

Sguardo d'insieme su  
**Le TECNICHE di CONTRASTO**  
in microscopia

L'argomento è vastissimo e non è possibile esaurirlo: occorrerebbero svariati volumi. Cerchiamo allora di limitarci ad una sommaria elencazione ed a considerazioni generali, anche facendo riferimento a testi facilmente reperibili, per es. in questo sito: "www.funsci.com".

Si suppone nel lettore una conoscenza generale della microscopia ottica, quale si può acquisire leggendo, ad es., in questo medesimo sito, il manuale: "Problemi Tecnici della Microscopia Ottica", l'art. n° 2 ("L'illuminazione in microscopia"), altri articoli di argomento più limitato, o qualcuno dei testi citati in bibliografia.

Per "tecniche di contrasto" s'intendono quegli accorgimenti o quegli strumenti che consentono di aumentare il contrasto di un'immagine al microscopio, in confronto a quanto si può avere col "normale" fondo chiaro e con la "normale" illuminazione sec. Köhler. Col tempo, ne sono state escogitate in numero quasi illimitato.

Precisiamo subito che molte di queste tecniche sono applicabili, almeno nel loro principio, sia alla diascopea, sia all'episcopia, e pertanto descriveremo soprattutto quelle, più diffuse, della diascopea. Per le altre, vedi l'art. n° 2 ("Illuminazione in microscopia"), n° 17 ("Microscopia interferenziale"), ecc., in questo sito.

Poiché molti oggetti biologici e le loro strutture quando si trovano nello stato naturale, magari ancora viventi, sono molto trasparenti, da sempre i micrografi hanno cercato un mezzo per farli apparire più percepibili, vale a dire più contrastati. Da secoli sono stati sperimentati molti metodi di "colorazione" che rendono l'oggetto più scuro e spesso colorato. I coloranti usati in microscopia sono innumerevoli, spesso selettivi, nel senso che tendono a colorare specificamente solo certi oggetti o loro parti e pertanto danno indicazioni sulla composizione chimica o sulla struttura fisica dell'oggetto. Sono preziosi ed insostituibili, ma ... Anche se esistono alcuni coloranti "vitali", relativamente non tossici e quindi applicabili a materiale *in vivo*, di solito la colorazione provoca la morte e qualche alterazione nella struttura dell'oggetto.

È naturale che siano stati cercati metodi puramente fisici che non intervengono sull'oggetto ma sullo strumento, consentendo l'osservazione di materiale anche vivente senza alcun trattamento. Si perde in genere la selettività del metodo (il contrasto dipende quasi esclusivamente dal cammino ottico), ma, oltre a prolungare la vita del preparato ed eliminare molte cause di alterazione legate alla colorazione, si ha in genere un'osservazione immediata, preziosa per il materiale vivente, senza richiedere lunghe manipolazioni né coloranti costosi, spesso difficili da reperire in quantità limitata, e rapidamente deperibili.

#### QUEL MALEDETTO VIZIETTO ...

Il più antico (e purtroppo il più usato) metodo per aumentare il contrasto è quello di ridurre l'apertura del fascio illuminante prodotto dal condensatore o effettivamente utilizzato dall'obiettivo: chiusura del diaframma d'apertura o abbassamento del condensatore stesso. Ma sappiamo che ciò comporta una perdita di luminosità e soprattutto una perdita di risoluzione (vedi il manuale: "Problemi Tecnici della Microscopia Ottica", Capp. 18.9, 18.10, ecc.).

Si potrebbe obiettare che ridurre l'apertura utile del condensatore non è come ridurre quella dell'obiettivo ma, come è spiegato nel testo citato, si ha sempre una perdita di risoluzione a causa di un restringimento dei "massimi" dell'onda diffratta dall'oggetto. Inutile dilungarsi: si

tratta di un perverso ripiego.

Nel caso di oggetti colorati, esiste il principio dei “filtri complementari”: un oggetto di un qualunque colore viene rappresentato con maggiore contrasto quando viene illuminato con radiazione di colore complementare al proprio<sup>1</sup>. Per ogni oggetto colorato, basta trovare il filtro colorato più adatto da inserire nel sistema illuminante. Ma le tecniche di contrasto vere e proprie si riferiscono ad oggetti trasparenti, quindi parliamo d’altro.

## L’ILLUMINAZIONE OBLIQUA ed il FONDO SCURO

Forse è utile introdurre qui un concetto nuovo, quello di **modulatore**. Intendiamo con questo termine un organo capace di alterare in qualche modo un “fascio” ottico, che si tratti del fascio illuminante o del fascio formatore d’immagine.

Escludiamo da questo concetto le lenti, i prismi e le lamine a facce piane e parallele (finestre di chiusura, filtri in vetro, ecc.). Escludiamo anche i casi ovvii, come un semplice diaframma ad iride centrato o un vetro smerigliato.

Ma sarà utile includere nella famiglia dei modulatori molti organi di cui dovremo parlare presto, come gli anelli di fase, i diaframmi anulari, le fenditure, i prismi di Wollaston, ecc.

Un’altra cosa da chiarire subito è l’ampia possibilità di intervento sul fascio illuminante, quello che un normale condensatore concentra sul piano oggetto, intervento ottenuto proprio a mezzo di qualche “modulatore”.

Cominciamo dal caso generale di un normale condensatore di Abbe, a due lenti, supposto corretto da aberrazioni (fig. 1).

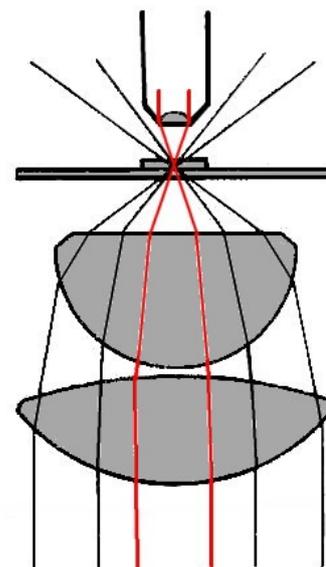
Fig. 1

Supponiamo per ora che l’obbiettivo rappresentato sia del tipo “a secco”, con un’apertura inferiore a quella del condensatore.

Dallo schema a fianco, s’intuisce che il fascio illuminante (centrato rispetto all’obbiettivo) viene accolto dall’obbiettivo stesso per la zona<sup>2</sup> centrale (in rosso) e sfugge verso l’esterno per la zona periferica (in nero).

Un’eventuale diaframma ad iride centrato, posto sotto al condensatore (possibilmente nel suo primo piano focale) può eliminare la zona periferica e limitare il fascio illuminante alla zona “utile”, quella effettivamente utilizzata dall’obbiettivo. È quanto previsto nell’illuminazione “sec. Köhler”.

Stiamo parlando di un diaframma centrato e quindi abbiamo definito un’illuminazione centrata, di apertura<sup>3</sup> variabile, ma sempre centrata.



Ora immaginiamo un diaframma più o meno chiuso, ma decentrato. Avremo una “illuminazione obliqua”, con un fascio di diametro variabile, ma non centrato. La sua apertura massima potrà essere anche forte, ma “tutta da una parte”. Possiamo parlare di illuminazione obliqua **unilaterale**.

L’apertura di un fascio per illuminazione obliqua può obbedire a tre condizioni ben diverse:

<sup>1</sup> Si chiamano complementari quei colori i quali, se sovrapposti, danno la sensazione di bianco. La definizione di complementarietà è assai diversa nel caso di superfici colorate opache o trasparenti.

<sup>2</sup> In ottica, “zona” indica una corona circolare centrata nella sezione di qualunque fascio od elemento ottico.

<sup>3</sup> Per apertura s’intende qui l’inclinazione massima dei raggi contenuti in un qualunque fascio illuminante. Che poi si esprima questa inclinazione come angolo  $\alpha$ , come apertura numerica  $n \sin \alpha$ , o altro, si vedrà caso per caso.

1) – essere tutta contenuta all'interno dell'apertura dell'obiettivo (fig. 2). In questo caso, il campo immagine sarà chiaro (“fondo chiaro”), ma l'obliquità del fascio illuminante creerà degli effetti particolari, tutte le volte che il fascio illuminante intercetta un qualunque oggetto. Si ha un'impressione di rilievo che è molto gradevole, anche se ingannevole. Diciamo “ingannevole” poiché il rilievo apparente non è dovuto alla forma geometrica dell'oggetto, ma al suo cammino ottico (spessore  $\times$  indice). Del resto, questo rilievo ingannevole è comune ad altri sistemi, come il famigerato DIC, il contrasto d'ampiezza, ecc.

Tempo fa, alcuni condensatori di Abbe erano forniti con un diaframma ad iride decentrabile (a mezzo di una piccola cremagliera), in modo da variare l'obliquità media del fascio illuminante. Ciò consentiva di variare le apparenze di rilievo dell'oggetto. Dunque, “illuminazione obliqua variabile in fondo chiaro”.

Fig. 2

Quando non esistevano altre tecniche di contrasto, questa semplice configurazione era preziosa e conserva ancora tutta la sua validità.

Si può anche migliorare il sistema dal punto di vista fotometrico dando al diaframma decentrato una forma diversa dalla circolare. Gli autori americani parlano di “COL” (dovrebbe essere l'acronimo di “Circular oblique lighting”), la solita riscoperta dell'acqua calda. La soluzione pratica è semplicissima: ridurre la pupilla d'ingresso del condensatore ad un “segmento” periferico, semplicemente introducendo sotto al condensatore un pezzo di cartoncino ad orlo diritto.

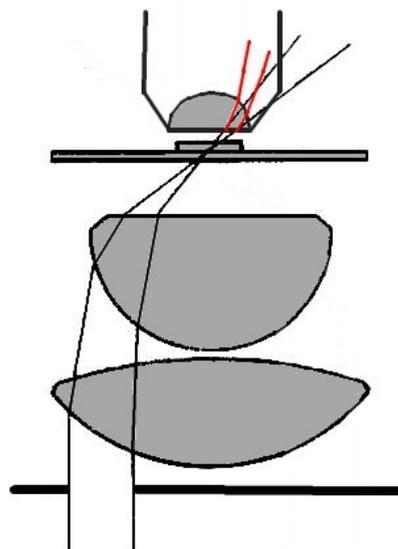


Fig. 3

Ancora meglio utilizzare un disco opaco (B in fig. 3), di diametro di poco superiore al diametro del diaframma d'apertura (A), in modo da aderire meglio alla forma circolare del diaframma stesso. Questi semplici schermi, ad orlo diritto o circolare, sono facili da realizzare, si applicano a qualunque microscopio, anche episcopico, e non costano nulla.

2) – L'apertura del fascio illuminante può essere tutta esterna all'apertura utile dell'obiettivo. In altre parole, anche il raggio meno inclinato del fascio illuminante è più aperto dell'apertura utile dell'obiettivo (fig. 4).

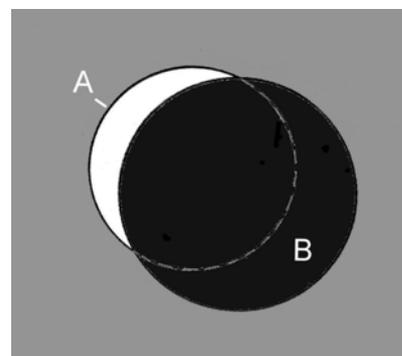
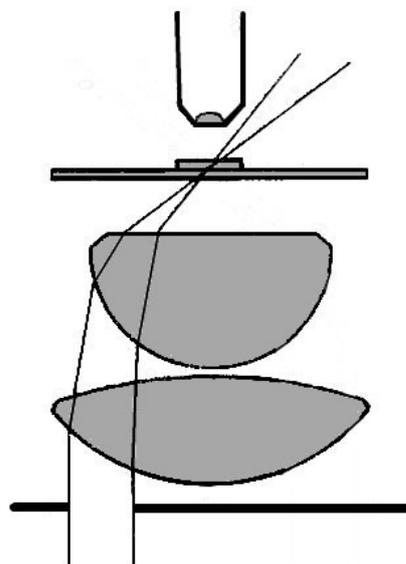


Fig. 4

Il fascio illuminante non viene raccolto dall'obiettivo, il fondo immagine è nero e quindi si può parlare di “fondo scuro unilaterale” oppure di “illuminazione obliqua in fondo nero”. La luce diffratta dall'oggetto, in parte accolta dall'obiettivo, renderà chiara la sua immagine, su fondo nero.

L'effetto di rilievo si presenta ancora, per via dell'asimmetria del sistema, ma la resa fotometrica sarà modesta e quindi questo metodo non è molto utilizzato.

3) – Il fascio illuminante è “a cavallo” dell'apertura utile dell'obiettivo, in parte viene accolto, in parte sfugge (nella fig. 5 la linea verde indica il confine dell'apertura utile dell'obiettivo). In questo caso, una parte del fascio illuminante rende chiaro il fondo immagine. La luminosità dell'oggetto andrà valutata caso per caso poiché dipende dalla



differenza fra le due aperture, dalle caratteristiche dell'oggetto, ecc. Comunque, sempre con effetto di rilievo.

Abbiamo un'illuminazione obliqua in fondo (un po' meno) chiaro, ma con un maggior peso del fascio diffratto dall'oggetto.

Fig. 5

Forse, questi diaframmi decentrati, circolari, a segmento circolare o a falce di luna, meritano il nome di "modulatori".

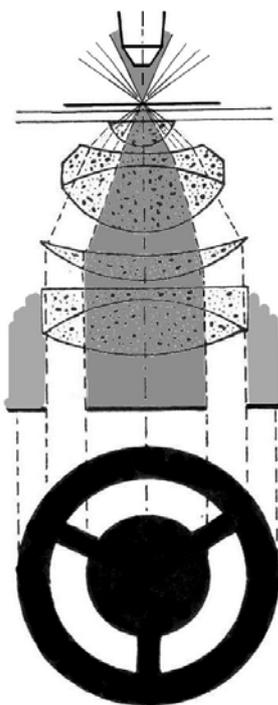
Ma andiamo avanti.

Nelle figure 2, 4 e 5, abbiamo esaminato il caso di un fascio illuminante abbastanza stretto, ma globalmente inclinato rispetto all'asse del sistema obbiettivo-condensatore (illuminazione obliqua, in ogni caso). Una disposizione così eccentrica del fascio illuminante produce ovviamente degli effetti altrettanto eccentrici, quello che abbiamo chiamato "effetto rilievo", con una direzione preferenziale del contrasto: intendiamo dire che qualunque oggetto allungato (una fibra, un fascio di fibre, ecc.) apparirà a forte contrasto se diretto perpendicolarmente alla direzione da cui proviene l'illuminazione, ma con contrasto assai ridotto se parallelo a quella direzione. La possibilità di ruotare il diaframma eccentrico (oppure l'oggetto) attorno all'asse dà la possibilità di adattare la direzione di massimo contrasto all'allungamento dell'oggetto.

Ma torniamo al caso che il fascio illuminante sia centrato rispetto all'asse, come in fig. 1: tutto è simmetrico e non troveremo una direzione preferita per il contrasto. Avremo il fondo chiaro normale.

Fig. 6

Fig. 7



Se però obliteriamo la zona centrale del fascio illuminante, per un'apertura leggermente superiore a quella dell'obbiettivo (fig. 6), quello che resta del fascio illumina l'oggetto ma non penetra direttamente nell'obbiettivo. Il fondo dell'immagine è di nuovo nero e l'immagine dell'oggetto è formata solo dall'onda diffratta da esso, che occupa una forte apertura. Avremo il "**fondo scuro omnilaterale**": simile a quello che si vede in fig. 4, ma con fascio simmetrico rispetto all'asse.

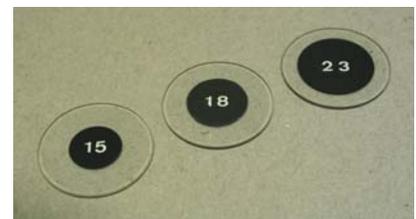
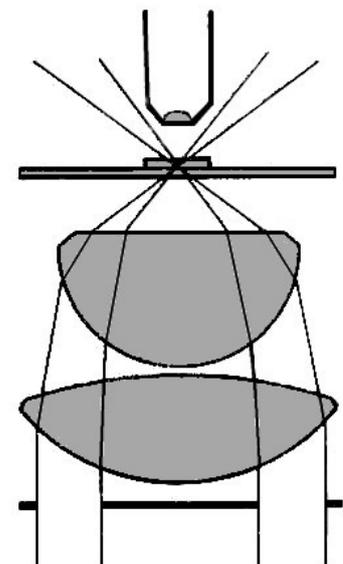
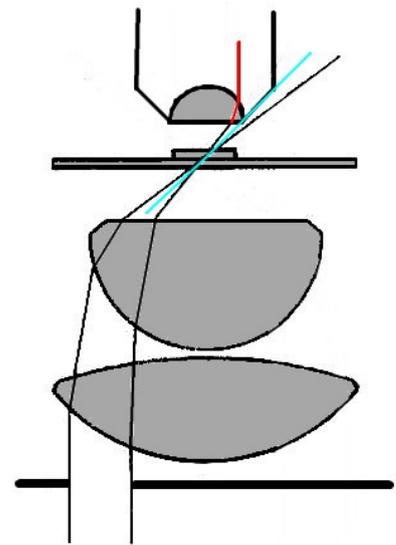


Fig. 8

Un fondo nero, senza effetti di ombreggiatura né di rilievo.

Questa tecnica si realizza con facilità: basta porre sotto al condensatore, sempre, possibilmente, nel suo primo piano focale (comunque il più possibile vicino alla lente inferiore), un dischetto opaco. Si può ritagliare un dischetto di cartoncino nero ed incollarlo su un disco di vetro o di plexiglas, di diametro adeguato all'eventuale porta-filtri (fig. 8).

Oppure fissare il dischetto opaco in centro ad un anello metallico a mezzo di tre bastoncini radiali (fig. 7).

Qualche volta, è possibile anche utilizzare i diaframmi anulari del contrasto di fase, scegliendo quelli più grandi, destinati agli obbiettivi più forti.

Questa tecnica è semplice, ma funziona solo con obbiettivi medio-deboli; con un condensatore ben corretto si può avere il fondo scuro fino ad obbiettivi di apertura massima di 0,65 circa. La ragione di questa limitazione viene dal fatto che un sistema convergente “a secco” non può avere un’apertura (NA) superiore a 1,0 ( $\text{sen } \alpha \leq 1$ ), ma la presenza del porta-oggetto ed una minima distanza di sicurezza impediscono di superare circa 0,9. Inoltre, il fascio convergente deve avere un certo “spessore”: la sua apertura massima può essere anche 0,9, ma la minima deve essere sensibilmente inferiore per non ridurre troppo l’illuminazione portata dal fascio. Si potrebbe pensare che, fissando un intervallo d’apertura da 0,9 a 0,7, dovrebbe funzionare, ma l’inevitabile sferica e cromatica del condensatore consente a qualche fascio di minore apertura di penetrare nell’obbiettivo e rendere il fondo immagine non nero. Ecco perché un’apertura d’obbiettivo di 0,65 è il massimo praticamente raggiungibile.

A questo punto, per ridurre le aberrazioni del condensatore e consentire aperture maggiori, non c’è mezzo migliore che ricorrere ad un sistema catottrico, a soli specchi (fig. 9), il quale è esente da aberrazione cromatica (nelle leggi della riflessione la lunghezza d’onda non compare).

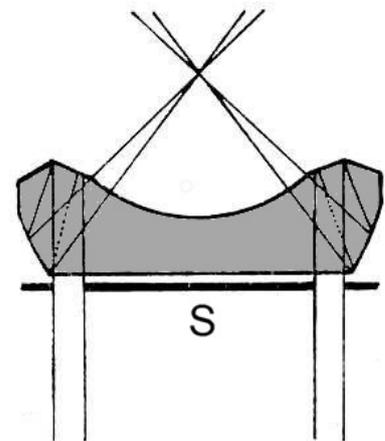


Fig. 9

Come si nota dallo schema a lato, il sistema comporta due riflessioni all’interno di un unico pezzo di vetro il quale, superiormente, è limitato da aria. Quindi il limite superiore dell’apertura è ancora 0,9 o poco più, ma il fascio è più “pulito”, meno affetto da aberrazioni.

In queste condizioni, si può pensare di utilizzare obbiettivi di apertura un po’ maggiore, ma comunque a secco.

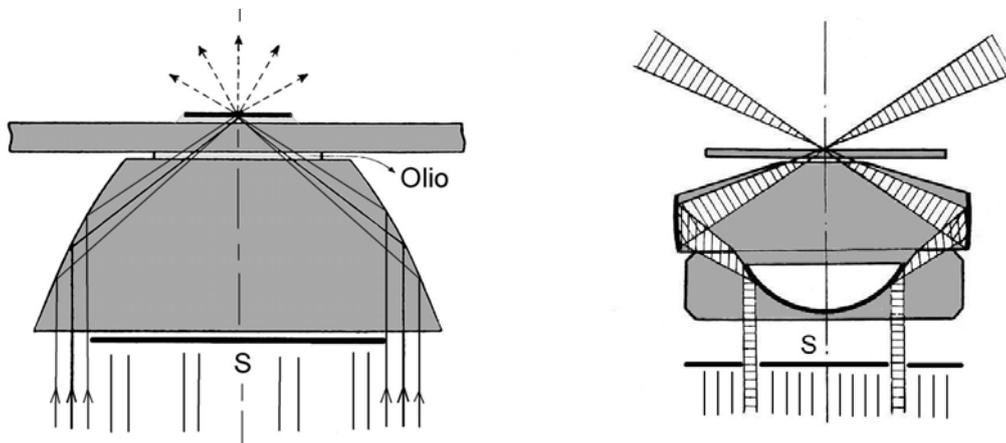


Fig 10 – Condensatori per fondo scuro ad immersione: paraboloidale (a sinistra) e cardioide (a destra). La superficie riflettente nel primo caso è paraboloidale, ed è difficile da costruire. Si noti anche che, secondo questo schema, il diametro del fascio anulare utile è assai maggiore che nel secondo. Questo presuppone che l’immagine del filamento proiettata dal collettore sulla pupilla d’ingresso del condensatore sia altrettanto grande, ma ciò raramente avviene e forse questa è un’altra ragione che ha portato all’abbandono della formula “paraboloidale”.

Nel modello “cardioide”, le superfici riflettenti sono due, entrambe sferiche, ma questo rende più difficile la correzione dell’aberrazione sferica.

La casa Will aveva prodotto un sistema cardioide in cui la superficie riflettente esterna era costituita da diversi anelli di diversa curvatura; ciò consentiva di variare l’apertura del fascio illuminante ed adattarla a quella dell’obbiettivo (a secco). Altro condensatore utilizzabile per il fondo scuro a secco con apertura variabile è quello di Heine (prod. Leitz), che è del tipo pancratico (zoom) a sole lenti (diottrico) e serve anche per il contrasto di fase.

E per gli obbiettivi ad immersione? Salvo casi particolari (alcuni costruttori hanno prodotto

serie di obbiettivi di ogni ingrandimento, tutti ad immersione per poter lavorare con oggetti privi di coprioggetto), gli obbiettivi “HI” hanno aperture da circa 1,0 ad un massimo di 1,4. Con essi occorre un condensatore parimenti ad immersione; se però si pensa ad un obiettivo normale, con  $NA = 1,25$ , il condensatore dovrebbe fornire un fascio con apertura compresa fra 1,3 ed 1,4 (il limite teorico di 1,5 non è raggiungibile, sempre per via dello spessore del porta-oggetti e della distanza di sicurezza fra vetrino e condensatore).

Questo è possibile sul piano teorico, ma non su quello realizzativo. Utilizzando un condensatore ad immersione catottrico, si arriva in pratica ad un fascio illuminante compreso fra 1,1 ed 1,4 di apertura massima. Questo significa che la gran maggioranza degli obbiettivi HI non può essere usato in fondo scuro.

Rinunciare? Vista l'importanza di alcuni campi di applicazione in parassitologia, ematologia o biomedicina, si ricorre in genere ad un espediente: limitare l'apertura dell'obiettivo a circa 1,0.

I mezzi utilizzati sono due: predisporre all'interno dell'obiettivo un diaframma ad iride regolabile dall'esterno (sono gli obbiettivi marcati “Iris” o “mit Iris”), oppure introdurre dall'alto nell'obiettivo un cilindretto “limitatore”, un diaframma fisso, che si può togliere dopo l'uso.

Per il tipo “Iris” si vedano in questo sito le schede tecniche n° 16 e 21.

Si tratta ovviamente di un ripiego, con perdita di luminosità e risoluzione, ma poco più sotto descriveremo un'alternativa, naturalmente con qualche difettuccio anch'essa.

Rimane inteso che il condensatore ad immersione deve essere “immerso”, nel senso che fra la sua superficie superiore e quella inferiore del vetrino deve esistere uno strato d'olio. Ma questo significa che una struttura come quella di fig. 9 non può andare: il sistema ottico deve terminare con una superficie in vetro e tutto il percorso del fascio all'interno del condensatore deve svolgersi in vetro (fig. 10).

E c'è un altro problemino, per chi osserva oggetti sospesi in acqua: il fascio prodotto da un condensatore per fondo scuro ad immersione attraversa dapprima lo strato d'olio, poi il porta-oggetto, poi il mezzo di montaggio (l'indice dell'acqua è circa 1,33), poi il copri oggetto.

Ma se l'oggetto è montato in acqua, quando cade l'indice, cioè al confine vetro-acqua, può avvenire una riflessione totale ed il fascio, o almeno la sua parte di maggiore apertura, torna all'ingiù (fig. 11). L'oggetto perde una parte o del tutto il fascio illuminante.

Ancora un'indicazione pratica: un condensatore per fondo scuro ad immersione può essere usato, senza limiti, e con ottimi risultati, per qualunque obiettivo a secco: infatti il fascio illuminante, appena raggiunta la superficie superiore del copri-oggetto, invece di proseguire verso l'alto come appare nella fig. 11 (valida solo con immersione dell'obiettivo), torna verso il basso per riflessione totale e non disturba il fondo scuro.

Fig. 11

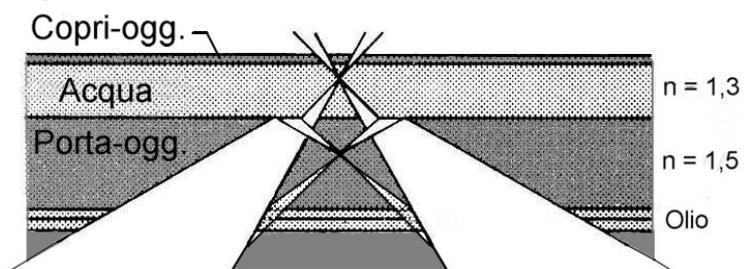
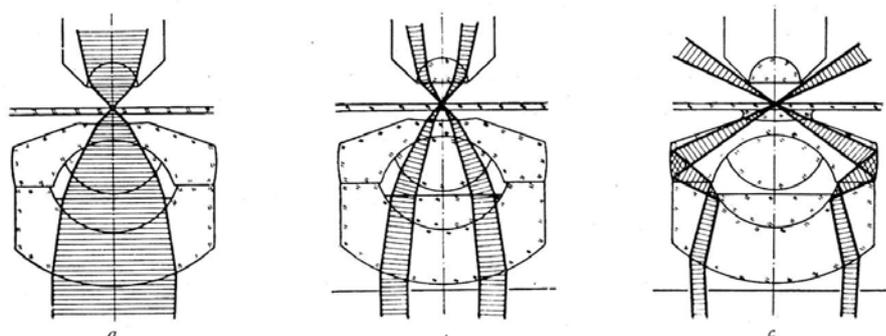


Fig. 12



Vale la pena di accennare anche al fatto che molti costruttori offrono condensatori

complessi, capaci di svolgere varie funzioni. In fig. 12, lo schema di un condensatore “Universale” Wild che, a seconda del diaframma posto sotto di esso, funziona in fondo chiaro a secco (a sinistra), in contrasto di fase (al centro) o in fondo scuro ad immersione (a destra).

Il campo scuro che abbiamo appena illustrato è dunque ottenuto da un fascio conico cavo, centrato, e si adatta ad obbiettivi a secco o ad immersione, ma di apertura limitata a circa 1,0. Si può definire un “campo scuro periferico”.

Ma qualcuno ha trovato il modo di aggirare l’ostacolo: il **campo scuro “centrale”**. Lo schema parte da un normale condensatore fornito di un diaframma anulare centrato, identico a quelli usati in contrasto di fase (vedi oltre e le figg. da 6 a 10). Nel piano focale superiore dell’obbiettivo vi è però un “modulatore” costituito da uno schermo opaco anulare centrato, simile ad un anello di fase; esso viene calcolato in modo da obliterare del tutto il fascio illuminante anulare proveniente dal condensatore (fig. 13).

Si ha qui uno schema simile a quello di fig. 6, ma il fascio illuminante viene totalmente accolto dall’obbiettivo ed intercettato subito dopo. Il diaframma anulare viene calcolato, per ogni obbiettivo, in modo da corrispondere ad un’apertura pari a metà o 2/3 di quella dell’obbiettivo.

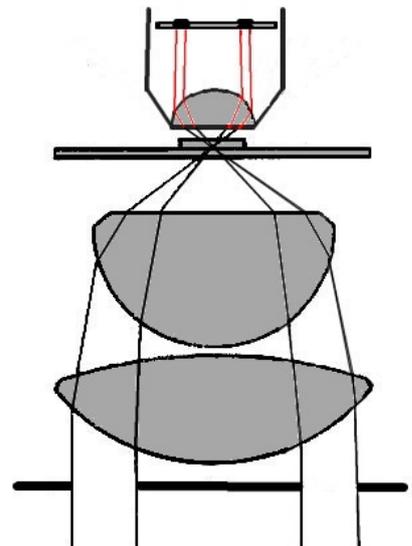
Fig. 13

Un vero fondo scuro, non più “periferico”, ma “centrale”.

Negli schemi di fig. 6, 9 o 10, l’onda diffratta dall’oggetto, che occupa generalmente un ampio angolo solido, viene accolta dall’obbiettivo solo da un lato, verso l’interno del fascio illuminante; i raggi di maggiore apertura, all’esterno del fascio, vanno perduti. Nel fondo scuro centrale, invece, l’onda diffratta viene recuperata (sempre parzialmente) dai due lati del fascio illuminante.

Questa tecnica soffre di un difetto: il fascio illuminante entra per intero nell’obbiettivo e quindi, per via dei riflessi su tutte le superfici che incontra, abbassa il contrasto. Ma i pregi della tecnica sono insostituibili: essa si può applicare a qualunque obbiettivo, di qualunque ingrandimento, a secco o ad immersione, senza mai doverne limitare l’apertura e senza immergere il condensatore.

Anche questo prodotto sembra attualmente abbandonato dai costruttori, forse perché richiede obbiettivi *ad hoc*.



Un dettaglio teorico: il contrasto che si ottiene nelle varie tecniche di fondo scuro dipende dal quadrato dello sfasamento operato dall’oggetto sull’onda che l’attraversa, e da qui deriva la sensibilità del metodo. Questo per contro significa che un oggetto dai bordi in forte rilievo, cioè con un forte salto di cammino ottico, in fondo scuro appare circondato da una larga linea luminosa che nasconde qualunque piccolo oggetto si trovi nei paraggi.

In contrasto di fase, invece, l’intensità dell’immagine dell’oggetto dipende dallo sfasamento alla prima potenza.

Ma il campo scuro ha l’asso nella manica: qualunque oggetto, anche molto più piccolo del potere risolutivo, appare sempre su fondo scuro, purché sufficientemente illuminato. La visibilità (“percezione”) dell’oggetto diventa allora solo un problema fotometrico. Si pensi ai flagelli di molti microrganismi: difficili da vedere, anche in contrasto di fase, ma sempre visibili in fondo scuro: è solo questione di sistema illuminante.

Inoltre il fondo scuro non richiede obbiettivi speciali, tranne che quelli ad immersione “con iride”.

Altra cosa da notare: abbiamo detto sopra: “condensatore di Abbe, supposto privo di aberrazioni ...”, ma un condensatore veramente corretto è un’utopia. Pertanto tutti gli schemi

visti sopra, che indicano limiti netti per ogni fascio, sono proprio degli schemi, ed un vero fondo scuro è difficile da raggiungere: i confini di ogni fascio sono sempre più o meno sfumati.

Abbiamo anche trascurato tutti i riflessi sulle superfici aria-vetro e sulle montature delle lenti, con le conseguenti perdite di contrasto, ecc.

## II CONTRASTO COLORATO sec. RHEINBERG

Immaginiamo di ripartire dallo schema di fig. 1 ed introdurre sotto al condensatore un “modulatore” costituito da uno schermo opaco con due zone trasparenti centrate: una di ridotta apertura, al centro, che potrebbe corrispondere al fascio a confini rossi di fig. 1, ed una zona periferica, a forte apertura, capace di produrre un fondo scuro omni-laterale (fascio a confini neri). Dunque: fondo chiaro a bassa apertura + fondo scuro esterno.

Detto così, non sembra avere senso. Ma si immagini di porre nel foro centrale del “modulatore” un filtro colorato a bassa trasparenza, in modo da creare un fondo chiaro colorato non troppo brillante; si ponga poi sotto la zona trasparente periferica un anello costituito da un altro vetro colorato, di colore diverso, poco assorbente.

Un oggetto trasparente apparirà dunque chiaro, del colore dell’anello periferico, su un fondo piuttosto scuro, del colore del filtro centrale.

È questa la tecnica introdotta da Rheinberg, che è stata adattata in mille modi, variando il colore, la densità ed il diametro dei due filtri colorati. Va da sé che, trattandosi in parte di fondo scuro, si incontrano tutti i limiti già visti: obiettivi a secco solo per aperture non superiori a 0,6 – 0,7 ed obiettivi più forti solo con limitatori d’apertura.

Per i due colori, si scelgono di preferenza colori ben contrastati, ma l’anello esterno può essere semplicemente trasparente e l’oggetto apparirà bianco su uno sfondo del colore del filtro centrale.

Un complesso condensatore del genere fu costruito dalla casa Reichert (“Optocolor-kondensator”) e dalla Zeiss Jena (“Mikropoly-chromar”), quest’ultimo visibile in fig. 14, in cui si vedono un diaframma ad iride per regolare l’ampiezza dell’anello esterno, un diaframma per il filtro centrale, un terzo per regolare l’intensità di quest’ultimo, ecc.

Fig. 14  
(dal catalogo Zeiss O.XI.33)

Un apparecchio simile può essere però costruito con mezzi semplici partendo da fogli colorati (per es. filtri fotografici in gelatina o semplici fogli di plastica trasparente, ritagliati in cerchi od anelli con apposite fustelle ed incollati su un dischetto di plastica rigida trasparente.

Meglio ancora se si possono recuperare dei dischi in vetro. Un esempio di realizzazioni del genere in fig. 15.

Negli esempi 1 e 2 un disco più piccolo è stato incollato al centro di un disco più grande, adatto al porta-filtri del condensatore; sono stati scelti i vetri in modo tale che la trasparenza del disco centrale sia ragionevolmente attenuata dal disco più grande.

(Fig. 1)

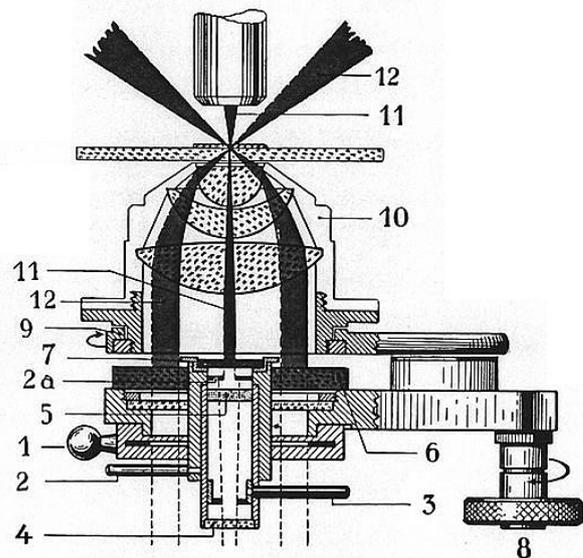
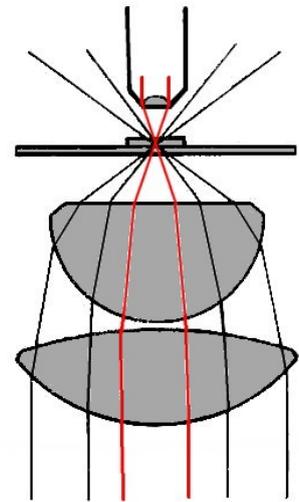


Fig. 15

In 4 un caso ancora più semplice: un disco rosso cupo (vetro RG 5 della Schott) incollato su un disco di vetro normale: l'oggetto apparirà bianco su fondo rosso.

In 3, invece, una raffinatezza: un disco di vetro Schott BG 12 incastonato in un anello in vetro OG1.

È ottima cosa incollare sul sistema un anello in cartoncino nero, della larghezza di 2 - 4 mm, in modo da creare una zona opaca concentrica al confine fra i due filtri.

Se poi ci si vuole sbizzarrire, si possono tagliare due anelli di diverso colore in 4 segmenti ed incollarne due d'un colore e due dell'altro in posizione opposta, in modo da ricavarne un anello a quadranti e dividere la zona esterna del filtro in quattro settori (fig. 16).

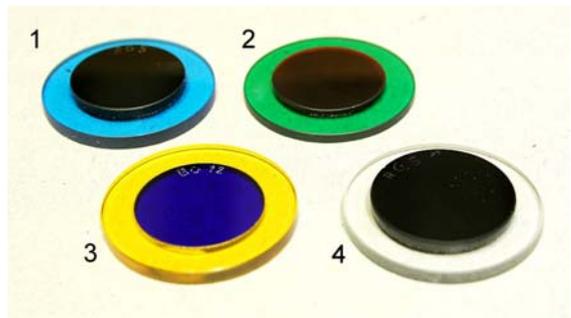


Fig. 16

Questa soluzione può produrre immagini con colori opposti sui due lati dell'oggetto.

La scelta dei colori possibili, del diametro dei filtri, della loro trasparenza, ecc. è sconfinata e non si possono dare regole generali.

Del resto, molto dipende dall'apertura del condensatore di cui si dispone, dalle sue aberrazioni, e dell'obbiettivo che s'intende usare.

Valgono i soliti limiti: con un condensatore a secco, difficilmente si potranno usare obbiettivi di apertura superiore a 0,6; meglio usare il condensatore, anche di tipo normale, in immersione.

Se poi il condensatore è affetto da sferica e/o cromatica, le cose s'ingarbugliano. Ma vale la pena di provare.

Un'altra possibilità è quella di dividere il nostro dischetto trasparente in due metà, rinunciando a qualunque residuo di fondo scuro: è ovvio che ogni oggetto tenderà a presentarsi bicolore, come se fosse illuminato da parti opposte da due diverse lampade, e magari con una certa apparenza di rilievo.

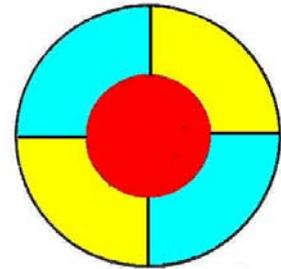
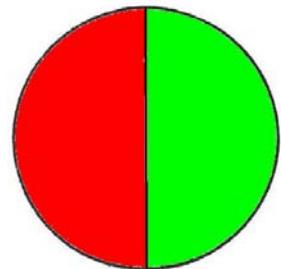


Fig. 17

Quest'ultima tecnica ha almeno un vantaggio: è indipendente dal modello e dall'apertura del condensatore e dell'obbiettivo, a secco o ad immersione. Si potrebbe chiamare "illuminazione bi-obliqua".



Il CONTRASTO a MODULAZIONE D'AMPIEZZA ("Contrasto d'ampiezza" o "Hoffman modulation contrast" (HMC) o "Amplitude contrast" o "Modulation contrast microscopy" = MCM)

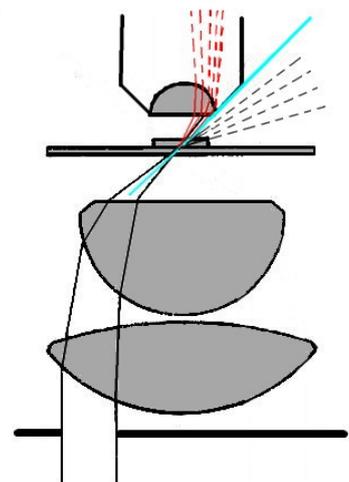
(Fig. 5, modif.)

Sempre al seguito dei vari metodi di illuminazione, con riferimento particolare all'illuminazione obliqua unilaterale, non poteva mancare qualche ulteriore sviluppo.

Ci hanno pensato R. Hoffman e Gross (1975), e la Zeiss Ober. l'ha ribattezzato "Varel".

Partiamo dalla fig. 5: illuminazione unilaterale, certo, ma con apertura al limite di quella dell'obbiettivo (linea verde). A parte l'effetto ovvio dell'ombreggiatura, va notato che l'onda diffratta dall'oggetto viene accolta dall'obbiettivo solo, ed in parte, verso l'interno (linee rosse nella figura), mentre va totalmente perduta se diretta verso l'esterno (linee nere tratteggiate).

Per realizzare questo schema basterebbe allora un diaframma decentrato, di qualunque forma, come in fig. 3.



Ma gli autori citati hanno voluto complicare lo schema descritto, anche se il concetto base è semplice.

Per meglio capire, ricordiamo i primi lavori sul “coltello di J. B. Foucault” (1859), che miravano al controllo delle lenti (fig. 18). Si tratta anche lì di un’illuminazione obliqua che presenta come ombreggiature tutte le irregolarità della lente o di un oggetto posto presso di essa. Se usata per il controllo dei vetri ottici o altri materiali trasparenti (Toepler), ogni irregolarità nell’indice del materiale appare come una o più striature, più o meno contrastate. Da qui il nome tedesco del metodo: “schlieren” = striature.

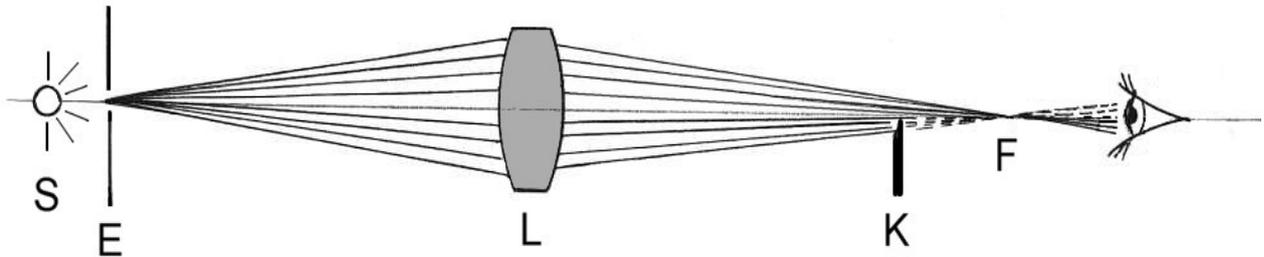
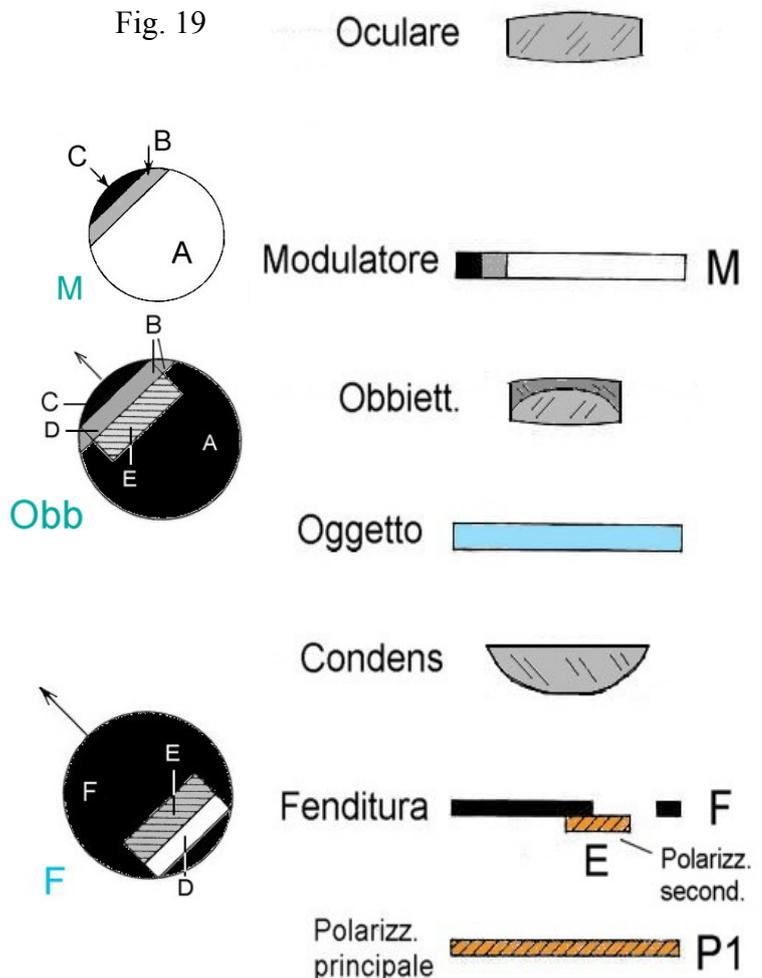


Fig. 18 – Nello schema di principio, una fessura (E) illuminata da dietro fornisce una sorgente quasi coerente, di cui una lente convergente (L) produce un’immagine reale in F. Presso F uno schermo opaco ad orlo diritto e parallelo alla fessura E intercetta una parte del fascio. Guardando verso la lente e muovendo lateralmente lo schermo K, la lente apparirà divisa in due parti, una chiara ed una scura, separate da una linea diritta. Ogni imperfezione o aberrazione della lente renderà la linea ricurva o sostituita da macchie di varia forma. Il metodo è tanto più sensibile quanto più K è vicino ad F: Se K sta alla destra di F invece che a sinistra, le regioni chiare e scure della lente s’invertono. Se K sta nello stesso piano di F, l’immagine di una lente perfetta cambia bruscamente da tutta chiara a tutta scura. Questa tecnica, con qualche variante, ha larghe applicazioni in molti campi della scienza e della tecnica.

La funzione esercitata dal “coltello” di Foucault, cioè dallo spigolo diritto che intercetta il fascio nel punto di convergenza, viene esercitata nel contrasto d’ampiezza dal margine della pupilla d’uscita dell’obbiettivo che oblitera il fascio da una parte sola. Infatti, ponendo una fenditura sotto al condensatore, una sua immagine si proietta (all’incirca) nella pupilla d’uscita dell’obbiettivo, ed è qui che il bordo della pupilla, di solito la montatura di una delle lenti, funge da schermo come K in fig. 18. Ponendo l’occhio sopra l’oculare, dove si trova un’immagine della pupilla d’obbiettivo, dal punto di vista dello schema di base è come porlo a destra di F nella fig. 18. Ne consegue un effetto di rilievo, con le ombre allungate perpendicolarmente al bordo della fenditura.

Fig. 19



In pratica, il contrasto d'ampiezza si realizza ponendo un "modulatore" opaco (F in fig. 19) sotto al condensatore; tale modulatore contiene una fessura trasparente parzialmente occupata da un filtro polarizzante (E nella figura a sinistra in basso di fig. 19).

Sopra l'obbiettivo viene posto un altro modulatore (M) contenente un segmento opaco (C, trasmissione circa 1%) del tutto periferico ed un altro segmento contiguo semitrasparente (B in figura,  $T = 15\%$  circa). Il tutto su supporto trasparente.

Nella pupilla d'uscita dell'obbiettivo (Obb) si sovrappongono così la porzione trasparente del modulatore inferiore (D) con la porzione semitrasparente del modulatore superiore (B), la porzione polarizzante del modulatore inferiore (E) con la porzione trasparente di quello superiore (A). Ma viene aggiunto anche un polarizzatore che occupa tutta la pupilla del condensatore (P1) e che può ruotare attorno all'asse. Questa rotazione rende più o meno "brillante" il filtro E presente su F; in questo modo si varia il rapporto fra la luminosità della regione D della pupilla d'obbiettivo e quella della regione contigua E.

Di solito, il modulatore inferiore può essere spostato in direzione perpendicolare alla fessura e ciò permette di variare l'intensità del fascio illuminante che traversa l'obbiettivo.

Il contrasto d'ampiezza presenta dunque varie possibilità di regolazione.

Ovviamente, siamo in condizioni di illuminazione obliqua, quindi fortemente asimmetrica, e si presenta il solito effetto di ombreggiatura, col contrasto maggiore per le strutture allungate parallelamente alle fenditure. L'immagine dell'oggetto è formata dall'onda diffratta da un lato solo del fascio illuminante poiché quest'ultimo si trova ai margini della pupilla d'obbiettivo. Il meccanismo di base è dunque ben diverso da quello del DIC, ma i risultati si somigliano molto.

Si noti che, togliendo il modulatore inferiore, lo strumento diviene (quasi) un normale microscopio in fondo chiaro. Inoltre l'oggetto non si trova in mezzo ai due polarizzatori e la sua eventuale birifrangenza non disturba. Questo rende possibile l'osservazione di oggetti contenuti in micro-cuvette o recipienti in materia plastica, generalmente birifrangenti.

Rispetto ad altre tecniche, il contrasto d'ampiezza è forse meno sensibile, ma ha il vantaggio che gli oggetti fuori fuoco non disturbano troppo e quindi si opera una specie di "sezione ottica" dell'oggetto. Per oggetti estesi, la resa del rilievo è migliore.

Una variante, dovuta a G. Ellis (1978), è chiamata "Single Sideband Edge Enhancement" (SSEE). I soliti paroloni.

Un'altra variante, dovuta a M. Pluta, e costruita per qualche tempo dalla casa PZO, si basa sullo stesso principio del sistema di Hoffman: attenuare l'onda diretta (il fascio illuminante) senza alterarne la fase e senza disturbare troppo l'onda diffratta dall'oggetto. Senonché il Pluta ha rinunciato all'illuminazione obliqua (ed all'effetto rilievo) ed ha dato ai due modulatori la stessa forma di quelli del contrasto di fase: un diaframma anulare nel condensatore ed un anello semitrasparente nell'obbiettivo. Tale anello non è sfasante ma diffondente, come quello previsto dal sistema Anoptral di Wilska (vedi oltre). L'oggetto appare brillante su un fondo piuttosto scuro, e questo è ovvio poiché ci si avvicina al "fondo scuro centrale" sopra descritto. La presenza dell'anello scuro nell'obbiettivo produce un lieve alone attorno ad ogni oggetto, simile a quello del contrasto di fase. La trasparenza di tale anello in genere si aggira su 20%.

La DISPERSIONE COLORATA (o "Immersione colorata" o "Dispersion staining" o "Optical staining") (Vedi:G.G. Crossmon e W.C. McCrone in Bibliografia)

Si tratta di una tecnica che produce immagini colorate di particelle trasparenti, ed i colori sono legati alla differenza di indice e di dispersione esistente fra un granulo ed il liquido in cui esso è immerso.

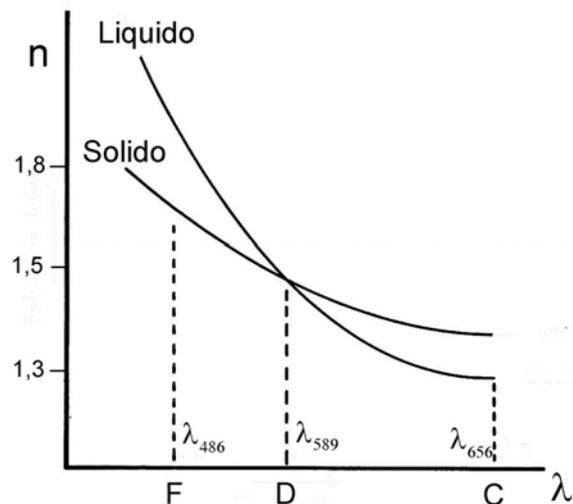
Questa tecnica è dedicata essenzialmente alla misura dell'indice di rifrazione di materiali in polvere, non a normali osservazioni, se non altro perché richiede di solito una forte chiusura del diaframma d'apertura, e pertanto non andrebbe inclusa nelle tecniche di contrasto.

Per questo ci limitiamo ad un cenno.

Fig. 20 – In ordinata, l'indice di rifrazione.

Il principio del metodo sta nella “dispersione”, la variazione, dell'indice di rifrazione al variare della lunghezza d'onda. Quasi sempre, l'indice è maggiore per le lunghezze d'onda minori. Per i liquidi, la dispersione è generalmente assai maggiore che nei solidi.

Nel semplice schema della fig. 20 vediamo un esempio ipotetico in cui un granello solido immerso in un certo liquido mostra lo stesso indice del liquido per una lunghezza d'onda intermedia, per es. la riga D del sodio.



In queste condizioni, se il granulo è incolore, come avviene in genere per i granuli minerali di piccole dimensioni, il granulo è invisibile poiché non produce alcuna onda diffratta. E ciò vale anche se l'osservazione avviene in fondo scuro o contrasto di fase.

Se però si illumina l'oggetto con radiazioni monocromatiche diverse, agli estremi dello spettro ottico, la differenza di indice può diventare forte e l'oggetto appare più o meno contrastato, se non altro per la formazione della ben nota “linea di Becke”.

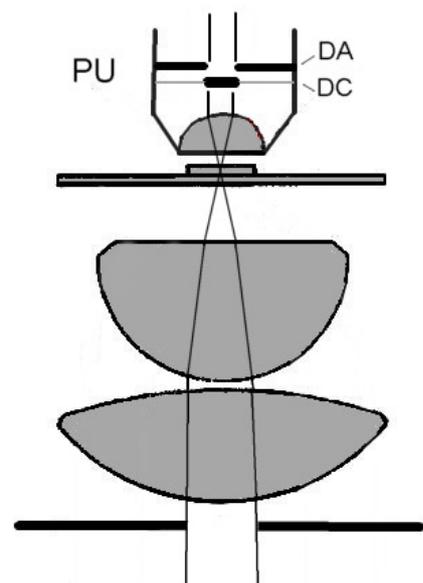
Ma, attenzione: la differenza d'indice cambia di segno al variare di  $\lambda$ . Nel caso nostro, nella regione del blu (riga F, ad es.) ed in quella del rosso (riga C, ad es.) la differenza d'indice cambia di segno. Se illuminiamo l'oggetto con luce bianca, verranno diffratte le radiazioni più corte e quelle più lunghe e l'oggetto apparirà con un alone blu e rosso, complessivamente di color magenta.

Se la coincidenza di indice avvenisse nella regione del blu (l'indice del granulo è maggiore), verrebbe diffratta maggiormente la radiazione dal giallo al rosso e l'oggetto apparirebbe arancione; se la coincidenza avvenisse verso il rosso, l'oggetto apparirebbe bluastrò.

Se poi si illumina l'oggetto in fondo scuro o contrasto di fase negativo, il colore degli aloni risalta meglio sul fondo scuro e la sensibilità del metodo aumenta. Con un po' d'esperienza, è possibile apprezzare l'indice, e quindi identificare, numerose specie chimiche e mineralogiche, anche se mescolate fra loro.

Fig. 21

Su questa strada sono stati compiuti numerosi lavori, utili all'identificazione di granuli minerali in miscele di ogni genere, polveri, ceneri e simili. Ma, soprattutto per opera dei McCrone (vedi la voce bibliografica, contenente a sua volta ampia bibliografia), il metodo è stato semplificato evitando l'uso del fondo scuro o del contrasto di fase. Nasce così la nuova versione della “dispersion staining”.



Il principio è semplice. Si parte da un obiettivo medio-debole (di solito un 10:1) e da un normale condensatore di Abbe. Nel condensatore vi è un diaframma molto chiuso, corrispondente ad un'apertura di 0,05 – 0,1; può essere il normale diaframma d'apertura ad iride. Nella pupilla d'uscita dell'obiettivo (PU in fig. 21) si pone un diaframma anulare (uno schermo con un foro centrale: DA in figura) che corrisponde ad un valore d'apertura simile a quella del condensatore (diaframmato come si è detto), oppure un diaframma “centrale”, cioè un dischetto opaco centrato, sempre per un valore simile d'apertura (DC in figura).

Nel primo caso (DA) è come usare un obiettivo a modesta apertura (3:1 o 4:1), accoppiato

con un oculare forte; nel secondo caso (DC = “diaframma centrale”) si tratta di un fondo scuro simile a quello esaminato sopra, che abbiamo sempre chiamato “centrale”, con la differenza che lo schermo opaco non è anulare ma discoidale.

Nulla vieta di decentrare leggermente uno o l'altro dei due schermi, in modo da ottenere qualche effetto di ombreggiatura, ma normalmente si controlla con un microscopio ausiliario che il tutto sia ben centrato.

Nel caso “DA”, l'immagine dell'oggetto è data quasi solo dall'onda diretta, visto che l'onda diffratta dall'oggetto è quasi del tutto obliterata da DA; l'oggetto appare con bordi scuri su fondo chiaro. Nel caso “DC”, invece, l'onda diretta è totalmente obliterata dal dischetto opaco centrale, e l'immagine dell'oggetto è data solo dalla luce da esso diffratta. Sarà un'immagine chiara su fondo nero.

Lo scopo di questa tecnica, l'abbiamo detto, è quello di apprezzare l'indice di granuli misti sospesi in un liquido, di cui si conosce l'indice. L'apprezzamento viene dai colori con cui si presenta l'orlo dei granuli. Si suppone che sia nota la dispersione e l'indice del liquido in cui sono immersi i granuli, ed è ovvio che si sceglieranno liquidi speciali a forte dispersione.

Sono state pubblicate tabelle per facilitare il riconoscimento dei principali minerali, fibre tessili, ecc. Una casa americana (Cargille) è specializzata in liquidi con grande varietà di proprietà ottiche

Dato l'uso di aperture molto piccole e l'eguaglianza, sia pure condizionata, dell'indice fra granulo e liquido, questa tecnica non è certo adatta a forti ingrandimenti né consente elevate risoluzioni. Nulla vieta di usare questa tecnica con normali sistemi a contrasto di fase negativo (negativo, al fine di rendere più evidenti su fondo scuro gli aloni colorati attorno ai granuli), ma i colori saranno diversi, a parità di ogni altra condizione. Si potranno però osservare grani più piccoli, non avendo il limite dell'apertura.

Da notare che questa tecnica si può realizzare “in casa” con mezzi semplici, introducendo nell'obbiettivo una rondella forata<sup>4</sup>, anche semplicemente poggiata sulla lente emergente, oppure depositandovi una goccia d'inchiostro di China, s'intende centrata.

## II CONTRASTO di FASE

Per quanto riguarda il contrasto di fase, una descrizione del principio di funzionamento è superflua, poiché la si trova in molti testi, anche in questo stesso sito (vedi l'art. n° 25: “La formazione dell'alone nel contrasto di fase”)<sup>5</sup>.

Di solito si fa la distinzione fra “oggetti d'ampiezza”, più o meno opachi, ma senza differenze di cammino ottico, ed “oggetti di fase”, trasparenti, ma con cammino ottico diverso dal mezzo circostante; poi si allegano alcune foto che permettono un confronto fra fondo chiaro e contrasto di fase, si accenna al fenomeno dell'alone, alla possibilità del contrasto “positivo” e “negativo”, e tutto finisce lì.

Vale la pena però di sottolineare che il risultato di questa tecnica, vale a dire l'alterazione dell'intensità nell'immagine dell'oggetto e del fondo, e quindi il contrasto nell'immagine finale, dipende da molti fattori. Per comprendere i vantaggi ed i limiti di questa tecnica occorre andare a fondo.

Una seria trattazione di questo argomento si trova nel prezioso testo di H. Beyer e H. Riesenbergh – Handbuch der Mikroskopie – Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 (479 pagg., ricchissima bibliografia), purtroppo in tedesco. Nel capitolo 6.1.2.3 di quel testo si cita un'equazione (6.1a) secondo cui la luminosità dell'oggetto appare dipendere dalla trasparenza

---

<sup>4</sup> Per un obbiettivo 10:1 il foro può avere un diametro di circa 3 mm.

<sup>5</sup> Facciamo solo notare che, nella rappresentazione vettoriale delle onde diretta e diffratta, si indica spesso il ritardo di fase con una rotazione del vettore in senso orario, mentre altri autori, specialmente quelli di lingua tedesca, usano il contrario.

dell'oggetto ( $p$ ), da quella dell'anello di fase ( $t$ ), dallo sfasamento operato dall'oggetto ( $\varphi$ )<sup>6</sup> e da quello dell'anello di fase ( $\psi$ )<sup>7</sup>. Nel caso del contrasto di fase "positivo" (il più diffuso) e con oggetti di fase "puri" (trasparenti) e molto piccoli, quella formula viene ripresentata in forma semplificata ed approssimata (6.1c), in cui l'intensità dell'oggetto ( $I_o$ ) è pari a:

$$I_o \approx t^2 + \varphi (\varphi - 2t)$$

dunque dipendente solo dalla trasparenza dell'anello di fase ( $t$ ) e dallo sfasamento operato dall'oggetto ( $\varphi$ ), in una relazione non lineare.

Ovviamente, l'intensità del "fondo" dell'immagine ( $I_u$ ) sarà il quadrato della trasparenza dell'anello di fase ( $t$ ):

$$I_u = t^2$$

Ma è bene rappresentare queste relazioni con un grafico generale che metta in evidenza il fenomeno dell'"inversione del contrasto" e l'andamento del contrasto medesimo al variare di  $\varphi$  nei due tipi fondamentali di contrasto di fase ("positivo" e "negativo").

Si veda la seguente figura in cui l'ordinata indica il contrasto nell'immagine ( $K$ ) e l'ascissa lo sfasamento operato dall'oggetto ( $\varphi$ ). Occorre chiarire che  $K$  corrisponde alla classica formula:

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

in cui  $I_{\max}$  indica nel caso nostro l'intensità del fondo-immagine ed  $I_{\min}$  l'intensità nell'immagine dell'oggetto.

Il contrasto sarà positivo quando l'oggetto è più scuro del fondo e può oscillare fra 0 ed 1 (sarà  $K = 1$  quando l'oggetto è completamente nero);  $K$  sarà negativo quando l'oggetto è più chiaro del fondo e sarà  $K = -1$  quando il fondo è nero (è questa la condizione limite, presente nel "campo scuro" ideale).

Ciò premesso vediamo nella fig. 22 due curve a tratto unito, valide per il contrasto di fase positivo con trasparenza dell'anello di fase pari a circa 0,32 ( $t^2 = 0,1$  - contrasto "duro") oppure 0,5 ( $t^2 = 0,25$  - contrasto "molle"). Le due curve a tratteggio valgono per il contrasto di fase negativo, per gli stessi valori di trasparenza dell'anello di fase.

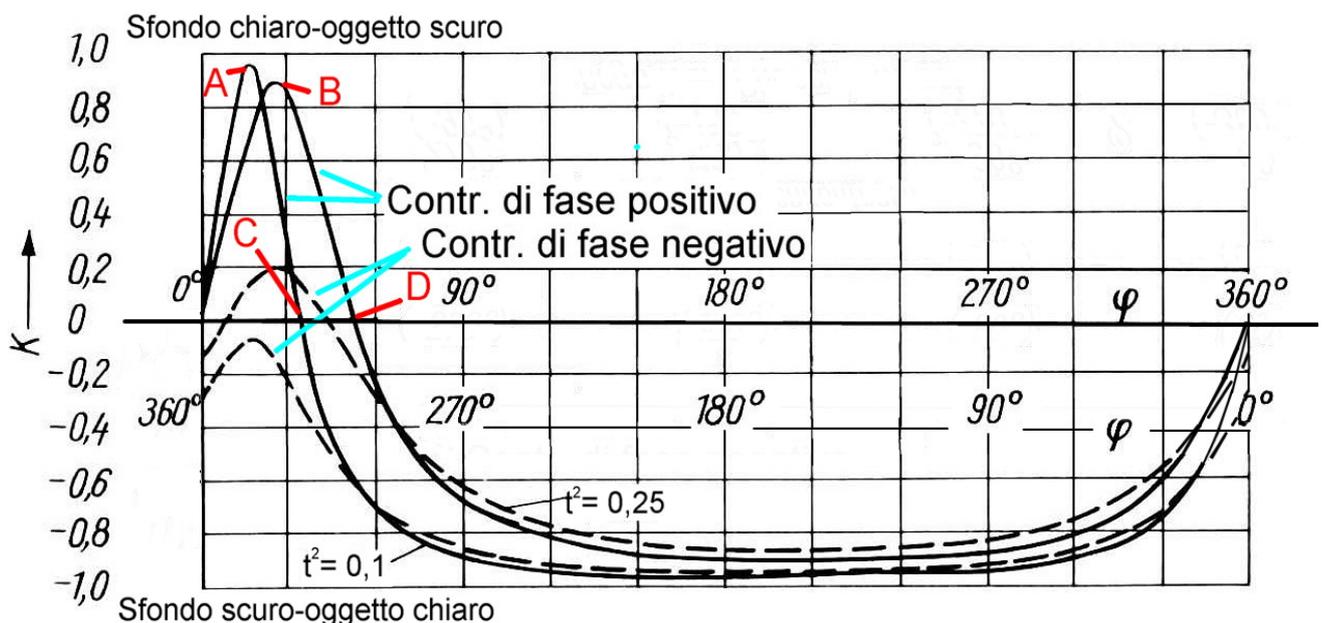


Fig. 22 - Variazione del contrasto nell'immagine microscopica in funzione del cammino ottico dell'oggetto ( $\varphi$ ) e della trasparenza dell'anello di fase ( $t$ ).

(da: H. Beyer e H. Riesenberg - Handbuch der Mikroskopie - Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 (fig. 6.15, modificata)).

<sup>6</sup> lettera greca minuscola "phi" (pron. "fi"). La differenza di fase operata dall'oggetto rispetto al mezzo circostante dipende dalla differenza di cammino ottico, che è il prodotto dello spessore dell'oggetto ( $d$ ) per la differenza di indice di rifrazione ( $\Delta n$  = differenza di indice fra l'oggetto ed il mezzo):  $\varphi = d \cdot \Delta n / \lambda$ .

<sup>7</sup> lettera greca minuscola "psi" (pron. "psi").

Va anche notato che il senso delle ascisse è stato invertito per i due tipi di contrasto di fase in modo da facilitare il confronto fra di essi riguardo all'andamento delle curve di contrasto; esaminando il grafico appare evidente che l'andamento delle due coppie di curve è comunque diverso, per cui non è esatto dire che il contrasto negativo è il “negativo fotografico” del contrasto positivo.

Ecco dunque il significato pratico della curva della figura.

Si nota subito che il contrasto è maggiore in ogni caso con una minore trasparenza dell'anello di fase (curve inferiori), ed è anche su questo che ogni costruttore cerca il miglior compromesso fra luminosità totale e contrasto, anche in vista di particolari categorie di oggetti: il contrasto aumenta quando l'immagine è più scura.

Ora veniamo al contrasto positivo (curve a linea continua). Si può notare che, via via che l'oggetto si fa più grosso o più rifrangente (sfasamento  $\varphi$  crescente, serie superiore di valori, con  $0^\circ$  a sinistra), il contrasto varia da quasi 0 a quasi + 1. Il massimo valore si verifica nei punti **A** o **B**.

Questi punti di massimo contrasto (oggetto più scuro in mezzo ad un campo chiaro) si ottengono con valori di sfasamento operato dall'oggetto ( $\varphi$ ) pari a circa  $18^\circ$  (per  $t^2 = 0,1$ , contrasto “duro”) o  $27^\circ$  (per  $t^2 = 0,25$ , contrasto “molle”). Questi valori di sfasamento sono molto piccoli; in pratica, quelli forniti da un batterio o una piccola cellula.

Da questa prima considerazione si capisce perché tutti i manuali consigliano di usare il contrasto di fase solo per oggetti piccoli, dispersi in un campo libero da altri oggetti, ed inoltre perché, per oggetti piccoli, è più adatto il contrasto “duro”, anche se l'immagine è meno luminosa.

Ma proseguiamo.

Si vede dal grafico che, oltre i punti **A** o **B**, cioè con sfasamenti maggiori (oggetti più grossi o più rifrangenti), il contrasto diminuisce fino ad azzerarsi in corrispondenza dei punti **C** o **D**. In pratica, questa condizione di “contrasto zero” difficilmente viene percepita poiché il preparato contiene sempre oggetti o parti di oggetti che si trovano fuori della zona di azzeramento e pertanto qualcosa si vede sempre.

Ma se l'oggetto è più “sfasante”, più grosso o più rifrangente, cosa accade? Chi ha un po' d'esperienza lo sa: il caos. Lo stesso oggetto può apparire in contrasto positivo sui bordi e con contrasto invertito (più chiaro del fondo) al centro. In breve: il contrasto s'inverte per un'ampia gamma di valori di sfasamento, fra circa  $50^\circ$  e  $350^\circ$  (oggetti molto rifrangenti) e raggiunge il massimo valore negativo (oggetto più chiaro del fondo) per  $\varphi = 198^\circ$  ( $t^2 = 0,1$ ) o  $207^\circ$  (per  $t^2 = 0,25$ ).

Se  $\varphi$  raggiunge  $360^\circ$  si ritorna daccapo (a parte la dispersione, uno sfasamento di un multiplo intero di  $360^\circ$  dà lo stesso effetto di uno pari a  $0^\circ$ ).

A maggior ragione si devono quindi osservare con questa tecnica oggetti sottili, piccoli e ben separati fra loro. Occorre evitare di varcare la soglia dell'**inversione del contrasto** (punti **C** o **D** del grafico), sia per evitare la sovrapposizione di elementi in contrasto normale e invertito, sia per non ingarbugliare l'interpretazione dell'immagine.

Se ora osserviamo le curve a tratteggio della figura precedente, relative al contrasto “negativo”, occorre partire dal lato destro del grafico, dove si trova il valore di  $\varphi = 0^\circ$ . Qui si vede che la curva, andando verso sinistra (valori crescenti di sfasamento operato dall'oggetto: oggetti sempre più rifrangenti), indica un contrasto sempre forte (negativo = immagine dell'oggetto più chiara del fondo) fino a valori di sfasamento di oltre  $270^\circ$ . Anche per oggetti poco rifrangenti ( $\varphi$  vicino a 0) il contrasto è sempre sensibile, intorno a 0,2.

Ma ecco la differenza fondamentale: col contrasto di fase “negativo” si ha ancora l'inversione del contrasto, ma solo con anelli di fase molto trasparenti ( $t^2 = 0,25$ ) e per forti valori di rifrangenza dell'oggetto ( $\varphi > 315^\circ$  circa).

Questa quasi assenza di inversione e la costanza del contrasto per amplissimi valori di rifrangenza dell'oggetto dovrebbe far preferire sempre il contrasto di fase negativo. Se spesso si

preferisce quello positivo è solo perché l'immagine da esso fornita è più "fisiologica", nel senso che un oggetto più rifrangente del mezzo che lo circonda appare più scuro.

Ma il contrasto positivo varia fortemente a seconda delle proprietà ottiche dell'oggetto e l'inversione del contrasto è sempre in agguato complicando l'interpretazione dell'immagine.

Ciò non toglie che il contrasto di fase negativo sia stato adottato da molti costruttori: Leitz, PZO (obiettivi marcati "A" = "Ampli"), Reichert, Zeiss, ecc.

Fig. 23 – Immagini originali pubblicate da un noto autore per dimostrare la differenza fra contrasto di fase positivo e negativo.

Sempre dall'esame del grafico di cui sopra, si può ancora vedere che, per oggetti piuttosto rifrangenti (sfasamento  $\varphi$  compreso fra circa  $60^\circ$  e  $300^\circ$ ), il contrasto è sempre forte e negativo (oggetto più chiaro del fondo), sia per il contrasto di fase positivo (curve a linea intera) sia per quello negativo (curve tratteggiate). Tali oggetti quindi appariranno sempre chiari rispetto al fondo immagine. È quanto l'esperienza dimostra.

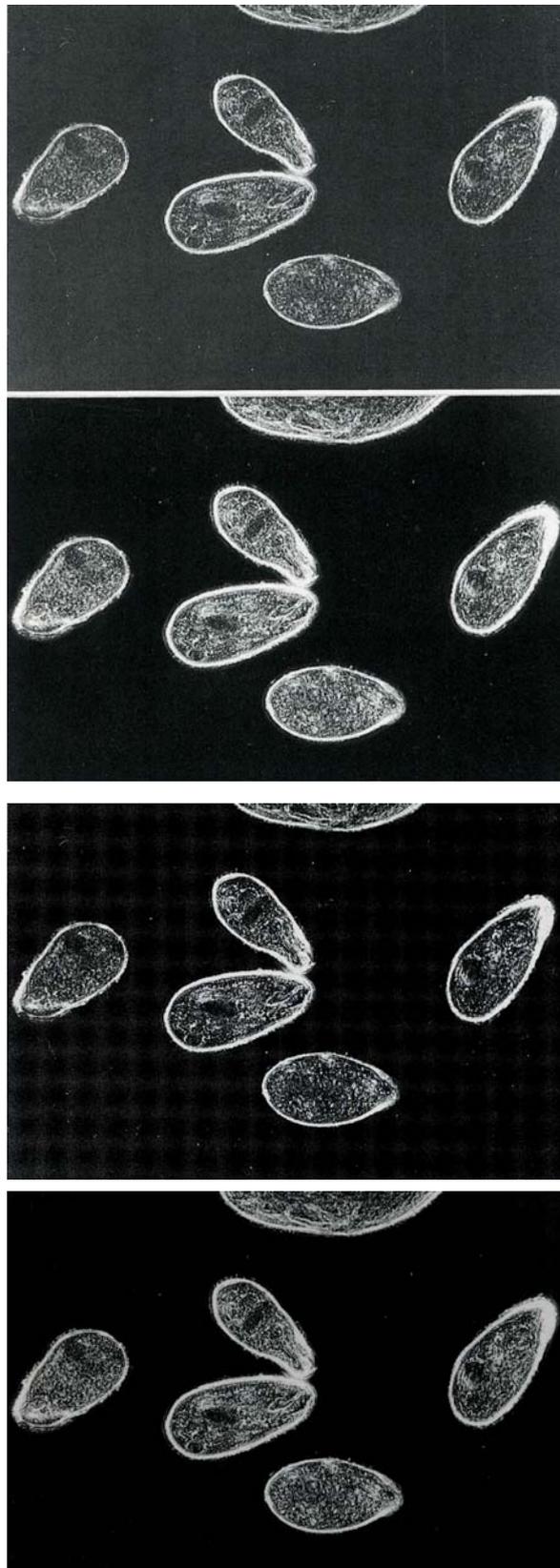


Fig. 24 – Le stesse figure, dopo aver alterato un poco il contrasto delle immagini originali.

Per renderci conto di questo fenomeno, e dimostrare quanto poco esso sia conosciuto, basta aprire un testo ben noto, che non nominiamo per pudore. In esso si trova la figura 23, la quale confronta l'immagine di un ciliato parassita intestinale in contrasto di fase positivo (in alto) e negativo (in basso). Così, a occhio, le due immagini sembrano differire di poco. Se poi le si riportano modificando leggermente il contrasto (fig. 24), è difficile distinguerle e le parti più rifrangenti del ciliato (la cuticola, ad es.) appaiono sempre più chiare del fondo. Occorreva eseguire il confronto positivo-negativo con un oggetto poco rifrangente, con uno sfasamento non superiore a  $50^\circ$ , corrispondente alla prima parte delle curve di fig. 22.

Un esempio di cattiva divulgazione.

In base ad altre considerazioni teoriche, si può anche dimostrare che il contrasto, a parità di altre condizioni, è più forte quando l'anello di fase presenta una minor superficie, ovvero è più sottile e di minor diametro. Naturalmente, un anello di fase di minor superficie produrrà un'immagine meno luminosa.

Rimane comunque l'esigenza costruttiva e commerciale di unificare il più possibile i vari dispositivi. Pertanto la maggior parte dei costruttori sceglie questa impostazione:

- strato sfasante nell'obiettivo a forma di anello (in passato sono state scelte forme diverse: discoidale, a striscia<sup>8</sup>, a croce, ecc.); si può parlare quindi di **anello di fase**; questa scelta evita di dare al contrasto una direzione preferenziale, come avviene, per es., nel DIC;
- contrasto “positivo” (sfasamento dell'anello pari a  $-90^\circ$ );
- trasparenza dell'anello pari a 20 – 40% (maggiore trasparenza porta a minore contrasto);
- diametro dell'anello pari alla metà o due terzi del diametro della pupilla d'uscita dell'obiettivo (maggiore diametro porta ancora a minore contrasto);
- larghezza dell'anello pari a 1/15 – 1/30 del diametro della medesima pupilla.

Se queste sono le caratteristiche di un normale sistema di fase, si può accettare la seguente regola pratica: risulta ancora percepibile un oggetto del diametro di  $1\ \mu$  (per es. un batterio) dotato di un indice di rifrazione che differisce da quello del mezzo che lo circonda per due unità sulla terza cifra decimale, cioè per  $\pm 0,002$ . Se non fosse per la luce diffusa (diffusa direttamente dall'anello di fase o da esso riflessa indietro e di nuovo riflessa dalle superfici delle lenti), la sensibilità del contrasto di fase potrebbe essere dieci volte maggiore.

I parametri sopra elencati influiscono anche sulle dimensioni e sul contrasto del famoso alone che circonda gli oggetti osservati in contrasto di fase: un difetto ben noto.

Il contrasto dell'alone è maggiore per gli oggetti più grandi, per gli anelli di fase di maggiore larghezza (non di maggiore diametro) e di minore trasparenza, e per gli obiettivi di minore focale, oltre a dipendere dalla lunghezza d'onda.

Di solito si dice, in coerenza con la regola appena citata, che l'alone dipende dal fatto che l'onda diffratta dall'oggetto viene parzialmente intercettata dall'anello di fase e pertanto l'alone è più forte per gli oggetti più grandi, per i quali l'onda diffratta ha minore apertura. Con gli oggetti più piccoli, l'alone dovrebbe scomparire.

Ma sembra che l'alone si veda benissimo anche con batteri e microrganismi assai minuti.

Pertanto deve esserci qualche altro fenomeno, più generale. Un cenno su questo problema si troverà nell'art. n° 25 (“La formazione dell'alone nel contrasto di fase”), in questo stesso sito.

Oltre all'inconveniente dell'alone, il contrasto di fase ne mostra un altro: tutti gli oggetti non a fuoco producono immagini sfumate ma contrastate che si sovrappongono all'immagine a fuoco e ne ostacolano la lettura. Il rimedio è sempre quello: pochi oggetti, piccoli e ben dispersi in un campo vuoto. Questo difetto è ancora più forte nel campo scuro (un oggetto sfocato produce un alone chiaro che riduce lo “scuro” del fondo e nasconde i più piccoli oggetti a fuoco). In fondo chiaro, in contrasto d'ampiezza ed in tutte le tecniche che presentano il fondo immagine chiaro, gli oggetti sfocati alterano poco la situazione in quanto producono solo una diminuzione della luminosità del fondo.

Per quanto riguarda il potere risolutivo di un obiettivo di fase, ricordiamo quanto ben noto: il disco di Airy nella centrica da esso prodotta risulta leggermente più piccolo, quindi in grado di assicurare una miglior risoluzione, però gli anelli della centrica sono più intensi, per cui, nel caso di oggetti poco contrastati, l'aumento di risoluzione può venire neutralizzato dalla perdita di contrasto.

Se poi quell'obiettivo viene usato in fondo chiaro, senza diaframma anulare, i vantaggi del

---

<sup>8</sup> Vedi: C.R. Burch e J.F. P. Stock – Phase contrast microscopy – L. Sci. Instrum., **19**, 71 (1942).

contrasto di fase non si presentano e rimane solo la perdita di contrasto. Esclusivamente le considerazioni economiche giustificano l'uso di obiettivi di fase in fondo chiaro.

Lo “shade off” o “zone-of-action effect”

È bene ricordare anche un caso particolare nel comportamento del contrasto di fase.

S'immagini un oggetto “di fase”, trasparente, di estensione assai maggiore della larghezza dell'alone (una grande cellula appiattita, una laminetta minerale, ecc.). Sappiamo che il contrasto di fase si basa sull'onda diffratta dall'oggetto. Ma la diffrazione nasce da un qualunque gradiente di cammino ottico, quindi si verifica ai bordi dell'oggetto, non all'interno di un oggetto omogeneo di estensione relativamente grande. Ne consegue che, all'interno dell'immagine di un oggetto di fase esteso, non vi sono variazioni di cammino ottico, né diffrazione, né contrasto di fase. Quell'oggetto sarà contrastato lungo i suoi margini, ma verso il centro ritornerà gradatamente ad una luminosità uguale a quella del mezzo circostante. Il contrasto di fase vale solo alla periferia degli oggetti. E ciò rimane valido anche se quell'oggetto è molto rifrangente o di forte spessore: la diffrazione, che è alla base del contrasto di fase, nasce solo da variazioni del cammino ottico.

Questo fenomeno è comune ad altre tecniche che si basano sui gradienti di cammino ottico (contrasto d'ampiezza, DIC, ecc.).

Tanto per dare un'occhiata alla storia, vale la pena di ricordare che già nel corso dell'ultima (per ora) guerra mondiale, presso la Zeiss di Jena, K. Michel aveva prodotto un filmato in accelerato dell'intero ciclo della mitosi (divisione cellulare) proprio a mezzo del contrasto di fase (K. Michel, Zeiss-Nachr. 4 (1943) S. 236). Questo filmato, divenuto presto famoso, era basato sulla spermatogenesi nei testicoli della cavalletta *Psophus stridulus*. Oltre a diffondere la conoscenza del contrasto di fase, il filmato dimostrò le possibilità della micro-cinematografia. I primi strumenti commerciali erano stati prodotti a Jena un anno prima, nel 1942.

Molti altri autori, da allora, si sono occupati dell'argomento: Barer, Beyer, Buchsbaum, Nomarski, Osterberg, ecc. Nel testo di H. Beyer e H. Riesenberg (Handbuch der Mikroskopie – Veb Verlag Technik, Berlin, 1988) esiste una ricchissima bibliografia in merito. Un testo fondamentale sul contrasto di fase è: A.H. Bennett, H. Jupnik, H. Osterberg e O.W. Richards – Phase microscopy - Principles and Applications – J. Wiley, N.Y., Chapman & Hall, London, 1951. Per la scelta del mezzo d'inclusione migliore da usare in contrasto di fase, si veda: G.C. Crossmon – Mounting media for Phase Microscope Specimens – Stain Technol. **24**, 241 (1949). Questo autore fa notare che, nel caso di materiale vivente, il mezzo di montaggio non deve solo portare al miglior contrasto, ma deve essere non tossico e comunque isotonico (deve avere la stessa pressione osmotica dell'oggetto).

È bene anche ripetere quanto detto sopra: il contrasto di fase migliora la sensibilità delle misure di micro-refrattometria (misure dell'indice di particelle o fibre sospese in un liquido) in quanto migliora la percezione della linea di Becke o comunque dei confini della particella (vedi in questo sito l'art. n° 24: “La microscopia ottica dall'osservazione alla misura”, pag. 19 e segg., nonché la bibliografia in esso contenuta). Si raggiunge in questo modo una misura dell'indice fino alla quarta cifra decimale. Anche altre tecniche di contrasto, come il DIC, possono essere usate per migliorare la precisione delle misure di rifrattometria.



Abbiamo detto sopra che i caratteri delle immagini riprese in contrasto di fase dipendono molto dalla struttura ottica dell'oggetto (trasparenza e cammino ottico). Possiamo quindi immaginare facilmente che qualche fantasioso ricercatore abbia studiato la possibilità di produrre un contrasto di fase “variabile”, capace di adattarsi alle mutevoli caratteristiche del preparato.

Se poi si pensa che gli oggetti più spesso osservati in contrasto di fase sono trasparenti, qualcun altro deve aver cercato di cavarne immagini a colori.

Elencheremo solo le principali soluzioni proposte poiché molti di questi dispositivi non sono

mai entrati in produzione industriale oppure sono stati prodotti solo per pochi anni a causa di un insuccesso commerciale. Vale a questo punto il monito di K. Michel (il creatore della serie “Axio” della Zeiss Ober.) che suona all’incirca così: non esiste nella pratica alcun oggetto così uniforme da richiedere un sistema di fase particolarmente adattato alle sue caratteristiche. Meglio adottare un sistema di compromesso che si adatti alla maggioranza degli oggetti reali.

Se poi si pensa che molti oggetti non particolarmente trattati sono privi di colore, è un po’ peregrino cercare di cavarne dei colori che sarebbero sicuramente falsi. Ma tant’è ...

#### DISPOSITIVI di contrasto di fase per immagini colorate

Finora abbiamo sempre parlato di sfasamento operato dall’oggetto ( $\phi$ ) o dall’anello di fase ( $\psi$ ) come se si trattasse di una grandezza legata solo alle caratteristiche dell’oggetto (cioè al suo cammino ottico = spessore  $\times$  indice =  $d \times n$ ) ma, se si esprime lo sfasamento non in unità assolute ma come frazione della lunghezza d’onda, allora lo sfasamento dipende anche dalla lunghezza d’onda in gioco:

$$\phi = d \cdot n / \lambda$$

È come dire che l’indice  $n$  varia a seconda di  $\lambda$ . Ci riferiamo alla “dispersione” dell’indice di rifrazione, di cui abbiamo già parlato.

Ne risulta che le condizioni di contrasto variano a seconda del colore e, operando in luce bianca, l’immagine dell’oggetto presenterà bordature di vario colore, che si sommeranno agli eventuali residui di aberrazione cromatica. Questi effetti sono in genere poco percettibili ma, per evitarli del tutto, i costruttori consigliano di lavorare in luce “verde”, anche se non strettamente monocromatica, al fine di ottimizzare il contrasto.

Per lo stesso motivo, si raccomanda di non osservare in contrasto di fase un preparato che sia di per sé colorato: la radiazione che traversa il sistema porterà ad effetti di contrasto che dipenderanno dal colore prevalente. L’immagine che ne deriva sarà difficilmente interpretabile.

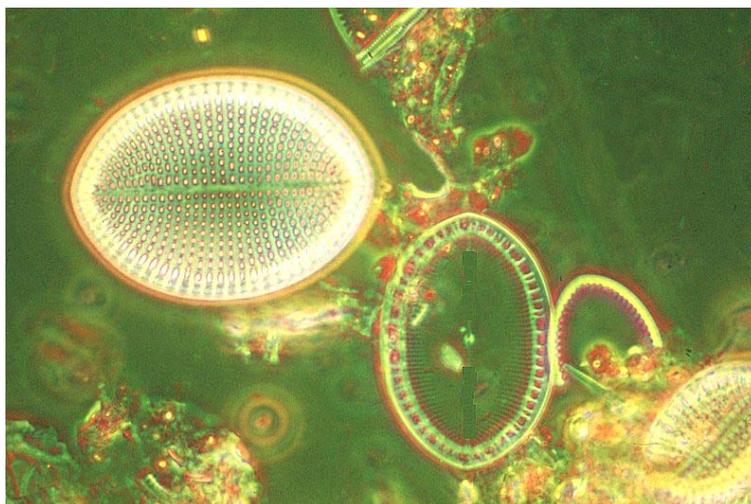
Però, proprio partendo dagli effetti della dispersione dell’indice, già F. Zernike nel 1949, assieme ad altri due ricercatori, alla ricerca di immagini colorate partendo da oggetti del tutto trasparenti, aveva escogitato un anello di fase costituito da un materiale con indice simile a quello della rimanente parte della piastrina che lo porta, ma con diversa dispersione. Per il centro dello spettro ottico (regione del verde,  $\lambda_0$ ), le due regioni presentano lo stesso indice ed il contrasto è assente: operando a quella lunghezza d’onda tutto avviene come in fondo chiaro. Però, agli estremi dello spettro, il contrasto può essere positivo per un colore estremo (regione del blu) e negativo per l’altro estremo. In pratica, un oggetto trasparente appare arancio su fondo bluastro.

Per accrescere l’effetto della dispersione dell’indice, è naturalmente possibile rendere lo sfasamento dell’anello di fase ( $\psi$ ) non pari a zero, ma ad un multiplo intero di  $\lambda_0$ . Se il valore considerato per  $\lambda$  è quello del centro dello spettro ottico ( $\lambda_0$ ), le onde diffratte che non attraversano l’anello sono sempre in fase con l’onda diretta ed il contrasto rimane nullo per quella regione spettrale. Ma lo sfasamento (ed il contrasto) sarà ancora maggiore per gli estremi dello spettro poiché qui il valore di  $\psi$  è stato moltiplicato per un intero.

Può sembrare che questa tecnica riporti alla “dispersione colorata” vista sopra, ma in quel caso si sfruttava soprattutto la dispersione dell’indice del liquido che circonda l’oggetto; qui invece si sfrutta la dispersione dell’anello di fase.

Attualmente almeno, un simile dispositivo non risulta presente sul mercato.

Fig. 25 – La diatomea *Cocconeis* in contrasto Varicolor. Si noti che gli oggetti più rifrangenti appaiono bianchi poiché, come spiegato a pag. 16, per essi il contrasto è sempre negativo (oggetto più chiaro del fondo) per tutto lo spettro ottico.



Più efficace è il sistema ideato dal Locquin (1951)(vedi: Sini G.P. – Il contrasto di fase interferenziale “Wild Varicolor”<sup>9</sup>-Atti della Fondaz. G. Ronchi, Firenze, XX, n° 4 - p = 374 - 393, 1965) e prodotto per qualche tempo dalla casa Wild.

Fig. 26 – Un obiettivo Varicolor, contrassegnato da un doppio anello ondulato.



In esso si sfrutta una caratteristica dei filtri interferenziali a banda stretta: tali filtri creano uno sfasamento dell’onda che li attraversa di segno – (ritardo) per le lunghezze d’onda maggiori di quella centrale (quella di massima trasparenza) e di segno + per le lunghezze d’onda minori. Lo sfasamento è nullo nel punto centrale della banda passante. Questo significa che, se l’anello di fase è costituito da uno di tali filtri, la cui banda passante sia al centro dello spettro ottico (regione del verde), per la regione blu - viola l’anello di fase si comporta come un anello per contrasto positivo ed un normale oggetto più rifrangente del mezzo circostante apparirà scuro, mentre, per la regione del rosso, avviene il contrario e l’oggetto apparirà più chiaro del fondo.

Il fondo sarà naturalmente verde poiché quello è il colore fondamentale dell’anello di fase. Pertanto, un oggetto poco rifrangente apparirà rosso (contrasto di fase negativo per la regione del rosso, positivo per l’altro estremo dello spettro) su fondo verde. Il contrasto sarà migliore ponendo nel sistema illuminante un filtro “didimo”, color magenta, con ridotta trasmissione nella regione del verde, poiché in quella regione lo sfasamento dell’anello di fase interferenziale è nullo ed il contrasto di fase non agisce.

Usando una sorgente di colore variabile (basta usare un filtro interferenziale a banda stretta in un supporto inclinabile: la banda passante si sposta modificando l’incidenza), è poi possibile passare con continuità da contrasto di fase positivo, nella regione del blu, a contrasto nullo (verde) o negativo (rosso).

Il sistema Varicolor quindi non consente di ottenere solo un’immagine a colori, ma anche di variare il segno ed il valore del contrasto.

Purtroppo, la produzione degli obiettivi Varicolor è stata interrotta dopo pochi anni a causa della tendenza degli anelli di fase interferenziali a degenerare (fig. 27), perdendo la loro funzione.

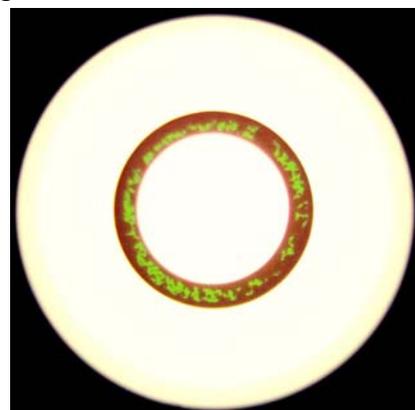


Fig. 27 – Un anello di fase Varicolor alterato col tempo e virato verso il colore rosso per una variazione irregolare del suo spessore.

Un’interessante soluzione al contrasto di fase colorato e variabile è stata data dalla Zeiss di

<sup>9</sup> Non si faccia confusione col vecchio sistema “Variocolor” della Leitz, che era solo un sistema di filtri polarizzanti capaci di produrre colori (di sottrazione) variabili.

Jena, partendo dal sistema interferenziale “Interphaco”, di cui accenneremo fra poco. Il principio di funzionamento è completamente diverso da quello classico ed è esente dai classici aloni. Si tratta di un sofisticato metodo basato sull’interferometro di Mach-Zender, posto sopra l’obiettivo. Esso rende possibile, non solo la creazione di immagini a colori, ma anche la variazione del colore dell’oggetto e del fondo.

Fig. 28 – Il sistema Interphaco, vecchio modello, sopra lo stativo Amplival della Zeiss di Jena (anni 1970-80).

Purtroppo questa tecnica, pare scomparsa anch’essa dal mercato, comporta uno strumento *ad hoc* ed una serie di accessori e di regolazioni molto delicate. Pertanto, non ha avuto successo commerciale.



#### DISPOSITIVI per contrasto di fase a contrasto variabile.

Scegliendo opportunamente certi parametri, si è già visto, varia il contrasto. Dunque, non c’è che modificarli.

Una soluzione drastica fu adottata dalla casa Leitz, offrendo una tripla serie di obbiettivi:

- per contrasto di fase negativo, a forte contrasto (assorbimento dell’anello di fase = 88 %), denominati “- h” (da “hart” = duro);
- per contrasto di fase positivo, a forte contrasto (assorbimento dell’anello di fase = 88 %), denominati anch’essi “h”, ma senza il segno meno;
- per contrasto di fase positivo, a contrasto normale (assorbimento dell’anello di fase = 75 %), denominati “n” (“normal”).

È ovvio che gli obbiettivi a forte assorbimento, e forte contrasto, producono immagini più scure e pertanto sono più sensibili alle perdite di contrasto per luce diffusa, per oggetti molto densi, ecc.

Un’altra soluzione, che fu prodotta per molti anni, è quella della Zeiss di Jena, secondo le ricerche di H. Beyer; parliamo della serie di obbiettivi denominati “Phv” (di fase variabile). Si tratta di obbiettivi con due anelli di fase, ovviamente concentrici, dotati della stessa trasparenza. I diaframmi anulari per il condensatore, forniti assieme agli obbiettivi, sono anch’essi doppi, ed anzi tripli nel senso che anche la zona periferica del diaframma è trasparente (tranne che per l’obiettivo 6,3:1).

Fig. 29

Con gli obbiettivi Phv, a seconda della posizione del diaframma d’apertura, è possibile realizzare:

- a piena apertura: il campo chiaro (con contrasto ridotto per il sovrapporsi di un fondo chiaro (zona esterna del diaframma anulare) col contrasto di fase (dovuto ai due anelli interni);
- a metà apertura: si illuminano entrambi gli anelli di fase dell’obiettivo e si ha un



contrasto di fase debole;

– a minore apertura: si illumina solo l’anello di fase più piccolo e si ha un contrasto forte, con minore luminosità;

– a chiusura totale: buio completo.

Il sistema è pratico e sicuro. Peccato che non sia stato imitato. È fuori commercio da circa 20 anni. Si tratta comunque di contrasto di fase positivo normale.

Molti anni fa (1950), il Payne propose un sistema di fase con un polarizzatore sotto il diaframma anulare, un ritardatore  $\lambda/2$ , un cuneo di quarzo e poi un analizzatore sopra l’obbiettivo. Ciò consente di variare con continuità l’intensità delle onde diretta e diffratta e quindi il valore, ma non il segno, del contrasto.

Va qui ricordato che tutti i sistemi basati sulla polarizzazione, compreso il DIC, creano strani effetti di contrasto e di colore quando l’oggetto è almeno parzialmente birifrangente, il che è frequente nei tessuti vegetali. L’interpretazione dell’immagine ne diviene quindi assai incerta.

Ancora sulla polarizzazione è basato il sistema di M. Pluta, fuori commercio anch’esso da un pezzo, basato su un doppio anello di fase.

Qui però bisogna parlare prima del sistema Anoptral, ideato da A. Wilska (1953) e prodotto per qualche tempo dalla casa Reichert di Vienna.

In sostanza, si tratta di un contrasto di fase negativo in cui l’anello di fase però non è costituito da uno strato metallizzato (e quindi riflettente, con produzione di luce diffusa e perdita di contrasto), ma da uno strato assorbente e diffondente, inizialmente costruito con un deposito di fuliggine, poi con materiali più stabili. La differenza essenziale rispetto al sistema originale di Zernicke consiste nel potere diffondente dell’anello di fase di modo che il fenomeno dell’alone è molto ridotto. Per rispettare il primitivo sistema a base di fuliggine, all’anello viene dato un colorito brucicco. L’assorbimento di esso viene tenuto piuttosto forte, fino al 90%, in modo da avere un forte contrasto.

In una prima versione (“Umbral”), Wilska aveva proposto una piastra di fase totalmente coperta di fuliggine, con un anello chiaro. Ciò dava un lieve contrasto positivo, adatto ad oggetti molto rifrangenti. Ma poi la Reichert adottò il sistema Anoptral, a contrasto negativo.

Ebbene, il ricercatore polacco M. Pluta propose un doppio anello di fase:

quello esterno con carattere “negativo”, con potere diffondente a somiglianza del sistema Anoptral e trasmissione molto bassa (circa 5 %);

quello interno “positivo”, di natura metallica, quindi riflettente, con trasmissione di circa 15 %.

La variabile funzione di questo sistema è ottenuta ancora una volta sfruttando la polarizzazione: sotto al condensatore viene sistemato un filtro polarizzante girevole. Sotto ognuno dei due diaframmi anulari (due, poiché doppio è l’anello di fase) è sistemato un altro polarizzatore in forma di anello. Di questi due anelli viene curato l’orientamento in modo che le loro direzioni di vibrazione siano fra loro perpendicolari. Ruotando il polarizzatore inferiore, la trasparenza dei due anelli viene variata in misura complementare, nel senso che l’una cala mentre l’altra cresce.

Ne consegue che i due settori, i due anelli che portano ad un contrasto di segno opposto, si sostituiscono gradualmente l’uno all’altro. Conclusione: contrasto variabile con continuità dal positivo al negativo.

Lo stesso Pluta ha proposto un sistema che sovrappone il metodo della stereoscopia mono-obbiettivo (vedi in questo sito: G. Carboni – “Stereoscopia ad alto ingrandimento”) con il contrasto di fase. In sostanza, il diaframma anulare viene diviso in due parti, occupate da due polarizzatori con direzioni di vibrazione perpendicolari. Sugli oculari si pongono altri due polarizzatori, ruotando i quali si ottiene la pari intensità delle due immagini e l’effetto stereoscopico. Se però l’obbiettivo possiede un anello di fase, si ha un’immagine in rilievo in contrasto di fase.

Tale sistema è stato prodotto dalla ditta PZO di Varsavia col nome di “Stereophase”.

È stato proposto (Grigg, 1950) anche un mixaggio fra contrasto di fase e campo scuro colorato sec. Rheinberg (vedi sopra). Al diaframma anulare sotto al condensatore viene sovrapposto un filtro colorato, per es. verde; alla corona esterna del medesimo diaframma, che normalmente è opaca, viene sostituito un filtro di colore complementare, per es. rosso. Si ha così un'immagine in contrasto di fase sovrapposta ad un fondo colorato.

E ancora, è stato prodotto da vari costruttori (Wild, ecc.) un sistema di fase classico, ma con le parti opache del diaframma anulare nel condensatore sostituite da filtri UV. In questo modo si ottiene una normale immagine in contrasto di fase positivo ma, se la lampada è dotata di forte emissione nell'UV (tubi a scarica in vapori di mercurio) e previa applicazione sopra l'obbiettivo di opportuni filtri d'arresto, si avrà anche un'immagine in fluorescenza. Quando gli oggetti fluorescenti sono piccoli e sparsi in un campo non fluorescente, la doppia immagine consente di osservare tutto il campo in contrasto di fase pur evidenziando i pochi oggetti fluorescenti.

La fantasia degli inventori non ha limiti.

Un sistema più serio per ottenere la variazione del contrasto era il congegno “Contrast” della Zeiss di Jena, creato per i microscopi della serie “250 CF”. Si trattava di uno scatolone più o meno parallelepipedo, da inserire fra revolver e tubo bioculare (figura qui sotto).

La novità del sistema Contrast consistette in un'ottica intermedia che permetteva di trasportare la pupilla d'uscita dell'obbiettivo molto al di sopra dell'obbiettivo stesso, all'interno dello “scatolone”. Questo accorgimento consentiva allora di inserire anelli di fase, prismi di Wollaston ed altri “modulatori” in un tamburo girevole (12 in figura) contenuto nello scatolone. Ruotando il tamburo, o sostituendolo con altri, era possibile porre in quella nuova posizione, facilmente accessibile, qualunque accessorio, pur tenendo nel revolver obbiettivi del tutto normali, per campo chiaro.

I “modulatori” disponibili erano i più svariati: anelli di fase del tipo a doppio anello (vedi il sistema “Phv” sopra citato), per contrasto forte e debole, positivo o negativo, e poi i prismi di Wollaston per il DIC (vedi oltre), ed infine gli anelli opachi per il fondo scuro “centrale”, già citati. Gli anelli di fase per contrasto positivo erano “molli” (trasmissione: 30-40 %), mentre quelli per contrasto negativo erano “duri” (trasmissione: 15-20 %).

Un sistema assai versatile dunque, con la possibilità di passare da una tecnica di contrasto all'altra con poche operazioni. È ben vero che la complessità del sistema portava alla moltiplicazione delle superfici aria-vetro e quindi ad un aumento di luce diffusa e ad una piccola perdita di contrasto; inoltre, la presenza di prismi richiese speciali accorgimenti (inclinazione particolare ed indice anomalo per il vetro) al fine di evitare l'effetto depolarizzante delle superfici riflettenti. Ma il Contrast aveva un pregio insostituibile: con qualunque obbiettivo per campo chiaro era possibile applicare tutte le tecniche di contrasto elencate, semplicemente inserendo al punto giusto l'apposito “modulatore”.

Sotto al condensatore, un opportuno disco-revolver permetteva di inserire nel sistema il modulatore desiderato: doppi diaframmi anulari per il contrasto di fase ed il fondo scuro oppure prismi di Wollaston per il DIC.

Purtroppo, con la caduta del muro di Berlino e la riunificazione delle due Zeiss, l'intera produzione di microscopi della casa di Jena è stata abbandonata, subito dopo il 1990.

La casa Reichert di Vienna ha prodotto qualcosa di simile per gli stativi Polyvar e Univar, ma con campo di applicazione più limitato.

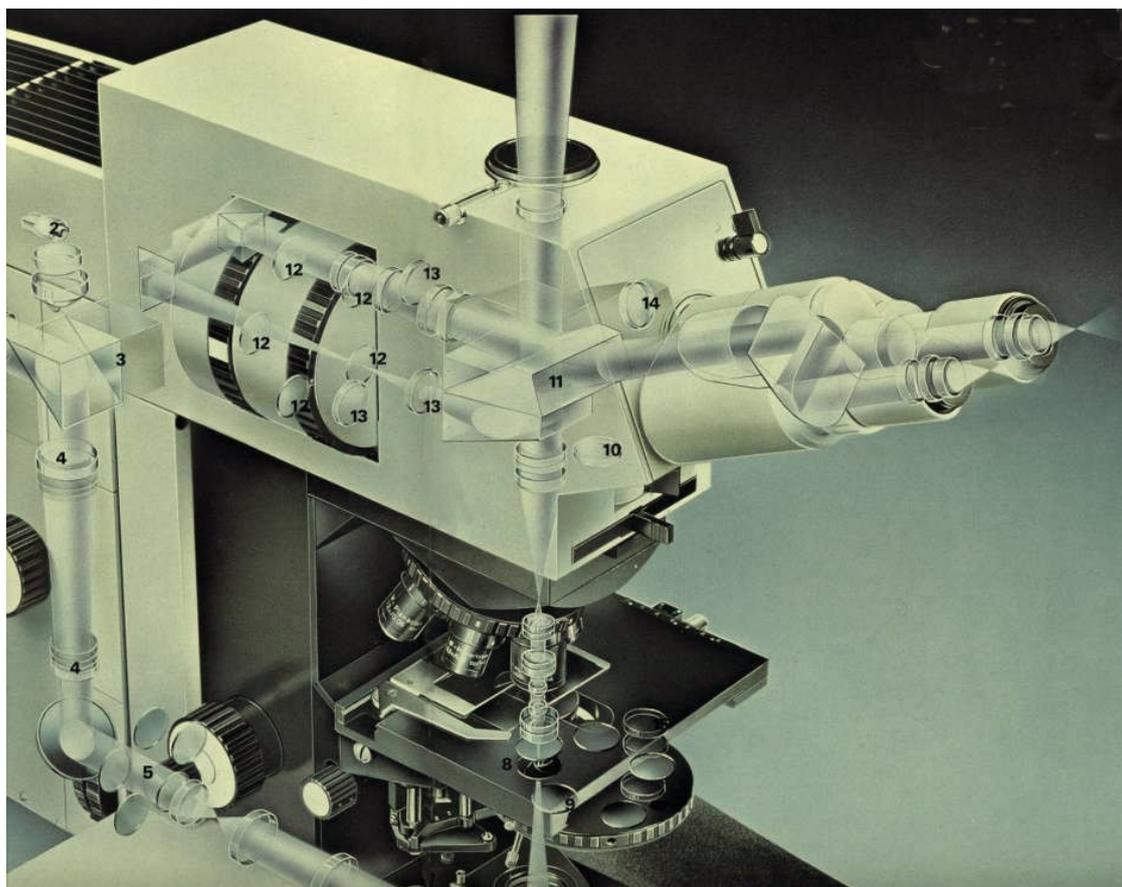


Fig. 30 – Il sistema CONTRAST sullo stativo Jenaval della Zeiss Jena.  
(Dal catalogo Jenoptik, Jena GmbH, Ag. 29/202/82)

## II CONTRASTO INTERFERENZIALE

Non descriviamo in dettaglio i vari sistemi che sono stati finora proposti in questo campo poiché sono troppi. Del resto, esiste in merito molta letteratura ed anche in questo sito, ad un tiro di schioppo, si possono trovare molti dati nell'art. n° 17 "Microscopia interferenziale". Ci riferiamo perciò implicitamente a quel testo in ciò che segue.

Inoltre, bisogna ammettere che la maggioranza dei sistemi proposti dai ricercatori non è mai stata prodotta industrialmente oppure è stata prodotta solo per pochi anni a causa della complessità e del costo dello strumento, nonché della scarsità di applicazioni.

Descriveremo alla fine, velocemente, due sistemi interferenziali che non erano ancora in commercio all'epoca di pubblicazione dell'articolo citato. Ma intanto vogliamo proporre confronti ad ampio raggio fra le varie tecniche interferenziali, al fine di chiarirne vantaggi e limiti.

### PRIMA DI TUTTO, QUALCHE CONSIDERAZIONE COMPARATIVA

Per cominciare, sarà bene distinguere gli strumenti destinati alla sola osservazione, cioè capaci di dare un aumento di contrasto e nulla più (come il DIC), dagli strumenti capaci di fornire ANCHE una misura del cammino ottico dell'oggetto, che vanno chiamati quindi MICRO-INTERFEROMETRI (il sistema Leitz, l'Interphaco di Zeiss Jena, Il sistema Pluta di PZO, ecc.).

In secondo luogo, si pensi che qualunque forma d'interferenza in ottica consiste nella sovrapposizione di due onde, i cui effetti si sommano punto per punto. Dato però che un normale fascio ottico è costituito da un numero sempre grandissimo di onde elementari (fotoni) che

oscillano in modo incoerente, senza alcun rapporto reciproco di fase né di direzione di vibrazione, l'interferenza è possibile solo se i due fasci sono **coerenti** fra loro, in modo che per ogni punto del piano d'interferenza le due onde s'incontrano con la stessa fase e lo stesso piano di vibrazione.

Il modo più semplice per avere due fasci coerenti fra loro, che possano interferire appena s'incontrano, è di partire da un fascio solo, e poi sdoppiarlo in due fasci identici.

Questa suddivisione si può ottenere nei due modi principali:

– da un materiale birifrangente, che suddivide ogni onda in due onde linearmente polarizzate, vibranti in piani perpendicolari fra loro;

– da una superficie semiriflettente, anche la semplice superficie di una lamina in vetro, che può polarizzare, ma solo parzialmente, tranne casi particolari.

In un microscopio, l'organo che esegue lo sdoppiamento si può trovare **prima dell'oggetto**, e di solito prima dell'obbiettivo, **oppure dopo l'oggetto**, e di solito dopo l'obbiettivo.

Nel primo caso, uno dei due fasci può seguire un percorso indipendente, che non attraversa il preparato (sistema Leitz), oppure scorrere così vicino all'altro da essere disturbato anch'esso dal preparato (sistemi differenziali, come il DIC).

Nel secondo caso, quando i due fasci vengono prodotti dopo l'obbiettivo, allora entrambi avranno subito l'effetto della presenza dell'oggetto. Poiché ci stiamo occupando essenzialmente di oggetti di fase, tale effetto consiste essenzialmente in una variazione della fase.

Nel caso di **un canale indipendente**, non alterato dalla presenza dell'oggetto (sdoppiamento totale del fascio illuminante prima dell'oggetto), quel canale dovrà essere identico all'altro, a parte l'assenza dell'oggetto stesso, ma dovrà comportare lo stesso tipo di obbiettivo, lo stesso porta-oggetto, gli stessi organi intermedi, ecc. In altre parole, un tale strumento dovrà possedere molti organi in duplice copia, con strette tolleranze sulle loro proprietà, e lo strumento sarà più costoso. Ma con un vantaggio: l'immagine dell'oggetto si formerà per sovrapposizione dell'onda disturbata dall'oggetto con un'onda piana indisturbata.

Se invece si ammette che **entrambi i canali** possano attraversare il piano-oggetto, essi potranno scorrere a piccola distanza l'uno dall'altro e traversare lo stesso obbiettivo, con notevole semplificazione del sistema (“**fasci ravvicinati**”).

Un esempio di due canali indipendenti è dato dal sistema Leitz, fuori costruzione da decenni, descritto nell'art. 17: “Microscopia interferenziale”, a pag. 19.

Molto più numerosi sono i sistemi “a fasci ravvicinati”.

In questo caso però occorre fare una seconda distinzione, come accennato prima:

— sdoppiamento del fascio **prima dell'oggetto** e dell'obbiettivo; in questo caso, le due onde che attraversano l'obbiettivo sono coerenti fra loro. Infatti, se l'organo che opera lo sdoppiamento si trova nella pupilla d'ingresso del condensatore e se l'organo in cui avviene il ricongiungimento si trova presso la pupilla d'uscita dell'obbiettivo, poiché le due pupille sono coniugate, ad ogni punto del primo piano corrisponde un punto del secondo e le due onde possono interferire, qualunque sia l'apertura del condensatore e dell'obbiettivo. In breve: si può lavorare a piena apertura, a tutto vantaggio della risoluzione e della luminosità.

— sdoppiamento del fascio **dopo l'obbiettivo**; in questo caso, occorre che il fascio che entra nell'elemento sdoppiatore sia già di per sé coerente, in modo che i due semi-fasci possano ricomporsi ed interferire in un secondo tempo. In breve, non si può lavorare a piena apertura poiché il fascio proveniente dal condensatore non è coerente. Per ottenere la coerenza di questo fascio, escludendo il foro di spillo per la sua scarsa resa fotometrica, non resta che una fenditura. Risultato: l'apertura utile del condensatore sarà molto ridotta, a scapito della risoluzione e della luminosità. Questa soluzione è più semplice dal punto di vista costruttivo, ma la tassa da pagare è molto elevata. Si comprende allora il successo del sistema DIC: a parte la semplicità d'uso ed il ridotto numero di regolazioni richieste, c'è il vantaggio di poter lavorare a piena apertura.

Tornando ai sistemi a “**fasci ravvicinati**”, abbiamo detto che entrambi i fascio portano con sé l'informazione, il “disturbo” portato dall'oggetto. Nel loro funzionamento si possono

distinguere tre modalità essenziali:

■ ■ sdoppiamento differenziale o contrasto differenziale: le due immagini dell'oggetto sono separate di pochissimo, di una lunghezza pari o di poco superiore al potere risolutivo dell'obiettivo. La separazione è quindi poco percettibile e serve solo a creare l'effetto di rilievo.

Non è in genere possibile eseguire misure di cammino ottico.

Come si formino le bordature, di diversa intensità o di diverso colore, ai due lati dell'oggetto si può intuire dalla fig. 31 qui sotto.

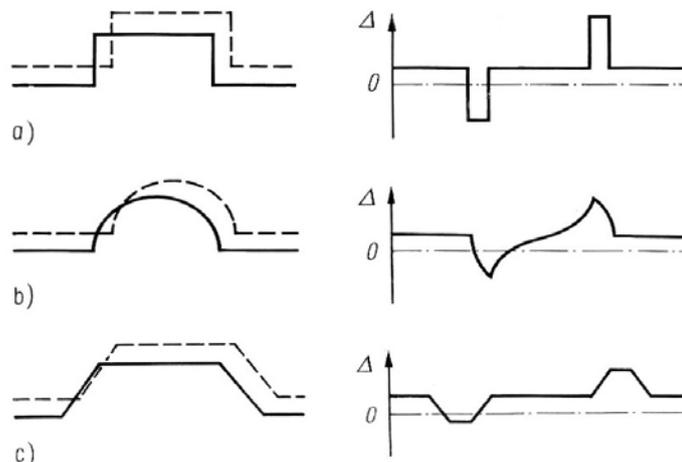


Fig. 31 – Schema della formazione delle bordature nel contrasto differenziale. A sinistra, esempi di forme d'onda create dall'oggetto a causa delle sue variazioni di cammino ottico. Le linee intere e tratteggiate indicano le due onde dopo lo sdoppiamento, leggermente sfasate l'una rispetto all'altra, ma soprattutto, lateralmente spostate di un piccolo ammontare.

A destra, il contrasto risultante dall'interferenza fra le due onde; le curve sono derivate dalla somma algebrica delle curve di sinistra.

(Da: H. Beyer e H. Riesenberg – Handbuch der Mikroskopie – Veb Verlag Technik, Berlin, 1988, pag. 160)

■ ■ interferogramma: le due onde sono inclinate fra loro ed i loro rapporti di fase variano attraversando il campo visuale. Secondo fasce successive, si passa regolarmente da linee d'interferenza positiva (più chiare) a linee d'interferenza negativa (scure); si parla di “frange”. In luce bianca, si avrà la classica successione dei colori della tavola di Michel Lévy, usata in polarizzazione (vedi la fig 32 e 33)<sup>10</sup>.

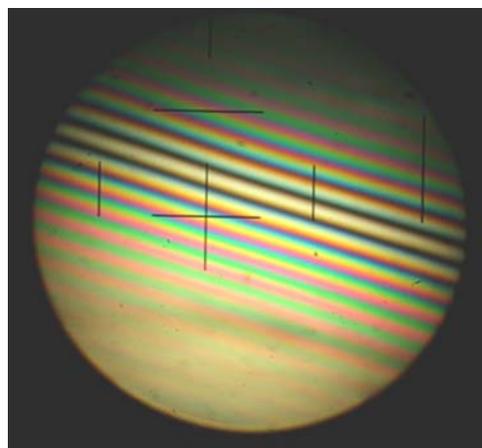


Fig. 32

L'oggetto varia la fase dell'onda che l'attraversa e le frange risultano deviate nel loro percorso. Dalla deformazione delle frange si possono eseguire le misure.

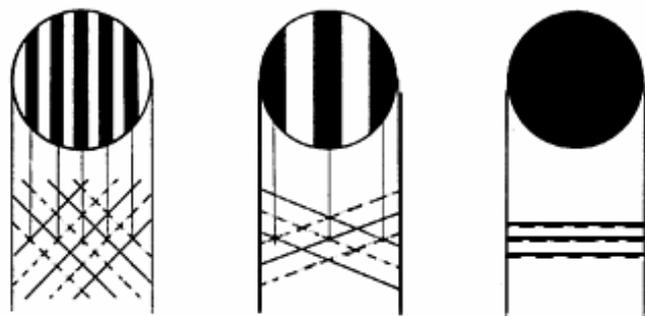


Fig. 33 – Schema della formazione delle frange per interferenza di due onde piane inclinate fra loro. Le frange verticali scure corrispondono ad interferenza negativa (opposizione di fase); quelle chiare ad interferenza positiva (concordanza di fase). Le linee intere e tratteggiate indicano, rispettivamente, le semi-onde positive e negative dei due sistemi di onde.

(Da: F. Walter (1963), “Blut”, IX, E. Leitz 92-52-106)

<sup>10</sup> Vedi anche la “tavola di Michel Lévy” a pag. 25 dell'articolo “Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata”, in questo sito.

■ ■ fondo unito: le due onde interferenti sono parallele per cui le differenze di fase (e quindi la luminosità ed il colore) sono costanti in tutto il campo, nella parte in cui esso è vuoto. La distanza laterale fra le due onde è forte per cui, se l'oggetto è piccolo in un campo vuoto, l'interferenza nasce fra l'onda "disturbata" che l'ha attraversato ed un'onda piana che gli è passata vicino. Su un fondo omogeneo, si vedranno due immagini simili dell'oggetto, spostate lateralmente l'una rispetto all'altra.

Solo in corrispondenza dell'oggetto si avrà un colore o luminosità dell'immagine diversi da quelli del fondo, oppure si avrà la formazione di frange simili alle isoipse di una carta topografica, che indicano l'ammontare dello sfasamento prodotto dall'oggetto. Regolando la fase di una o dell'altra onda con appositi "compensatori", è possibile equiparare il colore o la luminosità del fondo e dell'oggetto e da ciò misurare lo sfasamento operato dall'oggetto stesso.

A questa condizione particolare andrebbe riservato il termine "contrasto interferenziale".

In quest'ultimo caso, abbiamo detto, occorre che l'oggetto sia piccolo ed isolato in un campo vuoto, in modo da evitare che le deformazioni dell'onda provocate da diversi oggetti si sovrappongano, rendendo impossibile l'interpretazione dell'immagine.

Esempi di queste tre modalità di funzionamento si vedono nelle tre figure seguenti.

Fig. 34 – Esempio di sdoppiamento differenziale (Differential Interference Contrast). L'oggetto è una scaglia dell'ala posteriore di una *Vanessa Io*. Il colore del fondo e delle ombreggiature si può variare con qualche sistema ("compensatore" o altro) capace di variare la fase fra le due onde interferenti.

Sembra trattarsi di un DIC, ma il principio di funzionamento è assai diverso.

NB: Le figg. 34 – 36 sono state ottenute col sistema Interphaco della Zeiss Jena.

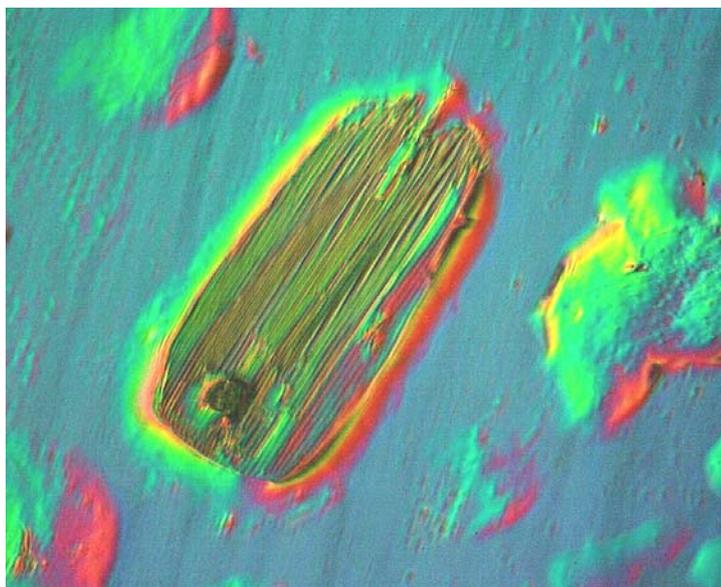


Fig. 35 – Esempio d'interferogramma sullo stesso oggetto. La deviazione delle frange è causata, e quindi dà la misura, dello sfasamento operato dall'oggetto.

La finezza dei dettagli che è possibile misurare dipende ovviamente dalla larghezza delle frange, legata a sua volta all'inclinazione fra le due onde interferenti.

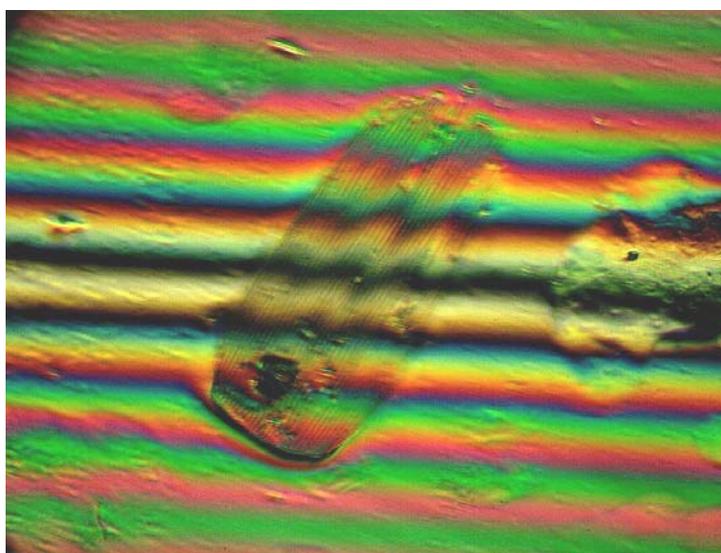
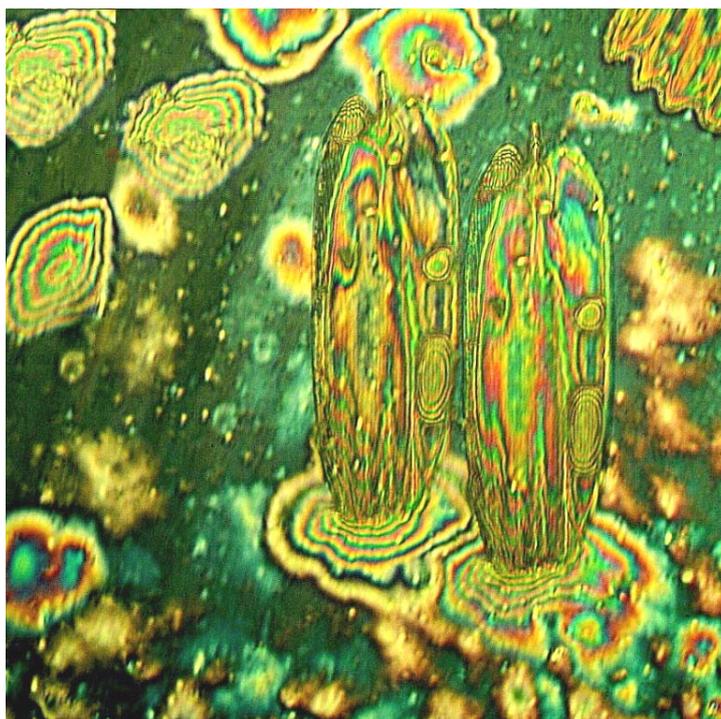


Fig. 36 – Esempio d'interferenza con sdoppiamento totale su fondo unito. Anche qui, col metodo della compensazione, è possibile eseguire misure di cammino ottico.

All'interno della doppia immagine della scaglia si vede un confuso intreccio di frange che danno un'idea della complessa struttura dell'oggetto. Tale complessità può non apparire nell'interferogramma della figura precedente poiché la larghezza delle frange è superiore alle dimensioni delle strutture fini dell'oggetto.

Anche nella fig. 34 (contrasto differenziale), le ombreggiature, legate alle striature interne della scaglia, coprono le variazioni globali di cammino ottico, quali appaiono qui.

Ognuna delle tre tecniche qui illustrate fornisce quindi differenti informazioni aggiuntive sulla struttura dell'oggetto.



Il DIC è divenuto, col passare degli anni, la tecnica più diffusa di contrasto interferenziale; ciò in funzione della sua semplicità d'uso, della ripetibilità dei risultati, della gradevolezza delle immagini fornite. Ma non si tratta di un interferometro: non consente misure.

Va ricordato anche che costituisce un sistema asimmetrico, con effetto di ombreggiatura, che non produce contrasto nel caso di strutture allungate parallelamente alla direzione di sdoppiamento. È sempre opportuno quindi ruotare il preparato attorno all'asse ottico, almeno se contiene strutture allungate.

Infine, come tutti i sistemi che operano in luce polarizzata, il DIC produce immagini che dipendono anche dall'eventuale birifrazione e dall'orientamento delle direzioni principali dell'oggetto. Tali immagini sono quindi difficile da interpretare.

E ricordiamo che quasi tutte le tecniche di contrasto forniscono chiari-scuri o rilievi che non dipendono dalla forma geometrica dell'oggetto, ma dalle sue variazioni (o "gradienti") di cammino ottico.

Certamente, il contrasto di fase ed il contrasto d'ampiezza non risentono della eventuale birifrazione dell'oggetto e, poiché non richiedono i costosi prismi di Wollaston, risultano più economiche. Il contrasto d'ampiezza, il DIC, ecc., d'altro canto, non producono alone, ma presentano una direzione preferenziale per il contrasto.

Per l'assenza di alone, le tecniche come il contrasto d'ampiezza, il DIC ed altre tecniche interferenziali non hanno l'inconveniente del contrasto di fase (un oggetto piccolo vicino ad uno grande rischia di essere nascosto dall'alone), ma il contrasto di fase non scompare comunque dal mondo della ricerca e dell'industria.

In fondo, quasi tutte le tecniche di contrasto si basano sulle variazioni di cammino ottico nell'oggetto; pertanto, in fatto di sensibilità, capacità di rivelare piccole variazioni di spessore o di indice, si equivalgono. Anche in fatto di risoluzione, non vi sono grandi differenze.

Insomma, ogni tecnica ha pregi e difetti e l'ideale sarebbe di possederle tutte in modo che l'oggetto possa venir esaminato con la maggior varietà possibile di metodi.

## IL SISTEMA DI M. PLUTA

Questo sistema, pubblicato nel 1983 e prodotto per qualche tempo dalla casa PZO di Varsavia, si basa sul sistema di Nomarski a prismi di Wollaston "modificati", ma tutto l'interferometro, compreso il primo prisma, lo sdoppiatore, è posto dopo l'obbiettivo. I prismi di Wollaston modificati sono costruiti in modo che l'asse ottico di uno dei due cunei di quarzo sia inclinato rispetto all'asse ottico. In questo modo, il piano virtuale in cui avviene lo sdoppiamento (o il ricongiungimento) dei fasci si trova all'esterno del prisma. Ciò consente di porre il prisma sopra l'obbiettivo, pur avvenendo lo sdoppiamento del fascio nel piano focale dell'obbiettivo stesso, che si trova spesso all'interno del sistema di lenti.

Come si vede dalla fig. 37, uno dei prismi è sistemato dentro l'obbiettivo (W1), l'altro (W2) sopra di esso, all'interno di un grosso tamburo fissato sopra al revolver. Lo sdoppiamento operato da questi prismi può essere forte, ma è possibile metterli "in sottrazione" affinché i loro effetti si compensino in misura variabile, in modo da poter passare dallo sdoppiamento totale al differenziale.

Tre diversi prismi W2 si possono scegliere all'interno del tamburo, manovrando una levetta (A, fig. 37). Si possono usare due diversi condensatori, l'uno con diaframma ad iride, l'altro con una **fenditura**, regolabile e girevole. Quest'ultimo condensatore porta un disco-revolver con quattro diversi prismi intercambiabili. Sotto al condensatore e sopra il prisma più alto vi sono filtri polarizzanti girevoli.

Come abbiamo detto sopra, quando lo sdoppiamento del fascio avviene dopo l'obbiettivo, è necessario dare un minimo di coerenza al fascio illuminante, e ciò si ottiene ponendo appunto una fenditura più stretta possibile nel primo piano focale del condensatore. Perdita di luminosità e di risoluzione.

Qui il secondo prisma (W2) può essere scambiato con altri due aventi un diverso angolo di sdoppiamento, e comunque esso è traslabile perpendicolarmente all'asse con apposita manopola; il primo prisma (W1), contenuto nell'obbiettivo, può ruotare attorno all'asse.

Queste operazioni consentono molti diversi modi di funzionamento, che si riconducono poi ai tre fondamentali:

- separazione totale e variabile dell'immagine dell'oggetto; fondo omogeneo;
- separazione differenziale, con ombreggiature variabili e fondo unito, oppure con interferogramma di sfondo;
- interferogramma con sdoppiamento variabile dell'oggetto e larghezza variabile delle frange. Larghezza che serve di base per le misure di cammino ottico.

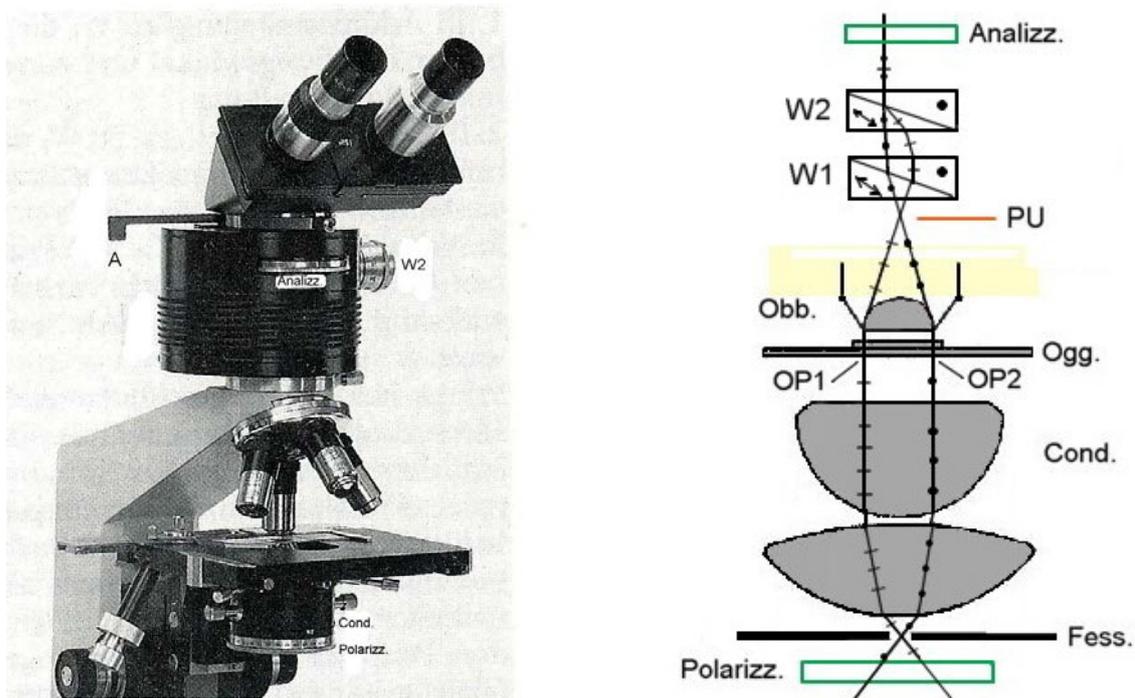


Fig. 37 – Aspetto esteriore e schema del micro-interferometro a due prismi di Wollaston, sec. Pluta. Il prisma W1 è alloggiato all'interno dell'obbiettivo, è girevole attorno all'asse ottico ed il suo piano di sdoppiamento si trova nel piano focale superiore dell'obbiettivo stesso (PU). Il prisma W2 può scorrere orizzontalmente e si trova nel tamburo superiore. Tre diversi prismi W2 sono sostituibili l'uno all'altro a mezzo della leva A. Analizzatore, polarizzatore e fenditura sono girevoli attorno all'asse.

Questo dispositivo è quindi molto versatile, può fornire immagini con svariate forme di contrasto. Esso inoltre è predisposto per funzionare da interferometro. Naturalmente, con tutti i limiti dovuti all'uso di radiazione polarizzata e di una fenditura nel sistema illuminante.

Lo si può paragonare al sistema Interphaco della Zeiss Jena (non entriamo nei dettagli poiché questo dispositivo è descritto nell'articolo n° 17 citato sopra: "Microscopia interferenziale", a pag. 22) poiché consente l'applicazione delle stesse tecniche interferenziali, ma collo svantaggio di servirsi della polarizzazione. Il principio è però completamente diverso: prismi di Wollaston variamente modificati nel sistema di M. Pluta, interferometro di Mach-Zender nel caso Interphaco.

Entrambi i sistemi però, come tutti i micro-interferometri, sono complessi e delicati: una minima alterazione delle regolazioni fa sparire tutto. Occorre un certo addestramento e molta pazienza. Il loro interesse sta nell'ampia gamma di tecniche realizzabili collo stesso strumento, ma il prezzo da pagare è la complessità e la criticità delle regolazioni.

## Il PlasDIC di Zeiss Oberkochen

Il “PlasDIC”, presentato da Zeiss Ober. nel 2003, rispolvera un dispositivo semplificato proposto sempre da Nomarski intorno al 1950 (vedi l’art. 17: “Microscopia interferenziale”, pagg. 36 e 37). L’utilità del PlasDIC consiste nel fatto che l’oggetto non è attraversato da radiazione polarizzata e pertanto è applicabile a culture di cellule in contenitori o microcuvette in materia plastica, notoriamente birifrangenti. La Zeiss propose questo dispositivo proprio per quell’applicazione.

Anche il condensatore, l’obiettivo ed il vetrino non devono essere esenti da birifrazione indotta, come invece è richiesto dal DIC tradizionale, dal microscopio polarizzatore, ecc.

La semplicità d’uso di questo strumento lo consiglia per gli esami di routine ed il suo carattere è ovviamente di una “tecnica di contrasto”, non di strumento di misura.

Fig. 38

Si tratta di una variante del sistema di Nomarsky in quanto viene usato un solo prisma di Wollaston posto nella pupilla d’uscita dell’obiettivo. Questa situazione, come diremo più sotto, obbliga ad un’illuminazione coerente, ottenuta come in altri dispositivi ponendo una fenditura sotto il condensatore. E, naturalmente, questo dà al contrasto una direzione preferenziale.

Lo sdoppiamento del prisma (l’angolo  $\epsilon$  della figura e la distanza OP1-OP2 sono molto esagerati per chiarezza) viene tenuto al limite del potere risolutivo dell’obiettivo. In sostanza, si vedono due immagini dell’oggetto, leggermente sfalsate fra di loro, come nel DIC normale.

Poiché il prisma deve stare nella pupilla dell’obiettivo, per ogni obiettivo occorre un prisma adatto, contenuto in un piccolo cursore a parte. Ovviamente, il prisma deve stare in mezzo a due polarizzatori “incrociati”, che vengono incollati sulle sue facce.

Le direzioni principali dei due polarizzatori sono orientate a  $45^\circ$  da quelle del prisma.

Il sistema è compatto. Se il prisma viene spostato orizzontalmente, varia lo spessore attraversato dal fascio nei due semi-prismi; così varia la fase fra i due raggi singoli (ottenuti per birifrazione) e varia il colore del fondo e dell’oggetto.

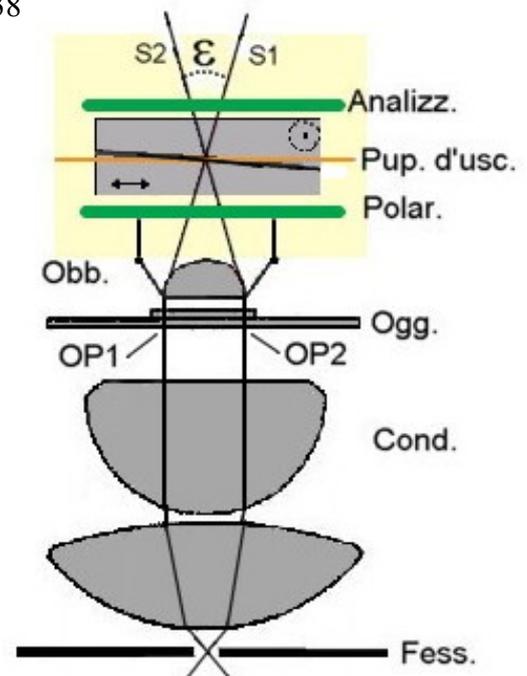
Un dispositivo simile era stato proposto da M. Pluta nel 1971. In esso, il prisma era spostabile anche verticalmente e ciò variava l’inclinazione reciproca dei due fasci singoli. Si passava così dal fondo omogeneo all’interferogramma.

Come in tutti i sistemi basati su un’illuminazione a fenditura, il contrasto è tanto migliore quanto più stretta è la fenditura ma, dal punto di vista fotometrico, è un guaio. Perciò il costruttore fornisce il dispositivo calcolato per un ragionevole compromesso.

Può aver senso accennare anche ad altre tecniche, capaci di fornire immagini ben contrastate o colorate di oggetti trasparenti. Parliamo della FLUORESCENZA e della RADIAZIONE POLARIZZATA.

La prima mette solo in evidenza una proprietà fisica di certi oggetti: la fluorescenza, un caso particolare di luminescenza in cui l’emissione è dovuta ad irraggiamento di altre lunghezze d’onda. La fluorescenza può essere primaria (spontanea) o secondaria, indotta dal trattamento dell’oggetto con particolari sostanze fluorescenti (fluocromi), spesso dotate di spiccata elettività.

L’oggetto appare colorato su un fondo più o meno scuro.



A parte una sorgente forte, possibilmente con buona emissione nell'UV (i soliti tubi a scarica in vapori di mercurio, o simili) e l'introduzione di opportuni filtri colorati, il sistema ottico è più o meno normale, con preferenza per gli obbiettivi a forte apertura.

Sommandosi con la tecnica confocale, la fluorescenza ha preso ampio sviluppo in campo biomedico poiché riduce uno dei fondamentali inconvenienti dell'osservazione in fluorescenza, cioè la luminosità diffusa del fondo immagine dovuta a tutti gli oggetti fuori fuoco.

La POLARIZZAZIONE si basa sulle proprietà ottiche degli oggetti birifrangenti (la maggioranza dei minerali, molti componenti dei tessuti, specialmente vegetali, fibre tessili, prodotti chimici, ecc.); essa richiede l'uso di filtri polarizzanti, eventualmente di opportuni "ritardatori" e "compensatori" birifrangenti, e qualche struttura particolare nello strumento.

Può fornire immagini ben contrastate e colorate, ma solo di oggetti birifrangenti; il cammino ottico qui non c'entra.

Su questo argomento esiste ampia letteratura, anche in questo sito (vedi: "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata", ecc.).

## BIBLIOGRAFIA

A.H. Bennett, H. Jupnik, H. Osterberg e O.W. Richards – Phase microscopy - Principles and Applications – J. Wiley, N.Y., Chapman & Hall, London, 1951.

H. Beyer – Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie, Akad. Verlagsgesellschaft. Geest & Portig K.-G. Leipzig, 1974.

H. Beyer e H. Riesenbergs – Handbuch der Mikroskopie – Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 (479 pagg., ricchissima bibliografia). *Testo completo e rigoroso, forse l'unico del genere, anche se un po' datato. Ricchissima bibliografia.*

G.C. Crossmon – The dispersion staining method ... – Stain Technology, **24**, 241 1949.

R. Danz – PlasDIC – a useful modification of the differential interference contrast ... – Photonik.

M. Françon – Le Microscope à contrastes de phase et le microscope interférentiel – Editions C.N.R.S., Paris, 1954.

G. Göke – Moderne Methoden der Lichtmikroskopie – Stuttgart, Franckh, Kosmos-Wissenschaft), 1988.

*Questo testo è aggiornato e chiaro, ma contiene molti passi copiati dal testo di Beyer e Riesenbergs e molte inesattezze. Si rivela una compilazione frettolosa. La bibliografia è abbondante.*

W.C. McCrone et al. – Polarized Light Microscopy – Ann Arbor, Mich., 1978.

*Testo dedicato alla determinazione di materiali in polvere con immersione colorata, luce polarizzata, ecc. Ampia bibliografia.*

J.P. Heath - Dictionary of microscopy – pagg. 352 - J. Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 2005. *Molti riferimenti al testo di D.B. Murphy, sottocitato.*

D.B. Murphy – Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging – J. Wiley – Liss, 2001.

*Testo interessante ed aggiornato, da leggere con cautela per sfrondarlo di vari (e numerosi) errori.*

G. Nomarski – Interféromètre à polarisation, French Patent 1.059.123, 1952.

M. Pluta – Mikrointerferometria w swietle spolaryzowanym, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1990.

M. Pluta – Variable-wavelength interferometry for optics and optoelectronics – Optoelectronics Review, 1/92, p. 3.

M. Pluta – Incidente-light double-refracting interference microscope with variable wavefront shear – Opt. Acta, **20** (1973), p. 625.

F.H. Smith – Microscopes, British Patent 639 014, Class 97(i), Group XX, 1947.