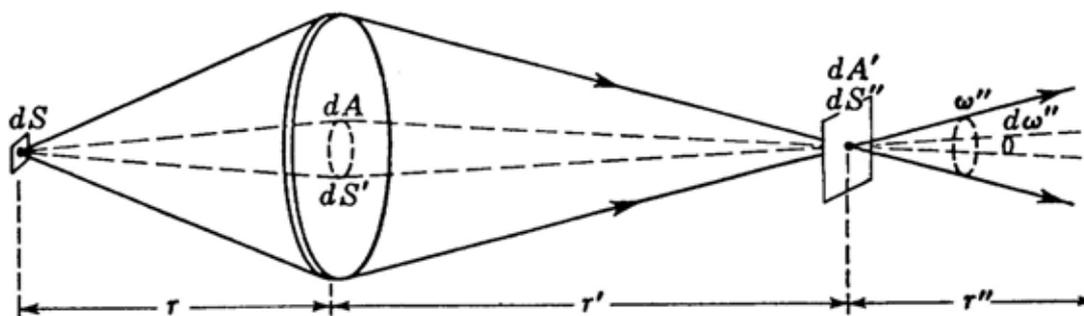


Fig. 2 - Schema di sistema ottico convergente che forma un'immagine reale ingrandita (dS'') di un elemento di superficie (dS).

Da: F. A. Jenkins e H. E. White, *Ottica*, Ist. Editoriale Universitario, Milano, 1972, pag. 143 (modif.).

Abbiamo considerato finora un microscopio composto ed in particolare il suo sistema formatore d'immagine; in altre parole: il suo oggetto (il preparato) e l'immagine finale. Cosa c'è in mezzo non conta, a parte qualche perdita, come detto sopra. Conta l'ingrandimento totale e l'apertura dell'obbiettivo.

Si può obiettare che in certi casi, come nel microscopio polarizzatore, l'illuminamento finale dipende in larga misura dall'orientamento reciproco dei due Nicol (vedi il manuale "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata"). Ma tutto si risolve pensando al sistema dei Nicol come ad un filtro assorbente particolare, a densità ottica⁷ variabile. Basta inserire nel calcolo dell'illuminamento finale il valore della trasmissione di tale filtro.

Anche in fluorescenza, i filtri posti fra obbiettivo ed oculare (specchio dicromatico, filtro di arresto, ecc.) rappresentano un elemento con un proprio valore di densità, ma in questo caso è essenziale tener conto della trasmissione "spettrale", cioè della variazione della densità in funzione della lunghezza d'onda: i filtri usati in fluorescenza sono tutt'altro che neutri. Anche le sorgenti usate in fluorescenza non emettono su uno spettro continuo, ma su bande o righe. L'illuminamento finale dipende quindi (fra l'altro) dalla brillantezza della sorgente e dalla trasmissione dei filtri, ma il calcolo sarà diverso per ogni valore di lunghezza d'onda. Occorre cioè tener conto della distribuzione spettrale sia per la brillantezza della sorgente che per la

⁷ Ricordiamo che la densità ottica D è il logaritmo decimale dell'inverso della trasmissione (t) del filtro: $D = \text{Log } 1/t$ (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 23).

densità dei filtri⁸.

Nel caso del contrasto di fase la situazione è più complessa: se è vero che l'anello di fase si può considerare un semplice filtro grigio per il fascio illuminante diretto, per la luce diffratta dall'oggetto la pupilla d'obbiettivo è quasi tutta trasparente (l'anello di fase occupa solo una piccola porzione della pupilla). Se poi, oltre all'illuminamento del fondo campo, si considera l'illuminamento nell'immagine del solo oggetto, molto dipende dai rapporti di fase fra onda diffratta ed onda diretta e l'oggetto può apparire (nel contrasto di fase positivo) anche più luminoso del fondo: è la cosiddetta "inversione del contrasto" (vedi l'articolo n° 25: "La formazione dell'alone ...").

Nel caso del contrasto interferenziale, le cose sono ancora più complicate poiché l'illuminamento del fondo come dell'oggetto dipendono da complessi rapporti di fase e da conseguenti fenomeni di interferenza. E poiché l'immagine interferenziale si può ottenere con tecniche assai diverse, meglio non entrare nemmeno in argomento⁹.

Torniamo allora alla nostra conclusione generale; l'illuminamento nell'immagine finale E è proporzionale a quattro fattori: 1) la brillantezza B dell'oggetto; 2) la trasparenza generale del sistema (t); 3) il quadrato dell'apertura dell'obbiettivo NA; 4) l'inverso del quadrato dell'ingrandimento totale M_M .

Ma, dicendo "brillantezza B dell'oggetto" cosa intendiamo?

Nel caso di oggetti fluorescenti, il concetto è chiaro poiché l'oggetto stesso è veramente "luminoso". Ma normalmente l'oggetto è illuminato da qualcos'altro.

Consideriamo allora tutto ciò che precede l'oggetto: il sistema illuminante. Poiché quest'ultimo può assumere varie forme (vedi l'articolo n° 2: "Sguardo generale ai metodi di illuminazione..."), siamo costretti ad esaminare separatamente i vari casi. Ne nascerà un elenco barboso, che oltretutto presuppone una conoscenza generale della microscopia, ma alla fine potremo trarne qualche conclusione utile nell'uso pratico.

OGGETTI OPACHI esaminati in EPISCOPIA ("in luce riflessa" o "verticale")

1) --- Illuminazione laterale in episcopia di un oggetto diffondente. È quanto avviene in un microscopio stereoscopico, quando si illumina di lato un oggetto opaco con una microlampada dotata di lente collettrice oppure con un semplice "faretto" del tipo "spot". Il termine "faretto" è generico e va inteso come "lampada capace di fornire un fascio illuminante concentrato"; la concentrazione del fascio è in genere ottenuta a mezzo di uno specchio (magari del tipo "freddo" o "dicroico", che non riflette l'infrarosso) che circonda il filamento.

L'oggetto diffonde poi il fascio che incide su di esso con un rendimento ed una distribuzione nello spazio che dipendono dalle sue caratteristiche fisiche.

In questo caso, la brillantezza dell'oggetto dipende dunque da come esso è fatto (dal suo potere diffondente) e dall'illuminamento su di esso prodotto dalla lampada. Quest'ultimo dipende a sua volta da: 1) l'apertura della lente collettrice o dello specchio concentratore; 2) l'ingrandimento nell'immagine del filamento; 3) la brillantezza del filamento.

Esaminiamo questi fattori.

1) Apertura della lente o dello specchio. Nel caso di una lente, si può riconsiderare lo schema di fig. 2: dS potrebbe rappresentare il filamento incandescente concentrato; diciamo "concentrato" per dire: a forma di elica compatta a spire ravvicinate, come avviene in molte lampadine ad incandescenza a bassa tensione¹⁰. La lente schematizzata in figura potrebbe essere il "collettore" della microlampada, cioè una forte lente convergente che crea in dS un'immagine ingrandita di dS. È questa immagine che si proietta sull'oggetto ed allora la brillantezza di questa immagine e l'illuminamento sull'oggetto saranno ancora una volta

⁸ La curva di emissione spettrale di una sorgente e la curva di trasmissione spettrale di un filtro si possono ottenere da opportuni "spettrofotometri" oppure dai dati forniti dal costruttore. Vedi i capp. 22.6, 23 e 30.6 nel manuale "Problemi tecnici della microscopia...".

⁹ È in preparazione una pubblicazione sulle tecniche interferenziali.

¹⁰ Quando un filamento deve lavorare a tensione di rete, deve possedere un'elevata resistenza elettrica e quindi un'elevata lunghezza. Di conseguenza, esso non può essere concentrato e non si presta a formare di sé un'immagine concentrata.

proporzionali al quadrato dell'apertura (numerica) del collettore ed inversamente proporzionali all'ingrandimento che l'immagine del filamento subisce. Déjà vu.

2) L'ingrandimento nell'immagine del filamento dipenderà dalla focale del collettore e dalle distanze in gioco. In pratica, si può pensare di guadagnare qualcosa riducendo l'ingrandimento, per es. allontanando il filamento dal collettore (molte microlampade consentono questo) ed avvicinando il tutto all'oggetto. Il trucco funziona a condizione che l'immagine del filamento occupi esattamente la superficie utile dell'oggetto; se l'immagine è più grande dell'oggetto, una parte del flusso andrà perduta.

Ma questo discorso presuppone che sull'oggetto si proietti un'immagine più o meno a fuoco del filamento stesso. Ciò è vero in una microlampada ben fatta, quando la focale del collettore è adeguata; può essere vero in certe (difficilmente reperibili) lampade ad alogeni in cui lo specchio è ellissoidico ed il filamento si trova in uno dei fuochi dell'ellissoide (l'immagine si formerà nell'altro fuoco). Ma a volte le microlampade, e tanto più i faretti a specchio, non danno un'immagine focalizzata del filamento ed il diametro del fascio da essi prodotto è assai più grande dell'oggetto, per cui vi è una forte perdita di flusso utile.

3) Brillanza del filamento. Qui le cose sono relativamente semplici. Se si considera il filamento incandescente come un "corpo nero"¹¹ (e la cosa vale bene in quanto si tratta di un corpo radiante), la sua brillantezza totale (anzi, radianza) è proporzionale alla quarta potenza della sua temperatura (legge di Stefan-Boltzmann); ma, poiché, coll'aumentare della temperatura, il picco di emissione si sposta dall'infrarosso al visibile e poi all'UV, (legge di Planck), l'aumento di brillantezza nello spettro ottico aumenta più rapidamente, colla ottava o decima potenza della temperatura. A questo punto si potrebbe pensare di non aver limiti nella brillantezza: basta aumentare la tensione applicata al filamento, quindi la corrente circolante, quindi la produzione di calore per effetto Joule, quindi la temperatura. Ma c'è un piccolo dettaglio: a 3.410 °C = 3.683 °K¹² il tungsteno fonde, e non è stato trovato un materiale che possa sostituirlo. Questo significa che la temperatura di un filamento di tungsteno deve essere inferiore a circa 3.150 °C (poco più di 3.400 °K), una temperatura inferiore al punto di fusione poiché, anche prima di fondere, il tungsteno "sublima", cioè vaporizza. Questo è un limite insuperabile. Le lampadine "alogene" o "ad alogenuri" vanno un po' più su, sfruttando la reazione fra il tungsteno e l'alogeno (in genere jodio) che recupera i vapori del metallo andandoli a ridepositare sul filamento. Ma il limite rimane.

Le lampade di maggior brillantezza debbono allora contenere un corpo luminoso che non soffre di questi limiti, cioè non ha un punto di fusione. Parliamo delle lampade ad arco in cui si realizza un arco elettrico (in atmosfera di xeno, di vapori di mercurio, ecc.); l'arco è costituito da plasma (gas ionizzato), per cui non può fondere e la temperatura equivalente può raggiungere i 20.000 °C. Se la brillantezza di un filamento di tungsteno va da circa 1.000 a 2.000 stilb, quella di una lampada a mercurio va da 6.000 ad oltre 50.000 stilb. Senza contare che la temperatura di colore (TC)¹³ delle lampade ad incandescenza (2.600 – 3.400 °K) non si presta alla fotografia a colori e può richiedere appositi filtri di compensazione, mentre la lampada ad arco in xeno è ben adattata alle pellicole "per luce diurna" (TC = 5.000 – 6.000 °K).

L'illuminazione laterale in episcopia¹⁴ di oggetti opachi diffondenti si può realizzare anche in un microscopio "normale", mono-obiettivo. Se la distanza frontale (distanza libera di lavoro) dell'obiettivo è di almeno 2 mm, si può proiettare il fascio concentrato di qualche microlampada sull'oggetto con forte inclinazione rispetto all'asse dell'obiettivo. Sarà un'illuminazione radente, con forti ombre, unilaterale, ma può essere utile per accentuare il contrasto di oggetti con scarso rilievo. Per facilitare le cose, qualche accorto costruttore (Wild ad es.) aveva costruito in passato appositi obiettivi con montatura appuntita.

¹¹ Un "corpo nero" è un radiatore integrale che emette come radiazione elettromagnetica tutta l'energia che possiede.

¹² Le temperature assolute si esprimono in gradi Kelvin (°K) mentre quelle centigrade in gradi Celsius (°C). Le temperature assolute (K) si misurano a partire dallo zero assoluto che è pari a -273 °C. Il valore del grado è sempre lo stesso; cambia solo l'inizio della scala.

¹³ Vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 22.6.

¹⁴ Episcopia equivale a "illuminazione verticale" o "incidente" o "luce riflessa".

In ogni caso, questo primo schema di illuminazione contempla due sistemi ingrandenti: un sistema illuminante, che trasporta un fascio di radiazione dal corpo luminoso all'oggetto, ed un sistema formatore d'immagine, che trasporta verso l'immagine finale ciò che l'oggetto diffonde. Ma fra i due sistemi si interpone un fattore non governabile: il potere diffondente dell'oggetto. Per ognuno dei due sistemi, vale la solita regola del quadrato dell'apertura e dell'inverso del quadrato dell'ingrandimento. Oltre al citato rapporto fra diametro dell'immagine del filamento e diametro dell'oggetto...

2) --- Illuminazione in fondo scuro di oggetti diffondenti in episcopia. Non si tratta dell'illuminazione unilaterale appena descritta, ma di quella omnilaterale, ottenuta con un fascio conico cavo il cui vertice deve trovarsi al centro del piano oggetto. Tale fascio conico è ottenuto da uno speciale condensatore a forma di anello, che circonda l'obbiettivo¹⁵. Per "alimentare" tale condensatore occorre un fascio cilindrico cavo che giunge su di esso circondando l'obbiettivo vero e proprio. Il fascio cilindrico si può ottenere "dilatando" il normale fascio prodotto dalla microlampada con un sistema di specchi conici, ed in questo caso le perdite fotometriche si riducono a poco (Zeiss Jena), oppure con un disco opaco che oblitera la parte centrale del fascio illuminante (o con uno specchio anulare che ne utilizza solo la parte periferica), ed in questo caso si deve introdurre un fattore di perdita legato a questa obliterazione.

Si può ripetere quanto detto sopra per il caso 1), più l'introduzione del fattore di obliterazione. Si noti che in campo scuro non vi è un rapporto obbligato fra apertura del condensatore e dell'obbiettivo; basta che la prima sia sempre maggiore della seconda.

Prima del condensatore vi sarà ovviamente una sorgente ed uno specchio, che in campo scuro non è semiriflettente (vedi oltre, fig. 3); in teoria, il condensatore per campo scuro dovrebbe in ogni caso produrre nel piano oggetto un'immagine a fuoco della sorgente ma, date le forti aperture e le conseguenti aberrazioni, non si tratterà di un'immagine molto nitida. Comunque, il principio è quello.

3) --- Illuminazione in fondo scuro di oggetti riflettenti in episcopia (per es., provini lucidati di leghe metalliche o di rocce)

Qui, il fascio illuminante obbedisce alla solita regola, con l'aggiunta del fattore di obliterazione, ma c'è un fatto nuovo: se la superficie dell'oggetto è perpendicolare all'asse ottico e se è semplicemente riflettente, il fascio illuminante viene riflesso completamente FUORI dall'apertura dell'obbiettivo e l'immagine appare completamente buia¹⁶. Solo se l'oggetto presenta delle irregolarità (fessure, parti diffondenti, scabrosità) può diffondere una parte del fascio illuminante verso l'obbiettivo e costruire un'immagine percepibile.

In questo caso, il fattore predominante diviene il potere diffondente dell'oggetto; in subordine rimangono importanti gli altri fattori (aperture ed ingrandimento del condensatore e dell'obbiettivo). L'immagine sarà in genere piuttosto scura.

4) --- Illuminazione in fondo chiaro di oggetti diffondenti in episcopia (come avviene spesso in campo naturalistico)

In questo caso, si può tornare a quanto detto nel caso 1), con due differenze:

a) il condensatore è costituito dall'obbiettivo, per cui la regola del quadrato dell'apertura si applicherebbe per due volte all'obbiettivo, ed alla fine l'illuminamento finale sarebbe proporzionale alla quarta potenza dell'apertura dell'obbiettivo; obbiettivo e condensatore hanno per forza la stessa apertura, visto che un unico sistema svolge le due funzioni. Ma con una complicazione.

Il diaframma d'apertura (quando esiste: certi modelli economici lo ignorano) in episcopia non può essere posto nella pupilla d'ingresso del condensatore poiché questa coincide con quella dell'obbiettivo e, chiudendo il diaframma d'apertura, si diaframmerebbe anche

¹⁵ Vedi l'articolo n° 2 ("Sguardo generale ai metodi di illuminazione...").

¹⁶ L'apertura minima del fascio illuminante è superiore a quella dell'obbiettivo.

l'obiettivo. Si usa allora un sistema di trasporto (lente-relé) che porta nella pupilla d'obiettivo un'immagine reale del diaframma d'apertura mentre il diaframma stesso si trova fisicamente più lontano. Come conseguenza, la chiusura del diaframma d'apertura riduce l'apertura del "condensatore" (= obiettivo) ma non dell'obiettivo in quanto formatore d'immagine. La regola del quadrato dell'apertura si applica allora separatamente, una volta per l'apertura del fascio illuminante (che dipende dalla manovra del diaframma d'apertura) ed una volta per l'apertura dell'obiettivo. La regola della quarta potenza dell'apertura si applica solo se il diaframma d'apertura riempie esattamente la pupilla d'obiettivo.

Per inciso, visto che il diametro della pupilla dell'obiettivo è diverso da un obiettivo all'altro, ad ogni cambio di obiettivo andrebbe di nuovo regolato il diaframma d'apertura.

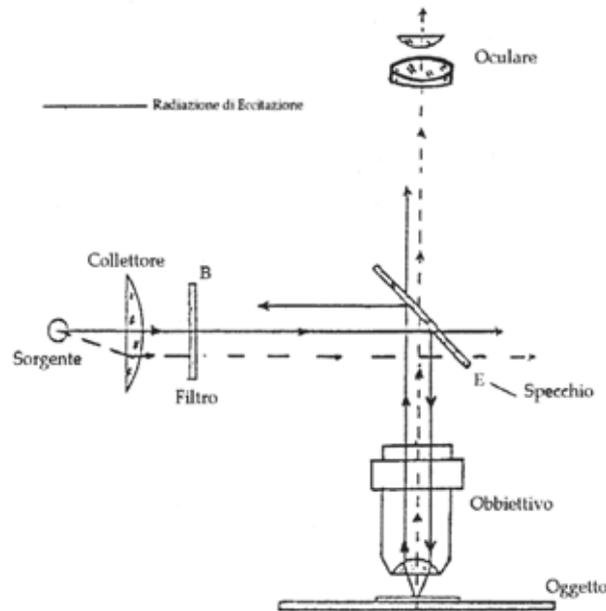


Fig. 3 – Schema di illuminatore per episcopia in campo chiaro. Lo specchio E è un semiriflettente che rimanda verso l'oggetto una parte del fascio illuminante e trasmette verso l'oculare una parte del fascio riflesso o diffuso dall'oggetto.

b) fra illuminatore ed obiettivo vi è uno specchio semiriflettente (E in fig. 3) che divide in due il fascio illuminante: una parte prosegue diritta e va perduta; l'altra viene riflessa e viene accolta dall'obiettivo. Lo specchio viene attraversato anche dal fascio formatore d'immagine poiché si trova fra obiettivo ed oculare; anche in questo passaggio, il fascio viene suddiviso in due. La perdita si ripete. È facile dimostrare che la perdita complessiva ha un valore minimo (almeno 75%) quando il rapporto riflessione/trasmissione dello specchio è di 1:1 (50% - 50%, nel caso migliore). In più, occorre tener conto di qualche perdita per diffusione e dell'assorbimento dello specchio: questo assorbimento è forte nei classici trattamenti metallizzati, ma scende a valori minimi nei moderni specchi interferenziali.

Il rendimento complessivo di un sistema illuminante in episcopia fondo chiaro non può quindi superare 25% ($50\% \times 50\%$), ma scenderà in funzione del potere diffondente dell'oggetto. A proposito di quest'ultimo, si noti che un oggetto veramente diffondente rinvia il fascio che incide su di esso in tutte le direzioni, mentre l'obiettivo ne accoglie solo la parte che rientra nella propria apertura. Anche se l'oggetto diffonde tutta la radiazione che riceve (assorbimento zero), comunque l'obiettivo ne perde una buona parte, specie se è debole, a bassa apertura.

In fig. 3, le linee intere possono rappresentare il fascio illuminante e quello eventualmente riflesso dall'oggetto. La linea a tratteggio fino indica la radiazione diffusa dall'oggetto.

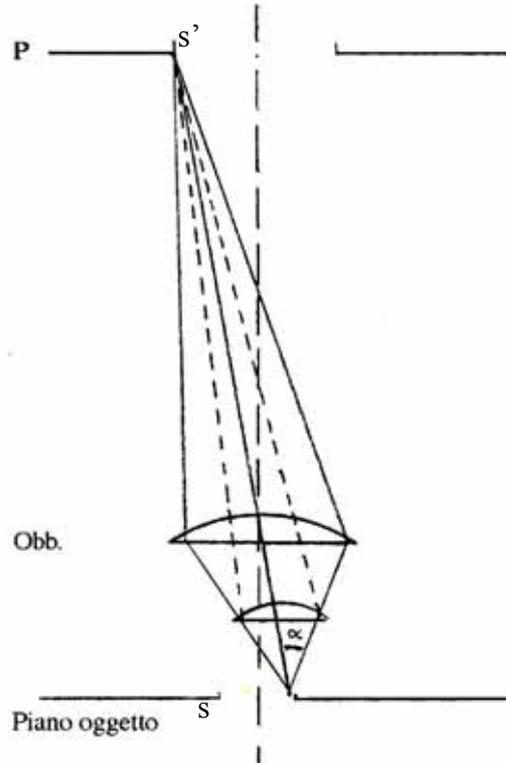


Fig 4 - Schema di sistema formatore d'immagine in un microscopio con due diversi obiettivi, di diversa focale ma di pari apertura α . s è il diametro del campo oggetto; s' è il campo immagine corrispondente dell'obiettivo (Obb), cioè l'indice di campo dell'oculare. P è il piano dell'immagine intermedia. α è l'apertura angolare dell'obiettivo.

Ora però dobbiamo fare un paragone col caso 5) seguente (oggetto riflettente in fondo chiaro in episcopia) e richiamare la fig. 4.

Il semplice schema di questa figura illustra il “passaggio” da un campo oggetto di diametro s al campo immagine di diametro s' . Tale immagine è l'immagine intermedia creata dall'obiettivo da microscopio (Obb).

Come chiarito nell'articolo n° 2 (“Sguardo generale ai metodi di illuminazione ...”), un tale schema si applica direttamente ad un microscopio in diascopea, ma anche ad uno episcopico. Infatti, i sistemi illuminante e formatore d'immagine sono equivalenti poiché l'obiettivo svolge anche la funzione di condensatore per il cammino illuminante; in altre parole, il piano oggetto è coniugato sia con l'immagine intermedia che col diaframma di campo; di conseguenza tale diaframma è coniugato indirettamente con l'immagine intermedia ed ha le stesse dimensioni (s'). Così M rappresenta sia l'ingrandimento fra s ed s' (per l'immagine dell'oggetto), sia quello fra il diametro del diaframma di campo ed s . L'ingrandimento fra il diaframma di campo ed s' è quindi pari ad 1:1.

La figura può quindi rappresentare sia il cammino illuminante che quello formatore d'immagine; naturalmente sopra l'obiettivo vi è in episcopia un semi-riflettente inclinato a 45° sull'asse ottico e, fisicamente, il diaframma di campo si trova su un asse ottico perpendicolare a quello dell'obiettivo. Ma, in figura, il piano P rappresenta sia il piano dell'immagine intermedia (cammino formatore d'immagine) che quello del diaframma di campo (cammino illuminante).

Ciò premesso, risulterebbe che tutto il flusso proveniente dal diaframma di campo (supposto costante) è lo stesso che si ritrova nel piano oggetto e quindi nell'immagine intermedia. E ciò indipendentemente dall'apertura e dall'ingrandimento dell'obiettivo. Troppo semplice.

Qui occorre fare qualche distinzione.

-- a) Se l'oggetto è perfettamente riflettente (ecco perché abbiamo fatto riferimento al

caso 5)) il discorso appena fatto funziona abbastanza bene e l'esperienza lo dimostra. Entrano però nel calcolo fattori contingenti, come le riflessioni alla superficie delle lenti e quindi la resa dei trattamenti anti-riflettenti ed inoltre, osservando le linee tratteggiate della fig. 4, si noti che, a parità di apertura, un obiettivo più forte, con focale minore, ha anche un diametro di pupilla minore e quindi utilizza una porzione più piccola del fascio illuminante. Poiché gli obiettivi più forti hanno in genere una pupilla più piccola, produrranno immagini leggermente meno brillanti. Per contro, a parità di ingrandimento, è ovvio che un obiettivo di maggiore apertura mostrerà una più grande pupilla d'ingresso (quando funziona da condensatore) ed utilizzerà una più grande porzione del fascio illuminante. Si può applicare la regola della quarta potenza dell'apertura, a condizione che l'immagine del filamento che deve trovarsi nella pupilla d'obiettivo sia almeno grande come la più grande delle pupille dei vari obiettivi in uso.

-- b) Se l'oggetto è invece diffondente (caso 4)) le cose cambiano: l'oggetto diffonde il fascio illuminante più o meno in tutto lo spazio e l'obiettivo, come già accennato, ne recupera solo quel tanto che ricade nella propria apertura utile. Poiché gli obiettivi deboli hanno in genere una minore apertura, in relazione al quadrato di quest'ultima sarà minore l'illuminamento finale.

L'esperienza dice appunto che l'osservazione di oggetti diffondenti in episcopia è penalizzata cogli obiettivi deboli.

Per quanto riguarda l'ingrandimento, esso non entra più nel conto: basta pensare che, quando esso aumenta, diviene più piccolo il campo illuminato (che coincide sempre col campo oggetto se il diaframma di campo è correttamente regolato) ma quest'ultimo corrisponde sempre all'immagine intermedia. In altre parole, sorgente (diaframma di campo) ed immagine intermedia sono sempre coniugati; ovvero: il flusso che dalla sorgente entra nell'obiettivo è lo stesso che dall'obiettivo arriva all'oculare, a parte la perdita per diffusione. Rimane la considerazione del punto a) (a parità di apertura...).

5) --- Illuminazione in fondo chiaro di oggetti riflettenti in episcopia

Uno sguardo alla fig. 3 fa capire che un oggetto riflettente piano e perpendicolare all'asse dell'obiettivo non fa che riflettere verso l'obiettivo tutto il fascio che lo illumina e che proviene proprio dall'obiettivo stesso. Nel determinare l'illuminamento finale entra ora il potere riflettente dell'oggetto; non si ha più la perdita per diffusione.

A questo punto, occorre fare una considerazione generale che interessa tutti i casi dal 2) al 5) compresi, cioè tutte le osservazioni in episcopia con illuminazione omnilaterale.

Supponiamo prima di tutto che in ogni caso, campo chiaro o campo scuro, il condensatore (o l'obiettivo che ne fa le veci) produca sempre nel piano oggetto un'immagine a fuoco della "sorgente", che in genere è il diaframma di campo di una microlampada. Abbiamo visto che vari fattori tecnici rendono indefinita tale immagine nel caso del campo scuro, almeno a forti aperture, ma accettiamo quell'ipotesi in via provvisoria.

Sempre o quasi in campo chiaro, spesso in campo scuro, esiste un "diaframma di campo" che limita le dimensioni della "sorgente" (di solito coincidente col collettore) e, con opportuna regolazione di tale diaframma, si può fare in modo che la regione illuminata dell'oggetto coincida col campo visivo dell'oculare. Quando però si cambia obiettivo si cambia allo stesso tempo anche il condensatore (le due parti coincidono in campo chiaro) per cui il campo illuminato coincide sempre col campo oggetto dell'obiettivo: cambiando obiettivo NON è necessario ritoccare il diaframma di campo. Il contrario di quanto avviene in diasopia. In campo scuro, non è detto che la focale del condensatore annulli vari sempre in proporzione a quella dell'obiettivo. Bisognerà vedere caso per caso.

Per quanto riguarda il diaframma d'apertura, in fondo scuro esso viene eliminato (o va tenuto tutto aperto) in quanto l'apertura del condensatore deve essere comunque superiore a quella dell'obiettivo; ma in fondo chiaro, se esiste, esso è prezioso per ottenere certi effetti di contrasto.

Nel caso **5)** (fondo chiaro su un oggetto riflettente in episcopia), l'oggetto, supposto perfettamente riflettente, rimanda verso l'obbiettivo tutta la radiazione che da quello gli proviene, le aperture di condensatore ed obbiettivo coincidono (salvo la riserva sulla manovra di un eventuale diaframma d'apertura indipendente) e l'illuminamento finale **NON VARIA** quando si cambia obbiettivo; ritorna la considerazione appena fatta: l'illuminamento finale dipende poco dalle caratteristiche dell'obbiettivo.

Concludendo, in episcopia con oggetti diffondenti bisogna tener conto del potere diffondente dell'oggetto; con oggetti riflettenti, conta il potere riflettente.

OGGETTI TRASPARENTI osservati in DIASCOPIA (“luce trasmessa”)

6) --- Illuminazione in fondo chiaro

Nell'osservazione **in diascopeia** (“in trasparenza” o “in luce trasmessa”) di oggetti trasparenti, l'eventuale condensatore per campo scuro si trova in luogo del condensatore normale, per fondo chiaro, e può avere struttura simile quando le aperture non sono elevate, ma la funzione è la stessa di quello per l'episcopia: produrre un fascio conico cavo col vertice nell'oggetto. In ogni caso, il condensatore forma nel piano oggetto un'immagine di una sorgente (una microlampada, o il suo collettore, o il diaframma di campo). Tale immagine, come si è visto, può essere poco definita in campo oscuro per ragioni tecniche, ma i due casi si possono assimilare.

Dunque abbiamo in sostanza un condensatore, cioè un sistema convergente forte, che crea un'immagine reale impiccolita di una generica sorgente (una microlampada, tanto per intenderci), e proietta tale immagine nel piano dell'oggetto. Che poi il fascio a valle del condensatore per campo scuro sia cavo, non importa; significa solo che la parte centrale del fascio incidente sul condensatore viene obliterata e solo la zona periferica del fascio illuminante viene resa convergente a formare il “cono” sopra citato.

Ma allora questi due casi riportano alla classica illuminazione **in diascopeia in fondo chiaro**, il caso più comune in microscopia. Rovesciando la fig. 2, si ha una sorgente dS (per ora definiamola genericamente “microlampada”), la sua immagine impiccolita (dS) ed in mezzo un sistema convergente forte (condensatore). L'immagine dS deve giacere nel piano del preparato, se il condensatore è correttamente focalizzato. In diascopeia campo chiaro, tutto il fascio incidente sulla lente (condensatore), di apertura ω , concorre nell'immagine dS , ed allora si applica il principio sopra citato: “l'illuminamento sull'oggetto è proporzionale al quadrato dell'apertura della lente ed inversamente proporzionale al quadrato dell'ingrandimento”. In campo scuro invece, diascopeia o episcopia, l'apertura del condensatore viene parzialmente obliterata da un'otturazione centrale e quindi nel calcolo entrerà un fattore di trasmissione dato dalla frazione del fascio che viene eliminata.

Qui però dobbiamo entrare più nel fine. Il semplice ragionamento condotto finora si applica alla condizione che tutto il fascio prodotto dal condensatore venga accolto dall'obbiettivo e per questo basta che l'apertura del condensatore (NA_k) sia esattamente la stessa di quella dell'obbiettivo (NA_{ob}). Se NA_k è inferiore, allora tutti i calcoli citati sopra (“l'illuminamento è proporzionale...all'apertura della lente”) valgono se si considera come apertura dell'obbiettivo NA_{ob} il valore di NA_k . Se ad essere minore è NA_{ob} , nel calcolo si introduce questo valore di NA_{ob} in quanto è il minore fra i due.

Ma con una precisazione: il valore di NA_k dipende dalla regolazione del diaframma d'apertura. Chiudendo questo diaframma, a partire dal suo valore massimo, si può non accorgersi di niente finché NA_k è maggiore di NA_{ob} . Da quando diventa minore, l'illuminamento nell'immagine diminuisce poiché prevale il valore di NA_k , proprio in quanto è il minore. In altre parole, il minore dei due valori, NA_{ob} ed NA_k , andrà utilizzato per calcolare l'illuminamento sull'oggetto (da parte del condensatore) e l'illuminamento sull'immagine finale (da parte dell'obbiettivo) poiché il fascio illuminante forma direttamente l'immagine finale.

Ora, trattando dell'osservazione in trasparenza in campo chiaro, dobbiamo esaminare gli schemi principali (vedi il manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 8 e l'Art. n°

3: “Il campo illuminato del microscopio”).

••• Illuminazione diffusa

In molti illuminatori economici, soprattutto in quelli basati su lampadine a tensione di rete, e quindi a filamento non concentrato, subito sopra la lampadina è necessario un forte diffusore, di solito un vetro smerigliato o una superficie smerigliata dell'eventuale lente collettrice, al fine di ottenere un illuminamento accettabilmente omogeneo.

Il rendimento di questi illuminatori è basso poiché, essendo essi generalmente sistemati nel piede dello strumento, occorre limitare la dissipazione di calore e la potenza della lampadina non può superare 15/20 W.

Inoltre, il diffusore irradia in tutto il semispazio sovrastante e nessun condensatore potrebbe raccogliere un fascio così aperto; molto utile è la presenza di una forte lente (collettore) sopra il diffusore, capace di accettare un fascio molto più ampio.

Per il resto, valgono i discorsi già fatti, in particolare sulla differenza fra NA_{ob} ed NA_k .

••• Illuminazione critica

Con o senza collettore, questo schema deve portare direttamente sul piano oggetto un'immagine reale del corpo luminoso¹⁷, per es. del filamento di un'ampolla ad incandescenza.

Se non vi è collettore, si applicano i soliti criteri e lo schema di fig. 2 (rovesciato). Se vi è un collettore, esso si può considerare assieme al condensatore un sistema unico convergente il cui ingrandimento sarà dato, con qualche condizione, dal rapporto delle focali dei due sistemi. Il valore dell'ingrandimento è essenziale poiché il massimo sfruttamento del flusso della sorgente si otterrà quando l'immagine del corpo luminoso avrà le stesse dimensioni del campo oggetto e non si spargerà su regioni fuori dal campo visuale. Ma, poiché le dimensioni del campo oggetto dipendono dall'obiettivo in uso, questo illuminatore si può ottimizzare per un dato obiettivo e solo per quello.

Volendo fare qualche calcolo, bisognerà poi vedere qual è l'apertura utile della coppia.

Se ben concepito, un illuminatore critico con collettore può dare, a pari flusso del corpo luminoso, il massimo illuminamento possibile sull'oggetto ed infatti è stato usato per la tecnica di osservazione più famelica dal punto di vista fotometrico: la fluorescenza.

••• Illuminazione secondo Köhler

Qui le cose si complicano poiché il condensatore “vede” come sorgente una microlampada, cioè un collettore il cui diametro utile può essere limitato da un diaframma di campo. Al collettore si applica lo schema di fig. 2 (diritto) ma l'immagine del filamento prodotta da esso deve coprire tutta la pupilla d'ingresso del condensatore e nulla più per evitare sprechi di flusso. Anche se questo è verificato, un obiettivo debole richiede una bassa NA_k , cioè un basso diametro della pupilla del condensatore o, che è lo stesso, del diaframma d'apertura: buona parte dell'immagine del filamento andrà perduta perché assorbita dalle lamelle del diaframma. Ciò significa che lo schema di Köhler ai bassi ingrandimenti rende poco.

Questo in genere non si nota poiché, in quelle condizioni, si sa che un obiettivo ha, in proporzione all'ingrandimento, una maggiore apertura e l'effetto di questa è più forte dell'ingrandimento. Pertanto, in genere l'illuminamento è sufficiente.

Con i forti obiettivi, le cose vanno peggio poiché, al contrario dei deboli, si avrà una carenza di apertura. Ma l'effetto più rilevante viene dal fatto che l'obiettivo forte ha un piccolo campo oggetto e pertanto richiede una forte chiusura del diaframma di campo, cioè una forte riduzione dell'apertura utile del collettore. E qui entra in ballo la legge del quadrato...

Si potrebbe pensare di ridurre l'ingrandimento del condensatore diminuendone la focale, cioè scegliendo un condensatore più forte; ciò consentirebbe una maggiore apertura del diaframma di campo. Ma, a parte la scomodità della manovra, ciò aumenterebbe il valore di

¹⁷ Si noti che a volte parliamo di “corpo luminoso” come “oggetto capace di irradiare energia nello spettro ottico” (filamento incandescente, arco elettrico, ecc.); altre volte abbiamo detto “sorgente” come “sistema ottico capace di irradiare in una certa direzione” (microlampada con corpo luminoso, collettore, eventuale diaframma di campo, ecc.).

NA_k che rapidamente supererebbe NA_{ob} . Altra sorgente di perdite. Non c'è molto da fare. Nonostante i suoi innegabili meriti, lo schema di Köhler non dà generalmente il meglio di sé in fatto di fotometria. Non si può avere tutto.

7) --- Illuminazione in fondo scuro in diascopea

Poiché un oggetto illuminato in fondo scuro diffonde in tutto lo spazio, l'illuminamento nella sua immagine dipenderà dal quadrato dell'apertura dell'obiettivo e dall'inverso del quadrato... Senza contare che l'immagine finale è data solo dalla radiazione diffusa dall'oggetto, che è sempre poca e che l'obiettivo raccoglie solo per quando è concesso alla sua apertura utile.

Per quanto riguarda il fascio illuminante, l'apertura del condensatore è difficile da calcolare, ma prevale l'effetto dell'obliterazione centrale del fascio stesso.

Un'immagine in campo scuro non abbaglia nessuno.

8) --- Fluorescenza in diascopea (in trasparenza)

È questa la tecnica classica, che ricalca di solito per l'illuminazione lo schema di Köhler (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 30.6). In più, vi sono i filtri di eccitazione, spesso preceduti da uno o più anticalorifici (le sorgenti usate sono spesso di forte potenza (almeno 50 W) e dissipano molto calore). I filtri d'eccitazione non servono ad illuminare il fondo immagine, se non altro perché trasmettono solo l'ultravioletto o, al massimo, l'estremo blu e del resto la radiazione da essi trasmessa viene assorbita dal filtro d'arresto. Il fascio illuminante serve solo ad "eccitare" l'eventuale fluorescenza dell'oggetto. Per quest'ultima vale la regola del quadrato dell'apertura ecc. colla solita perdita dovuta al fatto che la radiazione di fluorescenza viene emessa in tutto lo spazio, come avviene per la diffusione, e l'obiettivo ne riceve sempre meno della metà (l'apertura angolare di un obiettivo non può mai superare circa 70°). Per quanto riguarda il fascio illuminante, l'apertura del condensatore può superare utilmente quella dell'obiettivo; infatti, il fascio illuminante non concorre a formare l'immagine finale, come già detto, e la sua apertura, se in eccesso rispetto a quella dell'obiettivo è ancora utile per eccitare la fluorescenza dell'oggetto.

Comunque, il rendimento fotometrico della fluorescenza¹⁸ è sempre molto basso, generalmente inferiore a 10^{-3} , e per aumentarlo l'osservazione in fluorescenza richiede tutti gli accorgimenti possibili, che elencheremo fra poco.

9) --- Fluorescenza in episcopia

Lo schema da considerare è ora quello di fig. 3, con la differenza che il filtro B rappresenta il filtro (o i filtri) d'eccitazione e lo specchio semiriflettente E è dicromatico (di solito si dice "dicroico", ma è un errore poiché il dicroismo riguarda un fenomeno in luce polarizzata). Quest'ultima caratteristica significa che lo specchio E può riflettere verso l'oggetto molto più del 50% della radiazione di eccitazione che gli arriva dalla sorgente e può trasmettere verso l'oculare molto più del 50% della radiazione di fluorescenza, che si trova in bande di lunghezze d'onda assai diverse. Il rendimento complessivo dello specchio non è quindi al massimo 25%, come avviene per i normali specchi neutri dell'episcopia tradizionale, ma molto di più. Inoltre, per ogni oggetto (o colorante) fluorescente si cerca la miglior combinazione di filtri (di eccitazione e di arresto + specchio dicromatico) capace di accordarsi meglio con la banda spettrale di assorbimento dell'oggetto e con la sua banda spettrale di emissione. Questo è un problema sempre aperto poiché ogni giorno compaiono nuovi coloranti fluorescenti (fluocromi), adatti ad un numero sempre maggiore di ricerche specifiche.

Poiché interessa avere il massimo illuminamento sull'oggetto, non esiste in questo caso un diaframma d'apertura e quindi l'apertura dell'obiettivo entra per intero nei calcoli due

¹⁸ inteso come rapporto fra energia incidente sull'oggetto ed energia di fluorescenza

volte, ogni volta al quadrato, quando funziona da condensatore e quando fa il suo mestiere di obiettivo, quindi globalmente alla quarta potenza.

In fluorescenza si adoperano in genere lampade ad arco, sia per l'elevata brillantezza (vedi sopra), sia perché emettono in prevalenza nelle bande più utili a suscitare la fluorescenza (blu-viola ed ultravioletto).

Chiamiamo ora SI il cammino ottico del sistema illuminante, fra il diaframma di campo e l'oggetto; allo stesso modo, chiamiamo SF il cammino ottico del sistema formatore d'immagine fra l'oggetto e l'immagine intermedia.

Il semplice schema di fig. 4 illustra il "passaggio" da un campo oggetto di diametro s al campo immagine di diametro s' : l'abbiamo già illustrato.

Abbiamo già spiegato (caso 4) che un tale schema si applica direttamente ad un microscopio in diascopea, ma anche ad uno episcopico. La figura rappresenta sia il cammino SI che quello SF ; si è anche precisato che, sopra l'obiettivo, vi è in episcopia un semi-riflettente inclinato a 45° sull'asse ottico e che, in figura, il piano P rappresenta sia il piano dell'immagine intermedia (cammino SF) che quello del diaframma di campo (cammino SI).

Nella figura sono schematizzati due obiettivi di diversa focale, ma di pari apertura.

Per confrontare il rendimento fotometrico di vari sistemi ottici per epi-fluorescenza, occorrerebbe tener conto di alcuni fattori difficilmente misurabili (trasparenza dei vetri ottici delle lenti alle lunghezze d'onda utilizzate in ogni caso particolare, perdite per riflessione alla superficie delle lenti, sempre in funzione della lunghezza d'onda, rendimento del semi-riflettente, ecc.); per fortuna questi fattori sono in genere meno importanti. Invece è facile conoscere e modificare (cambiando obiettivo) altri fondamentali parametri: l'ingrandimento M dell'obiettivo e la sua apertura numerica NA .

1) Variazione della NA (lato oggetto) dell'obiettivo, a parità di M .

Cammino SI : il flusso fotometrico sul piano oggetto è proporzionale alla sezione del fascio accettato dall'obiettivo, cioè alla superficie della pupilla, cioè ad NA^2 .

Cammino SF : Poiché l'oggetto fluorescente irradia in tutto lo spazio, il flusso che concorre a formare l'immagine s' è ancora proporzionale ad NA^2 .

La resa fotometrica globale è quindi proporzionale alla quarta potenza di NA .

2) Variazione di M a parità di NA (vedi le due lenti schematizzate in fig. 4).

Cammino SI : crescendo M , cala linearmente la focale dell'obiettivo ed il diametro della sua pupilla; quindi, proporzionalmente ad M^2 , cala la sezione del fascio utile accettato dall'obiettivo, quindi il flusso totale in s . Nella stessa misura (M^2) cala però la superficie s del campo oggetto. Alla fine, l'illuminamento¹⁹ in s non dipende da M .

Cammino SF : crescendo M^2 , cala proporzionalmente la superficie (emettente) di s , che è coniugata con s' , quindi cala il flusso utilizzato.

La resa fotometrica globale, ignorando la trasparenza dell'obiettivo e gli altri fattori citati sopra, risulta quindi proporzionale a: NA^4 / M^2 .

Un'altra applicazione della regola dei quadrati.

¹⁹ Si potrebbe chiamare anche "densità di flusso" = flusso totale / superficie = quantità di flusso per unità di superficie.

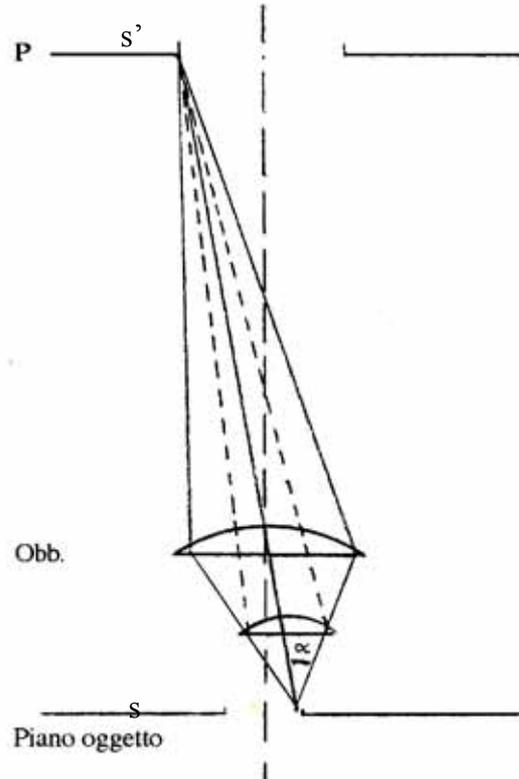


Fig 4 - Schema di sistema formatore d'immagine in un microscopio con due diversi obiettivi, di diversa focale ma di pari apertura α . s è il diametro del campo oggetto; s' è il campo immagine corrispondente dell'obiettivo (Obb), cioè l'indice di campo dell'oculare. P è il piano dell'immagine intermedia. α è l'apertura angolare dell'obiettivo.

CASI PRATICI

Veniamo ora a considerare le (poche) operazioni che sono consentite al micrografo per intervenire sulla resa fotometrica del suo strumento, cioè per variare l'illuminamento sul piano dell'immagine finale.

1° caso: illuminamento eccessivo = abbagliamento, oppure sovraesposizione di un'emulsione fotografica, oppure saturazione di un sensore a stato solido (CCD o simili).

Questo caso si può verificare più facilmente con obiettivi deboli, con le tecniche più "generose" (campo chiaro in diasopia ed episcopia, contrasto interferenziale, ecc.), con lampade sovradimensionate.

I rimedi utilizzabili sono:

--- Chiusura del diaframma d'apertura. Questa manovra, troppo usata dai faciloni, ha il vantaggio di aumentare la profondità di fuoco ed il contrasto (fino ad un certo punto: vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 17.1.2 e 18.10), ma ha un effetto sempre sottovalutato e sempre devastante: riduce la risoluzione. L'occhio si lascia distrarre dall'aumento del contrasto e non si accorge che i dettagli più fini scompaiono.

Comunque, il diaframma d'apertura non esiste (e sarebbe in genere dannoso) in campo scuro, in fluorescenza, ecc.

--- Ridurre l'apertura dell'obiettivo scegliendo modelli di minore apertura, per es. acromatici oppure usando, a parità di ingrandimento totale, una coppia: obiettivo debole – oculare forte. Questo comporta però sempre una perdita di risoluzione (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 18.5). Inoltre, gli obiettivi ad immersione "iris", con diaframma ad iride incorporato (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 19.2.6), permettono di diminuire la loro apertura, ma sempre a scapito della risoluzione. Ridurre l'apertura di un obiettivo porta per contro agli stessi vantaggi della

riduzione di apertura del condensatore: aumenta la profondità di fuoco ed il contrasto.

--- Aumentare l'ingrandimento totale scegliendo obbiettivi ed oculari più forti.

Obiezioni: si riduce la risoluzione nell'immagine finale
verificare che l'oggetto stia tutto nel campo visibile.

--- Ridurre la tensione di alimentazione della microlampada. Semplice e facile.

Obiezioni: non tutti gli alimentatori lo consentono
non tutte le lampade lo consentono (quelle ad arco si spengono)
la temperatura di colore²⁰ delle lampade ad incandescenza si abbassa
provocando una "dominante di colore" gialla nelle foto a colori; anche i normali "filtri di compensazione" con un mired di - 12 DM²¹ possono rendere compatibile una pellicola daylight con una sorgente ad incandescenza, ma presuppongono sempre una sorgente con temperatura di colore di 3.200 °K circa, cioè alimentata a tensione nominale.

Dove il riconoscimento dei colori è importante (colorazioni diagnostiche in batteriologia o istologia, colori d'interferenza in radiazione polarizzata. ecc.), comunque, una sorgente giallastra è d'impaccio.

--- Rimedio sovrano e sempre possibile: introdurre nel sistema illuminante uno o più filtri grigi o "neutri", anche se del tipo usato in fotografia²². Questi filtri sono economici e facilmente reperibili. Il valore della loro trasmissione dovrebbe essere costante in tutto lo spettro ottico al fine di non introdurre dominanti di colore, ma ciò è ragionevolmente verificato nella maggioranza dei filtri in commercio.

I filtri in genere non vanno posti fra obiettivo ed oculare al fine di non degradare l'immagine; il posto migliore è subito sotto il condensatore, cioè in un piano non coniugato coll'oggetto, affinché ogni granello di polvere o graffio alla loro superficie non si ritrovi a fuoco assieme all'oggetto. Troppi costruttori pongono la sede per filtri vicino al diaframma di campo, in un piano quasi coniugato coll'oggetto.

2° caso: illuminamento insufficiente = difficoltà d'osservazione, foto sottoesposte, molto "rumore" di fondo nelle riprese digitali oppure impossibilità di ripresa nei sistemi automatici, ecc.

Ciò è frequente a forte ingrandimento, in episcopia, in contrasto di fase, in campo scuro, in polarizzazione, con lampade economiche, con diaframma d'apertura troppo chiuso, ecc.

I rimedi e le obiezioni sono all'incirca l'opposto di quando detto nel 1° caso:

--- Aprire il più possibile il diaframma d'apertura del condensatore, compatibilmente con la perdita di contrasto e di profondità di fuoco. Eventualmente, in diascopea, cercare un condensatore di maggiore apertura e migliori correzioni. Parliamo di correzioni poiché un normale condensatore "di Abbe" è generalmente affetto da forte aberrazione sferica e ciò fa sì che non tutto il fascio emergente dal condensatore venga raccolto; specialmente nelle zone intermedie, i raggi si possono incrociare fuori dal piano oggetto e sfuggono all'obiettivo (vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 21.7 e figg. 88 e 89).

In episcopia non è in genere possibile sostituire il condensatore.

--- Aumentare l'apertura dell'obiettivo scegliendo, a parità d'ingrandimento, gli obbiettivi più forti (in genere, semiapocromatici o apocromatici). Abbiamo visto i casi in cui l'apertura dell'obiettivo entra in gioco alla quarta potenza. In fluorescenza, questo fattore diviene preponderante. Nel caso di obbiettivi ad immersione "iris", verificare che il diaframma interno non sia rimasto involontariamente chiuso.

--- Ridurre l'ingrandimento totale scegliendo, a parità di apertura, gli obbiettivi più deboli (apocromatici, ecc.) e gli oculari più deboli. Salvo che le dimensioni dell'oggetto lo consentano...

--- Attenzione anche ad eventuali variatori d'ingrandimento contenuti nel tubo ed a raccordi fotografici o "lenti di camera" capaci di introdurre un ingrandimento fotografico supplementare eccessivo (caso molto frequente!).

²⁰ Vedi il caso **1**) di cui sopra ed inoltre il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Capp. 22.6, 22.6.4 e 30.8.9.

²¹ Vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 23.2.

²² Vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Capp. 23.2 e 23.3.

--- Anche molti tubi trioculari o commutatori foto-visione contengono specchi o prismi che suddividono il fascio emergente dall'obiettivo. Se possibile, commutare i prismi in posizione "tutto in fotografia" o "tutto in visione".

--- Aumentare la tensione di alimentazione della lampada, finchè non brucia... Ammesso che il tipo di lampada e di alimentatore lo consentano...

--- Eliminare tutti i filtri non necessari, neutri, diffusori, ecc. Poiché il caso che stiamo esaminando si presenta in genere a forte ingrandimento, si ricordi che in quelle condizioni il campo oggetto è piccolo ed il problema dell'uniformità di illuminamento è raramente grave; perciò i diffusori, vetri smerigliati, ecc. sono inutili.

--- Eliminare, se presenti e non indispensabili, tutti gli elementi interposti: polarizzatori, prismi di Wollaston per il DIC, anticalorifici (prudenza!), ecc.

--- Si verifichi che il sistema illuminante sia ben regolato. Possono abbassare l'illuminamento finale molti errori: collettore o condensatore mal focalizzati o non centrati, lampadina in posizione scorretta (quelle precentrate possono essere montate in due posizioni a 180° l'una dall'altra, ma solo una va bene), diaframmi anulari del contrasto di fase non necessari, ecc.