

## IL MICROSCOPIO

## PRINCIPI DI MICROSCOPIA OTTICA

Il microscopio, come indica lo stesso termine derivante dal greco, serve per ingrandire e quindi rendere visibile l'immagine di oggetti piccolissimi, diversamente invisibili ad occhio nudo.

Il microscopio oggi è diventato un'unità operativa tanto poliedrica quanto indispensabile.

Non solo il naturalista o lo studioso di medicina, ma ben più estesi ambienti si servono oggi delle varie metodiche di microscopia.

Questa estensione di impiego fa sì che il microscopio venga utilizzato non solo dal microscopista specializzato, bensì anche, ed in misura crescente, da operatori tecnici completamente privi di esperienza nel campo della microscopia.

### Costruzione

Il microscopio meccanicamente è costituito da:

- un basamento metallico molto robusto (Stativo)
- un tubo binoculare per l'osservazione
- un sistema di illuminazione.

### STATIVO

Nello stativo sono incorporati:

- il percorso ottico utilizzato dall'illuminazione e alloggiato nel piede dello stativo. In alcuni microscopi vi è anche contenuto tutto il gruppo di illuminazione (composto da lampada, portalampana ed alimentatore).

- I meccanismi di micro e macrometrica che consentono ad un tavolino porta oggetto di muoversi con movimenti veloci (macrometrica) o con movimenti lentissimi (micrometrica).

- I Diaframmi

Nel microscopio ci sono due diaframmi: Diaframma di campo e Diaframma di apertura, entrambe con delle funzioni ben precise.

#### Il Diaframma di campo

Serve a dimensionare il fascio luminoso sull'oggetto, fino a farlo coincidere con il campo visivo del microscopio; trova posto nel piede dello stativo.

#### Il Diaframma di apertura

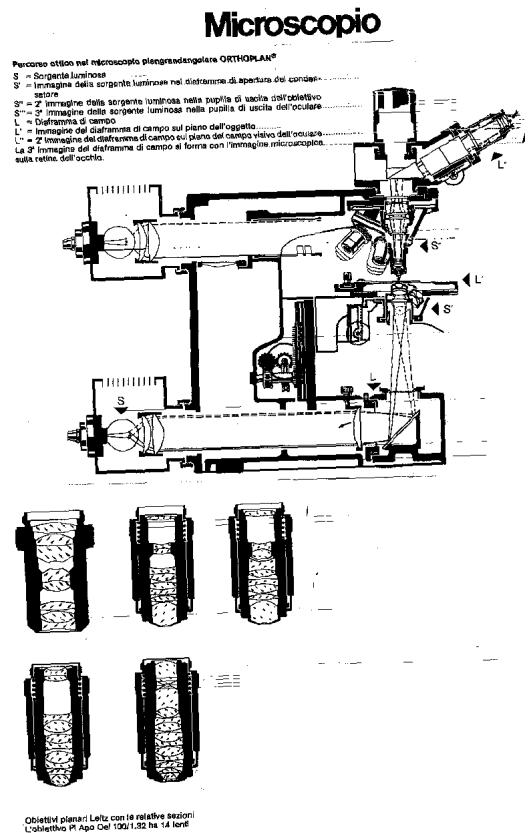
Serve a diaframmare l'immagine della sorgente luminosa ed inviare così al piano focale posteriore dell'obiettivo il necessario fascio d'illuminazione.

Altro compito del diaframma di apertura è quello di aumentare la profondità di campo (bisogna utilizzarlo con raziocinio perché si perde in risoluzione oltre alcuni limiti).

Normalmente è posizionato nel condensatore, (nei microscopi dell'ultima generazione il diaframma di apertura è posto nel piede dello stativo vicino al diaframma di campo).

Per determinare l'esatta apertura del diaframma, per ogni obiettivo, si opera nel seguente modo:

guardandolo dentro al tubo binoculare, dopo aver tolto un oculare, si apre completamente il diaframma di apertura e successivamente lo si chiude lentamente, così facendo si renderà visibile l'immagine del diaframma nella lente posteriore dell'obiettivo, questa immagine dovrà coincidere con il diametro del campo visivo del tubo binoculare. A questo punto l'apertura di illuminazione è uguale all'apertura dell'obiettivo. Questa posizione è la posizione ideale del diaframma per oggetti ben definiti e molto contrastati. Se invece il preparato non



é ben definito e ci sono delle strutture quasi impercettibili, bisogna chiudere notevolmente il diaframma fino ad un massimo di 2/3 e non oltre, diversamente si creano dei fenomeni di rifrazione.

- Sulla testa dello stativo si trova un bocchettone di attacco, ove prende posto il tubo binoculare. Nella parte inferiore si trova il revolver porta- obiettivi che può essere quadruplo o quintuplo o sestuplo.

### TUBO BINOCULARE

Ha il compito di supportare gli oculari ed eventualmente l'uscita per il sistema fotografico. Dentro il tubo binoculare trovano posto una serie di prismi che hanno il compito di dividere il fascio luminoso proveniente dall'obiettivo, in due fasci perfettamente paralleli che finiscono negli oculari, ed eventualmente in un fascio destinato al sistema fotografico. La scelta degli oculari supportati dal tubo binoculare é molto importante, poiché ne esistono con vari ingrandimenti, la scelta viene dettata dalla seguente relazione:

**Ingrandimento finale alla visione = ingrandimento obiettivo x ingrandimento oculare**, tale prodotto deve essere compreso fra 500 e 1000 volte l'apertura numerica dell'obiettivo, con bassi e medi ingrandimenti si può scendere sotto il valore di 500 (possibilmente utilizzando oculari a bassi ingrandimenti) ciò aumenta la limpidezza ed il contrasto, invece nel caso che si abbiano piccoli dettagli ben contrastati, dovrebbero essere esaminati con un risultato del prodotto, nella zona alta verso 1000.

### GRUPPO DI ILLUMINAZIONE

Di solito nei microscopi da ricerca (di una certa classe) il gruppo di illuminazione é racchiuso in una scatola metallica chiamata edicola dove prendono posto, lo zoccolo porta lampada, lo specchio di riflessione e la lente colletttrice, tramite delle manopole, e poste esternamente la scatola metallica, possiamo centrare la lampada rispetto allo specchio, ed anche muovere la lente colletttrice per concentrare o allargare il fascio luminoso. Il fascio luminoso proveniente dall'edicola deve essere perfettamente in asse con il condensatore, che ha il compito di illuminare uniformemente il vetrino porta oggetto, ed é posto immediatamente sotto il tavolino porta oggetto. Per essere sicuri che il condensatore é perfettamente in asse con il sistema di illuminazione, ed evitare degli sbilanciamenti di illuminazione nel campo visivo, si effettua la centratura del condensatore secondo Koeler;

spingere il condensatore fino alla battuta superiore, chiudere il diaframma di apertura (in alcuni microscopi si trova nel condensatore, in altri nel piede del microscopio), chiudere il diaframma di campo, mettere a fuoco i bordi del diaframma di campo, (alzando o abbassando il condensatore) che deve essere coassiale con il campo visivo, qualora il condensatore non fosse in asse, tramite le due viti poste ai lati di esso si effettua la centratura, effettuata la centratura, aprire il diaframma di campo ed il diaframma di apertura. Nella microfotografia é molto importante l'illuminazione, che deve fornire, una temperatura colore costante di 3200 cK, e una notevole quantità di luce che permetta di avere dei tempi di esposizione molto brevi in fase di ripresa. Perché come per gli stereo microscopi, maggiormente per il microscopio, eventuali vibrazioni si moltiplicano per l'ingrandimento finale, per gli effetti ne subisce la qualità dell'immagine.

### GLI OBIETTIVI PER IL MICROSCOPIO

Gli obiettivi sono la cosa più importante del microscopio da essi dipende tutto ciò che riusciamo a vedere e il modo di vederlo. Gli

obiettivi possono essere: Acromatici, Pianari NPL, Plan apocromatici PL Apo.

## Ottica di Immagine dei microscopio

### Visione diretta

Se guardiamo un oggetto, questo viene riprodotto sulla retina dell'occhio secondo le leggi dell'ottica geometrica

Grandezza e distanza dell'oggetto determinano la grandezza dell'immagine sulla retina e l'angolo visivo con cui l'occhio osserva l'oggetto. Se l'oggetto è molto piccolo o molto lontano anche l'angolo visivo diventa molto piccolo. L'occhio ha un angolo visivo limite (circa 1 grado), sotto il quale non si percepiscono più i dettagli dell'oggetto stesso. Se si vogliono rendere visibili i dettagli dell'oggetto, che cadono sotto l'angolo limite, bisogna ingrandire l'angolo di visione. Un occhio normale può vedere nitidamente, oggetti posti fra l'infinito e 200 mm che rappresentano la distanza minima di visione, a questa distanza il cristallino dell'occhio assume la massima curvatura (distanza minima = punto prossimo). In ottica la distanza standard per il calcolo delle lenti (punto prossimo) è di 250mm.

## LENTE E MICROSCOPIO

Il microscopio nella sua forma più semplice è rappresentato da una lente di ingrandimento, la combinazione di più sistemi di lenti da il microscopio nella sua forma più completa.

Per aumentare l'ingrandimento è necessario l'ausilio di uno strumento

ottico. Il più noto ed elementare di questi è la lente semplice per la quale l'ingrandimento viene calcolato con la formula

$I = \text{ingrandimento}$

$I = 250 \text{ mm} : f_{\text{mm}} \quad \text{opp.} \quad f = 250 \text{ mm} : I$

Per migliorare l'immagine si costruiscono sistemi ottici composti da più lenti incollate fra di loro. Per ragioni fisiche meccaniche la costruzione di un sistema ottico capace di dare forti ingrandimenti crea molteplici problemi costruttivi.

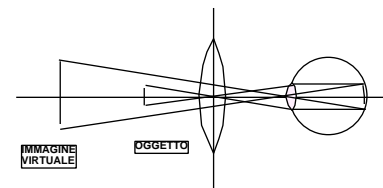
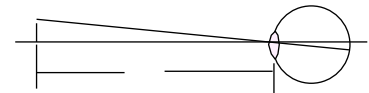
Si è giunti alla determinazione logica di ottenere gli alti ingrandimenti con due sistemi ottici corretti ed accoppiati, questo sistema ottico è il Microscopio.

Il compito del microscopio è quello di presentare all'occhio oggetti molto piccoli con un grande angolo, visivo. L'elemento centrale del sistema è l'obiettivo che proietta un'immagine reale ed ingrandita in un primo piano (primo stadio). I dettagli che non sono contenuti in questa immagine, proiettata ad una certa distanza dal piano oggetto, non potranno successivamente essere resi visibili con nessun altro mezzo. L'immagine reale capovolta fornita dall'obiettivo viene chiamata anche immagine intermedia poichè si tratta di un "risultato intermedio".

L'immagine intermedia può essere vista senza oculare, su di un vetro smerigliato, tralasciando nel tubo di osservazione (senza oculare) o anche osservando ad una distanza di 250 mm.

Nel secondo stadio l'immagine intermedia viene osservata attraverso l'oculare che si comporta esattamente come una lente d'ingrandimento. L'occhio che si trova nella pupilla d'uscita dell'oculare, vede dunque un'immagine dell'oggetto ancora ingrandita.

Qui di seguito vogliamo trattare ora il potere d'ingrandimento, il potere risolutivo, il campo visivo e la qualità dell'immagine di un microscopio. Sono queste le caratteristiche delle ottiche di un microscopio che interessano principalmente l'utilizzatore, precisamente obiettivi, oculari e ottica intermedia.



Per l'ingrandimento totale di un microscopio si ha dunque: ingrandimento (convenzionale) del microscopio = Ingrandimento reale dell'obiettivo x ingrandimento convenzionale dell'oculare.

Se si tratta di un microscopio con ottica intermedia nel porta obiettivi o nel tubo si deve tener conto anche del suo fattore d'ingrandimento. In questo caso per l'ingrandimento del microscopio vale la relazione **I microscopio = I R obiettivo X I oculare X F ottica intermedia**

I relativi valori sono stampati sugli obiettivi, sugli oculari, sui porta obiettivi (revolver), o sui tubi.

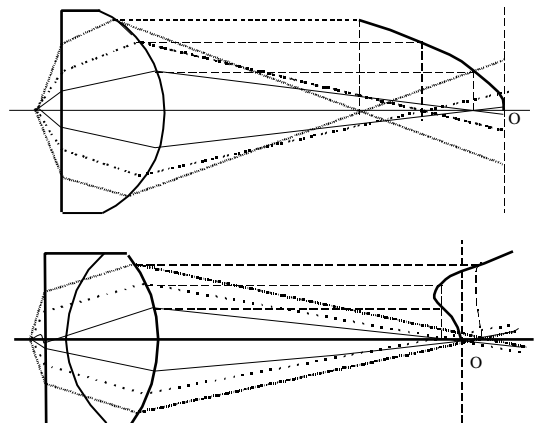
### DIFETTI DELL'IMMAGINE E LORO CORREZIONE

La prestazione ottimale di un sistema ottico viene raggiunta soltanto con uno stato di correzione ottica elevato. Questa premessa deve essere soddisfatta tanto più rigidamente quanto più sono aperti i cono dei raggi d'illuminazione, cioè quanto maggiore è l'apertura numerica degli Obiettivi. Purtroppo non è possibile costruire sistemi ottici assolutamente privi di difetti neppure teoricamente. Quasi sempre cercando di correggere un determinato difetto se ne provocano altri; tuttavia, con l'ausilio dei moderni mezzi di correzione, è possibile (e questo è determinante) ridurre al di sotto dei limiti di percezione i difetti dell'immagine che disturbano. Questi obiettivi sono tuttavia molto costosi. Vengono perciò tollerati difetti residui perciò gli obiettivi vengono classificati in funzione del loro grado di correzione.

### ABERRAZIONE SFERICA

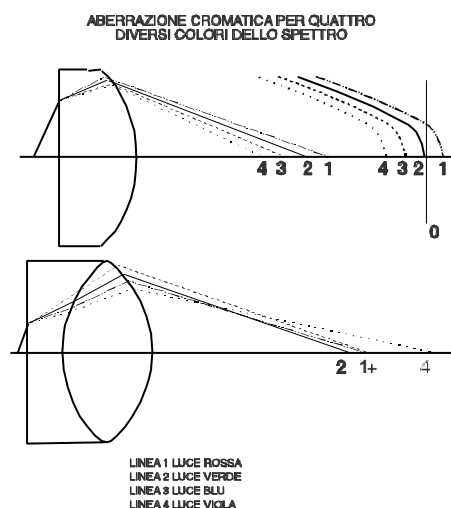
Se si invia una luce monocromatica attraverso una lente convergente semplice si nota che i raggi provenienti da un punto dell'oggetto non si riformano nuovamente in uno stesso punto. Ovvero la luce viene rifratta maggiormente sui margini che in vicinanza dell'asse ottico. Questo difetto provocato dalla forma sferica delle superfici delle lenti viene denominato appunto aberrazione sferica. Esso è tanto più rilevante quanto maggiore è l'apertura numerica della lente rispetto alla sua lunghezza focale; Si parla perciò anche di "difetto di apertura" di un obiettivo. Esso non può essere eliminato completamente, nelle lenti a superfici sferiche. È possibile invece correggerlo in modo rilevante con sistemi ottici costituiti da lenti convergenti e divergenti,

CORREZIONE DELL'ABERRAZIONE SFERICA CON UN SISTEMA OTTICO COSTITUITO DA LENTI CONVERGENTI E DIVERGENTI



### ABERRAZIONE CROMATICA LONGITUDINALE

Per l'osservazione visiva l'utilizzatore del microscopio non si serve di luce monocromatica ma di luce bianca che è composta di luce di tutte le lunghezze d'onda fra 400 e 800 nm. Se



questa luce viene fatta passare in una lente si scompone nei singoli colori (dispersione). Nel passaggio attraverso la lente le varie lunghezze d'onda verranno rifratte con un angolo diverso, esempio: la luce rossa viene rifratta meno rispetto a quella violetta che è rifratta più di tutte. Per correggere questo difetto si combinano lenti di vetri con diverso indice di rifrazione e diversa dispersione.

Se si determinano ora le differenze delle lunghezze d'intersezione per 4

colori per alcune altezze d'incidenza, e se si compongono graficamente si ottengono 4 curve che riflettono la correzione cromatica di un sistema ottico. In pratica si impiegano le lunghezze d'onda, lampada = 656 nm rosso, 546 nm

verde, 486 nm blu, 405 nm viola poiché queste o per linee di Fraunhofer ad esse molto prossime i relativi dati ottici dei vetri possono essere determinati facilmente e con sicurezza con le moderne lampade spettrali. Scopo del calcolo ottico è di far coincidere le lunghezze d'intersezione per due o tre colori, ricorrendo ad appropriate combinazioni di lenti con vetri a diversa rifrazione della luce

### ASTIGMATISMO E CURVATURA DEL CAMPO IMMAGINE

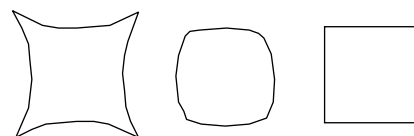
Quando con un sistema ottico, si riproduce un punto di un oggetto piano, adiacente all'asse ottico, necessiterebbe, affinché l'osservazione risulti ottimale, che al punto dell'oggetto in esame corrisponda nel piano dell'immagine un punto. In realtà, con un obiettivo non corretto astigmaticamente si originano due punti immagini a distanza diversa dal piano su cui giace l'immagine. Questo errore è tanto più grande quanto più il punto oggetto è distante dall'asse ottico. Di conseguenza da un oggetto piano si originano due superfici immagine di diversa curvatura. Con un tale sistema non è possibile ottenere un'immagine completamente a fuoco, fino ai bordi del campo. Questo difetto d'immagine viene designato come astigmatismo = Immagine non puntiforme. Con correzioni appropriate si può ottenere che le due superfici immagine abbiano la stessa curvatura. In questo modo viene eliminato l'astigmatismo, ma l'immagine resta ancora curva. Questa curvatura del campo immagine non può essere corretta con obiettivi da microscopio di tipo semplice.

Il raggio di curvatura della superficie immagine corrisponde circa alla lunghezza focale dell'obiettivo. Si capisce così come l'errore disturbi particolarmente con gli obiettivi forti ingrandimenti. Siino ad un certo limite la curvatura del campo immagine può essere compensata con oculari e questo procedimento è praticato soprattutto nella microfotografia dove si impiegano oculari negativi, che eliminano la curvatura del campo immagine di obiettivi di medio e forte ingrandimento. Poiché questo procedimento presenta svantaggi per l'osservazione, è preferibile eliminare la curvatura del campo immagine là dove essa ha origine e cioè nell'obiettivo stesso.

### COMA E DISTORSIONE

Con lenti non corrette si possono rilevare altri due difetti di immagine, che diventano rilevanti ai margini del campo immagine: coma e la distorsione. Per coma si intende l'aberrazione sferica asimmetrica del fascio obliquo e si manifesta sotto forma di punti immagine sfumati come comete. Nella distorsione il rapporto d'ingrandimento non è costante in tutta l'immagine ma aumenta o diminuisce ai margini. Ne deriva ad es. che un quadrato viene rappresentato a forma di barilotto o di cuscinetto. Si parla perciò anche di distorsione a cuscinetto o a barilotto. La completa eliminazione di questo difetto è indispensabile soltanto con obiettivi di misura

RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA  
DELLE DISTORSIONI A CUSCINETTO O  
BARILOTTO DI UN OGGETTO QUADRATO



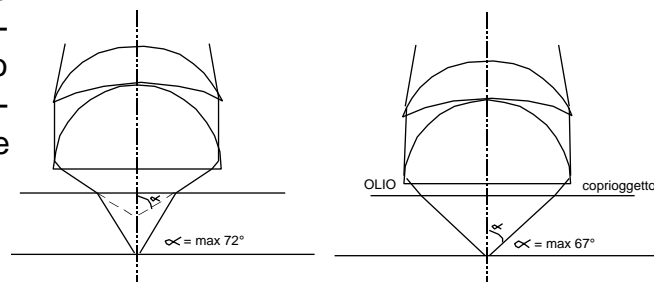
### QUOTE MECCANICHE ED OTTICHE

In funzione della piccolezza del dettaglio dell'oggetto da osservare si scelgono già con i mezzi più semplici, vale a dire con le lenti, ingrandimenti di diversa entità, cioè lenti di diversa lunghezza focale.

Passando al microscopio, con il quale l'ingrandimento complessivo è funzione dell'ingrandimento dell'obiettivo e dell'ingrandimento dell'oculare, è possibile variare in maniera ampia l'ingrandimento stesso. Tuttavia la variazione dell'ingrandimento, ottenuta sostituendo gli oculari, è soggetta a limiti relativamente stretti. Per questa ragione è necessario sviluppare, per coprire una sufficiente gamma d'ingrandimenti, una serie di obiettivi, prescindendo dal fatto che le esigenze di potere risolutivo e qualità dell'immagine nei diversi campi d'ingrandi-

mento possono essere soddisfatte soltanto con una serie di obiettivi appositamente calcolati.

Negli stativi moderni questi obiettivi sono impiegati su un revolver porta obiettivi che ne consente la rapida sostituzione. Per il lavoro pratico è indispensabile che la messa a fuoco dell'immagine sia mantenuta, quando vengono sostituiti oculari ed obiettivi, devono essere quindi pareggiati. Per soddisfare questa esigenza, deve essere costante la distanza "oggetto - immagine intermedia" per tutti i rapporti d'ingrandimento utilizzati, l'immagine intermedia deve formarsi sempre nello stesso piano del tubo. Queste condizioni sono realizzate con una opportuna scelta delle lunghezze totali dell'obiettivo, dalla lunghezza del tubo, predeterminata meccanicamente per ragioni pratiche - segue necessariamente anche una distanza costante "superficie di battuta obiettivo oggetto P". Naturalmente l'immagine deve restare a fuoco anche sostituendo l'oculare, il cui piano focale deve dunque coincidere con il piano dell'immagine intermedia dell'obiettivo. La distanza "porta oculare piano dell'immagine intermedia" viene indicata come distanza d'immagine intermedia dell'oculare. L'osservanza di queste quote è importante poiché se vengono impiegati obiettivi ed oculari che non sono pareggiati fra loro o non adatti al microscopio si ha una disparità di messa a fuoco, ed una immagine scadente priva di dettaglio. Su ogni obiettivo è perciò stampata la lunghezza appropriata del tubo d'osservazione. Per tubi monoculari dritti questa lunghezza è facilmente misurabile, mentre negli altri tubi è necessario tenere conto della variazione dei percorsi ottici attraverso prismi deviatori od altri elementi ottici. Recentemente sono state sviluppate serie di obiettivi per lunghezza del tubo di "infinito". Questi sistemi non proiettano alcuna immagine intermedia reale nel tubo ma proiettano un'immagine all'infinito. Soltanto in combinazione con ottiche intermedie incorporate nello stativo si riesce ad ottenere un'immagine intermedia reale al disotto del bordo superiore del tubo.



### Potere risolutivo dei microscopio

#### Apertura numerica

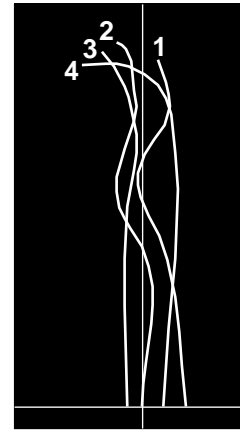
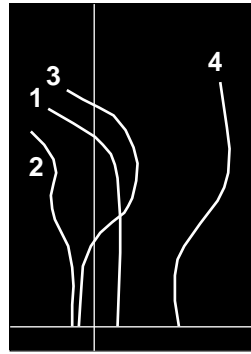
Il primo responsabile della buona prestazione di un microscopio è l'obiettivo. La capacità di un microscopio di rendere visibili separatamente dettagli piccolissimi, e cioè di risolverli, non dipende tuttavia dal rapporto d'ingrandimento dell'obiettivo ma soltanto dalla sua apertura numerica. Per l'importanza di questo concetto, indicato spesso anche semplicemente apertura, è bene parlarne qui un poco più ampiamente.

Per apertura numerica  $A$  si intende il prodotto

$$= n \sin$$

dove  $\alpha$  è l'angolo formato dal raggio più estremo ricevuto direttamente dall'obiettivo, o dal suo prolungamento, con l'asse ottico ed  $n$  l'indice di rifrazione del mezzo ottico (ad es. aria, olio d'immersione, vetrino coprioggetto) in cui si propaga il raggio fra l'oggetto e la lente frontale. Da due disegni schematici qui di seguito si ricava quali valori di apertura massimi possono essere generalmente raggiunti. Da un punto sulla faccia inferiore del vetrino coprioggetto la luce si propaga nelle diverse direzioni. Se, come supposto nella figura, fra vetrino coprioggetto e lente frontale si trova aria (indice di rifrazione  $n = 1$ ), per la legge della rifrazione possono passare nello spazio intermedio d'aria soltanto i raggi che non vengono riflessi totalmente nel vetro, dalla faccia superiore del vetrino cioè entro l'angolo limite della riflessione totale, qui di  $41,5^\circ$ . A questo angolo limite corrisponderebbe nell'aria una

cosiddetta uscita radente (parallela al piano orizzontale) cioè  $90^\circ$ . In base alla formula riportata all'inizio risulterebbe che il valore teorico massimo per i sistemi a secco è 1. È facile capire che è impossibile sfruttare pienamente quest'angolo limite poiché per ottenere questo la lente frontale dovrebbe essere a contatto con la superficie del vetrino coprioggetto, senza distanze interposte. In realtà, in seguito alla distanza che deve necessariamente esistere fra il vetrino e l'obiettivo, e per la grandezza limitata della lente frontale l'angolo massimo raggiungibile diviene di  $72^\circ$ , da cui si ottiene per questa categoria di obiettivi un'apertura massima raggiungibile praticamente di 0,95. Nella figura si mostra il percorso ottico in una immersione in olio.



656 nm ROSSO 1  
546 nm VERDE 2  
486 nm BLU 3  
405 nm VIOLA 4

La riflessione totale qui non si presenta perché il vetrino coprioggetto e l'olio di immersione hanno lo stesso indice di rifrazione  $n = 1,515$ . Dunque tutta la luce che si propaga entro un angolo di  $90^\circ$  rispetto all'asse ottico giungerebbe senza deviazioni nella lente frontale, se questa potesse essere sufficientemente grande. Le brevi lunghezze focali degli obiettivi ad immersione comportano tuttavia che le lenti frontali abbiano un diametro di circa 1 mm per cui esse, nonostante la piccolissima distanza frontale, possono abbracciare nel caso limite un angolo di  $67,5^\circ$  il che comporta una limitazione dell'apertura numerica pari a 1,40 ( $1,515 \times 0,92 = 1,40$ ). Questo tipo di osservazione mostra in modo particolarmente evidente come l'apertura numerica e quindi il potere risolutivo degli obiettivi aumenti in modo direttamente proporzionale al cono dei raggi che, partendo dall'oggetto, hanno la possibilità di giungere infine nell'obiettivo. In ogni gruppo vi sono obiettivi che non presentano l'apertura massima possibile. Essi non sono tuttavia obiettivi di secondo ordine; sono opportuni e necessari quando si vogliono eseguire osservazioni lavorando ad ingrandimenti microscopici relativamente bassi poiché un'apertura numerica troppo alta non sarebbe utilizzata in questi casi.

### Potere risolutivo laterale

Si può ottenere un prefissato ingrandimento complessivo sia con un obiettivo a basso ingrandimento proprio e con un oculare forte che, viceversa, con un obiettivo a forte ingrandimento proprio ed un oculare debole. Le due immagini tuttavia appariranno notevolmente diverse e cioè, la seconda, mostrerà dettagli notevolmente più piccoli della prima. La ragione consiste nel fatto che gli obiettivi forti presentano in generale un'apertura maggiore di quelli deboli ed inoltre che dalla maggior entità dell'apertura dell'obiettivo impiegato dipende il riconoscimento delle strutture più fini. La possibilità di un obiettivo di rendere visibili separatamente due punti adiacenti dell'oggetto viene detto il suo potere risolutivo e si parla di un potere risolutivo laterale quando si tratta di punti adiacenti nel piano dell'oggetto. Come limite del potere risolutivo si indica la distanza minima a cui due punti possono ancora venir riprodotti separati. Un potere risolutivo di  $1\mu$  significa dunque che due particelle puntiformi alla distanza di  $1\mu$  possono ancora essere riconosciute come due punti distinti mentre ad es. alla distanza di  $0,8\mu$  esse apparirebbero come un unico punto. Ciò risulta evidente se si considera quanto segue:

Anche un obiettivo perfettamente corretto sfericamente e cromaticamente non riproduce un punto dell'oggetto come un punto, ma ad ogni punto dell'oggetto corrisponde quale sua immagine nel piano di messa a fuoco del microscopio un dischetto luminoso che viene denominato cerchio di diffrazione. Questo comportamento si basa sulla natura ondulatoria della luce. Se consideriamo il dischetto di diffrazione come riproiettato sull'oggetto, se ci figuriamo cioè la sua grandezza nelle dimensioni del dettaglio dell'oggetto, il suo dia-



metro a piena apertura d'illuminazione è  $d = 1,22 \lambda / A$  dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce,  $A$  l'apertura numerica dell'obiettivo mentre 1,22 è un fattore determinato teoricamente. Il dischetto di diffrazione è ancora circondato da anelli di diffrazione di debole intensità luminosa che tuttavia proprio in seguito a questa piccolissima intensità luminosa sono visibili soltanto con l'illuminazione in campo oscuro. La grandezza di questo dischetto di diffrazione visibile, misurabile dalla parte dell'oggetto è evidentemente determinante per il potere risolutivo. Quando due punti dell'oggetto sono disposti in modo tale che i loro dischetti di diffrazione sono perfettamente a contatto essi possono essere certamente osservati come perfettamente separati l'uno dall'altro. Si dirà inoltre che due punti dell'oggetto sono ancora separati anche quando i loro dischetti di diffrazione interferiscono e si coprono parzialmente. Se adesso riprendiamo in considerazione il problema che ci eravamo posti all'inizio di questo paragrafo riconosciamo che per la rappresentazione di un dettaglio microscopico, non si tratta soltanto di realizzare in qualche modo un certo ingrandimento, ma soprattutto di scegliere l'apertura dell'obiettivo in modo da garantire un ben determinato potere risolutivo. A questo scopo l'ingrandimento accessorio dell'oculare deve essere scelto in modo tale che l'intero dettaglio risolto dall'obiettivo in virtù della sua apertura diventi comodamente riconoscibile per l'occhio, sia cioè presentato sotto un angolo visivo sufficientemente grande. Questo caso si presenta quando l'ingrandimento complessivo è compreso fra 500 e 1000 volte l'apertura dell'obiettivo. Tutto il cosiddetto ingrandimento utile si mantiene entro questo campo poichè ingrandimenti che superino notevolmente questo limite non comportano alcun guadagno di dettaglio visibile mentre ingrandimenti che restano al di sotto di questo limite non sfruttano pienamente le capacità dell'obiettivo.

## OBIETTIVI

In generale gli obiettivi da microscopio sono classificati in base al loro livello di correzione. In primo luogo ci si occupa della correzione cromatica. Quanto più si corregge tale aberrazione tanto più aumentano i mezzi impiegati; in tal modo la classificazione diventa: acromatici, sistemi fluorite o semi apocromatici, apocromatici, corrisponde anche ad una suddivisione in base ai costi. Per osservazioni in contrasto di fase, in luce polarizzata o in luce riflessa sono stati sviluppati obiettivi specifici, per i quali tuttavia vale di massima la suddivisione appena descritta.

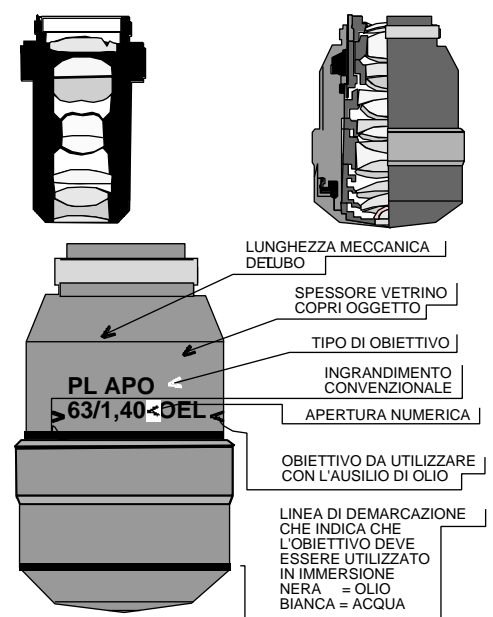
## ACROMATICI

Gli acromatici sono obiettivi in cui si sovrappongono le lunghezze d'intersezione di due colori. Si usano i colori rosso e blu. Gli acromatici sono dunque corretti nel campo del massimo della sensibilità cromatica dell'occhio umano e sono perciò adatti per osservazioni visuali. Per microfotografie su pellicole in bianco e nero è indicato l'uso di un filtro verde, attraverso il quale viene filtrato il viola, efficace fotograficamente ma non completamente compreso nella correzione. Gli acromatici sono naturalmente adatti anche per fotografie a colori, particolarmente per fotografie con normali esigenze di potere risolutivo e contrasto. La dominante di colore che si produce può essere in molti casi trascurabile.

## FLUORITE O SEMIAPOCROMATICI

È chiaro che la cromaticità di un sistema ottico non è completamente eliminata se l'errore cromatico è corretto per due soli colori. Per il resto dei colori, che non vengono sovrapposti, resta un piccolissimo cromatismo residuo che viene definito spettro secondario.

NOMENCLATURA DEGLI OBIETTIVI



Esso si presenta ad es. come una diminuzione dei contrasti cromatici nell'osservazione visuale. Tuttavia l'eliminazione dello spettro secondario non é possibile soltanto con i vetri Flint e Krown che vengono impiegati per la fabbricazione degli acromatici. Ciò avviene soltanto sostituendo il vetro Krown con fluorite o materiali ad essa simili, in tutto o in parte.

Questi obiettivi hanno circa lo stesso numero di lenti, degli acromatici ma una parte delle lenti é di fluorite. Lo spettro secondario non é ancora completamente eliminato ma appare molto meno che negli acromatici. Per la migliore possibilità di correzione l'apertura può essere notevolmente aumentata; l'immagine microscopica é dunque notevolmente più chiara e meglio risolta. I sistemi alla fluorite sono dunque particolarmente adatti per la microfotografia. Nelle riprese a colori sono raccomandati inoltre quando vi sono particolari esigenze di contrasto e potere risolutivo al centro dell'immagine.

### OBIETTIVI PLANARI PL

Fino a che l'utilizzatore si serve del suo strumento per osservazioni visive può accettare la curvatura del campo immagine che si presenta con i sistemi convenzionali, poichè é sempre libero di mettere sufficientemente a fuoco qualunque punto del campo visivo, eseguendo degli spostamenti con la vite micrometrica. Diversamente avviene nella microfotografia. Qui si richiede la nitidezza dell'intero campo visivo, per ogni singola ripresa. Con la crescente importanza che va assumendo la documentazione microfotografica é divenuta una questione essenziale anche l'eliminazione della curvatura del campo immagine.

Ciò si ottiene introducendo lenti negative appropriate, come ad es. menischi spessi. In questo modo possono essere spianati anche i campi visivi di sistemi di più elevato ingrandimento. Ovviamente l'impiego di mezzi di correzione é molto superiore per un campo grande che per i sistemi considerati fino ad ora. Naturalmente negli obiettivi piani si desidera anche una elevata correzione cromatica, ma quasi tutti i mezzi che possono essere impiegati per lo spianamento del campo immagine agiscono negativamente per quanto concerne la correzione apocromatica dell'obiettivo. Si é perciò costretti ad impiegare la fluorite, nota per la apocromatizzazione degli obiettivi, per un numero elevato di lenti. Se si pensa che negli obiettivi forti, non spianati l'astigmatismo e l'errore di simmetria scompaiono nella curvatura del campo immagine e devono perciò essere corretti in modo molto limitato, si capisce facilmente che per immagini spianate é necessario un forte impiego supplementare di lenti. In questo periodo si ha tuttavia anche la possibilità di ottenere la correzione apocromatica con un notevole impiego di fluorite o di materiali simili.

### APOCROMATICI

Con questi obiettivi si ottiene una perfetta sovrapposizione di tre colori dello spettro. Lo spettro secondario é così completamente eliminato mentre il terziario, che ancora permane, è in particolare senza importanza. Fino a che punto sia possibile con i moderni mezzi di correzione eliminare l'errore cromatico residuo è mostrato dalla figura sottostante. Queste figure rappresentano le curve di correzione di un obiettivo acromatico e di un apocromatico. Come si vede chiaramente negli acromatici le curve di correzione dei rosso, dei verde e dei blu hanno circa lo stesso andamento. Il viola, invece, non é ancora completamente compreso nella correzione. Inoltre tutte le curve sono ancora leggermente flesse. Nella rappresentazione degli apocromatici si rileva la maggiore apertura e l'andamento quasi rettilineo di tutte le curve di correzione.

Le curve si flettono soltanto con apertura quasi completa. Si deve tuttavia tenere presente che le curve sono state disegnate ingrandite di circa 5000-10000 volte per evidenziare l'errore residuo. La definizione dell'immagine ottenuta con un apocromatico é perciò sorprendente; nitidezza, contrasto e potere risolutivo sono ottenuti al massimo grado. Gli apocromatici sono perciò gli obiettivi preferiti per lavori di ricerca in cui si richiede il riconoscimento di minuscoli elementi strutturali. Eccezionalmente adatti sono ovviamente anche

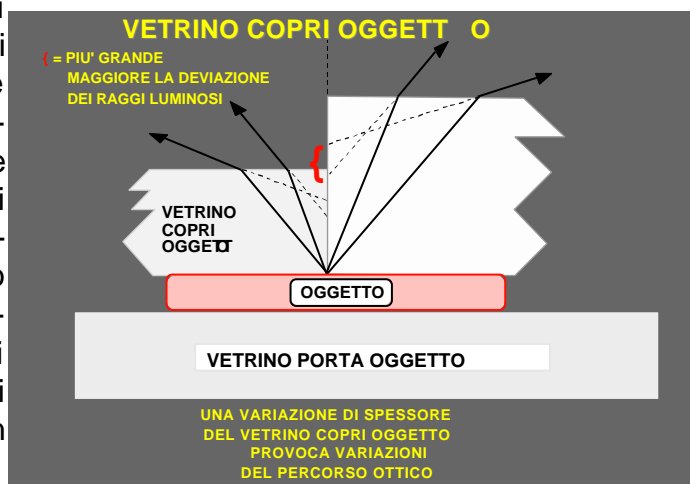
per la microfotografia a colori con grandi aperture d'illuminazione. Naturalmente gli elevati costi di fabbricazione e dei materiali rendono il prezzo molto elevato. Chi tuttavia volesse confrontare una volta le prestazioni dei due sistemi non vorrebbe vedere mancare gli apocromatici nel corredo ottico del suo microscopio.

Per osservazioni durante le quali vengono impiegati solventi o fissatori aggressivi, come acido acetico, ecc., sarebbe bene, per quanto possibile, non impiegare obiettivi ad alta correzione.

## OBIETTIVI PLANACROMATICI

Negli stativi con tubi di osservazione normali (o 23,2mm.) spesso non è necessario lo spianamento dell'immagine fornito dagli obiettivi planari Pi. Per questa ragione sono stati studiati gli obiettivi pianacromatici N131. Sono degli obiettivi per i quali è stato un po' limitato

l'impiego di mezzi di correzione. Essi hanno quindi un costo più conveniente e di conseguenza sono gli obiettivi da scegliere per le osservazioni di routine o per documentazione microfotografica, specialmente su pellicole in bianco e nero. Gli obiettivi pianacromatici NPI tuttavia non sono disponibili soltanto per osservazioni in campo chiaro in luce trasmessa ma, per l'importanza che riveste lo spianamento del campo immagine, sono stati studiati dei pianacromatici anche per la microscopia in contrasto di fase e in luce polarizzata.



## PREPARAZIONE DEL VETRINO

Partendo dal concetto fondamentale che la percezione della forma di un oggetto da parte del cervello umano è basata sul chiaro - scuro, possiamo comprendere come attraverso il microscopio non sia possibile osservare qualsiasi struttura per il solo fatto d'averla ingrandita. Ad esempio, infatti, per poter analizzare le strutture biologiche non è sufficiente ingrandirle attraverso il microscopio, in quanto la luce trasmessa dal microscopio, attraversa tali strutture senza interagire con esse. Si ovvia, a questa mancanza, utilizzando dei coloranti che fissano specifici costituenti della cellula e che assorbendo le radiazioni luminose rendono visibile la stessa. Il miglior obiettivo è inutile se l'oggetto che si va ad osservare non è correttamente preparato. La fettina di preparato posta sul vetrino portaoggetto deve essere più sottile possibile, dovrebbe avere uno spessore di circa 3 - 5  $\mu\text{m}$  e deve essere distesa perfettamente senza piegature, che porterebbero ad una sovrapposizione del coprioggetto non uniforme.

Lo spessore del coprioggetto per obiettivi con apertura oltre 0,40 è previsto nel calcolo della correzione ottica. Lo spessore del coprioggetto deve essere il più esatto possibile di 0,17 mm, infatti più è alta l'apertura dell'obiettivo, tanto più ristretta diventa la tolleranza del coprioggetto stesso  $0,17 +000^{0,035}$ -

## CAMPO VISIVO E CAMPO OGGETTO

### GRANDEZZA DEL CAMPO VISIVO

Mentre il potere risolutivo è determinato esclusivamente dalla bontà dell'obiettivo la grandezza del campo visivo dipende, dall'oculare. Ricordiamo: l'obiettivo proietta un'immagine reale intermedia capovolta nella scala dell'ingrandimento dell'obiettivo. Questa immagine si trova sotto il bordo del tubo. È evidente che con tubi normali, con diametro interno di 23,2 mm. la grandezza dell'immagine intermedia è limitata. Dipende dal tipo di oculare, dallo stato di correzione e dalla lunghezza focale quanta parte dell'immagine intermedia viene

effettivamente abbracciata. Nel caso più favorevole si tratta di 18 al massimo 19 mm. Questo diametro dell'immagine intermedia effettivamente abbracciata, espresso in mm. viene chiamato "indice di campo dell'oculare".

## GRANDEZZA DEL CAMPO OGGETTO

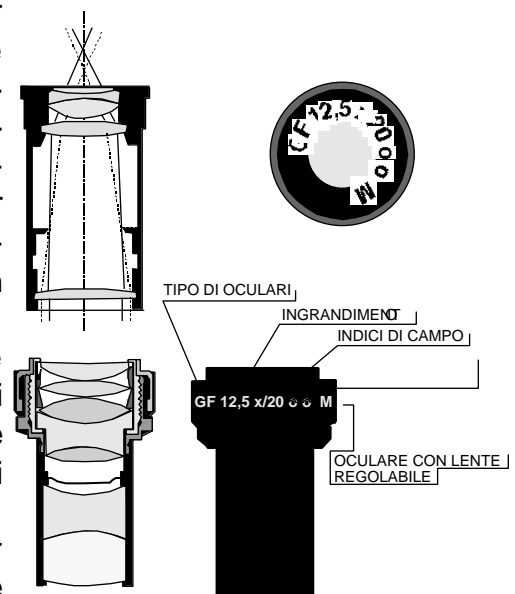
Se si divide l'indice di campo per l'ingrandimento dell'obiettivo e per il fattore dell'ottica intermedia si ottiene il campo osservabile del preparato, cioè il campo oggetto. Per un oculare con indice di campo 28, un obiettivo 10:1 ed un fattore d'ingrandimento del tubo  $\times 1$  si ottiene: campo oggetto osservabile =  $28/10 \times 1 = 2,8$  mm.

## OTTICA INTERMEDIA

Tubo binoculare o altre esigenze costruttive costringono spesso il costruttore a discostarsi dalle lunghezze meccaniche del tubo prescritte. Per conservare il pareggiamento negli obiettivi deboli e rispettivamente per non diminuire la qualità dell'immagine in quelli forti, l'immagine intermedia viene spostata mediante un sistema di ottica intermedia. L'obiettivo viene dunque utilizzato nella maniera prevista per la sua stazione ottimale e lo spostamento dell'immagine viene eseguito solo successivamente mediante un sistema ottico ad alta correzione.

A seconda dei vantaggi costruttivi e di riproduzione dell'immagine che si vogliono ottenere sono impiegati sistemi di ottica intermedia con i fattori 0,8x, 1x oppure 1,25x. Il fattore 1,25x corrisponde ad un aumento del fattore d'ingrandimento del 25%.

Sistemi con il fattore 0,8x sono impiegati talora per ampliare il campo oggetto osservabile ma ciò avviene a spese del rapporto d'ingrandimento.



## OCULARI

L'obiettivo riproduce un'immagine intermedia capovolta, reale, nella scala del suo ingrandimento. Poiché il piano dell'immagine intermedia dell'obiettivo coincide con il piano focale dell'oculare, l'oculare proietta l'immagine all'infinito, essa può perciò essere osservata con l'occhio accomodato all'infinito posizionato nel piano della pupilla di uscita dell'oculare. Ad ogni singolo punto oggetto corrisponde quindi un sottile fascio di raggi paralleli che l'occhio provvede a focalizzare, formando sulla retina l'immagine di questo punto oggetto. Di massima si potrebbe utilizzare come oculare un'unica lente convergente. Come si capisce facilmente, impiegando un tale tipo di oculare, il diametro della lente e la distanza della pupilla di uscita diverrebbero esageratamente grandi. In un oculare di questo tipo i fasci divergenti provenienti dal bordo dell'immagine, sono raccolti dalla prima lente, la lente di campo, e diretti verso la lente dell'occhio. In questo modo i diametri delle lenti possono essere mantenuti in dimensioni accettabili e la pupilla d'uscita si sposta ad una distanza dall'oculare favorevole per l'osservazione.

La figura mostra il percorso ottico in un oculare di questo tipo. I fasci obliqui (tratteggiati) provenienti dall'obiettivo, cadrebbero nel piano BB. Tuttavia sono precedentemente deviati dalla lente di campo K (chiamata anche lente collettiva) e convogliati nel piano BB attraverso la lente di campo. La successiva lente dell'occhio A, cui ora spetta soltanto il vero e proprio lavoro di una lente, è costruita in modo che il suo ingrandimento, tenendo conto dell'effetto rimpicciolimento prodotto dalla lente di campo, sia tale da realiz-

zare l'ingrandimento nominale dell'oculare.

## OCULARI HUYGENS

Questo semplicissimo oculare risale a Huygens. E' costituito da due lenti piano convesse le cui lunghezze focali singole e le distanze fra le lenti sono stabilite in modo che gli oculari, combinati con obiettivi acromatici a debole e medio ingrandimento, diano un campo visuale esente da aloni colorati. Tuttavia con gli acromatici a forte ingrandimento questi oculari semplici non forniscono prestazioni completamente soddisfacenti. essi sono assolutamente inadatti per sistemi alla fluorite, apocromatici ed obiettivi planari che richiedono oculari particolarmente corretti.

Gli oculari Hygens si riconoscono dall'esterno dal fatto che, oltre al nome dalla ditta costruttrice ed all'indicazione dell'ingrandimento, non portano alcun'altra denominazione. Si comprende facilmente che con un oculare composto da due sole lenti difficilmente può essere corretto l'errore di un obiettivo. Per esigenze maggiori si impiegano perciò oculari con sistemi di più lenti, con cui viene corretto l'errore di ingrandimento cromatico, che compare principalmente ai bordi dell'immagine, e l'occhio osserverà un'immagine esente da aberrazioni cromatiche sull'intero campo. Ciò vale sia per tutti gli apocromatici e sistemi alla fluorite che per gli acromatici a forte ingrandimento.

## OCULARI A GRANDE CAMPO

Un ulteriore sviluppo per ottenere campi maggiori è rappresentato dagli oculari a grande campo. Essi hanno indici di campo notevolmente più grandi. L'aumento di circa il 20% del diametro comporta un aumento di un buon 40% della superficie e quindi un corrispondente accrescimento del contenuto dell'immagine.

## OCULARI CON LENTI DELL'OCCHIO REGOLABILI

Per riprese microfotografiche, con camera senza Cannocchiale di messa a fuoco, sono indispensabili gli oculari con lente dell'occhio regolabile e vetrino inciso. (reticolo fotografico) Sul vetrino inciso, che si trova sul piano focale dell'oculare oltre alla delimitazione del formato, sono segnati dei piccoli cerchi doppi. L'osservatore regola la lente dell'occhio fino a che vede nitidamente i doppi cerchi. Accomoda, come suol dirsi, il suo occhio al doppio cerchio e quindi al piano focale dell'oculare. Mettendo a fuoco l'immagine microscopica l'immagine intermedia cade necessariamente sul piano focale dell'oculare. Di conseguenza è nitida anche l'immagine sul piano della pellicola della camera formato 35 mm. sia che si usi un tubo fotografico con compensazione automatica o manuale della distanza interpupiliare. L'immagine rimane nitida anche commutando l'obiettivo, ruotando il revolver.

## OTTICA D'ILLUMINAZIONE

La nitidezza e le caratteristiche dell'immagine sono influenzate in modo notevole dalla illuminazione, del microscopio. Una accurata regolazione dell'illuminazione, eseguita in funzione del preparato, fa parte delle premesse fondamentali per una perfetta immagine microscopica. L'illuminazione di un microscopio deve soddisfare le seguenti esigenze:

Deve fornire un fascio di raggi che soddisfi le esigenze di ogni combinazione obiettivo - oculare impiegata, cioè:

a) campo visivo

b) pupilla d'uscita dell'obiettivo devono poter essere illuminati in modo completo ed uniforme.

2. Deve consentire di modificare a piacere ed indipendentemente il diametro del fascio luminoso

a) sia sull'oggetto

b) nel piano focale posteriore dell'obiettivo.

Tuttavia le esigenze di illuminazione delle singole combinazioni obiettivo - oculare sono molto diverse. Se da una parte devono essere illuminati i campi relativamente grandi degli obiettivi a debole ingrandimento, dall'altra parte l'apertura della luce d'illuminazione deve poter essere adatta all'apertura dell'obiettivo. Questi rapporti così diversi si devono combinare possibilmente in un unico condensatore. Il condensatore deve perciò soddisfare le seguenti premesse:

- a) Deve poter fornire il fascio di raggi necessario per gli obiettivi a più debole ingrandimento. Per gli obiettivi a più forte ingrandimento sussiste comunque un eccesso di apertura del fascio luminoso, non pienamente utilizzabile, che può esercitare un effetto dannoso addirittura riducendo il contrasto, generando dei riflessi ed un inutile riscaldamento del preparato, per questa ragione il fascio luminoso deve poter essere ridotto nella misura ritenuta secondo i casi necessaria. Si ottiene questo con un diaframma di campo disposto sul percorso dei raggi. L'immagine di questo diaframma delimita i raggi convogliati sul preparato. Se questo diaframma viene chiuso i suoi bordi sono visibili sull'immagine microscopica,
- b) Almeno in teoria, l'apertura deve essere al limite altrettanto grande di quella dell'obiettivo più forte. In questo caso si ha però un eccesso di luce per i sistemi a più debole ingrandimento. Un secondo diaframma, il diaframma di apertura, ha perciò il compito di limitare quanto necessita il fascio di raggi sulla pupilla d'uscita. La sua immagine può essere vista, a diaframma chiuso ed oculare estratto, come limitazione circolare sulla lente posteriore dell'obiettivo, illuminata.

#### PERCORSO OTTICO INCROCIATO

Parlando del percorso ottico abbiamo fin qui tralasciato l'ottica di illuminazione. Se però si costruisse un microscopio privo di quest'ottica, non si potrebbe sfruttare la sorgente luminosa in maniera ottimale, né illuminare uniformemente.

E queste sono proprio le premesse indispensabili per ottenere una buona immagine. Per questo si raccoglie la luce di illuminazione mediante la cosiddetta ottica di illuminazione, collocata fra la sorgente luminosa (o filamento) della sorgente all'interno dell'obiettivo. Così la sorgente luminosa viene sfruttata pienamente e l'immagine risulta illuminata con intensità ed uniformità ottimali, ad onta delle zone chiare e scure tipiche delle sorgenti luminose.

L'ottica di illuminazione fa dunque sì che ogni punto della sorgente già di per sé irradia l'intero preparato, inoltre che questa luce venga pienamente utilizzata anche per la formazione dell'immagine.

#### PRINCIPIO DELL'ILLUMINAZIONE KOHLER

Il concetto di illuminazione sopra esposto viene applicato con straordinario successo in microscopia con il principio dell'illuminazione Kohler.

1. Proiettare la sorgente luminosa sul piano focale posteriore dell'obiettivo

2. Far sì che ogni punto della sorgente luminosa già di per sé irradia l'intero campo oggetto.

L'illuminazione del microscopio deve pertanto dare la possibilità di variare mediante diaframmi la sezione del fascio ottico, sia sul piano focale posteriore dell'obiettivo quanto sull'oggetto, a piacere e indipendentemente l'uno dall'altro. Consideriamo in primo luogo il percorso ottico di illuminazione. Subito dopo la sorgente luminosa  $S$  troviamo il collettore, che il più delle volte è collegato alla sorgente, formando così un dispositivo d'illuminazione. Il collettore proietta la sorgente  $S$  sul piano focale anteriore  $S'$  del condensatore. Su questo piano si trova anche il diaframma di apertura. La sorgente viene quindi proiettata ulteriormente, attraverso il condensatore e l'obiettivo, sul piano focale posteriore  $T$  di quest'ultimo ed infine nella pupilla d'uscita  $S''$  dell'oculare dove si trova la pupilla dell'osservatore.

I piani  $S$ ,  $S'$ ,  $S''$  si definiscono otticamente come "coniugati", in quanto ciascuno di essi costituisce un'immagine ottica del precedente. Il sistema di piani otticamente coniugati lo troviamo nel percorso ottico di formazione immagine. Il diaframma di campo limita l'apertura

del collettore. Questo diaframma viene proiettato nel piano  $L'$ , che è quello del preparato, attraverso il condensatore. L'obiettivo riproduce sul piano dell'immagine intermedia  $U'$  un'immagine ingrandita del preparato e del diaframma di campo, che attraverso l'oculare arriva all'osservatore ulteriormente ingrandita. La terza immagine del diaframma di campo  $L''$  e quella del preparato si formano così sulla retina dell'occhio.

Abbiamo quindi due gruppi di piani otticamente coniugati, che si avvicendano regolarmente l'uno dopo l'altro, vale a dire un percorso ottico incrociato. Resta ancora da chiarire quali funzioni abbiano i diaframmi collocati nei punti  $S'$  ed  $L$ . Il diaframma di apertura consente di diaframmare l'immagine della sorgente luminosa. Essa invia pertanto al piano locale posteriore dell'obiettivo di volta in volta impiegato un fascio di raggi di diametro conveniente.

Azionando il diaframma di apertura si allargano o si restringono i coni ottici che emergono dai punti dell'oggetto.

Azionando il diaframma di apertura si allargano o si restringono i coni ottici che emergono dai punti dell'oggetto. Il diaframma di campo varia la sezione del fascio ottico sul piano dell'oggetto. Aprendolo al massimo, si può illuminare non più del campo oggetto.

### ILLUMINATORI PER LUCE RIFLESSA

Quando si lavora in luce riflessa nella maggioranza dei casi la luce proveniente dalla sorgente luminosa deve essere deviata e convogliata sul preparato. I dispositivi ottici per questo scopo sono chiamati illuminatori Opak.

In funzione del loro tipo la luce viene diretta sull'oggetto ad es. con specchi anulari concentrici all'obiettivo o con condensatori anulari, oppure viene inviata direttamente. In quest'ultimo caso l'obiettivo funge anche da condensatore.

### GENERALITÀ

Sono opportune alcune considerazioni sulle condizioni ambientali. La stanza non deve essere troppo luminosa né ricevere luce solare diretta: sono particolarmente adatte le stanze rivolte verso Nord. Laboratori ove siano presenti vapori intensi o corrosivi sono decisa-

mente sconsigliabili per l'installazione di un microscopio.

Qualora capitasse di dover lavorare con acido in un ambiente di microscopica, ciò dovrebbe avvenire esclusivamente sotto una cappa di aspirazione.'

Spostando il microscopio da un ambiente freddo ad uno caldo, prima di adoperarlo bisognerà aspettare che le lenti si disappannino. La polvere, ineliminabile, può compromettere tanto la qualità dell'immagine quanto il funzionamento meccanico del microscopio: è perciò importante non lasciarlo mai scoperto per lunghi periodi. Si prenda fin dall'inizio l'ottima abitudine di coprire sempre il microscopio dopo l'uso e di riporre gli obiettivi non adoperati nelle apposite custodie in plastica. Maneggiando gli obiettivi e soprattutto nell'avvitarli al revolver si stia ben attenti a non toccare la lente frontale con le mani. Già una leggera impronta digitale può sbiadire l'immagine.

Per l'installazione si scelga un tavolo da lavoro ben solido e non troppo alto, sul quale ci sia posto anche per le diverse unità accessorie. Per non sentirsi troppo stanchi, il lavoro al microscopio va eseguito stando seduti in comoda posizione, con il busto leggermente inclinato. Sono particolarmente indicati pertanto, gli sgabelli e le poltrone regolabili in altezza.

Osservando ad un tubo monoculare bisognerà abituarsi a tenere aperto l'occhio inutilizzato. Con un po' di allenamento ci si abituerà presto a vedere solo l'immagine del microscopio e lasciar guardare l'altro occhio "nel vuoto". E' particolarmente importante lavorare con gli occhi rilassati, altrimenti ci si stancherà presto la vista.

A tale scopo bisogna presupporre che l'immagine sia più distante. Per assicurarsi che l'occhio sia veramente accomodato si può fare la seguente prova: si tenga uno specchio davanti all'occhio inutilizzato, in modo da scorgere un oggetto lontano. Quando l'occhio si sarà accomodato su questo oggetto, l'altro occhio dovrà vedere ancora nitidamente l'immagine precedentemente messa a fuoco. In caso contrario bisognerà rimettere a fuoco mediante la regolazione fine.

Nel tubo binoculare è invece indispensabile impostare la giusta distanza interpupillare.

Eventuali insufficienze della vista non disturbano, nella maggior parte dei casi, l'osservazione al microscopio. L'osservatore miope, presbite o non eccessivamente astigmatico può infatti mettere a fuoco l'immagine anche senza occhiali correttivi.

Difetti visivi disuguali possono essere compensati mediante oculari provvisti di lente dell'occhio regolabile. Per coloro che portano gli occhiali sono disponibili appositi "oculari per portatori di occhiaia, che consentono di osservare nel microscopio senza dover togliere gli occhiali.

#### IMPIEGO DEL DIAFRAMMA Di CAMPO

Il diaframma di campo consente all'osservatore di variare la sezione di illuminazione sul piano oggetto. Mediante il diaframma di campo si può quindi diaframmare il campo luminoso sull'oggetto, fino a farlo coincidere con il campo visivo del microscopio. E' così possibile risparmiare all'oggetto riscaldamento inutili o sovrairradiazioni dannose. Il diaframma di campo va quindi aperto soltanto quanto basta a farlo scomparire dal campo visivo del microscopio.

#### IMPIEGO DEL DIAFRAMMA Di APERTURA

Il diaframma di apertura è un componente dell'illuminatore. Come già detto nella parte teorica, serve a diaframmare l'immagine della sorgente luminosa ed a inviare così al piano locale posteriore dell'obiettivo il necessario fascio d'illuminazione. Se si apre completamente il diaframma di apertura e lo si chiude poi lentamente guardando dentro il tubo, dopo aver tolto l'oculare, l'immagine del diaframma diventerà ad un certo momento visibile nella lente posteriore dell'obiettivo. A questo punto l'apertura d'illuminazione è uguale all'apertura dell'obiettivo. con questa posizione del diaframma - definita piena apertura d'illuminazione - si vedono però soltanto quelle strutture, che si differenziano dal campo circostante grazie a



diverso assorbimento, queste strutture vengono appunto rese con potere risolutivo ottimale. Se però vi sono anche particolari dell'oggetto poco contrastati sarà allora opportuno procedere come segue: se a pieno diaframma si inquadra a sufficienza tutto il campo che si vuol vedere, si chiuda gradualmente il diaframma fino a circa  $2/3$  della piena apertura. Durante questa chiusura graduale compaiono anche le strutture meno differenziate. Non è consigliabile chiudere ancora il diaframma fino a  $1/2$  o a valori addirittura più bassi: diaframmando si aumenta sì il contrasto, ma non bisogna qui dimenticare che una parte di questa crescita di contrasto è soltanto apparente. Quanto si diaframma, infatti, l'immagine diventa più scura e dà così l'illusione di un'ulteriore aumento di contrasto. Inoltre, con una troppo forte diaframatura, la qualità dell'immagine viene alterata da frange di diffrazione. Resta ancora da chiarire quali effetti produca un'eccessiva apertura d'illuminazione; insomma cosa succede se l'apertura di illuminazione è più grande dell'apertura numerica dell'obiettivo?

Quest'illuminazione rappresenta in linea di principio una sovrapposizione d'illuminazione in campo chiaro ed una in campo scuro. Si vedrà di conseguenza un'immagine campo chiaro con sovrapposta un'immagine campo scuro: bordi ed altre strutture analoghe, che sono particolari diffusori di luce, verranno schiariti ed il contrasto dell'immagine sensibilmente ridotto. Si raccomanda pertanto di non regolare mai l'apertura d'illuminazione in modo che risulti maggiore dell'apertura dell'obiettivo.

Oltre che sulla risoluzione e sul contrasto, il diaframma d'apertura influisce anche sulla profondità di campo. Infatti, via via che l'apertura del diaframma viene ridotta, il fascio ottico di formazione dell'immagine diventa sempre più stretto e con ciò cresce la profondità dello spessore oggetto che viene riprodotto nitidamente. D'altra parte si riduce però la risoluzione, per questo il diaframma d'apertura va impiegato per aumentare la profondità di campo, ma con un certo raziccinio.

#### RISOLUZIONE, CONTRASTO E PROFONDITA' DI CAMPO

Sono regolabili dunque mediante il diaframma di apertura. Questo non va in alcun caso adoperato per regolare la luminosità, per la quale si impiegano invece il trasformatore regolabile o filtri grigi cromaticamente neutri.

#### REGOLAZIONE DEL TUBO BINOCULARE

1. Regolare la distanza dei due oculari sulla distanza interpupiliare: nel microscopio le due rispettive immagini devono allo stesso tempo vedersi pienamente e sovrapporsi. Si deve dunque arrivare a vedere un'unica immagine circolare.
2. Regolare i due accordi oculari girevoli sulla distanza letta sull'apposita scala.
3. Mettere a fuoco perfettamente l'immagine attraverso l'oculare fisso, mediante la regolazione micrometrica.
4. Regolare la lente dell'occhio mobile, finché l'immagine risulti a fuoco anche nel secondo oculare.

#### REGOLAZIONE DEL TUBO FOTOGRAFICO CON DUE OCULARI REGOLABILI

1. Regolare la distanza dei due oculari sulla distanza interpupillare; nel microscopio le due immagini parziali devono allo stesso tempo vedersi pienamente e sovrapporsi. Si deve arrivare a vedere un'unica immagine circolare.
2. Regolare le lenti dell'occhio dei due oculari fino a quando i bordi dei diaframma nei due oculari appaiono nitidi.
3. Rimettere a fuoco l'immagine mediante la regolazione micrometrica.

#### LA GIUSTA COMBINAZIONE OBIETTIVO-OCULARE

Poniamo il caso che si voglia lavorare partendo con un'ingrandimento di 250x. Questo si può ottenere con un oculare 10x ed un obiettivo 25x, oppure con un oculare 25x ed un obiettivo 10x.

Nel primo caso si ottiene un'immagine brillante, nel secondo la qualità dell'immagine lascerà alquanto desiderare, nel senso che mancano i particolari più piccoli. La causa va ricercata nella bassa apertura numerica dell'obiettivo 10x. Si potrebbe così in un primo momento dedurre che, a parità d'ingrandimento finale, sia sempre da preferirsi l'obiettivo di apertura maggiore. Nella pratica vale invece la regola, per la quale l'ingrandimento complessivo deve essere da 500 a 1000 volte superiore all'apertura dell'obiettivo. Questo campo da 500 a 1000 A. viene definito ingrandimento complessivo utile o ottimale.

Non ci si deve in realtà attenere troppo rigidamente a questi valori indicativi. Il più delle volte non è affatto necessario, nè tanto meno conveniente, sfruttare pienamente il potere risolutivo di un obiettivo. In particolar modo con bassi e medi ingrandimenti si può senz'altro lavorare al di sotto di un ingrandimento complessivo di 500A, vale a dire con deboli oculari, Si vedranno aumentare specialmente nitidezza e contrasto. Piccoli dettagli ben più contrastati dovrebbero essere esaminati nel campo più alto, a  $V = 1000 A$ .

Per operazione di misura e conteggio sono da preferirsi ingrandimenti complessivi più elevati. Utilizzando questi forti sovraingrandimenti va però tenuto presente che, quando si supera il limite di risoluzione, i piccoli dettagli non vengono più riprodotti fedelmente. In queste zone limite ciò che si vede il più delle volte non corrisponde esattamente alla forma reale.

#### IMPIEGO DEI PIU'FORTI INGRANDIMENTI OBIETTIVI AD IMMERSIONE

Si definiscono obiettivi ad immersione quelli che fra la lente frontale dell'obiettivo e l'oggetto invece di aria necessitano dell'interposizione di un liquido di immersione. Così entrano nell'obiettivo anche raggi di angoli di apertura notevolmente maggiori; per questo l'apertura numerica e il potere risolutivo di un obiettivo ad immersione risultano maggiorati. In generale vale la regola: aperture numeriche superiori a 0.95 si possono ottenere solo con obiettivi ad immersione, il limite massimo è di circa 1,40. Per applicazioni particolari però vengono utilizzati anche obiettivi ad immersione con apertura più bassa e medi i ngrandimenti.

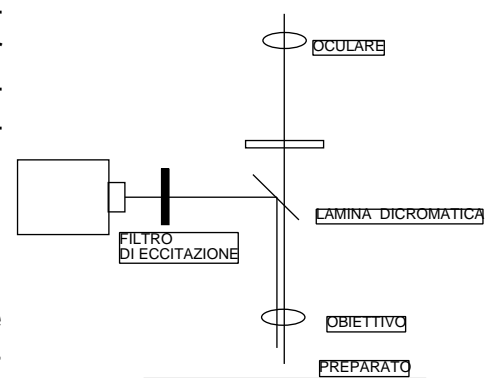
A prescindere dalle applicazioni speciali, in microscopia si impiegano solo immersioni in olio, raramente in acqua o altro. L'olio di immersione deve possedere la caratteristica di avere a 23°C esattamente un indice di rifrazione  $n = 1,518$  g una dispersione di  $v = 43^*$ . Inoltre non deve essere soggetto ad incrostazioni. L'olio di immersione va adoperato con parsimonia. Ultimato l'esame, lo si deve asciugare con un panno asciutto, eliminando infine la pellicola oleosa residua con una pezzuola inumidita di xilolo o benzina.

Quando ad una goccia di olio di vecchia deposizione viene ad aggiungersi dell'olio fresco, si formano delle impurità che deteriorano la qualità dell'immagine.

A rigor di fatti un'immersione in olio con la sua alta apertura richiede un'adeguata apertura d'illuminazione. Per sfruttare pienamente le possibilità offerte da questi sistemi, l'apertura d'illuminazione dovrà raggiungere addirittura l'apertura dell'obiettivo.

#### VISIONE IN FLUORESCENZA

Mediante l'irradiamento con luce di eccitazione a onde corte le sostanze fluorescenti diventano "illuminatori - autonomi mentre l'ambiente non fluorescente rimane scuro. Solo un gruppo di sostanze ha le caratteristiche di



emettere luce fluorescente se viene eccitata con irradiazione a onde corte. Questo tipo di fluorescenza viene indicata come fluorescenza propria o primaria. La maggior parte di tutti i campioni da esaminare al microscopio non dispone di tale caratteristica. Poiché lo scopo della microscopia in fluorescenza è rendere visibile determinate strutture del preparato, cioè evidenziare articolari che devono essere analizzati specificatamente, questi preparati devono essere colorati, con un colorante fluorescente o marcati nel senso di una reazione sierologica. L'emissione luminosa provocata mediante fluorocromi viene indicata come fluorescenza secondaria. Di particolare importanza è la così detta Immunofluorescenza

#### L'ECCITAZIONE IN LUCE RIFLESSA

L'eccitazione in luce trasmessa, molto usata in passato, è stata sostituita dalla eccitazione in luce riflessa. I dispositivi per fluorescenza in luce riflessa sono costruiti in modo tale da poter accogliere fino a 4 combinazioni di filtri. Queste combinazioni di filtri comprendono i filtri di eccitazione, i filtri di riflessione (lamine dicromatiche) ed i filtri di sbarramento.

#### FILTRO DI ECCITAZIONE

Seleziona nelle radiazioni luminose emesse dalla sorgente le lunghezze d'onda che servono per l'eccitazione della fluorescenza. Ciò viene consentito dalla massima trasmissione nel campo di eccitazione che interessa e del maggior effetto di sbarramento possibile negli altri campi di lunghezza d'onda.

#### LAMINA DICROMATICA

Riflette l'irradiazione di eccitazione a onde corte verso il preparato, è però trasparente per le radiazioni in fluorescenza a onde lunghe emesse dal preparato stesso.

#### FILTRO DI SBARRAMENTO

Blocca la luce di eccitazione dispersa dal preparato ed entrata nell'obiettivo. Possiede però la massima trasparenza per la specifica radiazione in fluorescenza. Questa combinazione ottimale di filtri riuniti in un blocchetto porta filtri facilmente intercambiabile, è la base per l'impiego di tutti i dispositivi di fluorescenza in luce riflessa e rappresenta un criterio essenziale per la standardizzazione di reazioni di immunofluorescenza allo scopo della diagnosi. In tutti i laboratori di ricerca e di diagnosi è divenuta indispensabile la microscopia in fluorescenza mediante eccitazione in luce riflessa.

#### SORGENTI LUCE

Condizione indispensabile per ottenere una sufficiente eccitazione del preparato in fluorescenza è poter disporre di sorgenti luminose adeguate, aventi massima intensità nel campo UV e nel visibile a onde corte. Per la semplice fluorescenza di routine (blu-verde) con poche esigenze alla densità di radiazione può essere impiegata una lampada alogena 12V 100W anziché una lampada a scarica di gas. Come lampade a scarica di gas sono disponibili lampade a vapori di mercurio ad altissima pressione o lampade allo xenon.

Le lampade di mercurio ad altissima pressione hanno uno spettro lineare caratteristico con elevata intensità. Le lampade allo xenon emettono invece nel campo visibile uno spettro continuo con intensità media costante. Generalmente vengono preferite le lampade a vapore di mercurio nel campo ultravioletto e verde e per la massima intensità nel campo del blu. Le lampade commercializzate sono HBO 50W -HB0200W a corrente alternata, HB0100-XB075 a corrente continua, queste ultime sono indicate per fotometria.