

3.2. IL MICROSCOPIO OTTICO COMPOSTO IN CAMPO CHIARO

Il microscopio ottico composto a luce riflessa in campo chiaro è lo strumento ottico più largamente usato per l'osservazione dei microrganismi.

È definito **composto** in quanto è costituito da un sistema di due lenti convergenti, l'**obiettivo** e l'**oculare**, avente, come già detto in precedenza, un **potere di risoluzione** e un **potere di ingrandimento** superiori sia a quella dell'occhio umano (lente biconvessa: cristallino), sia a quella di un microscopio ottico semplice (lente d'ingrandimento).

È definito **in campo chiaro** perché forma un'immagine scura dell'oggetto che si sta osservando su uno sfondo luminoso.

Ingrandimento e risoluzione

Sono le caratteristiche fisiche principali che caratterizzano la buona qualità di un microscopio ed in generale di un qualsiasi strumento ottico.

Per **INGRANDIMENTO** si intende la capacità che uno strumento ottico possiede di ingrandire le dimensioni dell'immagine osservata.

Il **POTERE DI INGRANDIMENTO** è perciò la capacità, da parte di un sistema ottico, di ingrandire di un determinato numero di volte le dimensioni reali dell'immagine osservata. Ad esempio, un potere di ingrandimento 10× significa che l'immagine viene ingrandita di 10 volte.

Per **RISOLUZIONE** si intende la capacità che uno strumento ottico possiede di separare otticamente due oggetti molto vicini nel campo visivo, in modo che essi possano essere distinti individualmente e non come un oggetto unico.

Il **POTERE RISOLUTIVO (o DI RISOLUZIONE)** è la capacità, da parte di un sistema ottico, di risolvere efficacemente l'immagine di due oggetti puntiformi contigui, cioè la capacità che una lente possiede di separare o di riconoscere come distinti piccoli oggetti molto vicini fra loro nel campo visivo. (**vedi tabella a pag. 14**)

Il potere di risoluzione dimensionalmente è $[L^{-1}]$, ed il suo contrario viene chiamato **limite di risoluzione**.

Lo strumento ottico che tutti abbiamo incorporato, l'occhio, in condizioni normali (non miope, non presbite, non astigmatico) possiede, posto a 25 cm di distanza da due oggetti, un limite di risoluzione pari a 75-100 μm (0,075-0,100 mm): questo significa che avvicinando tra loro i due punti ad una distanza minore di 75-100 μm , essi non sono più distinguibili l'uno dall'altro.

Il **limite di risoluzione** di un sistema di lenti obiettivo è la distanza minima tra due oggetti che consente di individuarli come entità distinte e non come un oggetto unico; è dato dalla seguente equazione:

$$\text{limite di risoluzione} = \frac{1}{2} \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

dove:

- λ lunghezza d'onda della radiazione utilizzata per illuminare il campione; essa deve essere inferiore alla distanza tra due oggetti affinché essi possano essere visti separati, cioè risolti;
- $n \sin \alpha$ apertura numerica, AN, della lente obiettivo;
- n indice di rifrazione del mezzo interposto fra il campione e la lente obiettivo;
- α metà dell'ampiezza angolare del cono di luce raccolto dalla lente obiettivo.

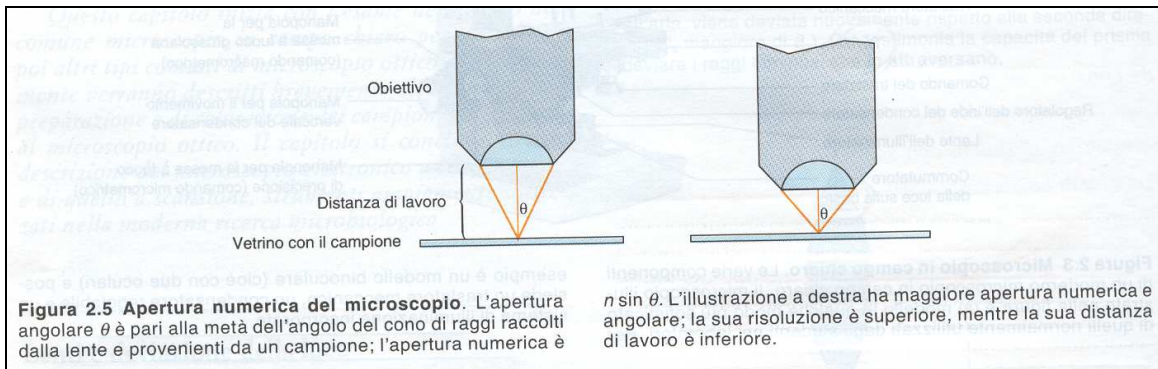
Il reciproco del limite di risoluzione prende il nome di **potere di risoluzione**.

$$\text{potere di risoluzione} = 2 \frac{n \sin \alpha}{\lambda}$$

Tanto più piccolo è il limite di risoluzione, tanto maggiore è il potere di risoluzione.

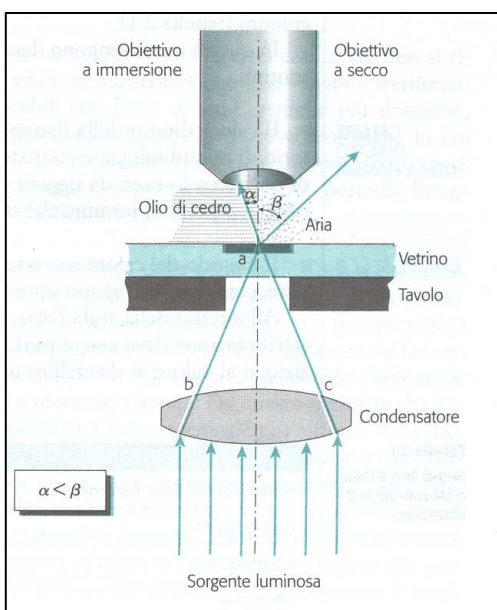
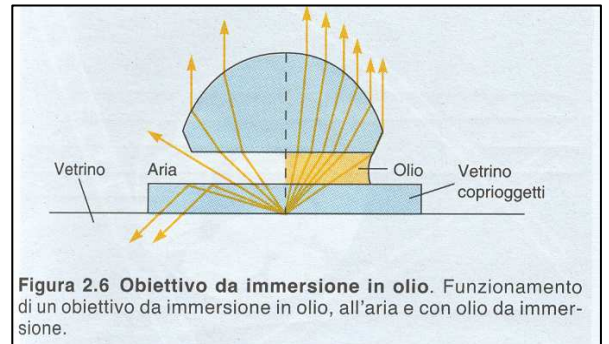
Per aumentare il potere di risoluzione, cioè per far sì che il suo valore numerico sia il più grande possibile, occorrerà dunque:

- ▶ **ridurre il denominatore**, cioè usare radiazioni a bassa lunghezza d'onda, compresa nell'estremità blu dello spettro luminoso (intervallo 450-500 nm); a tal scopo si può utilizzare la luce violetta o frapporre un filtro violetto davanti alla radiazione visibile emessa dalla sorgente luminosa del microscopio. Non è invece possibile utilizzare una sorgente che emetta radiazioni nel campo dell'ultravioletto perché verrebbero completamente assorbite dal vetro con cui sono costruite le lenti dei normali obiettivi;
- ▶ **aumentare il nominatore**, cioè aumentare l'apertura numerica dell'obiettivo ($n \sin \alpha$), agendo sulle due grandezze n ed α che la determinano:
- ▶ **per aumentare l'angolo α** è possibile diminuire la distanza frontale o distanza di lavoro, cioè la distanza tra l'obiettivo e il campione sul portaoggetti, come mostra la seguente figura:



- ▶ **per aumentare l'indice di rifrazione n** è possibile frapporre fra il vetrino coprioggetto e l'obiettivo un mezzo avente un indice di rifrazione maggiore di quello dell'aria ($n_{\text{aria}} \cong 1,00$).

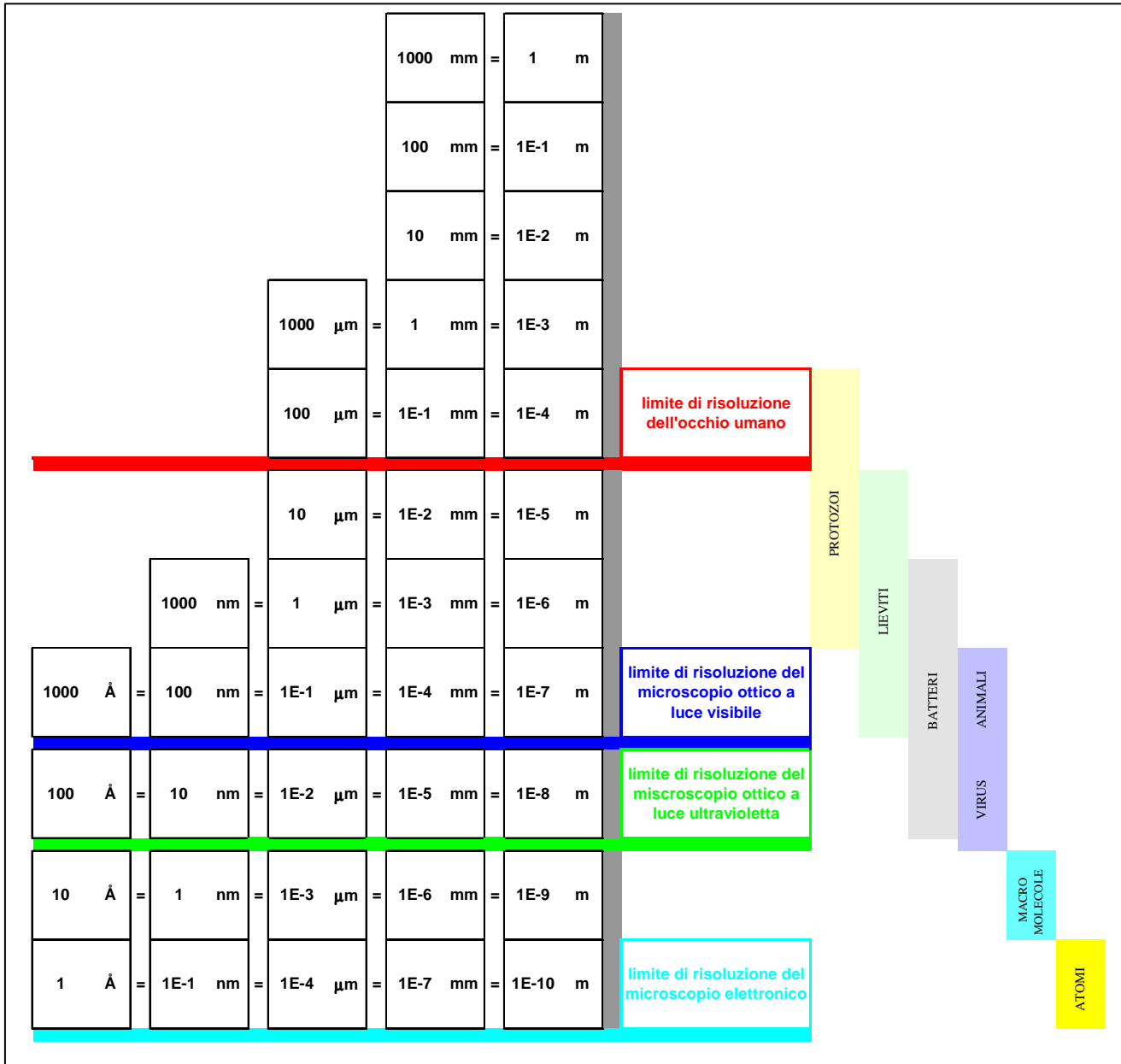
Infatti, dato che $\sin \alpha$ non può essere superiore a 1 (il valore massimo di α è 90° e $\sin 90^\circ$ è 1), nessuna lente che opera in un mezzo di propagazione come l'aria può avere



un'apertura numerica superiore a 1.

Il solo modo per ottenere un'apertura numerica superiore a 1 è quello di mettere tra il coprioggetto e l'obiettivo un **olio da immersione** (in genere si utilizza olio di legno di cedro) avente un indice di rifrazione pari a 1,515 che, essendo molto vicino a quello del vetro (circa 1,550), consente ai raggi che lo attraversano di non deviare eccessivamente, minimizzando così l'effetto di riflessione delle radiazioni quando passano da un mezzo più denso, vetro, ad un mezzo meno denso, aria. Si utilizzano per questo scopo i cosiddetti **obiettivi ad immersione in olio**. Nonostante non vi sia un limite teorico all'abbassamento del limite di risoluzione, in pratica per quanti accorgimenti vengano adottati il valore migliore ottenibile è di circa 200 nm (0,2 μm), la stessa dimensione di un batterio molto piccolo. Per ottenere un limite di risoluzione migliore bisogna affidarsi alle tecniche di microscopia elettronica.

LIMITI DI RISOLUZIONE DI VARI STRUMENTI



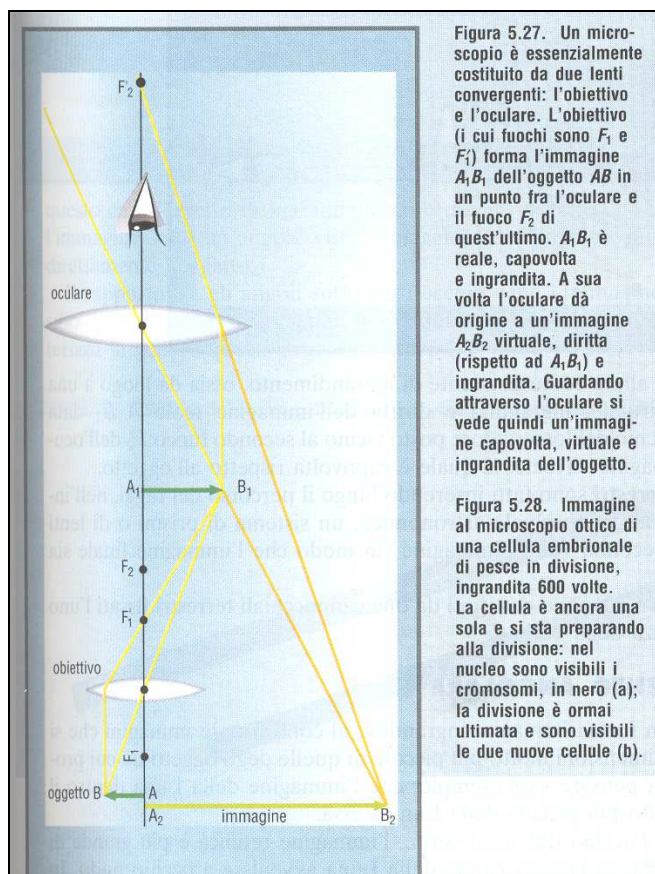
Principio di funzionamento

Figura 5.27. Un microscopio è essenzialmente costituito da due lenti convergenti: l'obiettivo e l'oculare. L'obiettivo (i cui fuochi sono F_1 e F_2) forma l'immagine A_1B_1 dell'oggetto AB in un punto fra l'oculare e il fuoco F_2 di quest'ultimo. A_1B_1 è reale, capovolta e ingrandita. A sua volta l'oculare dà origine a un'immagine A_2B_2 virtuale, diritta (rispetto ad A_1B_1) e ingrandita. Guardando attraverso l'oculare si vede quindi un'immagine capovolta, virtuale e ingrandita dell'oggetto.

Figura 5.28. Immagine al microscopio ottico di una cellula embrionale di pesce in divisione, ingrandita 600 volte. La cellula è ancora una sola e si sta preparando alla divisione: nel nucleo sono visibili i cromosomi, in nero (a); la divisione è ormai ultimata e sono visibili le due nuove cellule (b).

Vediamo come si forma l'immagine che si osserva attraverso un microscopio ottico composto.

L'oggetto AB che si vuole osservare si trova sul tavolino portaoggetti appena al di là del fuoco F_1 dell'obiettivo. Al di là della lente obiettivo si forma quindi una prima immagine A_1B_1 **reale** capovolta e ingrandita in una posizione che si trova tra la lente oculare e il suo fuoco F_2 .

Questa immagine viene raccolta dalla lente oculare che, a sua volta, trasforma la prima immagine ingrandita prodotta dall'obiettivo in una seconda immagine A_2B_2 prodotta dall'oculare che è **virtuale**, diritta rispetto ad A_1B_1 (e quindi capovolta rispetto all'oggetto AB) ed ulteriormente ingrandita che viene percepita dall'occhio.

Guardando attraverso l'oculare si vede il risultato di questo ingrandimento composto, cioè **un'immagine ingrandita e capovolta dell'oggetto AB** , che si forma ad una distanza dall'occhio pari alla distanza della visione distinta.

Con i migliori microscopi composti si ottengono ingrandimenti di circa un migliaio di volte (potere di ingrandimento 1000x) e si possono esaminare oggetti le cui dimensioni sono dell'ordine del micron ($1 \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6} \text{ m}$), la cui immagine ingrandita apparirà dunque all'osservatore dell'ordine del millimetro ($1 \text{ mm} = 1 \times 10^{-3} \text{ m}$).

L'immagine di un oggetto osservata attraverso una lente si dice **reale** quando il fuoco (punto sull'asse ottico dove la lente fa convergere i raggi luminosi incidenti paralleli all'asse ottico) è situato tra la lente e l'oggetto osservato; l'immagine risulta capovolta e tanto più ingrandita quanto più l'oggetto è collocato vicino al fuoco ed essendo reale, può essere raccolta da uno schermo di osservazione.

L'immagine di un oggetto osservata attraverso una lente si dice **virtuale** quando il fuoco è situato dietro l'oggetto osservato; in questo caso, però, non esiste alcun punto in cui si possa formare un'immagine reale, poiché i raggi divergono: questo significa che un rivelatore posto dall'altro lato della lente non potrebbe in alcun modo ricostruire l'immagine dell'oggetto. Il nostro occhio tuttavia percepisce l'immagine come se questo si trovasse dietro l'oggetto reale, e ce ne fornisce un'immagine virtuale, diritta ed ingrandita.

Caratteristiche costruttive

Sistema di supporto o stativo

Agisce da sostegno per tutti i dispositivi meccanici atti a sostenere e a spostare verticalmente il vetrino, a sostenere le lenti e ad illuminare il preparato. È costituito da:

1. **Sostegno a piede** - Base di metallo pesante su cui poggia tutto lo strumento e ne assicura una perfetta stabilità. Al suo interno è collocato il sistema di illuminazione.
2. **Tavolino portaoggetti** - Piano mobile posto tra due morsetti, con la funzione di sostenere il preparato da esaminare posto sopra ad un vetrino per microscopia. ha un'apertura centrale che consente il passaggio dei raggi luminosi provenienti dalla sorgente.
3. **Traslatore** - Congegno a vite situato a sinistra del tavolino che consente di spostare il preparato sul piano orizzontale lungo l'asse x (vite inferiore) e lungo l'asse y (vite superiore).
4. **Tubo portalenti** - Sostegno metallico sulla cui parte superiore sono collocati gli oculari, mentre nella parte inferiore è fissato il revolver portaobiettivi.
5. **Regolazioni di messa a fuoco** - Sistema di manopole coassiali situate sia a destra che a sinistra del tubo portalenti, il cui movimento sposta il tavolino portaoggetti in senso verticale, che, avvicinandosi od allontanandosi dall'obiettivo permette la messa a fuoco del preparato collocato sul tavolino lungo il percorso luminoso.

Si distinguono:

- ▶ **vite macrometrica**: manopola esterna più grande, la cui rotazione in senso orario alza verticalmente il tavolino e lo abbassa in senso antiorario di grandi spostamenti fino a raggiungere approssimativamente il fuoco dell'immagine;
- ▶ **vite micrometrica**: manopola interna più piccola, la cui rotazione in senso orario alza verticalmente il tavolino e lo abbassa in senso antiorario di piccoli spostamenti fino a raggiungere la perfetta messa a fuoco (*fochettare l'immagine*).

Sistema di illuminazione

Comprende tutti quei dispositivi atti a illuminare il preparato collocato sul tavolino portaoggetti e a controllare la misura del cono di luce che entra nell'obiettivo. È costituito da:

6. **Trasformatore** - Voltmetro che trasforma la tensione di rete (220 V) nella tensione con cui è alimentata la lampadina (6V).
7. **Sorgente luminosa** - Lampadina con filamento di tungsteno (emette radiazioni luminose nel campo del visibile) ad intensità luminosa regolabile mediante apposito potenziometro situato vicino all'interruttore di accensione.
8. **Specchio riflettente** - Superficie speculare che raccoglie i raggi luminosi provenienti dalla sorgente e li dirige verso il tavolino portaoggetti.
9. **Diaframma di campo – Condensatore** - Lenti collocate tra lo specchio riflettente e il tavolino portaoggetti che hanno lo scopo di concentrare il fascio di luce proveniente dallo specchio sul piano dell'oggetto da osservare sotto forma di cono luminoso.
10. **Diaframma ad iride** - Posto tra lo specchio e il condensatore, serve a regolare la quantità di luce utile che entra nell'obiettivo.

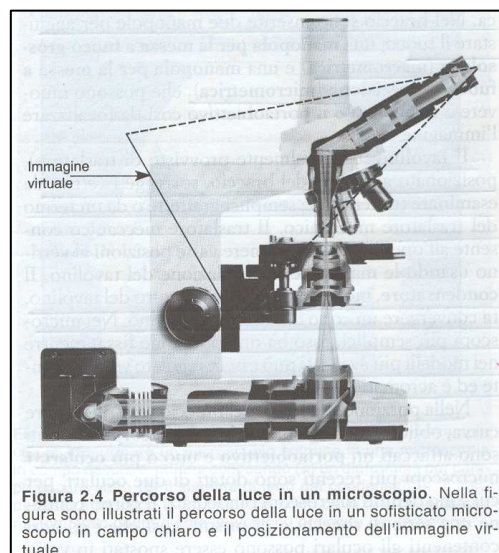


Figura 2.4 Percorso della luce in un microscopio. Nella figura sono illustrati il percorso della luce in un sofisticato microscopio in campo chiaro e il posizionamento dell'immagine virtuale.

Sistema ottico

È la parte fondamentale dello strumento e comprende i due sistemi di lenti composti: **gli obiettivi e gli oculari**.

11. Obiettivi - Sono collocati sul revolver portaobiettivi girevole, fissato nella parte inferiore del tubo portalenti, sopra al tavolino portaoggetti.

Ogni obiettivo è costituito da un sistema di lenti in grado di ingrandire di un determinato numero di volte ($3,2x$; $10x$; $40x$; $100x$) le dimensioni reali dell'oggetto che si sta osservando.

A seconda del loro utilizzo, si distinguono:

- ▶ **obiettivi a secco**: così chiamati perché durante l'osservazione tra la lente obiettivo ed il vetrino con il preparato si trova aria;
- ▶ **obiettivi ad olio**: così chiamati perché durante l'osservazione tra la lente obiettivo ed il vetrino con il preparato si interpone un olio ad alto indice di rifrazione allo scopo di aumentare il potere di risoluzione della lente. Sono costruiti in modo tale che l'olio non possa entrare dentro alle lenti danneggiandole.

12. Oculari - Sono collocati nella parte superiore del tubo portalenti, sopra al revolver portaobiettivi.

Il tubo binoculare consente la visione del campo ottico sfruttando entrambi gli occhi; sono presenti sistemi meccanici per regolare la distanza interpupillare e le diottrie di entrambi gli occhi.

L'ingrandimento dell'oculare ($10x$) moltiplicato per l'ingrandimento dell'obiettivo fornisce l'*ingrandimento totale* dell'immagine che l'occhio percepisce: ad esempio, con l'oculare $10x$ accoppiato all'obiettivo $40x$ si ottiene un'immagine ingrandita di 400 volte.

