



Il microscopio ottico

Tra gli strumenti più importanti per l'osservazione e lo studio delle cellule e dei microrganismi c'è il microscopio ottico, che assolve due importanti funzioni:

- Ingrandisce gli oggetti invisibili ad occhio nudo (potere di ingrandimento)
- Permette di vedere separati due punti che ad occhio nudo appaiono uniti (potere di risoluzione)

Ingrandimento. Il microscopio ottico, con le combinazioni di lenti appropriate può ingrandire fino a 1000 volte gli oggetti. Per capirlo, dobbiamo capire come si forma l'immagine in un microscopio composto (provvisto di due lenti: oculare e obiettivo)

Risoluzione. La distanza minima tra due punti, al di sotto della quale i due punti sono visti come un punto solo, si chiama **limite di risoluzione**.

Anche l'occhio ha un limite di risoluzione. Due punti devono distare almeno 0,1 mm per essere percepiti come punti separati; se sono più vicini, sono visti come un punto solo. Quindi si dice che il limite di risoluzione dell'occhio umano è di 0,1 mm.

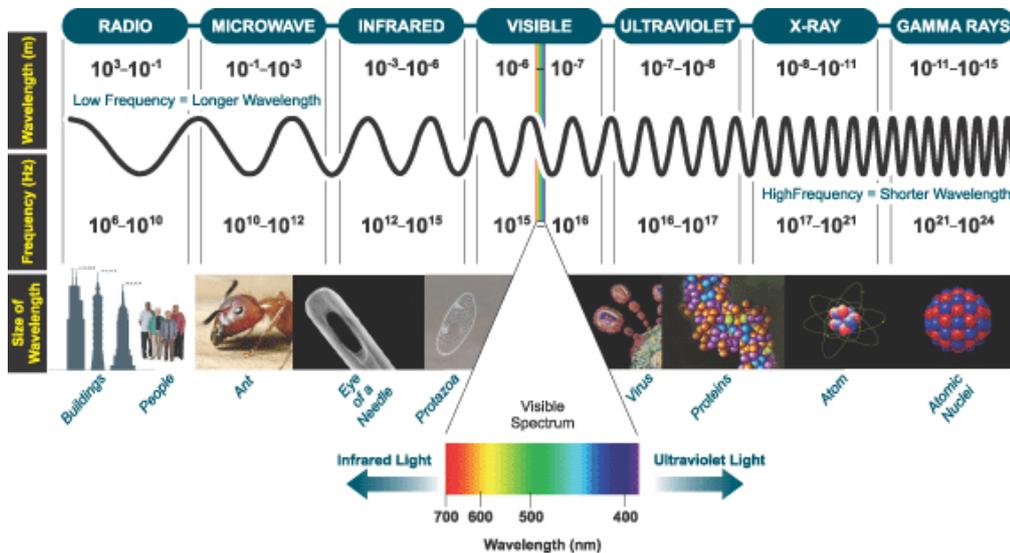
Il microscopio diminuisce questo limite di 1000 volte. In altre parole, si può dire che il potere di risoluzione del microscopio è 1000 volte superiore a quello dell'occhio.

Da che cosa dipende il limite di risoluzione del microscopio ottico? Può essere abbassato ulteriormente? Guardiamo la formula, dove **d** è il limite di risoluzione, **λ** è la lunghezza d'onda della luce incidente, **n** è l'indice di rifrazione del mezzo tra obiettivo e vetrino (quasi sempre aria) e **α** è l'angolo di apertura della lente, ovvero l'ampiezza del cono di luce che entra nell'obiettivo.

$$d = \frac{\lambda}{(n \cdot \sin \alpha)}$$

Dalla formula osserviamo che, modificando la lunghezza d'onda della luce utilizzata dal microscopio ottico, si può aumentare o diminuire il limite di risoluzione.

Guardiamo lo spettro della luce



Il microscopio ottico utilizza l'intervallo delle lunghezze d'onda del campo visibile che, come vedete, è molto ristretto. Questo tentativo quindi non è molto efficace.

Essendo il limite di risoluzione un rapporto, potremmo allora agire sul denominatore (aumentandolo). Ma, possiamo solo intervenire sul valore di n , utilizzando un obiettivo detto ad immersione, in cui lo spazio compreso tra l'oggetto e l'obiettivo è riempito di un olio (olio da immersione) che ha un indice di rifrazione minore dell'aria.

In queste condizioni, il limite minimo raggiungibile è di circa 0,2 micrometri, cioè 0,2 millesimi di mm.

Questo potere di risoluzione è idoneo per l'osservazione delle cellule perchè le cellule hanno in genere un diametro compreso tra 1-2 e 30-40 micron. Ci sono cellule anche più grandi, fino a 100 micron. A proposito, ci sono cellule osservabili ad occhio nudo?

Vediamo adesso la struttura del microscopio ottico. Comprende una **parte meccanica** (lo stativo), una **parte ottica** (le lenti).



Lo **stativo** comprende:

- A. una **base**, di solito pesante, che minimizza le vibrazioni trasmesse dal piano di appoggio (e contiene la lampadina)
- B. un **tavolino portaoggetti**, in genere mobile (piano traslatore). **L'oggetto da osservare** è sempre montato o appoggiato su un vetrino porta-oggetto che verrà a suo volta posto sul tavolino portaoggetti, forato in corrispondenza del fascio di luce, perché la luce deve attraversare il preparato. L'oggetto da osservare deve essere sull'asse ottico!!! Il vetrino deve essere bloccato sul tavolino mediante l'apposita leva con molla. Il vetrino può essere traslato sul tavolino portaoggetti, lungo l'asse delle X e delle Y con le apposite viti che si dipartono dal tavolino stesso. I movimenti di traslazione sul piano XY possono essere tracciati attraverso la scala graduata presente sul tavolino. Inoltre, il tavolino può essere alzato o abbassato tramite le due manopole in basso, che fanno compiere al tavolino movimenti grandi (**manopola macrometrica**) o piccoli (**manopola micrometrica**), utilizzati per regolare la messa a fuoco dell'oggetto.
- C. un **tubo portalenti**, connesso allo stativo del microscopio, che contiene il sistema di lenti, gli **oculari** (in alto) e gli **obiettivi** (in basso), questi ultimi montati su un portaobiettivi a revolver.

La **parte ottica** è formata da:

- D. Un **dispositivo di illuminazione**, composto da una **lampada** che produce la luce visibile utilizzata per l'osservazione (sorgente di illuminazione) e da un **condensatore**.
 - 1) La **lampada** si accende con un interruttore, situato nella base dello stativo, ed è provvista di un **reostato** perché i diversi obiettivi hanno diverse necessità di luce, per cui dovremo, ogni volta che cambiamo obiettivo, dosare la quantità di luce che arriva al microscopio. Due raccomandazioni: 1) la luce deve essere **intensa** perché è il presupposto della formazione dell'immagine, anche se dovremo evitare di esserne

abbagliati; 2) per assicurare una durata di vita quanto maggiore possibile alla lampada è opportuno porre al minimo il reostato al momento in cui spegniamo il microscopio.

2) Il **condensatore** è il sistema di lenti necessario per focalizzare la luce sul piano del preparato. La posizione del condensatore può essere variata tramite un sistema meccanico a cremagliera presente sullo stativo, che regola la distanza del condensatore dal preparato: alzando il condensatore si avrà una maggiore luminosità e un minore contrasto, abbassandolo, un maggiore contrasto e una minore luminosità. In genere, con gli obiettivi che avete a disposizione, la posizione corretta è a fine in corsa, in alto. Quando iniziate a lavorare controllate che il condensatore sia in questa posizione (nel caso qualcuno prima di voi abbia compiuto manovre sbagliate) e non è di solito più necessario modificarne la posizione per tutto il tempo delle osservazioni al microscopio. Solo con preparati particolarmente poco contrastati, o con obiettivi particolarmente potenti, è necessario adeguare la posizione del condensatore per ottenere il migliore compromesso tra intensità di luce e contrasto.

3) Sulla lente del condensatore è presente un **diaframma di campo**, che permette di regolare la quantità di luce che arriva sul preparato. Il diaframma si regola con una levetta posta direttamente sul condensatore. Troviamola e guardando NEL microscopio vediamo cosa succede facendole fare una piena escursione. Durante l'osservazione è utile modificare "in continuazione" la posizione della leva del diaframma di campo per trovare le condizioni ottimali di osservazione: ogni preparato e ogni obiettivo hanno le proprie, perché a seconda del tipo di preparato e della sua colorazione, varia la quantità di luce necessaria. Inoltre, può essere utile diminuire l'illuminazione per aumentare il contrasto (anche se ricordiamoci che questo può diminuire la risoluzione).

Quindi, in genere, per una corretta illuminazione del preparato, conviene intervenire su 1) e 3) e non su 2) (se non per controllo)

E) **Sistema di lenti, oculari e obiettivi.** Gli **oculari** sono montati sulla testata ottica del microscopio e consentono ingrandimenti del valore indicato sulla lente stessa (nel nostro microscopio sono 10x, cioè danno un ingrandimento di dieci volte le dimensioni reali).

Avete a disposizione più **obiettivi**, che hanno lunghezza diversa e forniscono ingrandimenti diversi, indicati da uno dei numeri incisi sull'esterno (es. 10, 25, 40). Moltiplicando l'ingrandimento dell'obiettivo per quello dell'oculare si ottiene l'ingrandimento reale del vostro microscopio. Ci sono altri numeri incisi sulla superficie esterna dell'obiettivo, che stanno ad indicare l'apertura numerica (NA) di cui si è parlato prima (es. 0,65), la distanza in mm che deve intercorrere tra obiettivo e oculare (es. 160) e lo spessore massimo in mm, che deve avere il vetrino coprioggetto (es. 0,17).

Uso del microscopio ottico

1. Iniziate le osservazioni con l'obiettivo a minore ingrandimento, perché è quello con cui la messa a fuoco è più semplice e che ha il maggiore campo visivo. Questo consentirà una panoramica sull'organizzazione complessiva dell'oggetto da osservare.
2. Per guardare il preparato con entrambi gli occhi, dovete regolare la **distanza degli oculari** sulla vostra distanza interpupillare. A questo scopo, gli oculari sono posizionati su di una slitta che scorre sul piano orizzontale. Per capire qual'è la distanza giusta per voi, iniziate con gli oculari nella posizione di massima distanza e guardate NEL microscopio, finché i due campi visivi originariamente separati si sovrappongono. Avvicinate molto lentamente gli oculari, vedrete i campi visivi che si avvicineranno progressivamente, fino a sovrapporsi: questa è la distanza giusta per ciascuno di voi. Un ulteriore avvicinamento degli oculari vi costringerebbe infatti a convergere gli occhi.

Consigli pratici e avvertenze sulla fase 2

Dovete prendere confidenza con questa manovra perché capiterà oggi stesso che ci chiederete di guardare il vostro preparato, nel vostro microscopio, e per chi ha consuetudine all'uso del microscopio è automatico compiere questa manovra, per cui se voi avete faticosamente trovato la vostra distanza, arrivo io e imposto la mia e tutto il vostro lavoro è messo all'aria in un attimo. Vi può aiutare osservare che vi è un righello di riferimento che misura la distanza tra gli oculari, potrete quindi segnare il valore corrispondente alla vostra distanza per ritrovarla più rapidamente. La possibilità di mostrare il vostro preparato ad un altro osservatore richiede due avvertenze estremamente importanti. Il primo è relativo alla **vite** che è posizionata sotto il **blocco degli oculari**. Questa vite per l'appunto ferma il blocco oculare sul braccio dello stativo del microscopio. La vite deve essere posta a fine corsa, in modo che il blocco oculare non si muova, basta fargli fare un mezzo giro per levare il blocco e girare gli oculari verso il secondo osservatore. **NON** svitate ulteriormente la vite perché se è troppo lenta il blocco oculare può cadere (oltretutto gli oculari sono solo appoggiati, quindi si possono rompere facilmente!). La seconda avvertenza estremamente importante riguarda la possibilità che vogliate mostrare il vostro preparato al vostro vicino di banco: **non dovete sollevare o spostare** il microscopio verso il vostro vicino, ma semplicemente farlo alzare e girare gli oculari verso di lui.

3. **Messa a fuoco** dell'immagine. Questa è la parte più "personale" del discorso. Entro certi limiti, perché deve essere effettuata con le due viti, **macrometrica** e **micrometrica** poste sullo stativo del microscopio. La macrometrica consente di posizionare il preparato alla distanza focale del sistema di lenti, obiettivo e oculare, la micrometrica ci consentirà la messa a fuoco dei raggi ottici sulla distanza focale del nostro occhio.

Consigli pratici e avvertenze sulla fase 3

- I due **oculari** possono essere regolati in **altezza** con un'apposita ghiera e, se non si hanno particolari problemi di differente capacità visiva tra i due occhi, gli oculari devono essere alla stessa altezza, altrimenti non potrete mai avere lo stesso punto di messa a fuoco su entrambi gli occhi e ciò vi scoraggerà ulteriormente dalla visione binoculare
- talora, alla base della difficoltà di mettere a fuoco vi è la **sporczia** che si trova sul percorso ottico, in particolare le ditate e la polvere. Evitate SEMPRE di toccare le lenti e inoltre impugnate SEMPRE sui bordi i vetrini porta- e coprioggetto. Prendete l'abitudine di controllare ed eventualmente pulire i vetrini prima ancora di metterli sul porta preparato. Se avete necessità di pulire qualsiasi lente del microscopio (questo è molto probabile per gli oculari), dovete farlo con estrema delicatezza, usando carta morbida e il liquido per lenti che avete a disposizione. Inoltre per le esercitazioni in cui avrete a disposizione vetrini con coprioggetti sigillati sul portaoggetto (istologia) dovete controllare che il vetrino coprioggetto sia rivolto verso l'alto, perché se è rivolto verso il basso, è impossibile mettere a fuoco

Cose DA NON FARE: oltre che non toccare nessuna lente con le dita e non scaraventare il microscopio sul proprio vicino di banco **NON SMONTATE I MICROSCOPI!!!** in nessuna forma: non scambiate gli obiettivi tra i microscopi, non ruotate a caso nessuna delle viti che vedete e che non sono state menzionate tra quelle su cui siete stati richiesti di intervenire. Per ogni problema chiedete assistenza a chi è responsabile in aula in quel momento. Sul decalogo sono riportati alcuni dei problemi (e relative soluzioni) che incontrate più frequentemente.

Infine capiamo: come si formano le immagini?

I raggi luminosi che attraversano l'oggetto (AB) saranno rifratti dalla lente obiettivo formando una prima immagine reale dell'oggetto (A'B') capovolta e ingrandita. I raggi luminosi che attraversano questa immagine saranno rifratti anche dal passaggio attraverso gli oculari. Per la posizione che l'immagine A'B' ha nel microscopio composto (all'interno del fuoco della lente oculare), la seconda immagine non è reale ma un'immagine virtuale diritta rispetto alla prima, ma capovolta rispetto all'oggetto, e ingrandita (A''B'') (l'immagine è virtuale, cioè non può essere raccolta su uno schermo). L'immagine diventa reale quando attraversa una terza lente, che concentra i raggi divergenti, che può essere il cristallino dell'occhio oppure una lente obiettivo di una macchina fotografica o di una telecamera. Così, l'immagine finale è un'immagine reale, capovolta e fortemente ingrandita dell'oggetto.

L'ingrandimento finale dell'immagine apparente raccolta dai nostri occhi è il risultato della moltiplicazione dei fattori di ingrandimento dei due sistemi di lenti.