

## Art. n° 52 – I “VETRINI” Qualche precauzione

Abbiamo messo fra virgolette il titolo poiché il termine “vetrino”, in microscopia, è piuttosto ambiguo. Qui vogliamo occuparci dei “porta-oggetti”<sup>1</sup>, dei “copri-oggetti”<sup>2</sup>, e del “mezzo di montaggio” in cui viene immerso l’oggetto fra i due vetrini.

Si dice sempre che il “cuore” del microscopio è l’obbiettivo, magari accompagnato dall’oculare e da qualche altro elemento. Ma i vetrini non hanno il loro posto?

Non sappiamo che il copri-oggetti sta fra oggetto ed obbiettivo? E quindi fa parte del sistema formatore d’immagine?

Nel confezionare un preparato per un oggetto da osservare al microscopio in trasparenza, vale a dire parlando dei normali preparati per la diascopea, si compra una scatola di porta-oggetto, una di copri-oggetto ed un bottigliino di “balsamo del Canada”, e non ci si pensa più.

Ma è meglio non fidarsi troppo.

Vogliamo ora esporre qualche esame che è stato eseguito su una ventina di confezioni (di diverso fabbricante o distributore) di porta-oggetti ed una decina di confezioni di copri-oggetti.

Le foto che seguono, salvo diversa indicazione, sono state riprese con un obbiettivo Zeiss Jena, Phv, 40/0,65, acromatico, a contrasto di fase – contrasto positivo<sup>3</sup>.

Nel caso dei portaoggetti, essi sono stati coperti da un copri-oggetti di spessore normalizzato. Fra i due vetrini non è stato posto alcun oggetto, solo uno straterello di olio d’immersione, al fine di simulare la normale struttura di un preparato confezionato con “balsamo”.

Sei campioni di porta-oggetti e tre di copri-oggetti, fra tutti quelli esaminati (quindi, in percentuale non trascurabile), hanno rivelato delle irregolarità nella superficie, ed a quelli si riferiscono le foto seguenti. In condizioni normali, lavorando in fondo chiaro con apertura normale, con sezioni sottili o strisci colorati montati in resina, tali irregolarità sono appena percettibili e normalmente ignorate. Ma capita spesso, in campo naturalistico o biologico, di esaminare sospensioni acquose di microrganismi, cellule, batteri o particelle. In questo caso, l’indice dell’oggetto (sostanzialmente acqua) e quello dei vetrini è diverso, e ciò rende evidente ogni variazione di cammino ottico, cioè ogni deviazione da una superficie piana del vetrino, e qualunque disomogeneità dell’indice.

Soprattutto, nei casi appena elencati, si lavora spesso in contrasto di fase, e tutte le irregolarità citate appaiono con contrasto rinforzato.

Ecco perché, salvo diversa indicazione, le foto sono state riprese proprio in contrasto di fase: è quella la situazione più critica.

Le prime tre foto mostrano, alla superficie superiore di diversi porta-oggetti, delle macchioline chiare; potrebbe trattarsi di piccoli incavi (minor cammino ottico), ma lo straterello d’olio da immersione che copre il vetrino dovrebbe far scomparire la loro immagine a causa dell’eguale indice. L’origine di quelle macchioline deve essere un’altra. Infatti, le macchioline chiare si sono presentare sia col vetrino “montato” in olio, sia con lo stesso vetrino senza olio, col copri-oggetti semplicemente poggiato sopra.

Potrebbe trattarsi di piccole disomogeneità nel vetro, un condensarsi di uno dei componenti del vetro stesso, di minore indice, ma è strano che tali disomogeneità siano tutte disposte alla superficie del vetrino.

Primo mistero.

---

<sup>1</sup> In francese: “lame”; in inglese “slide”, in tedesco “Objektglas” o “Objektträger”.

<sup>2</sup> In francese: “lamelle”; in inglese “coverglass”, in tedesco “Deckglas”.

<sup>3</sup> La variante positiva del contrasto di fase fa apparire più scuri gli oggetti (piccoli) con un indice più elevato del mezzo circostante (vedi in questo sito l’art. n° 25, “La formazione dell’alone...” e l’art. n° 33, “Le Tecniche di Contrasto”).

Intanto, si può dire che, esaminando uno striscio di sangue o cellule sferoidali, le macchioline chiare potrebbero apparire come cellule, sia pure prive di struttura, e dare un risultato falso.

Fig. 1

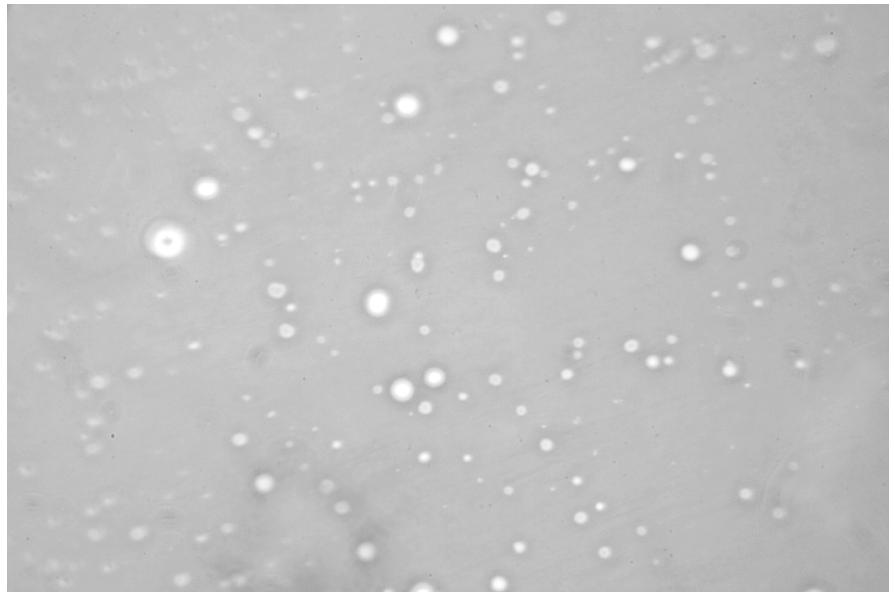


Fig. 2

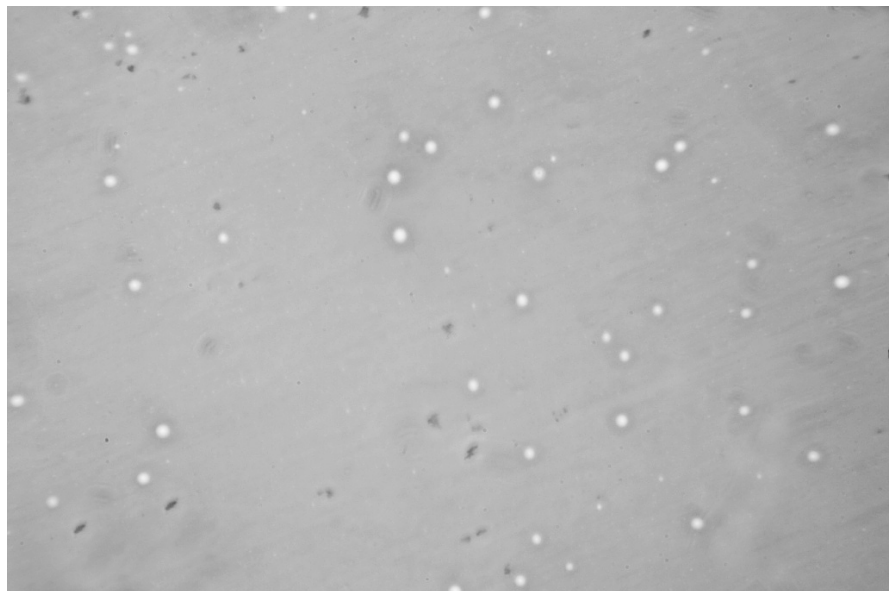


Fig. 3 – Nei tre campioni, sono diverse le dimensioni delle macchioline, ma l'aspetto è identico.

Il sistema ottico del microscopio è sempre lo stesso.

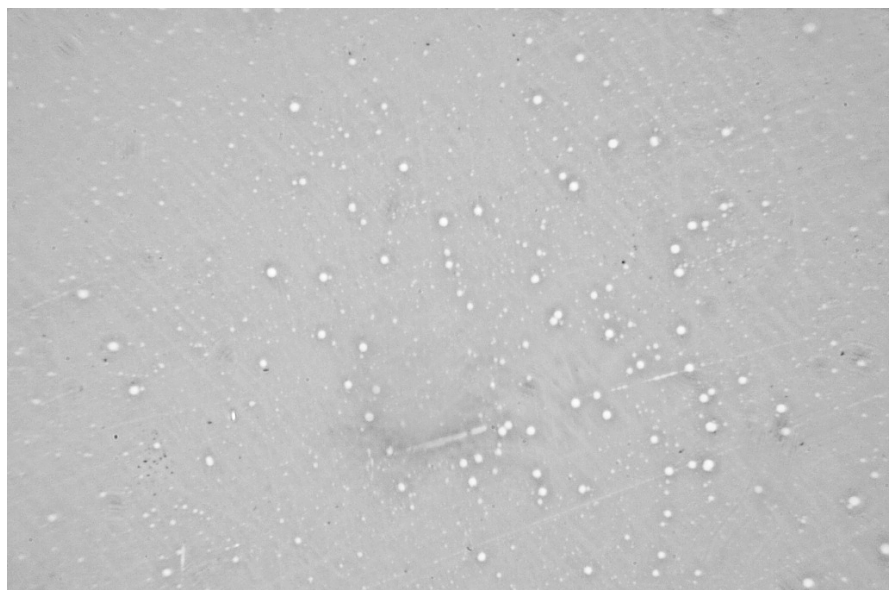


Fig. 4

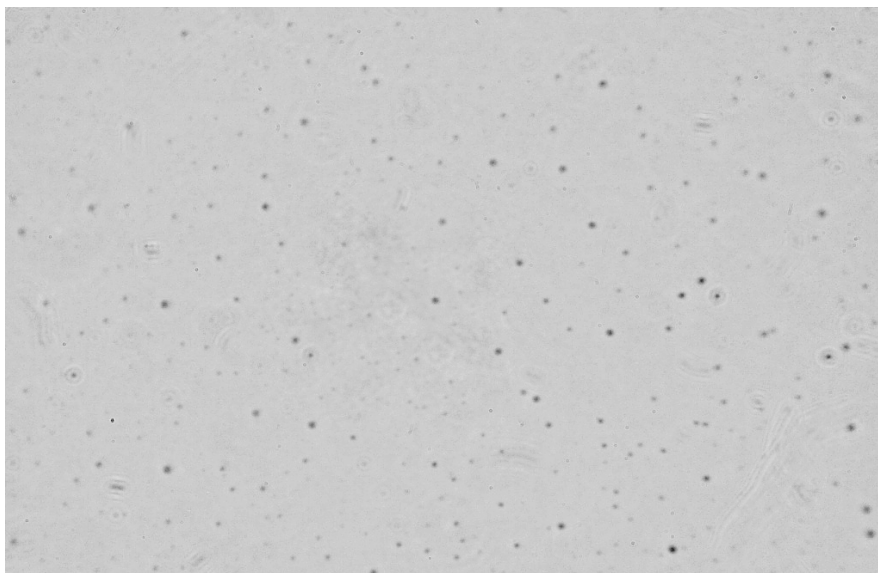


Fig. 5

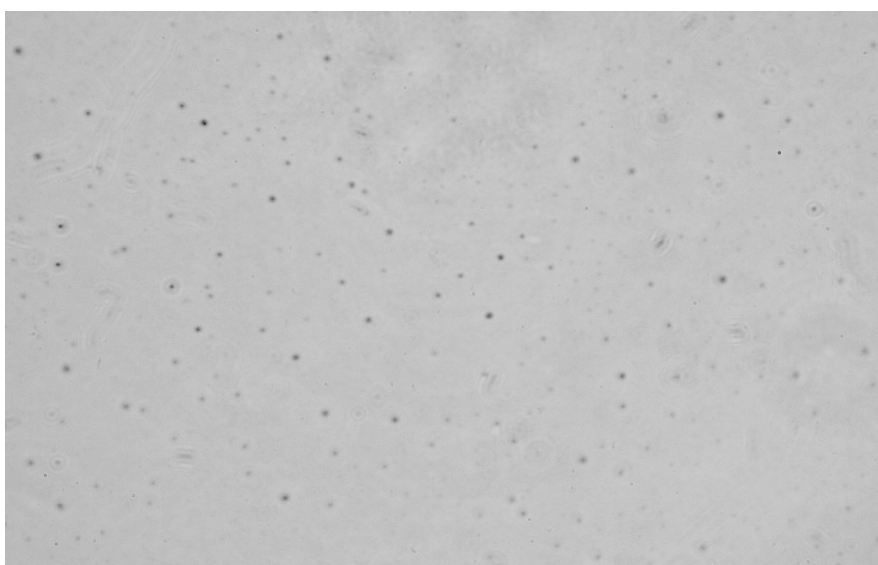
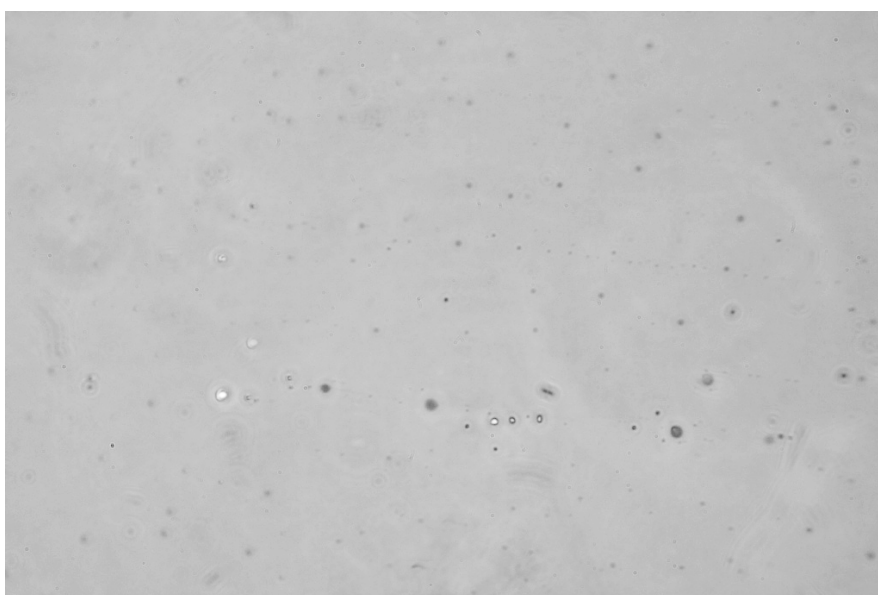


Fig. 6



In questi altri tre casi, le irregolarità del vetrino (porta-oggetti) appaiono come macchioline, ancora più piccole, ma scure. Potrebbe trattarsi di piccole protuberanze del vetro oppure di componenti più rifrangenti all'interno del vetro. La prima ipotesi è la più accettabile poiché, anche qui, le macchioline si trovano tutte alla superficie del vetro.

Fig. 7

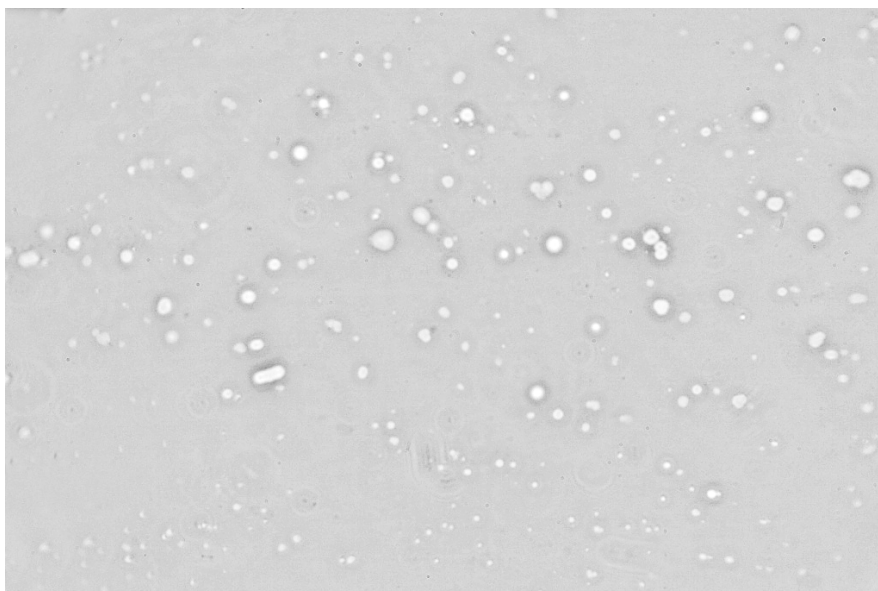


Fig. 8



Nelle due foto qui sopra appare il caso di un porta-oggetti che è stato fotografato prima in contrasto di fase (Fig. 7), come nelle foto da 1 a 6, e poi in fondo chiaro (Fig. 8).

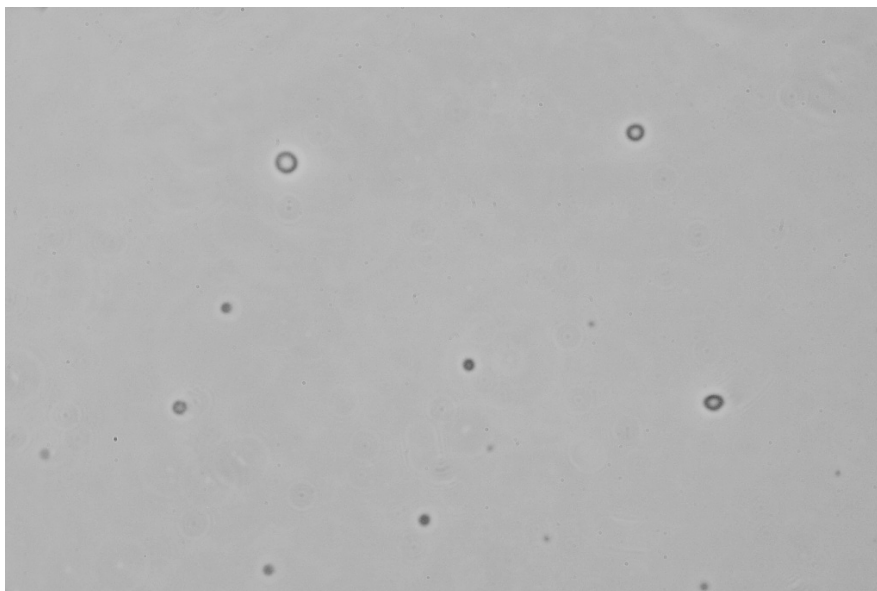
Si conferma quanto detto all'inizio: in fondo chiaro i difetti osservati nei vetrini sono appena percettibili.

Il problema si pone allora in contrasto di fase, specialmente quando il mezzo di montaggio è acquoso, e non una delle solite resine con indice simile a quello del vetro.

Per quanto riguarda i copri-oggetti, su tre dei campioni esaminati si sono visti dei puntini scuri, simili a quelli delle figg. 4 o 5, probabilmente della stessa origine.

Tale origine andrebbe cercata nei processi di fabbricazione dei vetrini, nella composizione chimica di essi, nei trattamenti termici subiti, ecc.

Fig. 9



Nella foto qui sopra vediamo invece un copri-oggetti con delle nitide bollicine di notevoli dimensioni (qualche  $\mu$ ). Un unico caso fra quelli esaminati, che può lasciare traccia nell'immagine finale.

Un tale caso dimostra, più di quelli precedenti, compresi i porta-oggetti, che le irregolarità osservate tendono sempre ad avere una forma circolare o sferoidale.

Questo non deve stupire: prima di diventare solido al termine del processo produttivo, il vetro è liquido e qualunque suo componente, liquido o gassoso, non perfettamente sciolto nella massa, tenderà ad formare delle bollicine sferiche, se non altro per ragioni di tensione superficiale, come fanno le bollicine di anidride carbonica nella schiuma delle gazzose.

Ora occupiamoci del “mezzo di montaggio”, quel liquido, spesso destinato a solidificare, in cui è immerso l'oggetto prima di venire “montato”, cioè racchiuso fra porta-oggetti e copri-oggetti.

Anche questo straterello fa parte del sistema formatore d'immagine. Una sua irregolarità di fase (variazioni di spessore o indice di rifrazione) non porta in genere a difetti avvertibili nell'immagine poiché tale “oggetto” si trova nel piano oggetto dell'obbiettivo, lontano dalla lente. Ma in compenso, poiché quello straterello è a fuoco assieme all'oggetto, ogni variazione di ampiezza (granuli opachi) sarà vista come una macchia scura nell'immagine finale.

Il mezzo d'inclusione quindi può essere non perfettamente omogeneo dal punto di vista dell'indice, ma deve essere privo di qualunque corpo opaco.

Come abbiamo detto, nel caso di oggetti vivi o simili, il mezzo è acqua. Ed il preparato è definito “temporaneo”.

In casi particolari, soprattutto per i microrganismi, se si cerca una conservazione permanente, si usano invece liquidi speciali: gelatine varie, gelatina glicerinata, resina dammar<sup>4</sup>, resina cumarone<sup>5</sup>, ecc. Nel caso dei frustuli di diatomee o in pochi altri, al fine di aumentare il contrasto, si usavano mezzi ad alto indice che vanno sotto vari nomi, come nafrax, stirax<sup>6</sup>, liquidambar<sup>7</sup>, balsamo di Tolu<sup>8</sup>, ecc. Per preparati non permanenti si usano (o si usavano) il mono-bromonaftalene, lo ioduro di metilene, lo zolfo sciolto in solfuro di carbonio, il solfuro d'arsenico, il solfuro d'antimonio, l'acido arsenioso, ecc. Oggi esistono numerosi composti più efficaci.

<sup>4</sup> La resina dammar è estratta da varie piante tropicali asiatiche, della famiglia Dipterocarpacee.

<sup>5</sup> Il cumarone è un benzofurano oleoso, incolore, ottenuto dalla distillazione del catrame di carbon fossile. Polimerizzato con indene, dà le resine cumaroniche.

<sup>6</sup> È la resina dello *Styrax orientalis* – indice: 1,63.

<sup>7</sup> È la resina del *Liquidambar styracifera*

<sup>8</sup> È la resina del *Balsamodendron toluifera* – indice: 1,64.

Qui vogliamo limitarci alle resine usate normalmente per i preparati permanenti (strisci, polveri, fibre, sezioni sottili ottenute dopo l'inclusione in paraffina, celloidina o simili, ecc.).

Molto tempo fa, ci si contentava della "tremantina di Venezia", che era la resina dell'*Abies pectinata*.

Fino alla metà del secolo scorso, la più diffusa resina era il "balsamo del Canada", una resina naturale tratta per purificazione dalla resina di un paio di conifere del Nord-America (*Abies balsamea*, *Abies canadensis*).

Tale resina "naturale" è diventata sempre più rara e costosa, per giunta poco gradita per alcuni difetti: – ingiallisce col tempo – è fluorescente – non sempre è chimicamente neutra ed occorre neutralizzarla – se sciolta in xilolo, come si fa di solito, richiede settimane o mesi per indurire.

In compenso, il balsamo "naturale" è insostituibile per alcuni vantaggi: – è quello che aderisce meglio al vetro – non "si ritira", lasciando che l'aria penetri fra i due vetrini e renda inservibile il preparato – se di buona qualità, mantiene i suoi vantaggi per decenni – se, durante il montaggio, trascina con sé qualche bollicina d'aria, non c'è che aspettare, e dopo pochi giorni l'aria si scioglie nella resina e scompare da sola.

Oggi, invece, si trovano in commercio innumerevoli resine sintetiche vendute come "balsamo", a volte perfino come "balsamo naturale": ma occorre diffidare.

Le ragioni della loro diffusione sono varie: – costano poco – seccano in fretta (poche ore) – non sono fluorescenti – non ingialliscono. Ma, come il solito, c'è il rovescio della medaglia: – le resine sintetiche aderiscono male al vetro e, col tempo, formano uno straterello che si stacca dai vetrini, magari portando con sé la fettina – si ritirano molto e, anche dopo poche settimane, l'aria s'infiltra fra i due vetrini ed il preparato è da buttare.

Vediamo qualche esempio.

Fig. 10 – Un preparato di diatomee da Las Vegas, confezionato da qualche anno con una resina sintetica, è reso quasi inutilizzabile poiché l'aria si è infiltrata profondamente fra i due vetrini.

Le linee scure sinuose segnano proprio il confine fra aria e resina.

Obiettivo 6:1 – fondo chiaro.

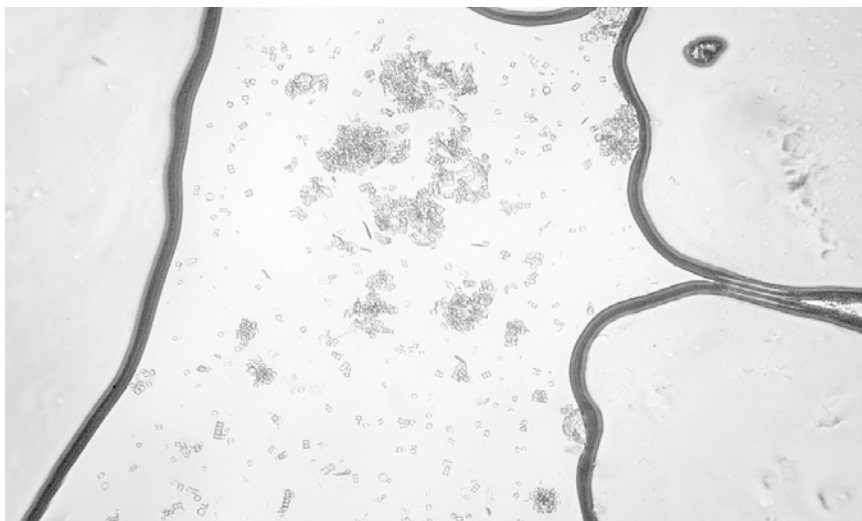


Fig. 11 – Questo preparato (sezione a mano, trasversale e longitudinale, di un fungo – *Fomitopsis pinicola*) è di due anni fa.

La resina sintetica (non facciamo il nome per pudore) non perdona. È ben vero che l'oggetto è spesso qualche decimo di mm, e, con una normale sezione sottile istologica, il processo sarebbe molto più lento, ma non si sfugge.

Macrofoto. 2,5:1.





Un altro difetto di molte resine sintetiche è quello di formare al proprio interno, con gli anni, delle minuscole concrezioni che si sovrappongono all'oggetto.

Si tratta d'impurezze dovute a reazioni chimiche imprevedibili e difficilmente identificabili. Qualche esempio, sempre senza fare nomi.

Fig. 12 – Sezione di embrione di topo. Dopo una decina d'anni, c'è la sorpresa.

Sempre l'obbiettivo a contrasto di fase 40/0,65.

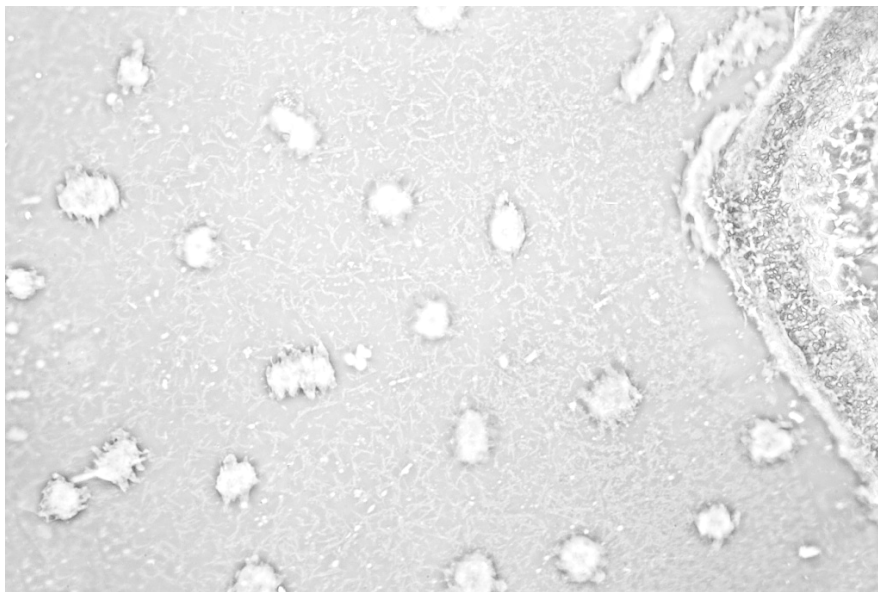


Fig. 13 – Le concrezioni sono simili a quelle del caso precedente ma, in più, si sono formate delle piccole druse di cristalli aghiformi, anche belle da vedere in radiazione polarizzata, ma disturbanti.

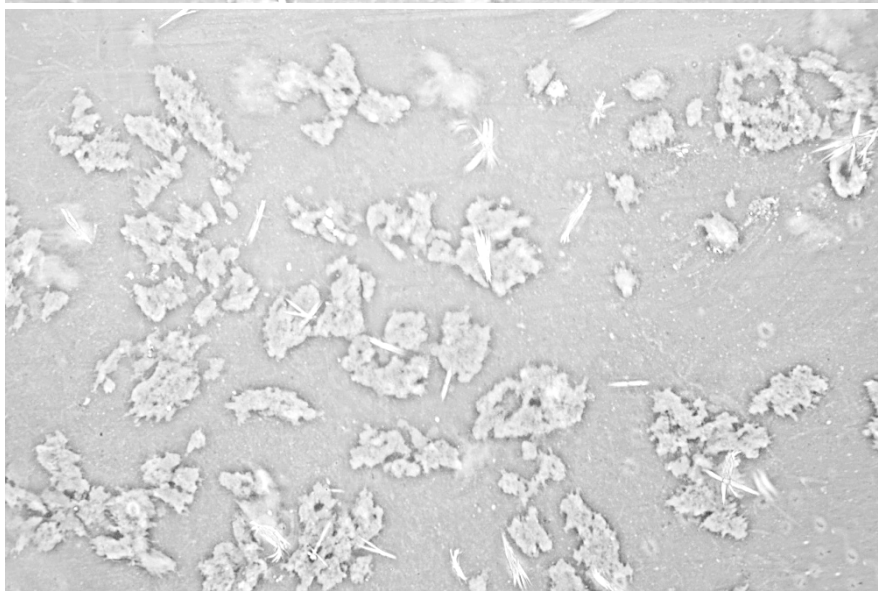


Fig. 14 – Qui, i corpi estranei hanno forma più rotondeggiante, tanto da far pensare ad inclusioni liquide.



Fig. 15 – Sezione di arteria.

Le inclusioni sono più piccole, ma ugualmente fastidiose.

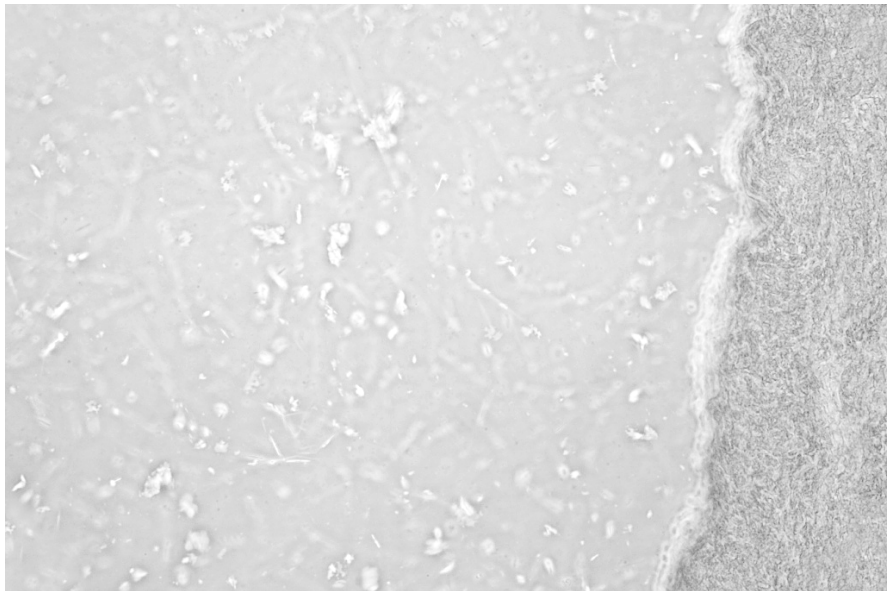


Fig. 16 – Sezione della parete dello stomaco di topo (superficie interna).

In questo caso, le concrezioni sono di dimensioni e di forme assai variabili.



Ancora un'indicazione: il tempo non solo altera le caratteristiche dei mezzi di montaggio, ma anche i vetrini possono trarne danno.

Sembra impossibile che anche il vetro subisca danni spontanei col passare del tempo; magari il vetro in sé, no, ma l'umidità favorisce la proliferazione di funghi inferiori, anche sui vetrini. Tali vegetali formano alla superficie del vetro una ragnatela di sottili filamenti, le "ife", che ne costituiscono il corpo vegetativo.

In ambiente umido, anche in pochi mesi, alcuni vetrini mostrano queste proliferazioni. Se l'attacco è recente, una pulizia con alcool può bastare e sul vetro non resta traccia. Ma, dopo qualche anno, il vetro resta intaccato permanentemente: ogni ifa del fungo scava alla superficie un sottile solco indelebile.

Questo fenomeno si presenta naturalmente anche alla superficie delle lenti e di tutti gli elementi in vetro di qualunque strumento ottico. A volte, l'intero strumento diventa inservibile (vedi in questo sito, ad es., la scheda tecnica n° 98, pag. 769 e segg.).

Ancora una volta, la composizione chimica dei vetrini è varia e la possibilità di attacco da parte dei funghi lo è altrettanto. Sarà da vedere volta per volta. Ma, anche in questo caso, la conservazione dei preparati a lungo termine prevede un ambiente asciutto.

Ora, per essere completi, dopo aver fatto tanta maldicenza sulle resine sintetiche delle foto precedenti, andiamo a vedere cosa succede col balsamo del Canada naturale.

Nelle foto che seguono un reticolo Ronchi a righe, montato trent'anni fa con balsamo rigoro-



samente naturale, mostra qua e là qualche difetto.

Fig. 17 – Anche il balsamo del Canada naturale, col tempo, può, mostrare queste arborescenze.

L'obbiettivo usato è lo stesso per le due foto qui di lato, 16:1, per contrasto di fase.

Le righe opache del reticolo appaiono chiare poiché si tratta di un "oggetto di fase", per il quale la formazione del contrasto (in contrasto di fase) è anomala.

Sono evidenti le alterazioni dell'omogeneità del mezzo di montaggio.

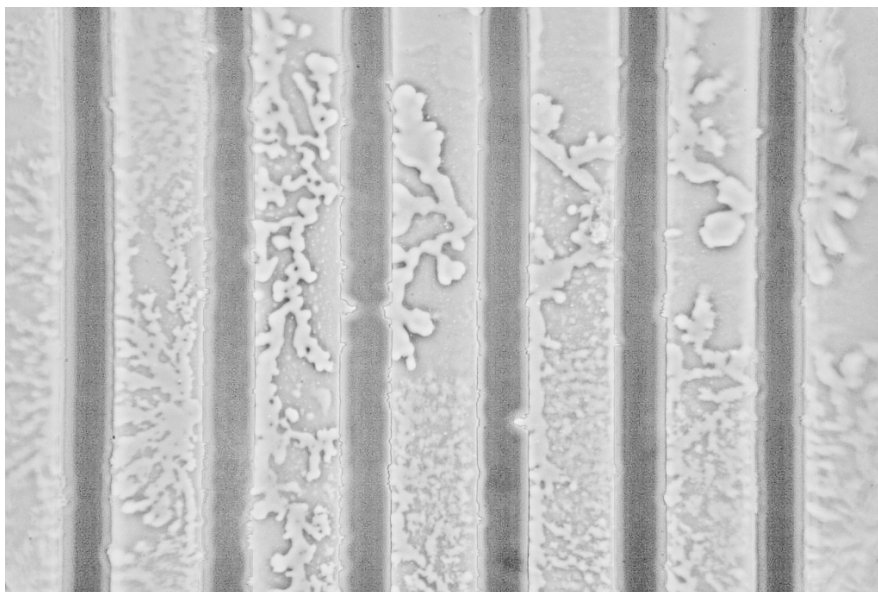
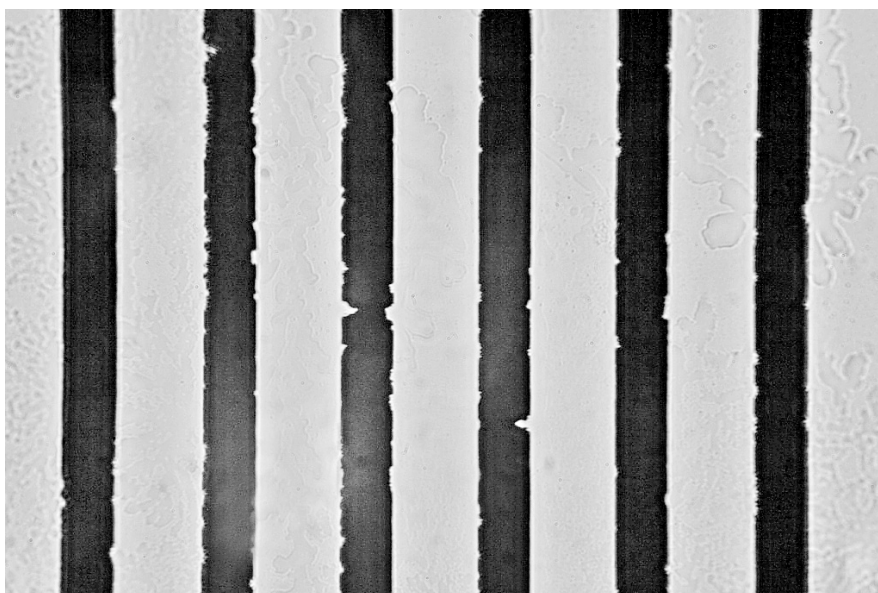


Fig. 18 – Lo stesso vetrino, in fondo chiaro e col medesimo obbiettivo, mostra un'immagine con i contrasti previsti, mentre le arborescenze della foto precedente sono quasi impercettibili.

Ancora una volta, le irregolarità nella superficie dei vetrini e nel mezzo di montaggio appaiono in evidenza quasi solo in contrasto di fase.

Basta saperlo ...



Questo raro fenomeno di alterazione del balsamo naturale è favorito dal fatto che esso, sui bordi del copri-oggetti, si secca rapidamente; la parte interna, invece, resta fluida per tempi lunghissimi essendo protetta dall'evaporazione (di eventuali componenti volatili) dal bordo già disseccato.

Questa, per inciso, è la ragione per cui le bolle d'aria in esso scompaiono rapidamente: il miscuglio resta liquido all'interno dello straterello per tempi assai lunghi e consente la dissoluzione delle bolle d'aria.

La lunga permanenza allo stato liquido del balsamo, in compenso, può favorire qualche processo chimico che porta alla separazione dei vari componenti.

Occorre dunque qualche attenzione nella scelta e nella conservazione dei vetrini, ancora da usare e già "montati", e qualche controllo sul loro stato, a distanza di tempo.