

## TITOLO: IL MICROSCOPIO OTTICO - Biologia 02

Il **microscopio** è uno strumento che ci permette di ingrandire gli oggetti da osservare. Esso è formato fondamentalmente da tre parti:

- **Meccanica (stativo)**

Lo **stativo** a sua volta è composto da:

1. un **sostegno**, che di solito è molto pesante; in questo modo vengono minimizzate le vibrazioni che provengono dal piano di appoggio
2. un **tavolino portaoggetti**, in genere mobile (piano traslatore) che presenta un'apertura, in corrispondenza della quale vengono appoggiati i vetrini da osservare bloccati da una levetta (4). Il tavolo è libero di muoversi in due direzioni, destra-sinistra, avanti e indietro, tramite due manopole che si trovano al di sotto verso destra (5). Per muoverlo verso l'alto o il basso si usa un'altra manopola detta vite macro-metrica(9) che in realtà serve per la messa a fuoco grossolana (trovare il punto di massima risoluzione) e permette di avvicinare o allontanare il tavolo portaoggetti dall'obiettivo, fino a quando non si rende visibile il preparato. Un'altra vite più piccola, micrometrica (10), in continuità con la macro-metrica serve anch'essa per la regolazione fine della messa a fuoco. Questa è l'unica vite da regolare quando si passa da un obiettivo all'altro, dopo la prima messa a fuoco con la vite macro-metrica, poiché gli obiettivi sono costruiti in modo tale da mettere a fuoco il preparato usando la stessa distanza di lavoro cioè quella tra il vetrino e l'obiettivo e sono detti parfocali. I movimenti per spostare questa vite devono essere molto delicati. La scala graduata presente sul tavolo tiene conto degli spostamenti di traslazione.

- **Illuminazione:**

Alla base del microscopio e internamente è custodita una lampada alogena la cui intensità luminosa può essere regolata tramite una manopola situata a destra in basso(8).

- **Ottica, costituita dalle lenti;**

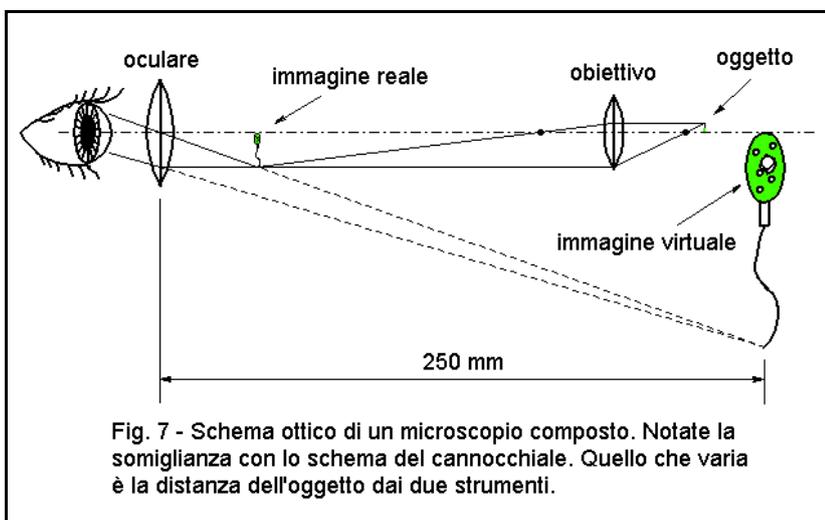
La luce attraversa una lente convergente che permette di concentrare i raggi luminosi verso un condensatore ottico. Esso è un sistema ottico costituito da diverse lenti che permettono di condensare e di focalizzare la luce sul preparato e da qui nell'obiettivo. La quantità di luce che passa attraverso il condensatore, viene regolata tramite un diaframma ad iride (simile a quello che si può osservare nelle macchine fotografiche) che permette di regolare la distanza del condensatore dal preparato e permette di variare il contrasto del preparato (chiudendolo lo fa aumentare).

Procedendo verso l'alto troviamo il portaobiettivi a revolver, così detto perché ruota. Sul tamburo ruotante sono montati gli obiettivi, recanti un numero seguito da una x che indica il fattore d'ingrandimento: il più basso è 4x (si legge 4 per), seguono il 10x, 40x e 100x. Ciascun obiettivo è formato da 2 o più lenti e può essere a secco, quando tra obiettivo e preparato c'è aria, oppure ad immersione quando tra di essi si pone dell'olio. L'obiettivo usato ad immersione è il 100x.

Procedendo ancora verso l'alto troviamo un tubo porta lenti: nella parte superiore vengono alloggiati gli oculari che, tramite un sistema meccanico a slitta, possono variare la distanza tra di loro adattandosi alla distanza tra le pupille che è in genere di 65 mm. Sono lenti attraverso le quali si effettua l'osservazione ed anche su di esse è inciso il fattore d'ingrandimento (4x-10x-40x-100x)



Le parti del microscopio che effettivamente ingrandiscono l'immagine di un oggetto sono le lenti dell'oculare e dell'obiettivo. Per sapere di quanto un'immagine è stata ingrandita occorre moltiplicare l'ingrandimento dell'obiettivo con quello dell'oculare. Per esempio se è stato usato l'obiettivo 4x e l'oculare 10x si avrà  $4x * 10x = 40x$ . Ciò vuol dire che l'oggetto è stato ingrandito 40 volte. Insieme, l'obiettivo e l'oculare formano l'immagine ingrandita che viene osservata.



### Come si usa il microscopio.

Il microscopio è uno strumento di precisione che deve essere trattato con cura; non bisogna spostarlo una volta posizionato sul tavolo, quindi per l'osservazione non si sposta il microscopio ma ci si sposta noi e bisogna evitare di toccare le lenti con le mani.

Per ogni osservazione che si fa, si consiglia di adottare sempre la seguente procedura:

1. Impugnando lo stativo (1), appoggiare il microscopio su un piano stabile per evitare vibrazioni.
2. Accendere la luce (2)
3. Allineare al tubo ottico (7), l'obiettivo con l'ingrandimento minore 4x (6) (è l'obiettivo più corto).
4. Posizionare il vetrino sul tavolo portaoggetti (3), bloccarlo con la levetta (4) e mettere la parte che si vuole osservare perfettamente al centro, al di sotto dell'obiettivo 4x (6) azionando le viti (5) che fanno traslare il tavolo (3); appoggiare gli occhi sui due oculari (7) e regolare la

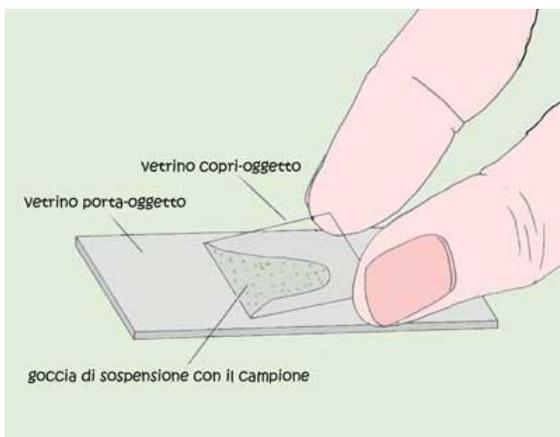
distanza inter-pupillare cambiando la posizione dei due oculari, tirandoli o spingendoli insieme; in pratica occorre spostare gli oculari in modo tale che si abbia un'unica visione dell'immagine del preparato cioè circolare e non sdoppiata. Infatti quando i due oculari sono abbastanza distanti si vedranno due campi di visione mentre spostandoli se ne vedrà solo uno. **N.B.** L'osservazione dei vetrini va effettuata usando **ambidue gli occhi contemporaneamente**.

5. Regolare l'intensità luminosa usando il regolatore d'intensità (8) in modo da avere una giusta quantità di luce mentre il diaframma deve essere aperto;
6. Guardando dal lato (e non dall'oculare) avvicinare l'obiettivo 4x (6) al vetrino usando la vite macro-metrica (9) che muove il tavolo dall'alto verso il basso e viceversa (fare attenzione che l'obiettivo non tocchi mai il vetrino).
7. Mettere a fuoco l'immagine dell'oggetto azionando lentamente l'obiettivo tramite vite macro-metrica (9). Dopo questa operazione tale vite **NON SI DEVE** più toccare. Infatti, essendo gli obiettivi para-focali, una volta effettuata la prima messa a fuoco con il 4x essa sarà mantenuta anche per gli ingrandimenti maggiori che saranno pressoché a fuoco.
8. Effettuare una seconda messa a fuoco più fine con vite micrometrica (10). Spostando leggermente avanti e indietro la vite micrometrica (**FOCETTAMENTO**) è possibile una migliore definizione dei particolari.
9. 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 esca dal campo visivo bisogna ricominciare l'osservazione dall'ingrandimento 4x.
10. Terminata l'osservazione riposizionare l'obiettivo 4x e spegnere la lampada dall'interruttore.

### Come si prepara un vetrino.

Gli oggetti che si osservano al microscopio devono essere trasparenti o sufficientemente sottili da risultare trasparenti almeno in parte. Per questo l'osservazione al microscopio viene compiuta raramente su organismi interi; se ne preparano invece delle sottili "fettine" di essi che sono dette sezioni.

- Accertarsi che il vetrino sia pulito e sistemare il materiale da osservare, detto campione, al centro del vetrino;
- Se il campione da osservare non è liquido, fatevi cadere con un contagocce qualche goccia di soluzione fisiologica in modo che sia coperto di liquido; a volte è meglio far cadere la goccia prima della posa dell'oggetto così la tensione superficiale dell'acqua distende meglio il frammento che si sta per osservare;
- Appoggiate con delicatezza sul liquido un vetrino copri-oggetti a partire da un lato e poi accompagnarlo obliquamente in modo da evitare che restino intrappolate bolle d'aria. Il vetrino copri-oggetti serve a tenere piatto il campione da osservare ;
- Con della carta assorbente togliere il liquido in eccesso sul vetrino copri-oggetti per evitare che questo tocchi le lenti dell'obiettivo



## EFFICIENZA DEL MICROSCOPIO OTTICO

Vi sono **TRE** parametri che definiscono l'**EFFICIENZA** di un microscopio ottico.

**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 di risoluzione di un sistema ottico consiste nella capacità di distinguere due punti dell'oggetto che stiamo osservando come due punti distinti fra di loro (questo concetto è importantissimo: il Pd R è relativo alla distanza fra i punti e non al diametro del singolo punto). L'occhio umano non può distinguere due punti separati da meno di 0,1 mm, mentre impiegando il microscopio ottico il potere risolutivo sale a 0,2 micron.

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 (OBIETTIVO)**. 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, puoi 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 2 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).

