

## MICROSCOPIA OTTICA: INGRANDIMENTO E MICROSCOPIO OTTICO

La microscopia ottica è una tecnica di osservazione capace di produrre immagini ingrandite di oggetti o di particolari di essi, troppo piccoli per essere osservati ad occhio nudo. Gli strumenti utilizzati per eseguire tale tecnica prendono il nome di **MICROSCOPIO OTTICO (m.o.)**. Per vedere un oggetto distintamente è necessario che sulla retina (delicato strato di fibre nervose) dell'occhio umano si formi un'immagine nitida, trasferita attraverso il nervo ottico al cervello. Il cristallino ha le proprietà di una lente convergente in grado di modificare la sua forma e quindi la sua **distanza focale** (intervallo di spazio in cui è possibile la messa a fuoco); la sua elasticità consente all'occhio normale di **“accomodarsi”** per una visione distinta per tutte le distanze comprese tra  $d_{\min} = 250 \text{ mm}$  (distanza della visione distinta più vicina all'occhio o **PUNTO PROSSIMO**) e l'**infinito (PUNTO REMOTO)**. Quando si vuole esaminare un piccolo oggetto nei suoi dettagli, lo si avvicina il più possibile agli occhi, affinché l'angolo di osservazione sia il più piccolo possibile e l'immagine retinica la più grande possibile, Ma come detto la minima distanza alla quale l'occhio può adattarsi per una **visione distinta** è quella del **punto prossimo**. Per ovviare a questo “inconveniente” si fa ricorso all'uso di sistemi ottici o sistemi di lenti ed in particolare al **MICROSCOPIO OTTICO (m.o.)** che può essere **SEMPLICE** o **COMPOSTO**.

### II MICROSCOPIO SEMPLICE

Il microscopio semplice è una lente convergente posta tra l'occhio e l'oggetto da osservare in modo che quest'ultimo si trovi in posizione intermedia tra il primo piano focale e la lente stessa. In tali condizioni la lente fornisce un'immagine virtuale diritta e ingrandita dell'oggetto, anche se questo si trova ad una distanza dall'occhio inferiore al **PUNTO PROSSIMO**. Il massimo ingrandimento ottenibile con una singola lente è di **8-10** volte (**8x-10x**).

### IL MICROSCOPIO COMPOSTO

Ingrandimenti maggiori si possono raggiungere invece grazie al microscopio composto, un sistema di due lenti convergenti dette, rispettivamente, **OBIETTIVO** e **OCULARE**. L'oggetto da osservare viene posto davanti all'obiettivo che ne fornisce un'immagine reale, capovolta e ingrandita, Questa immagine viene fatta cadere davanti all'oculare a distanza opportuna, che ne dà un'altra, virtuale, ingrandita e orientata nello stesso verso.

Occhio nudo	$d = 0,1 \text{ mm}$	
Con il microscopio	$d = 0,1 \text{ mm}/400 = 250 \text{ nm}$	<b>REALE</b>
	$d = 0,1 \text{ mm}/1000 = 100 \text{ nm}$	<b>VIRTUALE *</b>

\* L'ingrandimento a 100x è possibile solo con la tecnica dell'**“IMMERSIONE IN BAGNO D'OLIO”**.

## EFFICIENZA DEL MICROSCOPIO OTTICO

Vi sono **TRE** parametri che definiscono l'**EFFICIENZA** di un (m.o.).

- 1) **INGRANDIMENTO**
- 2) **POTERE RISOLUTIVO**
- 3) **DIFFRAZIONE**

### INGRANDIMENTO

Si definisce **INGRANDIMENTO** il rapporto tra le dimensioni dell'oggetto originale, e quelle dell'immagine ottenuta. E' dato dal prodotto tra l'ingrandimento dovuto all'oculare (solitamente 10x) moltiplicato l'ingrandimento dovuto agli obiettivi (solitamente 4x, 25x, 40x, 100x).

L'ingrandimento totale del m.o. raggiunge quindi facilmente il fattore 1000x, ma è inutile oltre 400x per il limite al **POTERE RISOLUTIVO** (o **RISOLUZIONE**) del microscopio imposto dalla **DIFFRAZIONE**.

L'ingrandimento, infatti, non è lo scopo principale di un m.o. poiché oltre un certo livello di ingrandimento non si possono distinguere ulteriori dettagli. Questo limite **E' SUPERABILE** grazie al **POTERE RISOLUTIVO** o **RISOLUZIONE** del m.o.

### POTERE RISOLUTIVO o RISOLUZIONE

Il **POTERE RISOLUTIVO** di un microscopio è la distanza minima tra due punti che lo strumento consente di osservare distinti. Supponiamo che una certa struttura contenga due piccoli punti molto vicini, Se le immagini di questi due punti si sovrappongono non li si vede più come distinti, ma come una struttura unica. Se invece l'immagine li presenta ancora separati possiamo dire che il microscopio **HA RISOLTO** (cioè **SEPARATO**) questi due punti. La distanza minima alla quale due punti sono visti come distinti si chiama **LIMITE DI RISOLUZIONE**. Di solito, in un microscopio composto, la risoluzione è determinata dal sistema di lenti **più vicino all'oggetto (OBBIETTIVO)**. Inoltre, al fine di rendere facilmente visibili i dettagli, l'obbiettivo ed il sistema di lenti **più vicino all'occhio (OCULARE)** hanno anche la funzione di ingrandire l'immagine ma questa funzione, può essere considerata **SECONDARIA** rispetto alla risoluzione.

In definitiva la risoluzione si ottiene quando punti oggetti molto vicini possono essere distinti come separati. Però la capacità di risoluzione **È LIMITATA**, a sua volta dal fenomeno della **DIFFRAZIONE**.

### DIFFRAZIONE

La **DIFFRAZIONE** è un fenomeno fisico che si ottiene quando onde incontrano oggetti sul loro cammino, associato anche al mezzo nel quale si tali onde si propagano. Questo fenomeno è tipico di ogni genere di onda, come il suono, le onde sulla superficie dell'acqua o le onde elettromagnetiche come la luce o le onde radio. Gli effetti della diffrazione sono però rilevanti solo se un'onda incontra un ostacolo le

cui dimensioni sono comparabili o minori rispetto alla propria lunghezza d'onda. Quando ciò accade, le due immagini non possono essere più essere viste come due immagini separate cioè non sono più risolvibili (esempio dei fari dell'automobile.)

## LE PARTI DEL MICROSCOPIO

- (1) **STATIVO**: braccio robusto del microscopio.
- (2) **TASTO LUCE**: permette di accendere e spegnere la lampada.
- (3) **RIPIANO PORTAVETRINO**: il piano su cui si appoggia il vetrino da osservare.
- (4) **FERMA-VETRINO**: levetta metallica angolare posta sul ripiano porta-vetrino. Permette di bloccare il vetrino porta-oggetti.
- (5) **TAVOLINO TRASLATORE**, che permette di spostare facilmente il vetrino in maniera controllata tramite una o due **VITI**.
- (6) **OBIETTIVI**: ciascun microscopio ha tre o quattro obiettivi. Insieme l'obiettivo e l'oculare formano l'immagine ingrandita che viene osservata. Nella parte centrale del corpo di ciascun obiettivo è indicato il fattore d'ingrandimento (4x, 10x, 40x, 100x).
- (7) **OCULARI REGOLABILI**: sono le lenti attraverso le quali si effettua l'osservazione; da un lato hanno inciso il numero 10x che rappresenta il loro fattore d'ingrandimento.
- (8) **REGOLATORE DELL'INTENSITÀ LUMINOSA**: permette di variare l'intensità luminosa del campo mediante il controllo della tensione applicata alla lampada.
- (9) **VITE MACROMETRICA O CURSORE**: è la manopola di regolazione grossolana della messa a fuoco, permette di fare spostamenti sensibili del tavolino porta preparati, accicinandolo o allontanandolo dall'obiettivo, fino a quando non si rende visibile il preparato, **la si usa solamente con l'obiettivo più piccolo** ( il 4x).
- 10) VITE MICROMETRICA O MICROCURSORE**: più piccolo della precedente è coassiale con essa. Permette la regolazione fine della messa a fuoco. Perché gli obiettivi sono parafocali, questa è **l'unica manopola che è necessario regolare** per mettere a fuoco il preparato, quando si passa da un obiettivo all'altro (Tutti gli obiettivi sono costruiti in modo da mettere a fuoco il preparato, usando la stessa distanza di lavoro, cioè quella tra il vetrino e obiettivo, e sono detti parafocali).

## TAPPE PER L'USO DEL MICROSCOPIO

1. Se, eventualmente c'è necessità di spostare il microscopio sul bancone non usare le parti mobili, ma impugnare lo **STATIVO** (1), mettendo contemporaneamente una mano sotto al microscopio.
2. Accendere la luce (**TASTO LUCE**) (2).
3. Posizionare il vetrino sul **RIPIANO PORTA-VETRINO** (3) e bloccarlo con la levetta **FERMA-VETRINO** (4).
4. Posizionare il vetrino al centro del fascio luminoso utilizzando la **VITE** (o le viti) per il **MOVIMENTO** del **RIPIANO TRASLATORE** (5). Tale vite permette l'osservazione di tutto il preparato una volta operata la messa a fuoco.
5. Cominciare l'osservazione utilizzando **SEMPRE** per primo l'ingrandimento minore (**4x**) tra gli **OBIETTIVI A VARI INGRANDIMENTI** (6). Poiché il suo campo visivo è più vasto consente una la visione di una superficie maggiore di preparato istologico.
6. Regolare la distanza interpupillare cambiando la posizione dei due **OCULARI REGOLABILI**(7) tirandoli o spingendoli insieme.**N.B.** L'osservazione dei vetrini va effettuata usando **ambidue gli occhi contemporaneamente**.
7. Aggiustare l'intensità del fascio luminoso utilizzando la levetta o la manopola messa a fianco della **SORGENTE LUMINOSA REGOLABILE**(8).
8. Effettuare una prima messa a fuoco grossolana usando la **VITE MACROMETRICA** (9). Dopo questa operazione tale vite **NON SI DEVE** più toccare. Infatti, essendo gli obiettivi parafoali, una volta effettuata la prima messa a fuoco con il 4x essa sarà mantenuta anche per gli ingrandimenti maggiori che saranno pressoché a fuoco.
9. Effettuare una seconda messa a fuoco fine usando la **VITE MICROMETRICA** (10). Spostando leggermente avanti e indietro la vite micrometrica (**FOCETTAMENTO**) è possibile una migliore definizione dei particolari.
10. Passando all'obiettivo 10x o al 40x bisognerà usare **SOLAMENTE** la vite micrometrica per ottimizzare la messa a fuoco. Qualora il punto che stavamo

osservando con gli ingrandimenti alti bisogna esca dal campo visivo bisogna ricominciare l'osservazione dall'ingrandimento 4x.

11. Terminata l'osservazione riposizionare l'obiettivo 4x e spegnere la lampada dall'interruttore.

## **REGOLE PER L'USO DEL MICROSCOPIO**

Il microscopio è uno strumento **DELICATO E COSTOSO** ed e' quindi opportuno **trattarlo con cura usando alcune norme di buon senso.**

- a. Per spostare il microscopio da un tavolo di lavoro ad un altro bisogna afferrarlo con una mano per il braccio dello stativo e mettere l'altra mano sotto la base.
- b. Durante lo spostamento ed il posizionamento sul tavolo di lavoro evitare di far prendere dei colpi allo strumento.
- c. Quando si condivide il microscopio con un collega e si vuol fare osservare il preparato, bisogna evitare di spostare il microscopio, trascinandolo sul tavolo, perché a causa delle vibrazioni che ne deriverebbero l'apparecchio potrebbe danneggiarsi. E' preferibile cedere il posto, lasciando immobile il microscopio.
- d. Lavorare con il microscopio di fronte disponendo il notes per gli appunti o disegni di lato; non il contrario. L'osservazione, in questo modo, è facilitata e non si corre il rischio di far cadere accidentalmente il microscopio dal tavolo.
- e. Pulire le lenti quando è necessario. Quando gli oculari o gli obiettivi sono sporchi è ovvio che la qualità della visione ne risentirà, per cui si rendere necessario procedere alla pulizia delle lenti.
- f. Per pulire le lenti bisogna usare la carta speciale per lenti ed acqua distillata. Non usare mai tessuto comune o strofinare una lente quando è asciutta.
- g. Se si presenta un problema imprevisto rivolgersi al docente.

## IL MICROSCOPIO ELETTRONICO

A differenza del microscopio ottico che "illumina" i campioni con un fascio di luce visibile, il microscopio elettronico (**m.e.**) utilizza un fascio di elettroni che hanno una lunghezza d'onda molto più breve rispetto ad un fascio di fotoni. Infatti, mentre per la luce visibile il valore medio della lunghezza d'onda è di circa 5000 Å, per un fascio di elettroni accelerati a 100 kV la lunghezza d'onda è di circa 0,05 Å, il che significa un potere risolutivo circa 100.000 volte superiore. Questo permette di ottenere immagini con una risoluzione molto maggiore e, quindi, di poter ottenere un ingrandimento maggiore. Inoltre, al contrario del microscopio ottico nel (**m.e.**) si utilizzano lenti magnetiche per deviare i fasci di elettroni (cariche elettriche in movimento, quindi sensibili al campo magnetico) e quindi ingrandire le immagini.

Il microscopio elettronico è costituito da un cannone ad elettroni (**1**) che emette un fascio di elettroni primari (**2**), da una lente condensatore magnetico che concentra gli elettroni sul campione (**3**), da una lente magnetica obiettivo (**3a**), da una lente magnetica proiettore (**3b**) che mantiene gli elettroni sull'asse ottico del sistema. Dopo aver incontrato il campione (**4**) gli elettroni lo attraversano generando un fascio definito "**fascio degli elettroni secondari**"(**5**). Sono raccolti da un rilevatore (**6**) e proiettati su uno schermo fluorescente o su una pellicola o lastra fotografica su cui si raccolgono le immagini (**7**). Le immagini ottenibili al microscopio elettronico sono **ESCLUSIVAMENTE IN BIANCO E NERO**. Allo scopo di evitare la diffusione del fascio di elettroni, nel sistema è mantenuto un vuoto piuttosto spinto (**8**).

Nel campione non tutte le zone sono permeabili nello stesso modo al passaggio di elettroni. Questa diversa permeabilità è dovuta alla presenza di **carica elettrica** diffusa in maniera disomogenea nel campione. Le zone con maggior presenza di carica elettrica offriranno una **resistenza maggiore** al passaggio del fascio di elettroni primari risultando "**più elettrondense**". Gli elettroni saranno distribuiti in maniera diametralmente opposta nel fascio secondario rispetto al fascio primario. Ciò provocherà un'inversione nel cromatismo dell'immagine del campione. Il "**negativo**" che ne risulta sarà impresso su di una lastra o su di una pellicola fotografica. Sviluppando fotograficamente la lastra o la pellicola otteniamo un "**positivo**" in cui il cromatismo reale del campione è stato ristabilito. Un esempio è la MEMBRANA PLASMATICA dove le parti esterne del doppio strato fosfolipidico, ricche di gruppi polari, appaiono scure mentre la parte interna che è apolare risulta chiara.