

**La microscopia ottica:
la storia, gli strumenti
ed i principi di
funzionamento**

La microscopia ottica

Un cristallo trasparente, casualmente più spesso al centro che ai bordi consente di osservare oggetti ingranditi. Lo stesso cristallo può far convergere i raggi del sole dando fuoco a materiale infiammabile.



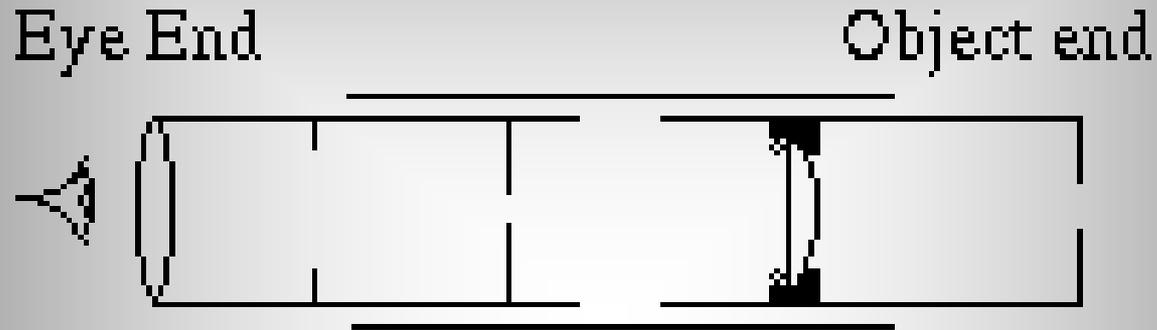
La microscopia ottica

Le "lenti da ingrandimento" e quelle "ustorie" menzionate già negli scritti di Seneca e di Plinio, non sono state usate razionalmente sino all'invenzione degli occhiali, verso la fine del XIII secolo.



Furono chiamate "lenti" per la loro forma, che ricorda quella di una lenticchia.

La microscopia ottica



Il microscopio semplice più antico era costituito soltanto da un tubo con una piastra per l'oggetto da osservare ad un'estremità e, all'altra, da una lente "obiettivo" in grado di offrire un ingrandimento di circa dieci diametri (dieci volte) la dimensione reale.

La microscopia ottica

Il primo microscopio ottico composto, costituito da due lenti fu costruito per la prima volta da Zacharia Janssen e dal figlio verso il 1595.



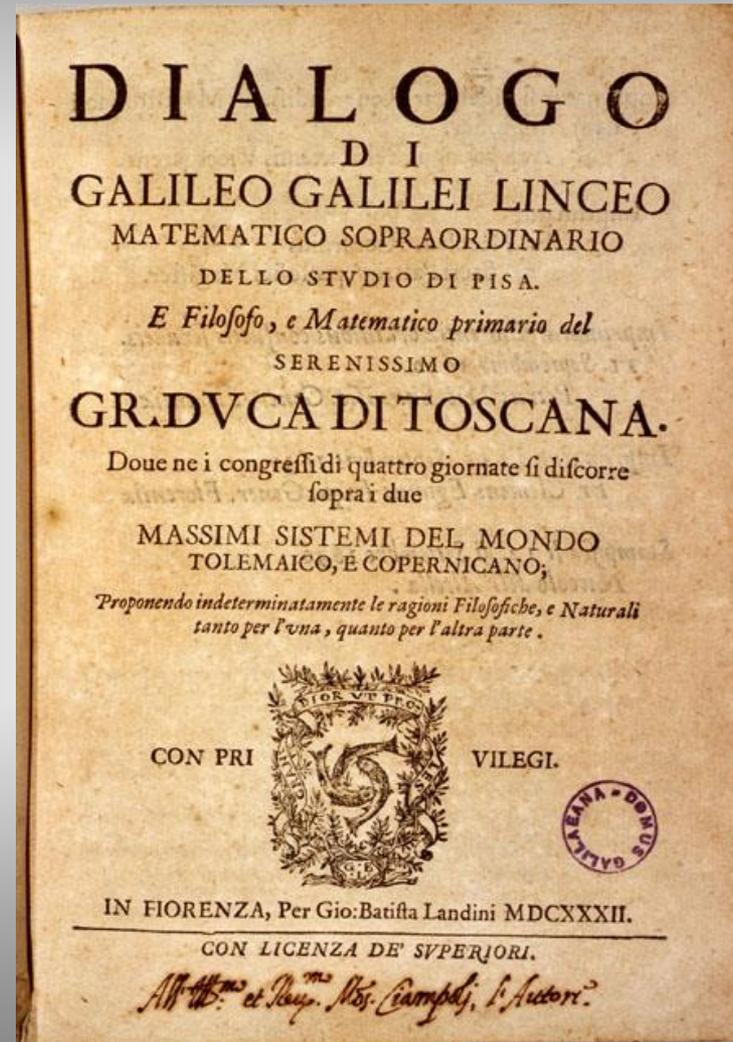
Sperimentando con più lenti montate in un singolo tubo, scoprirono che oggetti vicini apparivano notevolmente ingranditi. Quello era il precursore del microscopio composto e del telescopio

La microscopia ottica



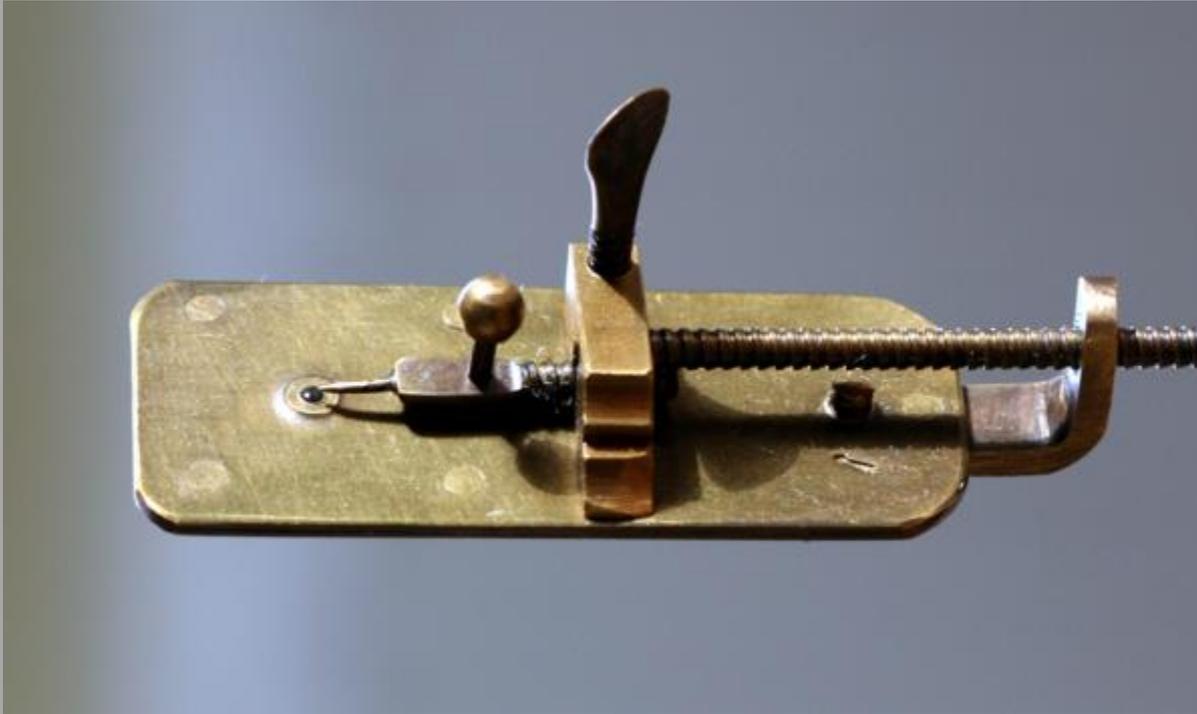
Fu Galileo nel 1609 che studiò i principi fisici del funzionamento delle lenti e costruì uno strumento di maggior qualità, dotato di un dispositivo di focalizzazione

La microscopia ottica, il metodo sperimentale ed il dialogo sopra i due massimi sistemi dell'universo



La microscopia ottica

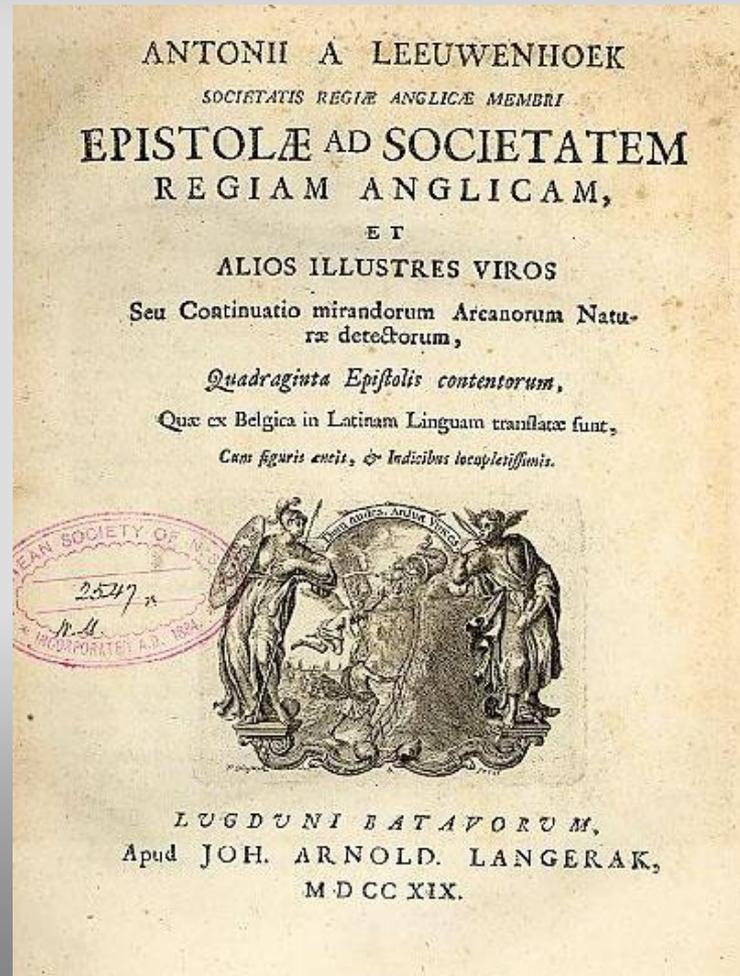
Padre vero e proprio della microscopia è considerato, però, l'olandese Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), che come apprendista in un deposito di stoffe sperimentò lenti d'ingrandimento per contare i fili nella trama del panno.



Affinò metodi per la molatura e la lucidatura delle lenti, piccole e di grande curvatura, offrendo ingrandimenti fino a 270 diametri.

La microscopia ottica

La costruzione dei microscopi e le scoperte che ne derivarono (batteri, il lievito, la circolazione di corpuscoli sanguigni in vasi capillari) gli consentirono di pubblicare più di cento "letters" alla Royal Society ed all'Academy Française. .



La microscopia ottica

MICROGRAPHIA:
OR SOME
Physiological Descriptions
OF
MINUTE BODIES
MADE BY
MAGNIFYING GLASSES.
WITH
OBSERVATIONS and INQUIRIES thereupon.

By *R. HOOKE*, Fellow of the **ROYAL SOCIETY**.

*Non possis oculo quantum contendere Linceus,
Non tamen idcirco contemnas Lippus inungi.* Horat. Ep. lib. 1.



Robert Hooke riconfermò le scoperte di van Leeuwenhoek sulla reale esistenza di organismi viventi molto piccoli in una goccia di acqua. Egli (genio della meccanica e collaboratore di Boyle, lo scopritore del vuoto) perfezionò il microscopio pioneristico aggiungendo parti integranti del MO

La microscopia ottica



Il microscopio di Hooke fu costruito nel 1665 da Cooke e rappresentò un modello di riferimento.

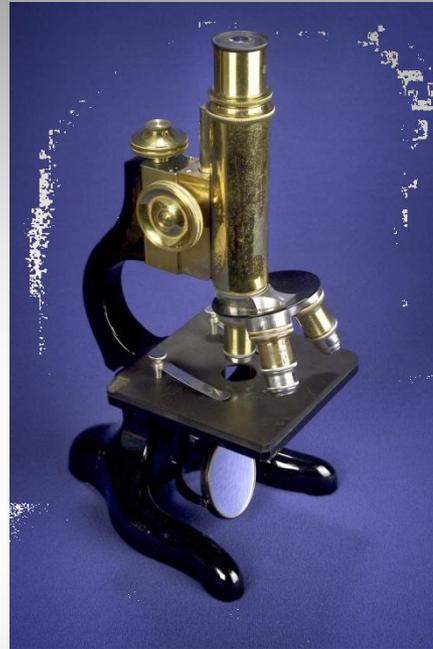
La microscopia ottica



Duca di Chaulnes 1751



Zeiss 1879



Leitz 1913



Reichert 1950

In seguito, pochi importanti miglioramenti sono stati apportati fino alla metà del diciannovesimo secolo, quando cominciò la produzione industriale in parecchi paesi europei e nel continente americano.

Gli strumenti di oggi, evoluti ma sostanzialmente immutati, offrono ingrandimenti fino a circa 1250 diametri.

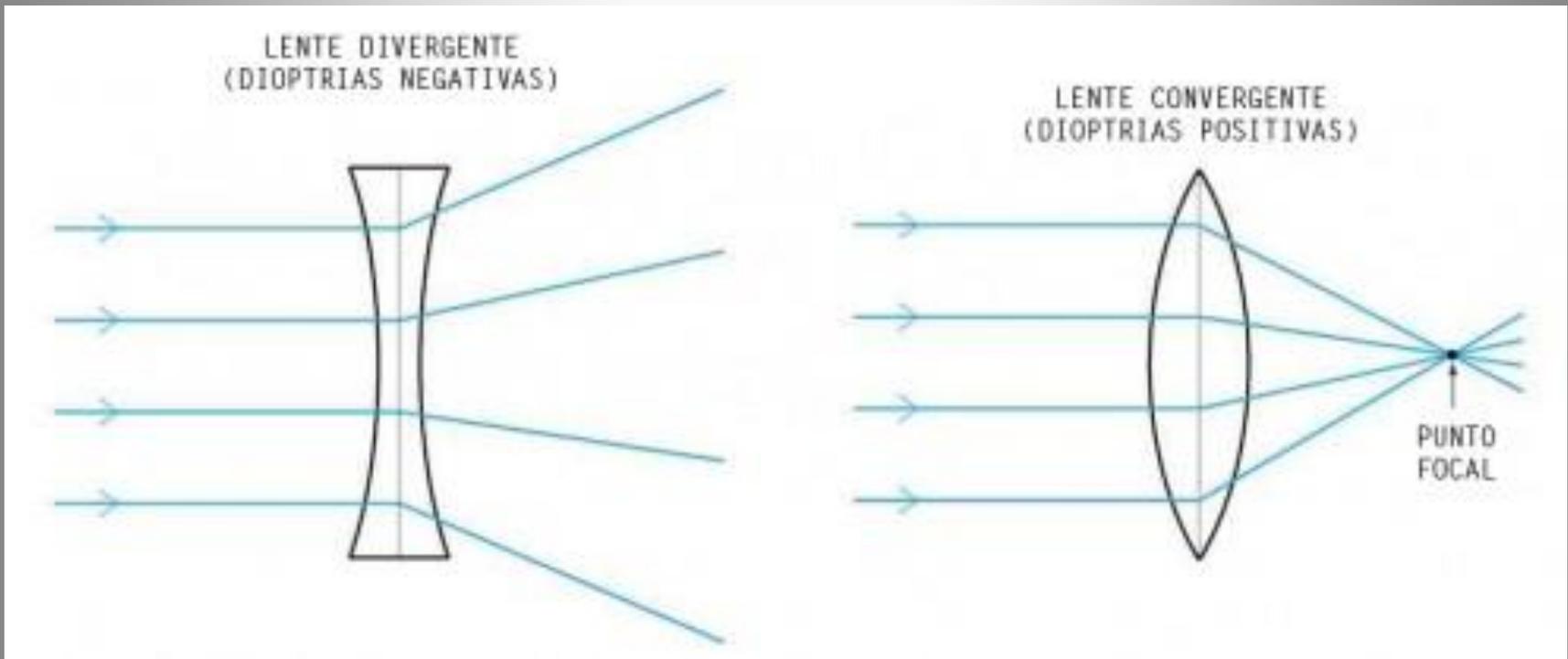
Il microscopio ottico composto a luce trasmessa (in campo chiaro)



Ancora oggi i microscopi ottici composti a luce trasmessa costituiti da più **lenti convergenti** sono quelli più largamente utilizzati in biologia.

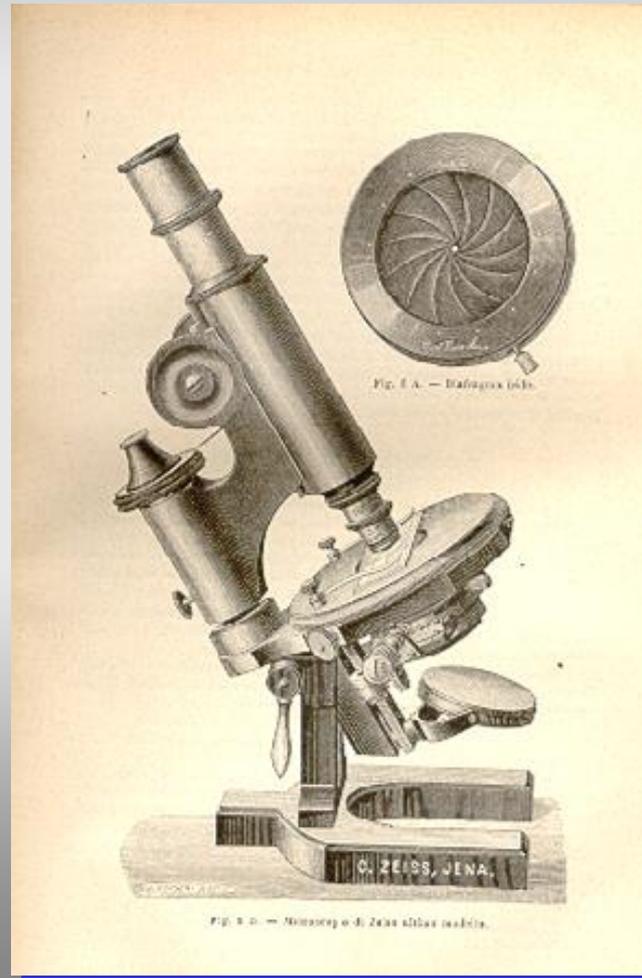
Lenti convergenti e fuoco

I microscopi ottici sfruttano l'uso di **lenti convergenti**, ovvero le lenti che convergono in un punto detto **fuoco** i raggi provenienti da una sorgente luminosa).



Il microscopio composto: le basi

Lo schema costruttivo composto prevede la presenza di un **obiettivo** ed un **oculare** a cui si sono andati sommando altri componenti.



Componenti aggiuntive del microscopio ottico



1 Sistema di lenti
ottiche: obiettivi,
oculari.

3 Condensatori
e diaframmi

2 Apparato di
illuminazione

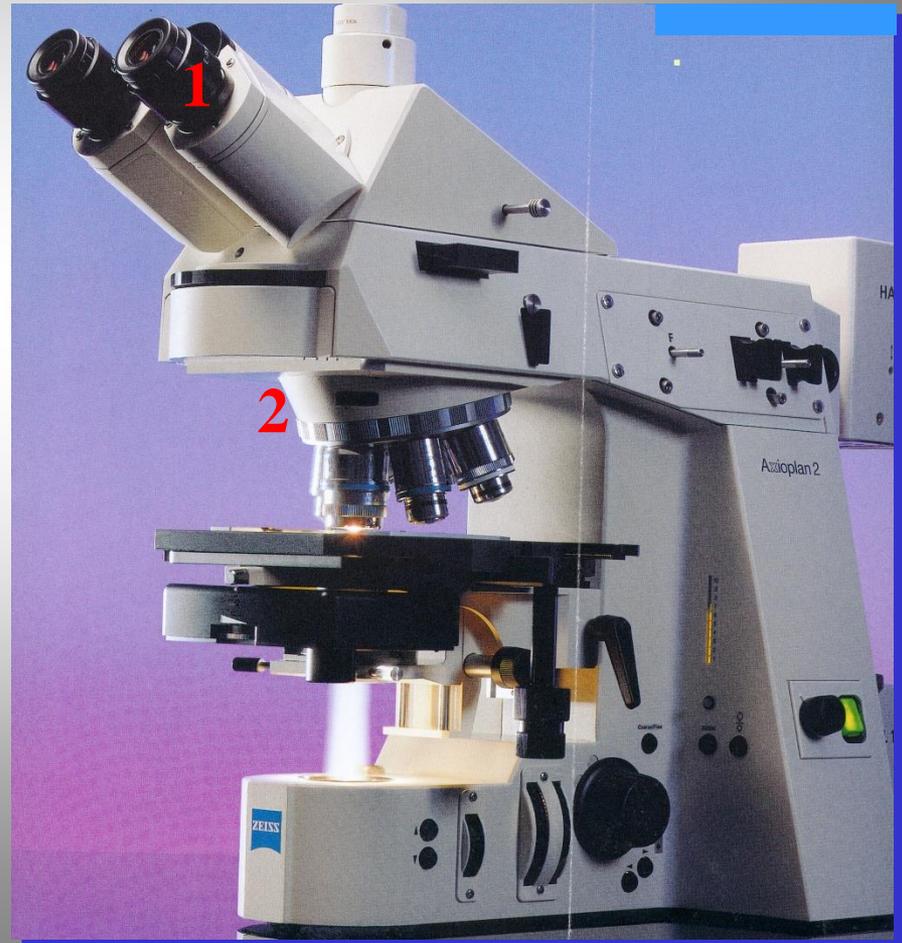
5 Tavolino
traslatore

4 Stativo

Componenti del microscopio ottico: sistema di lenti

1: oculari

2: revolver portaobiettivi



Componenti del microscopio ottico: apparato di illuminazione e condensatori

- 3: sorgente luminosa
- 4: reostato ed interruttore
- 5: diaframma di campo
- 6: condensatore
- 7: diaframma del condensatore



Componenti del microscopio ottico: stativo ed apparato di traslazione

- 8: piede o basamento
- 9: braccio
- 10: tavolino porta oggetto
- 11: comandi x y
- 12: vite macro e micrometrica
- 13: manopola centratura condensatore
- 14 : tubo portaottica
- 15 : tubo camera



Componenti del microscopio ottico a fluorescenza

- 16: lampada a vapori di mercurio
- 17: specchio dicroico
- 18: filtri di sbarramento

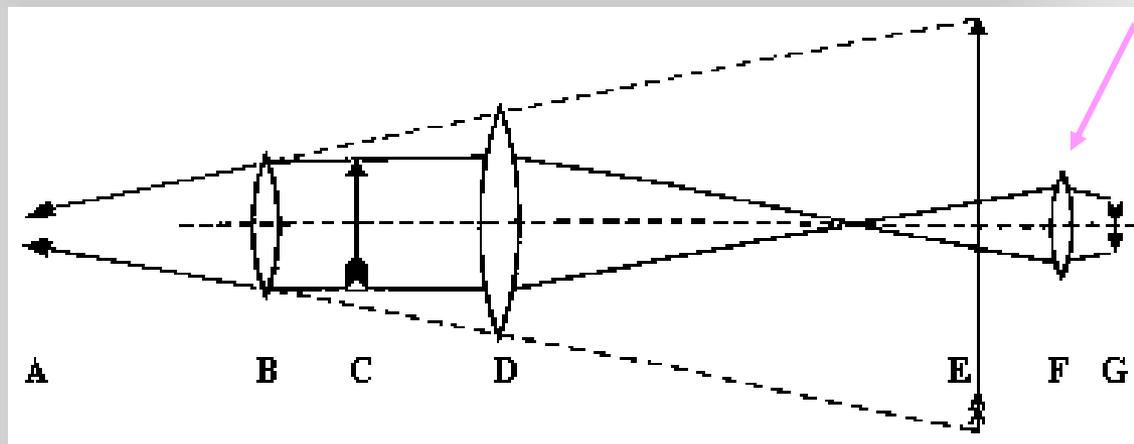


Percorso ottico e risoluzione nel MO composto: l'obiettivo



L'obiettivo è costituito da un **insieme di lenti** contenute
in una montatura meccanica.

Percorso ottico e risoluzione nel MO composto: l'obiettivo



B - occhio

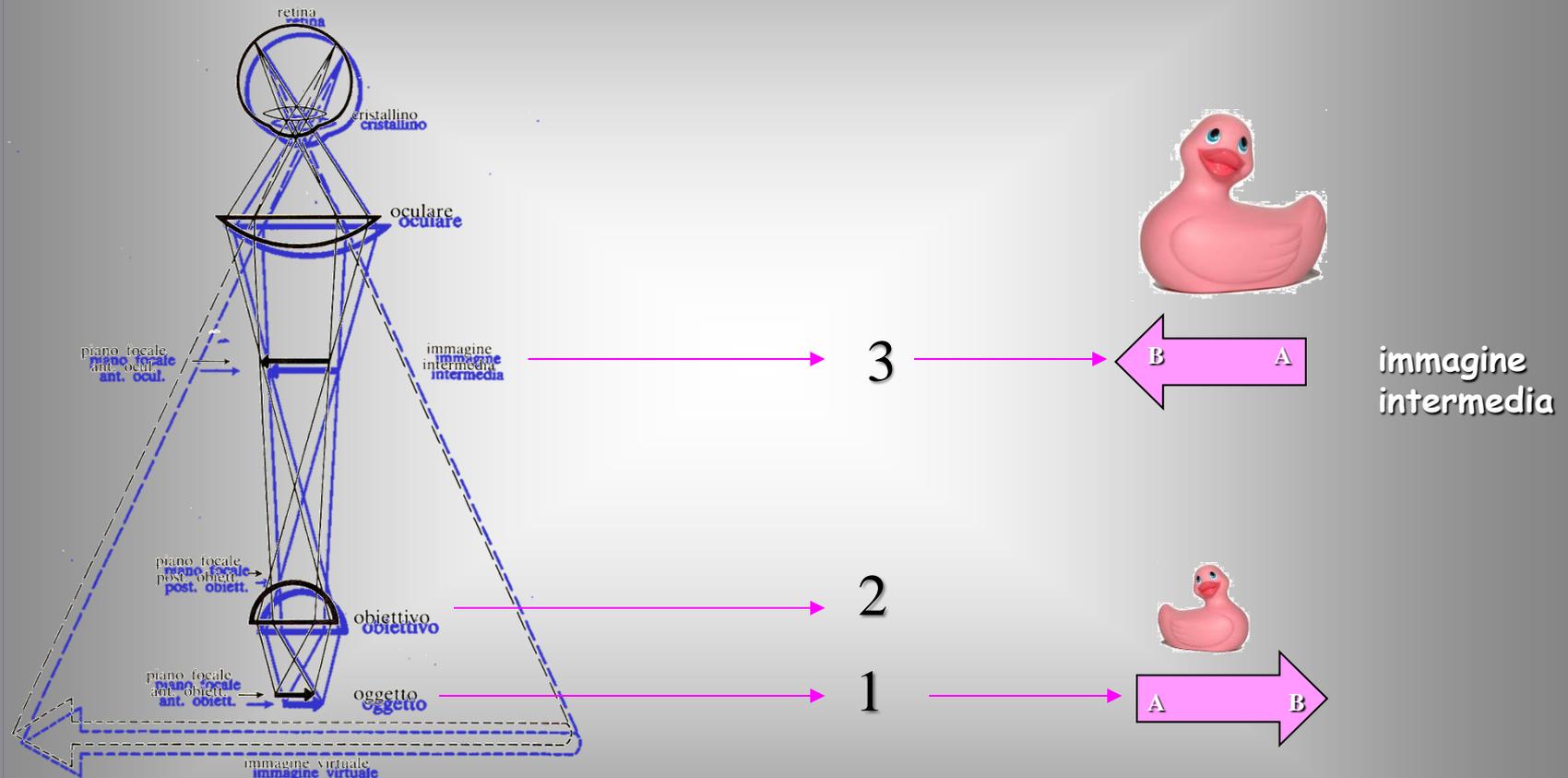
D - lente di campo

F - lente obiettivo

G - preparato

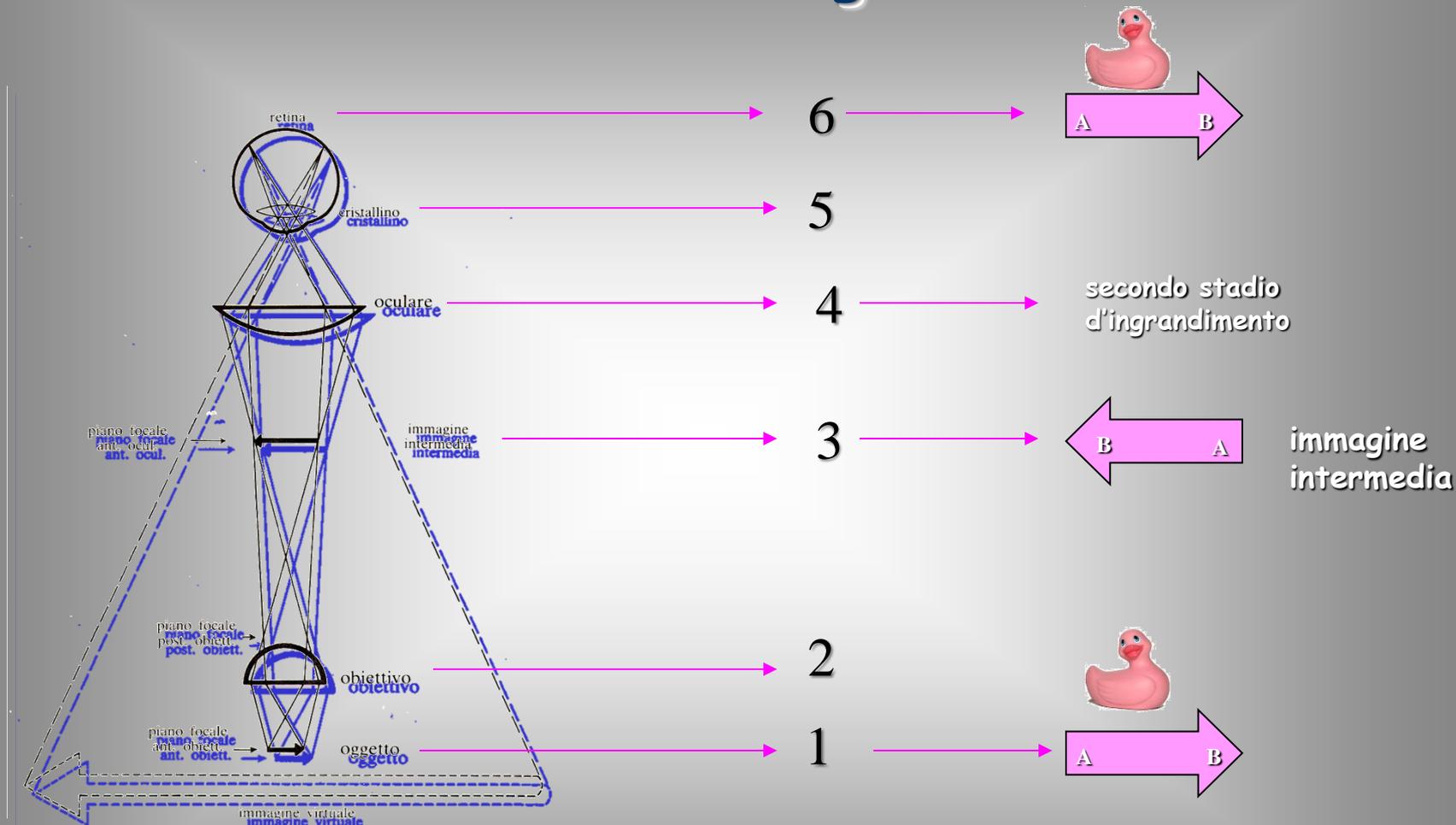
Le caratteristiche di risoluzione dell'immagine finale fornita dall'oculare dipendono dal potere risolutivo del sistema di lenti dell'obiettivo (i difetti dell'obiettivo sono solo potenziati dall'oculare).

Percorso ottico e risoluzione nel MO composto: l'immagine intermedia



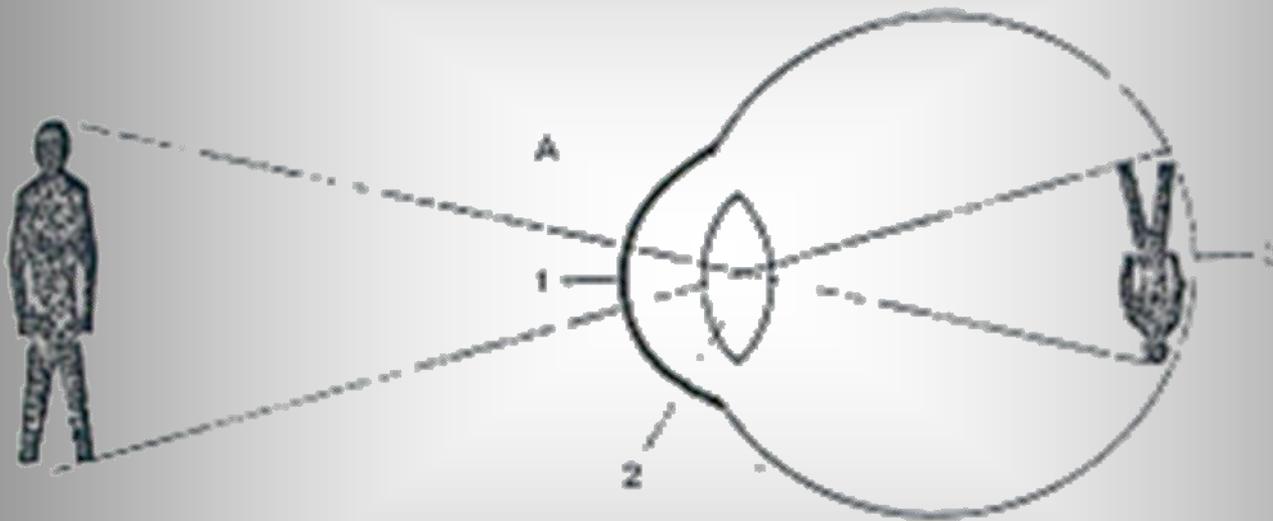
Lungo il percorso ottico l'obiettivo dà del preparato un'immagine **REALE**, **CAPOVOLTA** ed **INGRANDITA** che prende il nome di **immagine intermedia**

Percorso ottico e risoluzione nel MO composto: il secondo stadio d'ingrandimento



L'oculare o gli oculari lungo il percorso ottico offriranno all'occhio dell'osservatore un'immagine intermedia ulteriormente **ingrandita** ma **diritta**.
Questo ulteriore ingrandimento viene denominato **secondo stadio d'ingrandimento**.

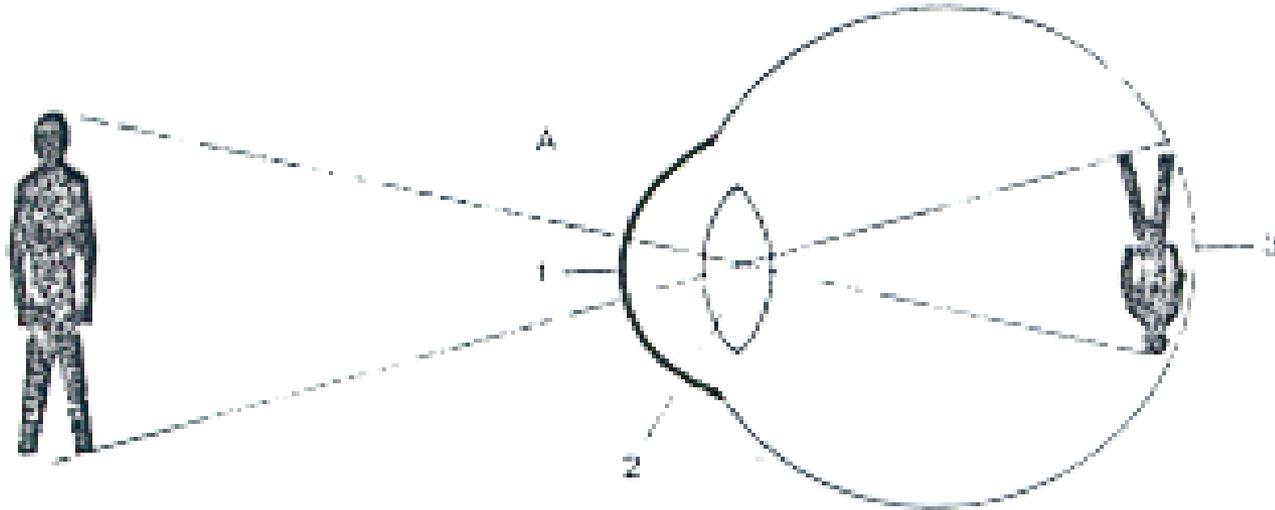
Percorso ottico e risoluzione nel MO composto: l'osservatore



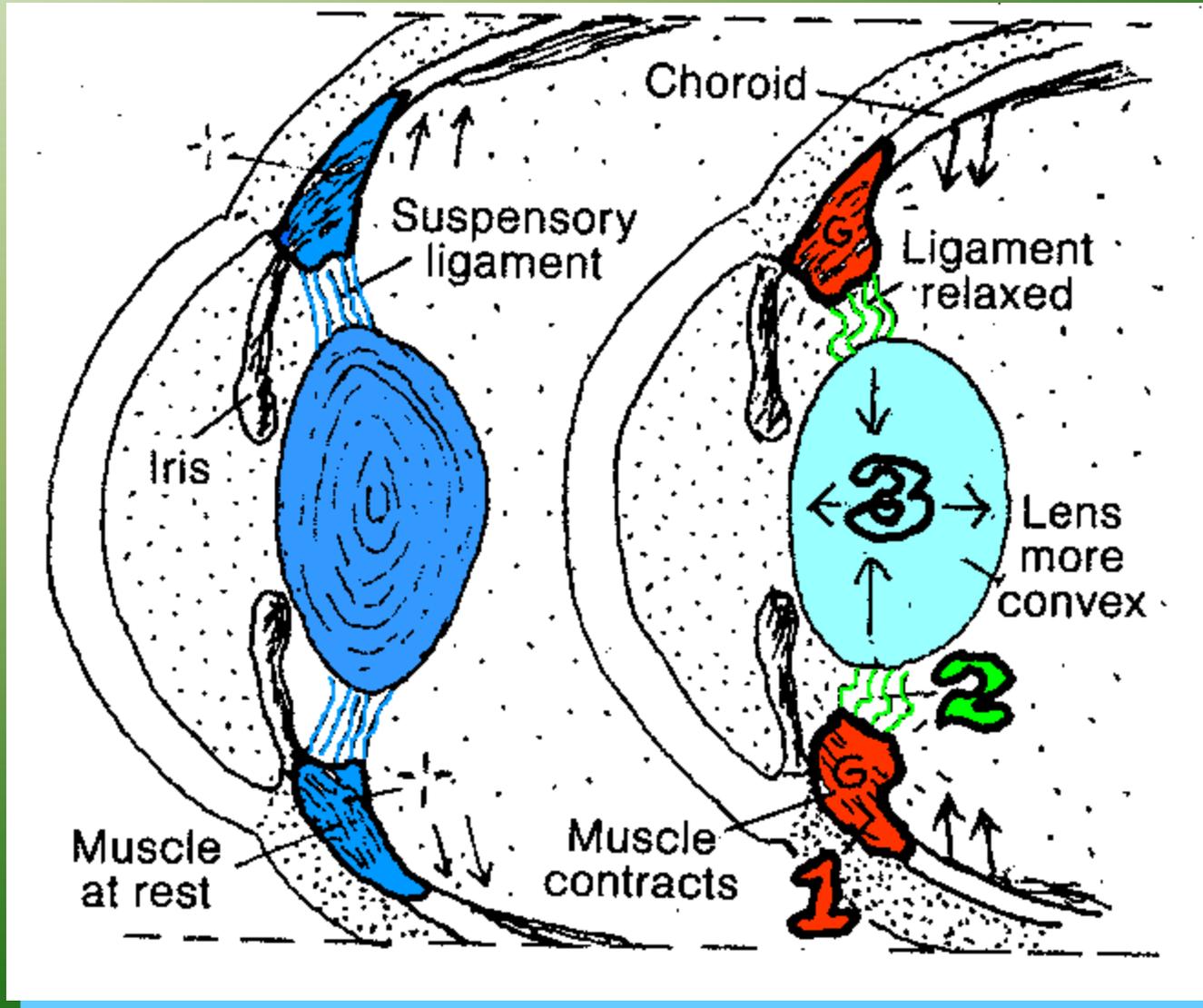
Il cristallino produce quindi sulla retina l'immagine coerente **A** **B** che il cervello percepisce fisiologicamente capovolta.

**«SISTEMA
DI LENTI BIOLOGICO»**

ACCOMODAMENTO: VISIONE NORMALE

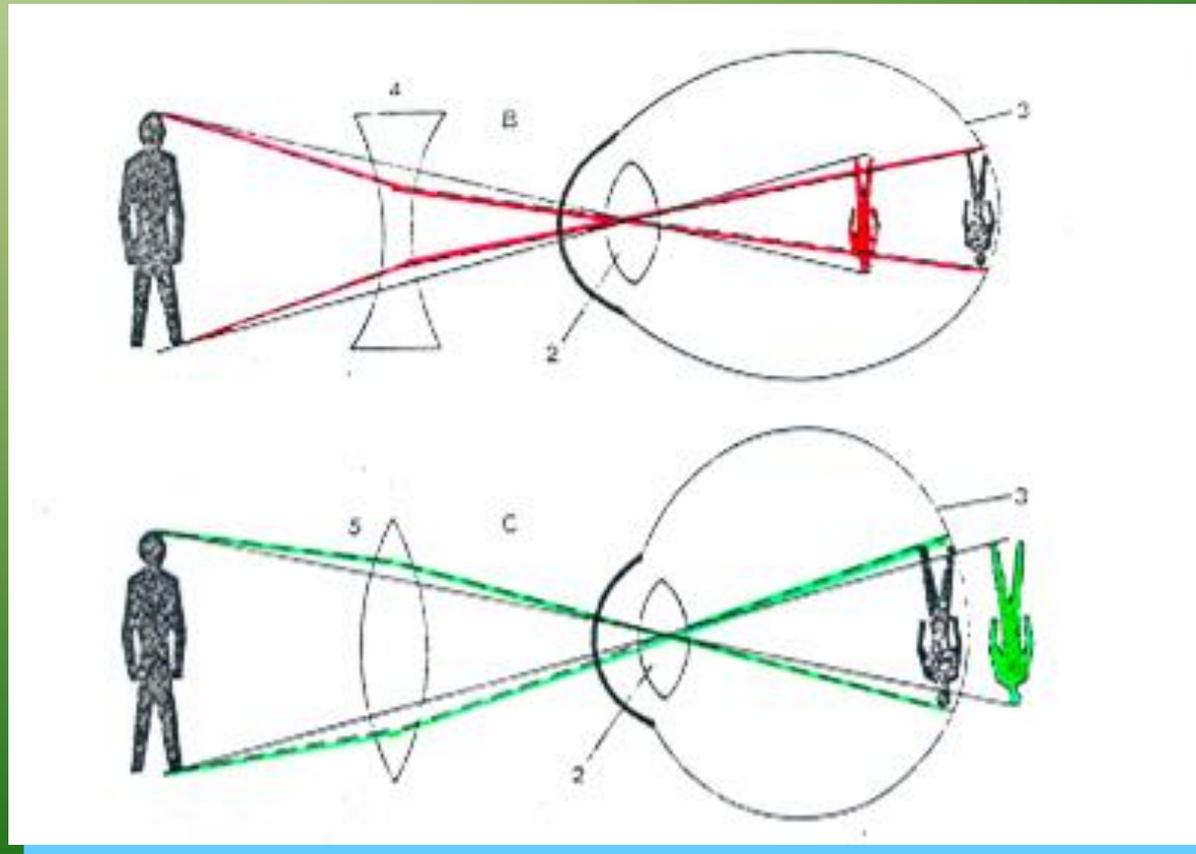


AZIONE DI UNALENTE «ELASTICA»



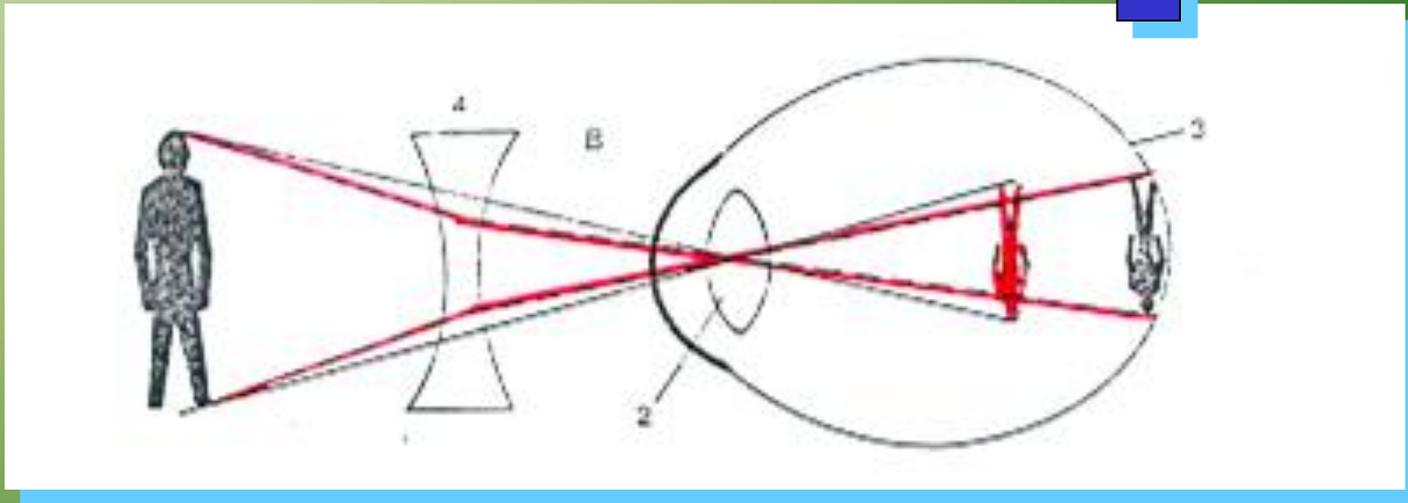
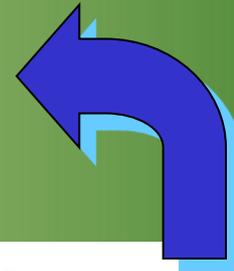
Ametropia

Tutte le anomalie dell'occhio, per cui il secondo fuoco cade prima della retina (miopia) o oltre la retina (presbiopia)



ACCOMODAMENTO:

MIOPIA

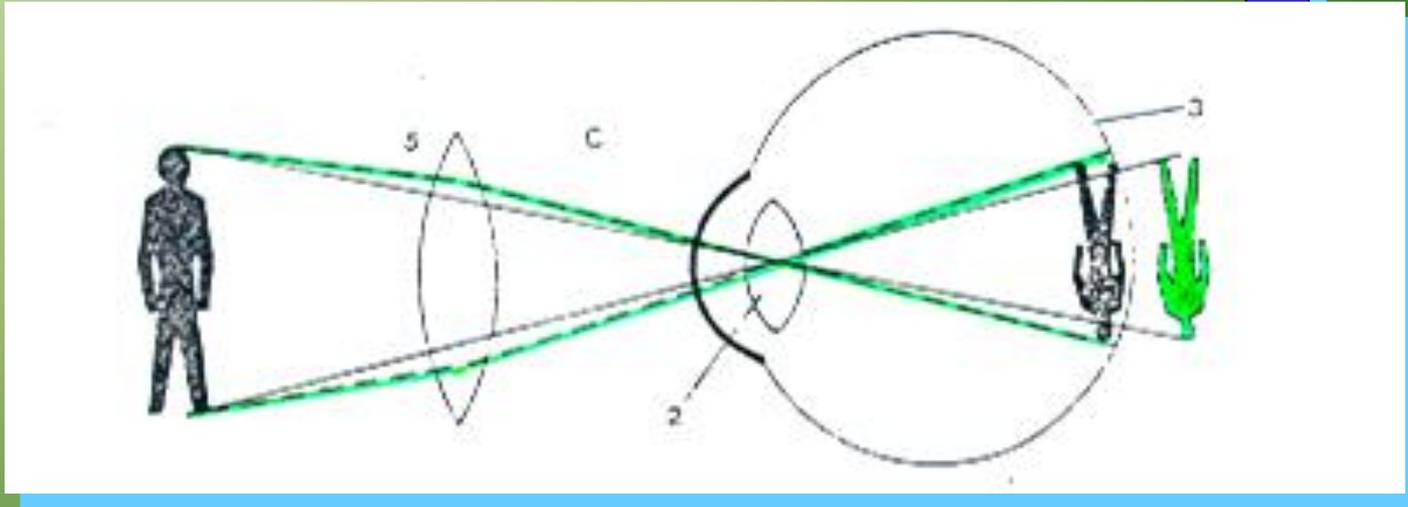
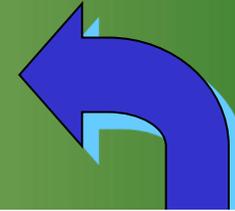


Visione corretta da una lente concava (secondo una linea Tratteggiata). L'immagine di oggetti lontani si forma nell'occhio al davanti della retina per cui l'immagine risulta indistinta.

Gli oggetti vicini sono invece visibili.

ACCOMODAMENTO:

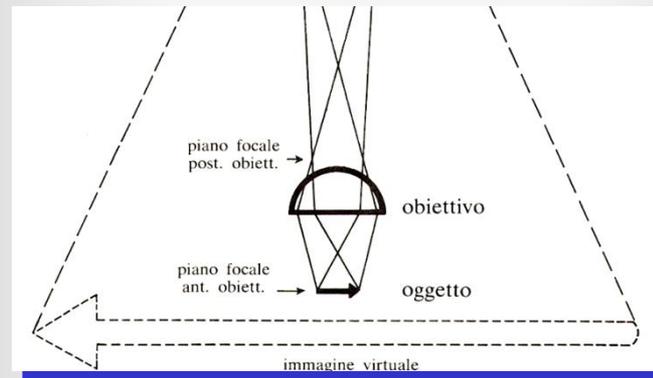
IPERMETROPIA



Visione corretta da una lente convessa (secondo una linea tratteggiata).

Riduzione del potere di accomodazione per cui non si vedono gli oggetti vicini.

Lente frontale e distanza frontale

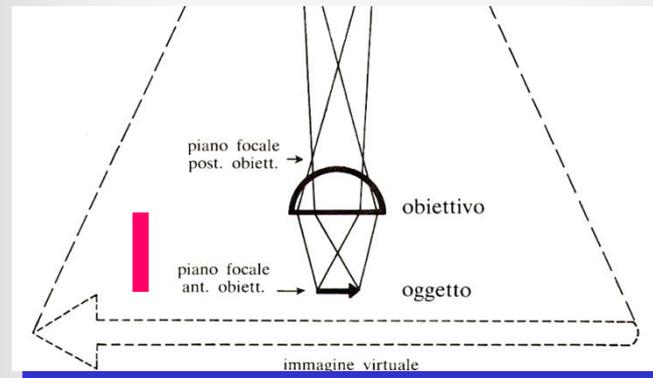


Lente frontale

Distanza frontale

Ogni obiettivo presenta una **lente frontale** dell'**obiettivo** di diametro tanto minore quanto più ingrandisce l'oggetto.

Distanza frontale

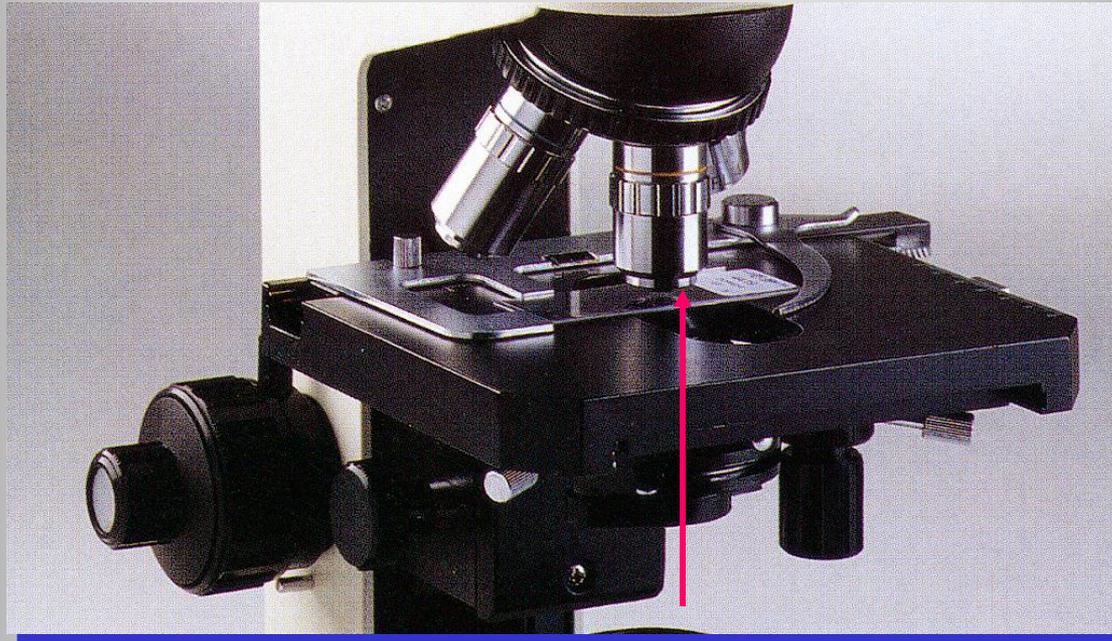


Lente frontale

Distanza frontale

La distanza che separa la lente frontale dall'oggetto è detta
distanza frontale.

Distanza frontale



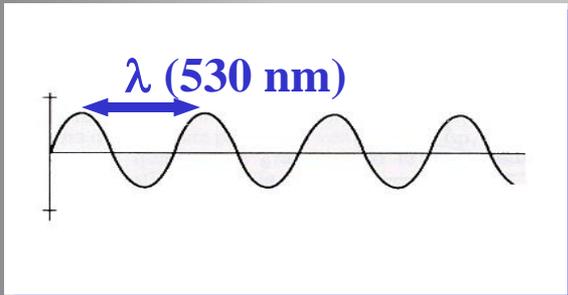
Varia da pochi centimetri a qualche millimetro
Essa è tanto minore quanto maggiore è il potere di
risoluzione dell'obiettivo.

Potere di risoluzione in funzione degli obiettivi (Obiettivi a secco e ad olio)

Il potere di risoluzione dipende da:

1. **Indice di rifrazione : n**
2. **Apertura numerica : $\text{sen } \alpha$**
3. **Lunghezza d'onda : λ**

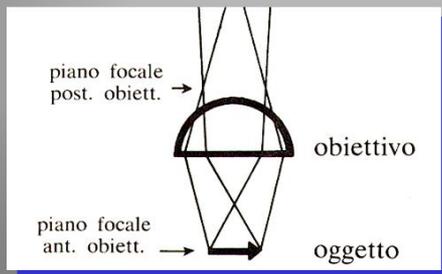
Variabili del potere di risoluzione



Per la luce diffusa non varia



L'indice di rifrazione del mezzo è maggiore
Se si sfrutta l'olio rispetto all'aria.



L'apertura numerica della lente frontale



Indice di rifrazione del mezzo



Tra il preparato e la lente frontale può essere
posto come mezzo di rifrazione:

aria (con $n=1$) oppure
olio (con $n=1,512$)

Obiettivi e potere di risoluzione a
secco o ad olio

Obiettivi e potere di risoluzione a secco o ad olio

Poiché il potere di risoluzione per la formula di Abbe dipende da:

1. Lunghezza d'onda λ
2. Indice di rifrazione n

Allora si può quantificare il valore di An in obiettivi a secco ed ad olio

$$An = 2 \times n \times \text{sen}\alpha$$

$$\begin{aligned} N_{\text{aria}} &= 1 \\ \text{Obiettivo a secco} &= 72^\circ \text{ sen}\alpha \end{aligned}$$

$$An = 0.95$$

$$\begin{aligned} N_{\text{olio}} &= 1.52 \\ \text{Obiettivo ad olio} &= 67^\circ \text{ sen}\alpha \end{aligned}$$

$$An = 1.40$$

Obiettivi con grande apertura numerica come quelli ad olio, aumentano il potere di risoluzione a scapito del contrasto

Formula del potere di risoluzione del MO

$$PR = k \times \lambda / An$$

$$K = 0.612$$

Coefficiente legato alla capacità della retina a riprodurre la risoluzione fornita dall'obiettivo. Se l'immagine ingrandita fornita dal microscopio è registrata su un'emulsione fotografica il valore sarà 0,45.

$$\lambda = 500 \text{ nm}$$

Lunghezza d'onda della luce.

$$An = 1.40$$

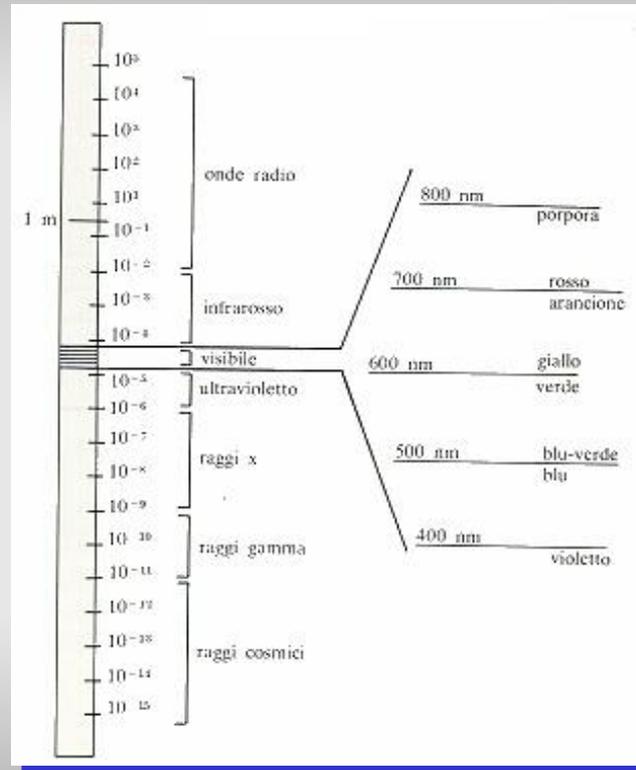
Apertura numerica dell'obiettivo ad olio

Allora:

- 1) per obiettivi ad olio: $PR = 0.612 \times 500 / 1.40 = 0.218 \mu\text{m}$
- 2) per obiettivi a secco: $PR = 0.612 \times 500 / 0,95 = 0.322 \mu\text{m}$

ABERRAZIONI OTTICHE

Correzioni delle aberrazioni ottiche

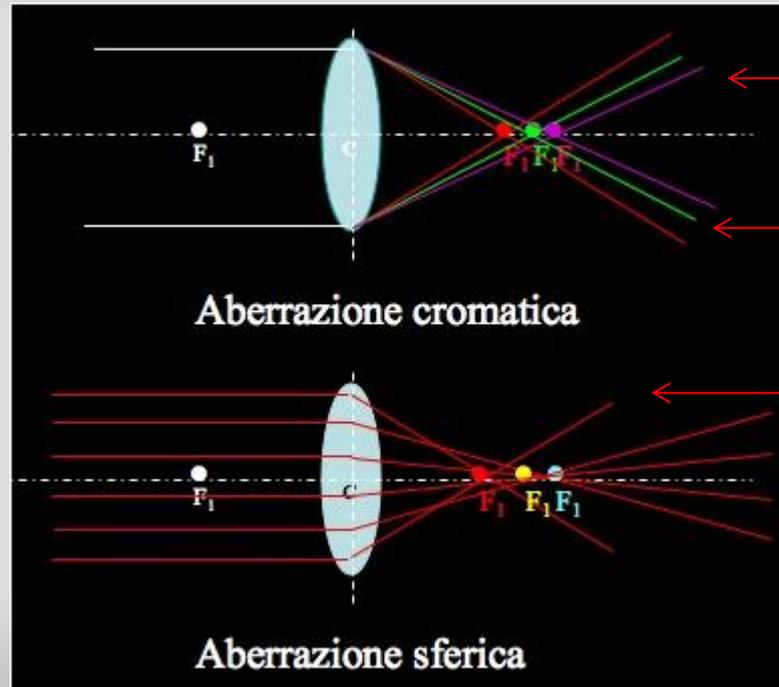


Ciascuno obiettivo ha caratteristiche dipendenti dal grado di perfezione della lavorazione, dai materiali utilizzati, e può presentare come tutte le lenti **aberrazioni cromatiche**, di **sfericità** e di **planarietà**.

ABERRAZIONI OTTICHE: CROMATICHE E SFERICHE

Tutte le lenti convergenti danno origine a due tipi di aberrazioni:

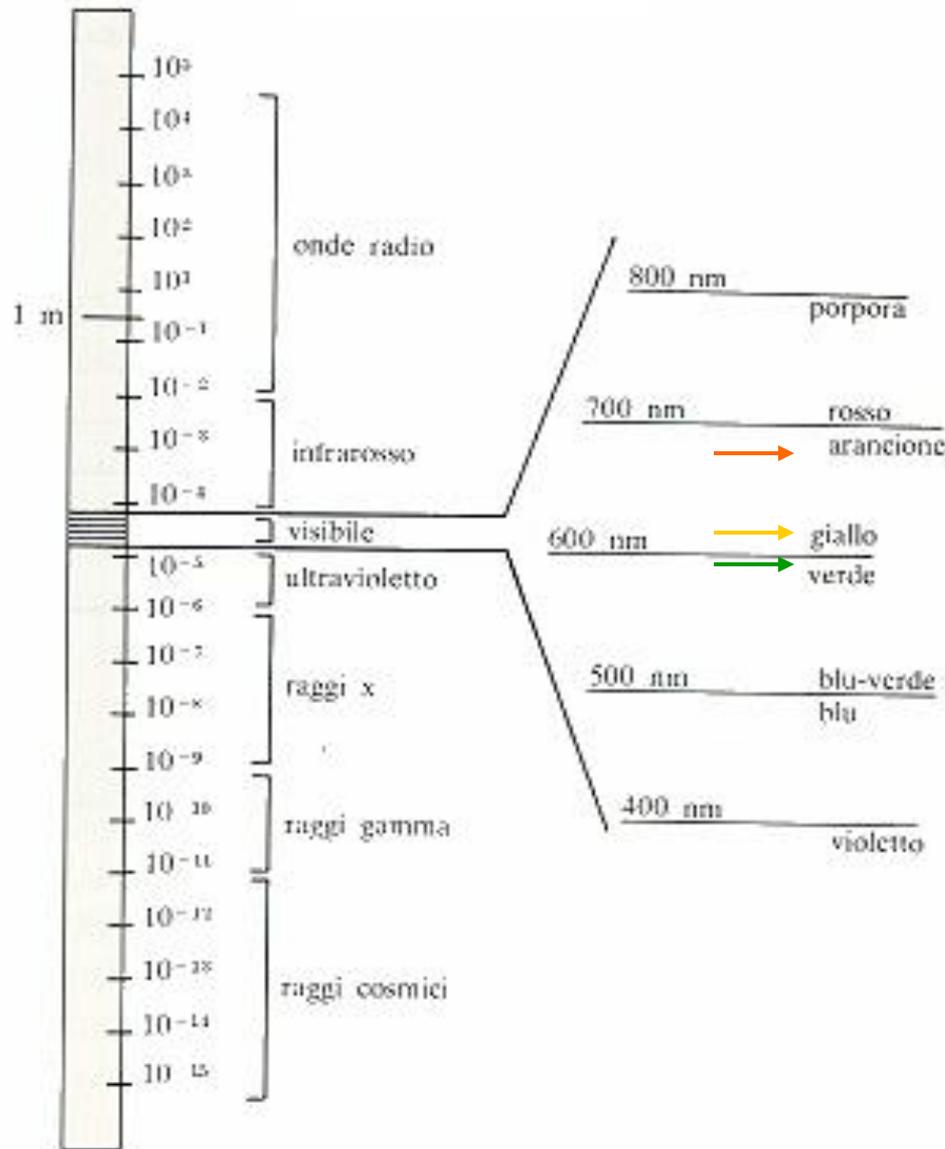
- 1) la **CROMATICA** - provoca nell'immagine la comparsa di aloni colorati



- 2) la **SFERICA** - provoca la messa a fuoco dell'immagine su piani diversi).

Occorre pertanto correggere tali aberrazioni.

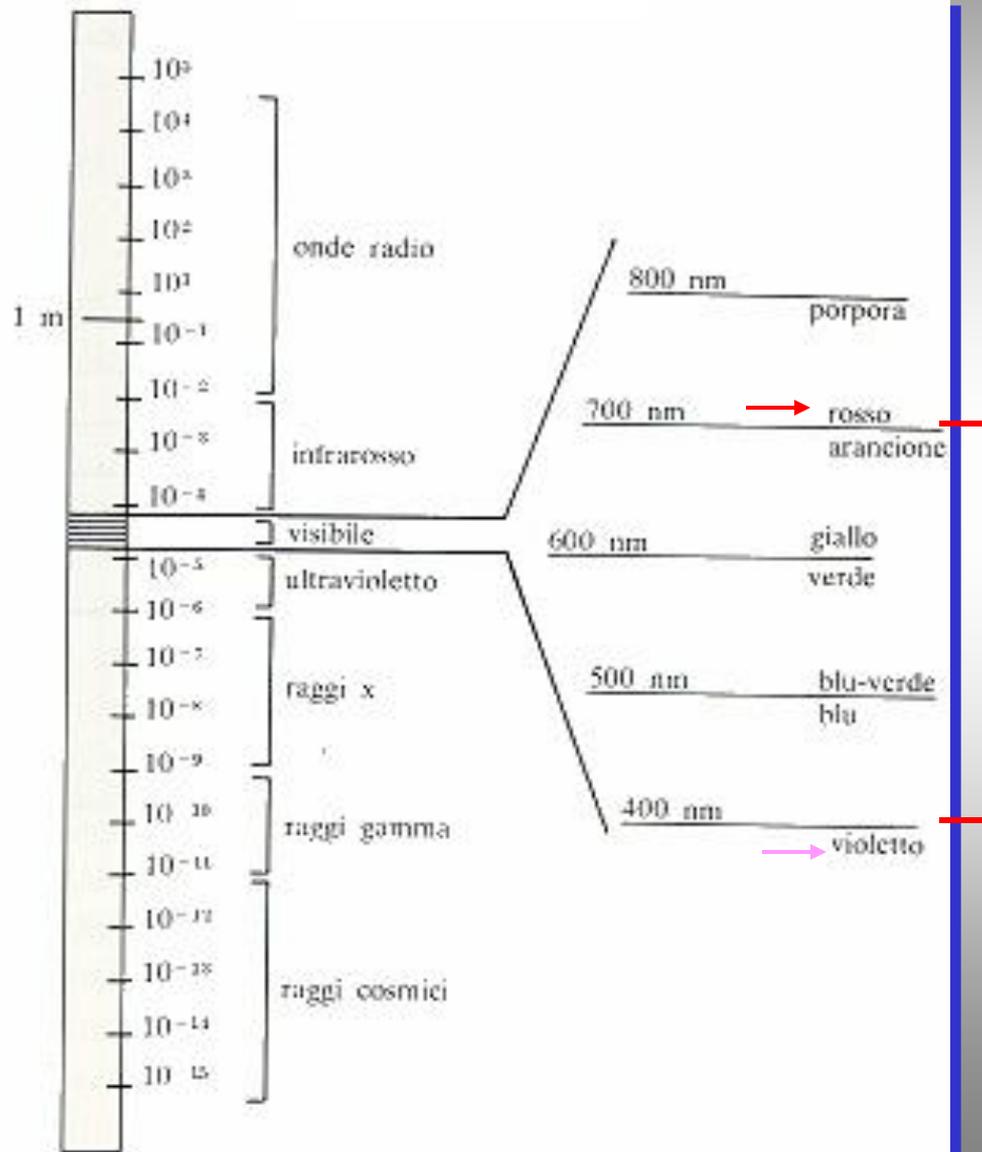
Correzioni delle aberrazioni cromatiche: *obiettivi acromatici*



Obiettivo acromatico

Questi obiettivi raffrontando una lente convergente ed una divergente consentono la correzione cromatica facendo coincidere sullo stesso piano focale immagini corrispondenti ai due colori dello spettro **giallo-verde** ed **arancio**.

Correzioni delle aberrazioni cromatiche: *obiettivi apocromatici*



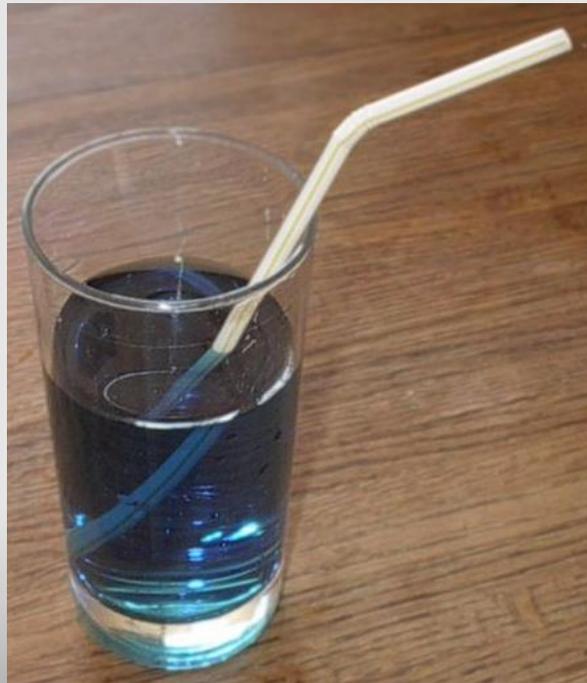
Obiettivo apocromatico

Questi obiettivi consentono una perfetta convergenza delle immagini per tutti i colori dello spettro, dal **rosso** al **violetto**.

Correzioni delle aberrazioni sferiche

Rifrazione

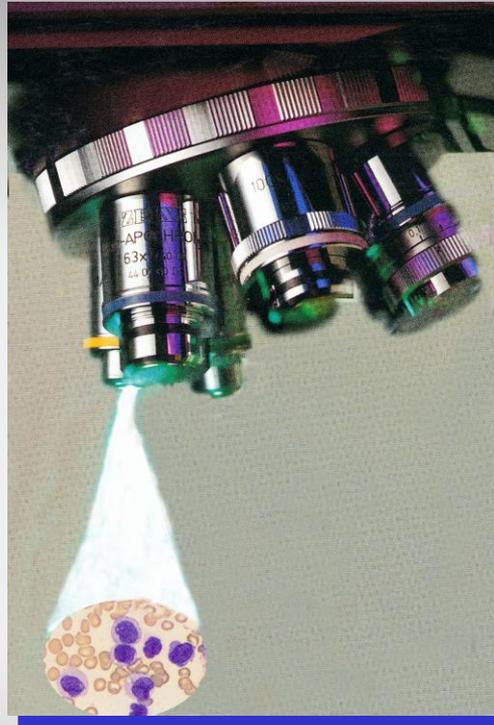
La **rifrazione** delle parti periferiche delle lenti del microscopio è più elevata che nelle parti centrali.



La cannuccia sembra piegata, a causa della rifrazione della luce tra l'acqua e l'aria.

« La rifrazione è la deviazione subita da un'onda che ha luogo quando questa passa da un mezzo ad un altro nel quale la sua velocità di propagazione cambia. »

Correzioni delle aberrazioni sferiche



Il difetto di rifrazione è corretto negli obiettivi planari in cui si inserisce uno spesso menisco fra le lenti così da ottenere una planarità dell'immagine

Sigle di un obiettivo



170 / 0.17 – Pl Apo ÖI 100 1/32



Lunghezza del tubo in mm

Schema delle lenti ottiche nel MO composto: gli oculari



L'oculare o gli oculari sono applicati sul tubo portaottica a distanza fissa dall'obiettivo. Possono essere inclinati rispetto all'asse dell'obiettivo mediante l'interposizione di un prisma. Così anche l'interposizione di più prismi consente lo sdoppiamento del fascio di luce proveniente dall'obiettivo su due oculari distinti.

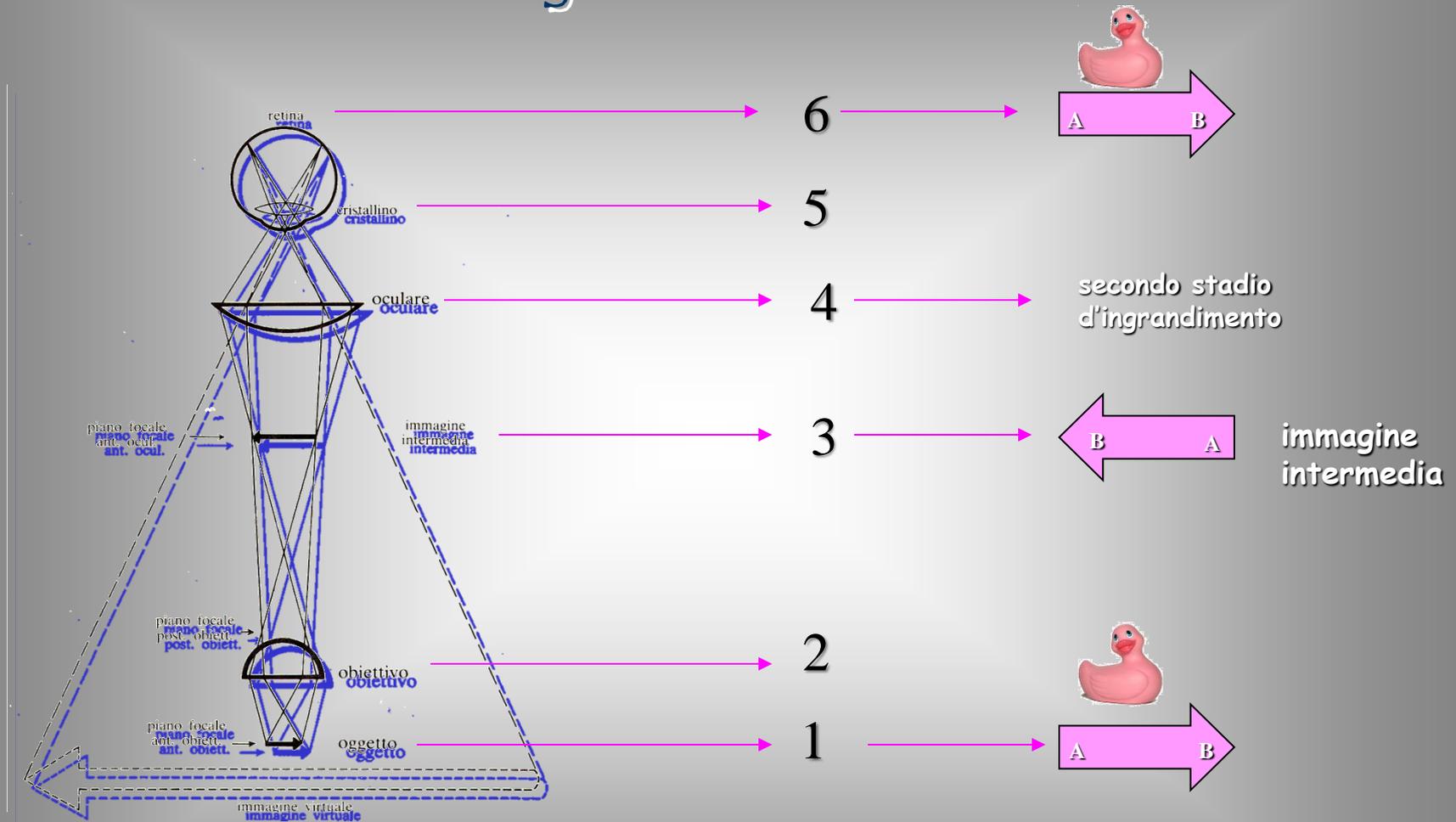
Schema delle lenti ottiche nel MO composto: gli oculari



L'oculare o gli oculari ingrandiscono (di 4x o di 10x) l'immagine intermedia fornita dall'obiettivo offrendo così all'osservatore un'immagine:

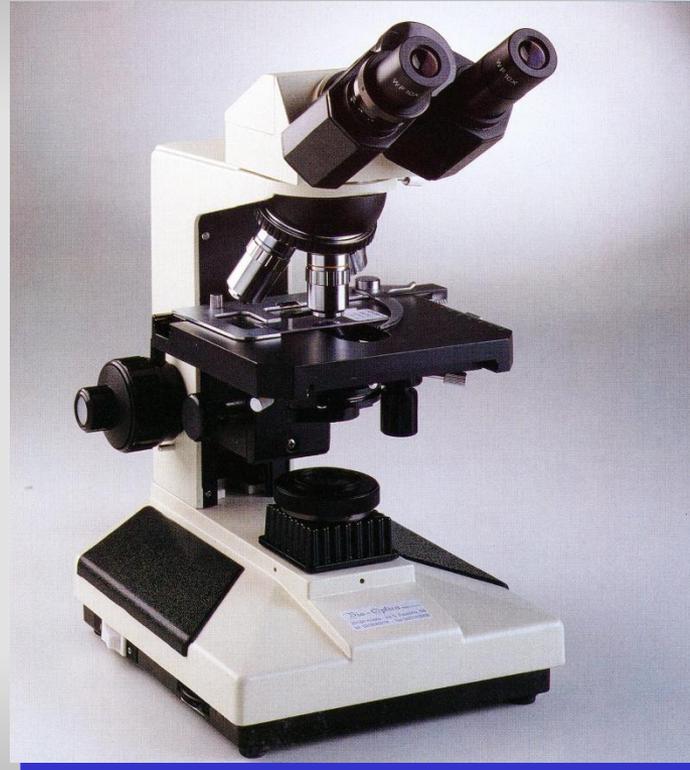
- * Virtuale
- * Ingrandita
- * Non capovolta

Schema delle lenti ottiche nel MO composto: gli oculari



L'occhio dell'osservatore vede attraverso l'oculare una immagine virtuale ingrandita dell'immagine intermedia dell'oggetto fornita dall'obiettivo.

Ingrandimento finale del MO



Ingrandimento dell'obiettivo
 \times
Ingrandimento dell'oculare

Sistema di "lenti": ottiche e magnetiche

