

7. IL MICROSCOPIO BIOLOGICO

Il microscopio è lo strumento centrale della materia ed è essenziale la qualità delle ottiche per poter effettuare discrete osservazioni. Non vale la pena di perdere tempo con i microscopi giocattolo, i quali presentano ottiche troppo scadenti per effettuare osservazioni serie. Per l'hobbista che ha intenzione di avvicinarsi alla microscopia esistono degli ottimi piccoli microscopi ad un prezzo che oscilla tra le 100 e le 150 euro. Prima di acquistarne uno è bene controllare la qualità delle ottiche chiedendo al negoziante di mostrarci un vetrino. L'immagine deve essere chiara e non troppo sfuocata e i dettagli devono essere visibili. Non è importante avere un microscopio con ingrandimenti alti se il potere di risoluzione non è buono. Per la maggior parte delle osservazioni bastano ingrandimenti da 40 X a 400 X e non è necessario andare oltre. E' importante però che lo strumento abbia almeno vite macrometrica e micrometrica per la messa a fuoco fine. Se un hobbista o uno studente è particolarmente appassionato o interessato alla materia troverà forse limitativo l'uso di un microscopio troppo semplice e allora dovrà scegliere un microscopio più completo, che permette di avere immagini più nitide e belle, ma soprattutto permetterà in un futuro di montare accessori standard come il campo oscuro, il set per la polarizzazione o il contrasto di fase. Il microscopio magari potrà effettuare ingrandimenti fino a 1000 X con gli obiettivi ad immersione, potrà avere l'illuminazione incorporata, il condensatore focalizzabile e dotato di diaframma ad iride, il tavolo traslatore e ottiche migliori. E' possibile trovare ottimi microscopi monoculari con queste caratteristiche ma con obiettivi acromatici con un prezzo di 300 o 400 euro a seconda della casa costruttrice e del rivenditore. Microscopi binoculari invece sono più adatti per stancare meno la vista e i trinoculari per poter lasciare la macchina fotografica o la telecamera montata durante l'osservazione. Microscopi ancora più belli, ma di costo maggiore, potranno avere anche il diaframma di campo per l'illuminazione di Köhler, obiettivi planari e altri accessori.

7.1 Le componenti ottiche del microscopio biologico

Non mi dilungherò più di tanto a spiegare l'ottica del microscopio, ma indicherò solo le componenti di base del microscopio composto e il loro utilizzo. Iniziamo subito con l'indicare la definizione di ingrandimento: l'ingrandimento del microscopio è definito da quante volte vediamo ingrandita l'immagine del preparato. Per ottenerlo si moltiplica l'ingrandimento indicato sull'obiettivo per l'ingrandimento riportato sull'oculare.

Il microscopio è costituito dalle seguenti componenti (fig. 5):

- 1) Oculare: è un sistema di lenti che ingrandisce ulteriormente l'immagine prodotta dall'obiettivo. L'operatore guarda il preparato attraverso l'oculare. Tra i più usati sono gli oculari grandangolari che permettono di vedere un ampio campo. Esistono anche altri tipi di oculari come oculari per la visione a distanza adatti a chi porta gli occhiali e oculari con reticolo adoperati nelle misurazioni micrometriche.
- 2) Obiettivi: forniscono la prima immagine ingrandita e sono formati da più lenti. Sono le componenti più importanti del microscopio e ne garantiscono la qualità ottica. Gli obiettivi devono fornire un'immagine non distorta e il più piana possibile, nonché devono avere un alto potere di risoluzione. Gli obiettivi più semplici sono gli acromatici e forniscono un'immagine corretta nei colori, ma non forniscono un'immagine perfettamente piana del preparato all'interno del campo visivo. Gli obiettivi planari sono corretti per le distorsioni della forma e forniscono immagini piane. Gli obiettivi per gli alti ingrandimenti hanno una distanza di lavoro e una profondità di campo molto piccola, ovvero la messa a fuoco avviene a stretto contatto del coprioggetto e l'intervallo di spazio in cui il campione è a fuoco è piccolissimo. E' importante perciò che gli obiettivi in questione siano telescopici, proprio per evitare la rottura accidentale dei vetrini e il conseguente danneggiamento irreparabile dell'obiettivo. Spesso non è possibile usare obiettivi di case di produzione differenti da quella del proprio microscopio perché gli obiettivi vengono calcolati in base alla lunghezza del tubo porta ottica. Un fattore che influenza la qualità di un microscopio è la centratura della torretta girevole. Nel passaggio da un ingrandimento all'altro il soggetto al centro del campo visivo non dovrebbe spostarsi e l'immagine dovrebbe rimanere più o meno a fuoco. Sulla montatura di ciascun obiettivo si possono trovare alcune indicazioni come il tipo di obiettivo, l'ingrandimento, l'apertura numerica, la lunghezza del tubo porta ottica per il quale è stato calcolato, lo spessore consigliato del vetrino coprioggetto e se deve essere adoperato a secco o ad immersione.
- 3) Tubo: in genere ha lunghezza pari a 160 mm e collega l'oculare al corpo del microscopio. In genere è inclinato a 45° per facilitare l'osservazione.

- 4) Torretta portaobiettivi: è girevole e permette di cambiare gli obiettivi rapidamente durante l'osservazione. In genere può contenere tre, quattro o cinque obiettivi, i quali sono uniti ad essa tramite attacchi a vite.
- 5) Tavolino: è il luogo in cui si appoggia il preparato. In genere è quadrato e ad esso è collegato il condensatore, che si sposta con esso durante la messa a fuoco.
- 6) Tavolo traslatore: si tratta di un dispositivo utilissimo compreso nel tavolino che permette lo spostamento uniforme del vetrino. Il portaoggetto viene fissato al tavolo traslatore tramite un aggancio a molla e viene spostato durante l'osservazione agendo su viti poste a fianco del tavolino che consentono spostamenti del preparato in su e in giù e a destra e a sinistra.
- 7) Condensatore focalizzabile dotato di viti per la centratura: è costituito da un sistema di lenti ed è posto al di sotto del tavolino. Permette di dirigere un fascio di luce di ampiezza adatta agli obiettivi che si stanno adoperando. Se si usano obiettivi ad ingrandimento maggiore, che hanno un'apertura minore, il condensatore andrà spostato in alto, quasi a toccare il portaoggetto. In questa maniera si convoglierà nell'obiettivo tutta la luce perché il fascio di uscita avrà un'ampiezza minore. Il condensatore dovrà essere posizionato più in basso quando si usano obiettivi a minor ingrandimento.
- 8) Diaframma ad iride: è posto sotto al condensatore e viene utilizzato per aumentare o diminuire il contrasto delle immagini. Quando si chiude il contrasto aumenta.
- 9) Portafiltri: viene adoperato per inserire filtri correttivi o colorati, nonché filtri di vetro smerigliato per garantire un'illuminazione più diffusa.
- 10) Vite macrometrica: viti che permettono la messa fuoco grossolana attraverso ampi spostamenti del tavolino, o nei vecchi microscopi il sistema ottico.
- 11) Vite micrometrica: viti che permettono la messa fuoco fine. Fanno compiere al tavolino piccoli spostamenti.
- 12) Illuminatore: è composto da una lampada alogena fissa con una lente per convogliare la luce e un filtro azzurro di correzione. L'intensità della luce può essere regolata attraverso un regolatore di tensione posto sul basamento accanto all'interruttore di accensione. Al di sopra può essere presente il diaframma di campo regolabile utilizzato per la regolazione dell'ampiezza del campo illuminante.
- 13) Stativo: è il basamento e il braccio che sostiene tutto il gruppo ottico e può avere forme differenti.

7.2 Apertura numerica, ingrandimento utile e potere di risoluzione del microscopio

Il potere risolvibile è uno dei più importanti indici sulla qualità ottica di un microscopio. Il potere di risoluzione, o potere separatore, è definito dalla capacità di vedere due punti distinti. Questo è senza dubbio valutabile in base alla nitidezza e alla ricchezza di particolari delle immagini osservate al microscopio. Più l'obiettivo è potente e più è difficile ottenere immagini nitide. Non possono esistere obiettivi ad ingrandimento maggiore al 100 X perché dopo questa soglia non è più possibile avere immagini nitide ed utilizzabili (ingrandimento utile). La minima distanza dm alla quale si possono vedere due punti come distinti è data da:

$$dm = \frac{1,22 \lambda}{2n \sin \alpha}$$

Dove λ è il valore della lunghezza d'onda della luce usata, n è l'indice di rifrazione del mezzo interposto tra coprioggetto e lente frontale dell'obiettivo e α è il semiangolo di apertura dei raggi che entrano nell'obiettivo. Il valore del potere separatore P si ottiene facendo il reciproco di dm . Il potere separatore aumenta quando si usano mezzi con n molto alto come olio di legno di cedro ($n = 1,51$) e piccole lunghezze d'onda. P è direttamente proporzionale ad α , ed è per questo che a diaframma aperto si ottengono fotografie più nitide. L'aria ha indice di rifrazione pari a 0,7, ed è quindi non sufficiente per compensare la piccola ampiezza del semiangolo di apertura dei raggi che entrano negli obiettivi ad alti ingrandimenti. Per alzare il valore di apertura numerica ($A.N. = 2n \sin \alpha$) si sfruttano dunque mezzi ad n elevato.

Per conoscere l'ingrandimento utile del microscopio si moltiplica per 1000 il valore dell'apertura numerica dell'obiettivo. Il valore di ingrandimento utile serve per determinare il valore massimo di ingrandimento dell'oculare da utilizzare con quell'obiettivo fino al quale possiamo avere immagini nitide. Ad esempio con un obiettivo da 40 X avente un valore di apertura numerica di 0,65 possiamo ottenere al massimo ingrandimenti di 650 X. Con questo obiettivo è possibile utilizzare oculari da 5 X, 10 X, 16 X, ma non un 20 X perché altrimenti si sorpasserebbe l'ingrandimento utile. E' meglio in ogni caso scegliere oculari di minore potenza (10 X, in genere) per ottenere immagini migliori.

7.3 Regolazione del microscopio secondo Köhler

Il metodo di Köhler viene adoperato per la corretta regolazione di condensatore e diaframma ad iride. Microscopi sprovvisti di diaframma di campo non possono essere regolati secondo il metodo di Köhler. Per questi microscopi bisognerà imparare ad utilizzare bene condensatore e diaframma ad iride come indicato nel paragrafo 7.1 per aumentare le prestazioni del microscopio. Le modalità di messa a fuoco saranno spiegate nel paragrafo 8 del capitolo 2.

Per il metodo di Köhler occorre innanzitutto mettere a fuoco un qualsiasi preparato agendo sulle viti macro e micrometriche. Si apre completamente il diaframma ad iride posto sotto al condensatore, si chiude completamente il diaframma di campo e si ruota la manopola del condensatore fino ad avere a fuoco l'ombra del diaframma di campo all'interno del campo visivo. Usando ingrandimenti alti non si riescono a distinguere bene le lamelle del diaframma di campo. In questo caso si regola il condensatore al punto di passaggio dal colore blu al rosso dei raggi di luce diffratti dalle lamelle del diaframma di campo. Si centra infine l'immagine del diaframma di campo all'interno del campo visivo agendo sulle apposite viti poste sul condensatore. Questa operazione non è semplice. Si apre il diaframma di campo fino a portare l'immagine del bordo a coincidere con i limiti del campo inquadrato. Ora la corretta posizione in altezza del condensatore e il suo centraggio sono regolate, così come la corretta apertura del diaframma di campo. Bisogna ancora regolare l'apertura del diaframma ad iride posto sotto al condensatore: si sfilava un oculare e si regola il diaframma ad iride in modo che oscuri circa un quarto della superficie illuminata che si osserva in fondo al tubo. Si rimette l'oculare e si osserva il preparato al microscopio. Questa regolazione deve essere fatta ogni volta nel passaggio da un ingrandimento all'altro.