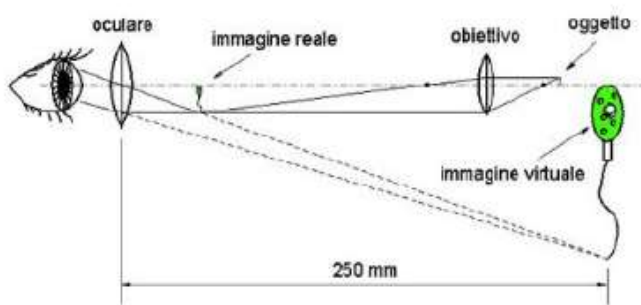
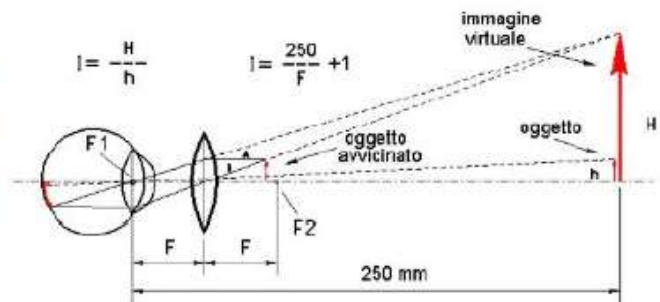


Il microscopio

Didattica > Laboratorio > Microscopio

Il Microscopio ottico biologico

Se vogliamo osservare i dettagli di un oggetto, lo avviciniamo agli occhi oppure utilizziamo una lente di ingrandimento. Ma la semplice lente o anche un sistema di lenti più complesso, non dà mai più di 6-10 ingrandimenti. In tali condizioni la lente fornisce un'immagine virtuale dritta e ingrandita dell'oggetto osservabile dall'occhio, posto nel secondo fuoco della lente, anche se si trova ad una distanza dall'oggetto inferiore alla distanza di visione distinta (immagine a fianco).



Ingrandimenti maggiori si possono raggiungere invece grazie al microscopio composto, un sistema di due lenti convergenti dette, rispettivamente, obiettivo e oculare. In pratica queste due lenti sono a loro volta costituite da due combinazioni di lenti diverse tali da correggere e ridurre al minimo le aberrazioni ma, dal punto di vista funzionale, il discorso non muta. L'oggetto da osservare viene posto davanti all'obiettivo (ad una distanza maggiore della sua lunghezza focale), 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 capovolta rispetto all'originale (vedi figura a fianco).

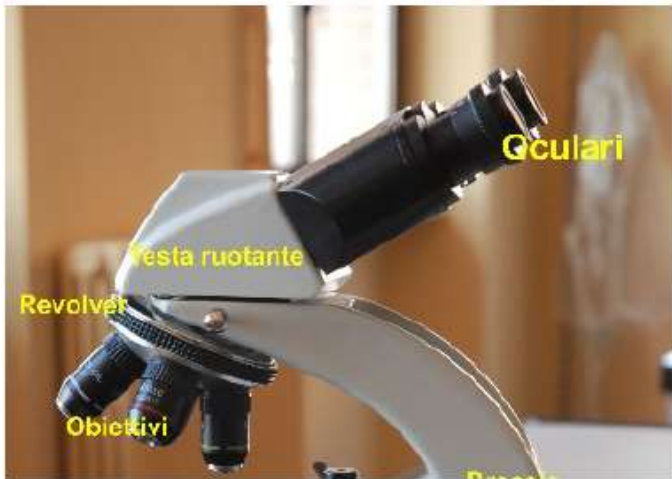


In realtà esistono due tipi di microscopi ottici: lo "stereomicroscopio" a sinistra nella foto ed il "microscopio biologico" a destra nella foto. Il primo, oltre ad avere due oculari, ha anche due obiettivi, spesso nascosti dentro ad un barilotto e permette la visione, in stereo, con luce incidente, di oggetti solitamente non troppo piccoli a basso ingrandimento (10x - 60x). Il Microscopio biologico invece permette di vedere, per luce trasmessa, oggetti trasparenti ad alto ingrandimento (40x-1000x). In questa pagina vediamo la struttura e l'uso del microscopio biologico.



Obiettivo ed **oculare** sono inseriti all'estremità di un tubo metallico della lunghezza standard di 160 mm, appoggiato su un sostegno detto **stativo**, il quale regge anche il **tavolino** dove viene posto il preparato da osservare. La distanza tra obiettivo e preparato può essere variata con un movimento a cremagliera del tubo, regolato da due viti, quella **macrometrica** per spostamenti rapidi e quella **micrometrica** per la messa a fuoco precisa. Con movimenti laterali del piatto si può esaminare la parte del preparato che interessa di più. Sotto il tavolino porta-oggetti si trova il **condensatore** che fa convergere sull'oggetto la luce prodotta da un'eventuale lampadina incorporata nel microscopio: il condensatore è munito di un **diaframma** regolabile. Le caratteristiche fondamentali di un microscopio ottico sono l'**ingrandimento**, il **contrasto** ed il **potere di risoluzione**.

- **Oculari**: sono le lenti attraverso le quali si effettua l'osservazione, in altre parole si poggia l'occhio. Da un lato hanno inciso un numero, seguito da una **x**, che rappresenta il fattore di ingrandimento (generalmente 10x, ma talora 8x o 12x). I migliori microscopi hanno due oculari, che rendono comoda la visione, altri solo uno.
- **Tavolino portavetrini** con clip blocca vetrino, fisso o con movimento sui due assi x e y grazie a due **manopole traslatrici**. Può essere rettangolare o circolare.
- **Obiettivi**: ciascuno microscopio ha tre o quattro obiettivi, montati su un "**revolver**" ruotante che permette di cambiarli velocemente. 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** (da 4x a 100x) ed altri **dati numerici**.
- **Condensatore**: Il condensatore è un sistema di lenti, posto sotto il tavolino porta-oggetti, che ha la funzione di inviare all'obiettivo la quantità di luce adatta alle sue caratteristiche ottiche. È regolabile.



in verticale ed è sempre provvisto di un **diaframma** ad iride che serve a regolare l'ampiezza del cono di luce che entra nell'obiettivo.

- **Viti di regolazione del fuoco:** I microscopi hanno due viti di regolazione del fuoco. Una grande **macrometrica** che mette a fuoco grossolanamente, permette di fare spostamenti sensibili del tavolino portapreparati, avvicinandolo o allontanandolo dall'obiettivo, fino a quando non si rende visibile il preparato. La si usa solamente con l'obiettivo più piccolo (il 4x). Una piccola **micrometrica**, coassiale con la prima, permette la regolazione fine della messa a fuoco. Perché gli obiettivi sono parfocali, questa è l'unica manopola che è necessario regolare per mettere a fuoco il preparato, quando si passa da un obiettivo all'altro.

- **Ingrandimento:** L'ingrandimento totale del microscopio è dato dal prodotto dell'ingrandimento dell'obiettivo per quello dell'oculare. Oltre all'ingrandimento occorre però considerare il **potere di risoluzione** ovvero la distanza minima tra due punti che si riesce a distinguere.

Due ottimi video che spiegano passo passo la struttura del microscopio ottico (stereo e biologico) e le sue parti, il primo e l'uso del microscopio il secondo.

Gli Obiettivi del Microscopio

Gli **obiettivi** sono sistemi di lenti che danno la prima immagine ingrandita del campione. Sono avvitati su una torretta girevole a **revolver**, che ne porta fino a sei con diverso ingrandimento e diverse caratteristiche. Sull'obiettivo sono incisi di norma tre numeri e talora anche altre informazioni, importanti per capirne le caratteristiche.

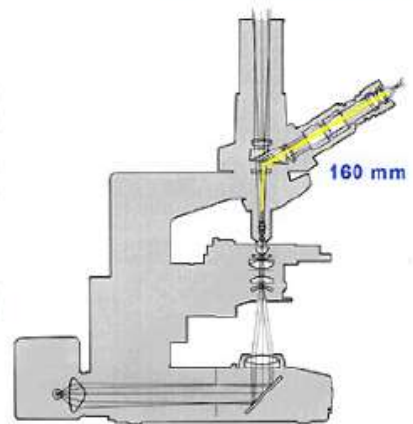
Il numero più grande, sempre presente, seguito talora da una **x** indica l'**ingrandimento**. Questo valore moltiplicato per quello dell'oculare dà l'ingrandimento totale della coppia. Nel nostro caso vediamo un oculare da 10X, da 40X ed uno da 100X. Nascosto è un oculare 4X.

Accanto, seguito da una barra, un numero con la virgola che nel nostro caso è 0,25 (per 10X) e 0,65 (per il 40X) è l'apertura numerica (A.N.). Maggiore è tale valore e maggiore sarà la risoluzione dell'obiettivo, in altri termini la sua qualità ottica. Nel caso dell'obiettivo 100X l'A.N. è ben 1,25; ma in questo caso c'è l'indicazione "oil". Questo vuol dire che si tratta di un **obiettivo ad immersione**.



Il potere di risoluzione di un obiettivo dipende grandemente oltre che dall'apertura numerica (A.N.) anche dall'indice di rifrazione (n) del mezzo interposto. Il problema è che la luce esce dal vetro copri-oggetto ($n=1.53$), passa nell'aria ($n=1.00$) e poi di nuovo entra nel vetro dell'obiettivo ($n=1.53$). Per ovviare a ciò, nel caso di forti ingrandimenti, si usano "**obiettivi a immersione**". Tra l'obiettivo ed il vetrino si mette una goccia di olio (in genere di cedro con $n=1.51$) che permette di arrivare molto vicino all'indice di rifrazione del vetro ed ottenere quindi un percorso omogeneo della luce.

Sotto troviamo altri due numeri, che nel nostro caso sono in tutti e quattro i casi **160** e **0,17**. Sono i valori più comuni. Il primo rappresenta la lunghezza del **tubo porta ottica** e nel caso non permette la compatibilità di obiettivi di marca diversa dal microscopio. Il secondo indica lo spessore del **vetrino copri-oggetto**: appunto di 0,17 mm. Nel caso di obiettivi per strisci di sangue senza vetrino c'è l'indicazione "-".



Ingrandimento del microscopio

Nel microscopio ottico composto l'ingrandimento totale è il risultato del prodotto tra l'**ingrandimento dell'obiettivo** e l'**ingrandimento dell'oculare**. Sono i valori scritti sui tubi degli obiettivi, spesso seguita da una X e quelli scritti sull'oculare dove si avvicina l'occhio.

$$I_{\text{totale}} = I_{\text{obiettivo}} \times I_{\text{oculare}}$$

In teoria usando più lenti l'immagine potrebbe essere ingrandita in modo indefinito. In pratica se si ingrandisce l'immagine oltre una certa soglia questa appare "sgranata", perde in risoluzione e quindi l'immagine ottenuta non è utilizzabile. Ogni strumento ottico, come microscopio, cannocchiale ecc. possiede un proprio **potere di risoluzione**, che dipende dal limite di risoluzione (LR) che è la distanza minima a cui due punti possono essere percepiti come oggetti distinti. Ricordiamo che nel caso dell'occhio umano il limite di risoluzione è di 0,1 mm: questo vuol dire che anche la migliore vista umana non può distinguere due punti distanti meno di 0,1 mm.

- LR per il microscopio ottico con obiettivi a secco = 0,2 μm
- LR per il microscopio ottico con obiettivo ad immersione = 0,1 μm
- LR per il microscopio elettronico = 0,2 nm

L'**ingrandimento utile** è il massimo ingrandimento utilizzabile, senza perdere in potere di risoluzione. Ricordando il limite dell'occhio umano per il quale LR = 0,1 mm, dividendo questo valore per quello di un microscopio, abbiamo che:

- microscopio ottico con obiettivi a secco LR = 0,2 μm → massimo ingrandimento utile **500 X**
- microscopio ottico con obiettivo ad immersione LR = 0,1 μm → massimo ingrandimento utile **1000 X**
- microscopio elettronico LR = 0,2 nm → massimo ingrandimento utile **500.000 X**

Il **limite di risoluzione (LR)** dipende da tre fattori:

- la lunghezza d'onda utilizzata (λ); più piccola è la lunghezza minore sarà il limite di risoluzione. La luce visibile va da circa 800 nm (rosso) a circa 400 nm (violetto).
- la proprietà del mezzo interposto tra l'oggetto e l'obiettivo (n). Per l'aria n=1,00, mentre per il vetro n=1,53.
- caratteristiche della lente: α l'angolo massimo che un raggio luminoso proveniente dall'oggetto forma con l'asse ottico dell'obiettivo (α < 90°).

Si ha che:

$$LR = \frac{\lambda}{n \cdot \text{sen} \alpha}$$

In particolare il prodotto **n sen α** rappresenta l'apertura numerica (AN) tipica di ogni obiettivo ed indicata accanto all'ingrandimento.

$$AN = n \cdot \text{sen} \alpha$$

Poiché per diminuire LR non è semplice diminuire la lunghezza d'onda (si può utilizzare gli UV ma crea problemi) si può però aumentare l'apertura numerica AN usando un mezzo con alta AN.

