

Alberto Monico

“APPUNTI DI MICROSCOPIA”

ESPERIENZE AL MICROSCOPIO

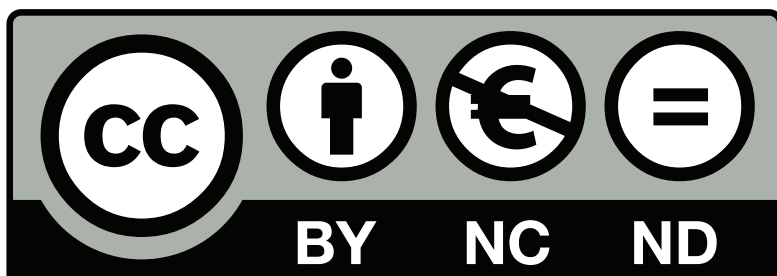
Mogliano Veneto - 2010

PRO MANUSCRIPTO



Licenza Creative Commons

"APPUNTI DI MICROSCOPIA" ESPERIENZE AL MICROSCOPIO is licensed under a Creative Commons Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 2.5 Italia License.



Questo documento può venir liberamente usato, copiato o stampato, in parte o totalmente, purchè a titolo gratuito e citando la fonte.

PRESENTAZIONE

Il campo della microscopia è sconfinato e rifiuto di pensare che qualcuno riesca ad esplorarlo tutto.

Mi pare di aver scritto da qualche parte: “Dalla vita dei microrganismi all’accrescimento dei cristalli, dalla struttura elementare degli esseri viventi alla costituzione delle sabbie, dalle fibre tessili alle leghe metalliche, sono pochi i fenomeni naturali ed i prodotti industriali che non possano essere meglio compresi coll’aiuto del microscopico ottico.”

E mi risulta che l’unica opera (in tedesco) che ha tentato una sintesi di questa materia abbia superato i 20 volumi.

Entrare in questo campo può quindi spaventare i più coraggiosi. E allora? Non fare niente? Troppo comodo.

Ben vengano invece quegli autori che, con umiltà, e possibilmente con correttezza, affrontano qualche aspetto particolare del mondo “piccolo” e pubblicano le loro osservazioni e le loro esperienze. Con un duplice risultato: stimolare i pigri e far tesoro del proprio lavoro mettendolo a disposizione di tutti, si spera anche in avvenire.

Purtroppo molti amatori, abilissimi nel loro campo, non pubblicano il loro lavoro e rischiano che nessuno in futuro possa trarne vantaggio.

Il tempo è sempre tiranno, si sa, e poi le mogli brontolano... Ma rendere accessibili i risultati del proprio lavoro può diventare quasi un dovere.

Auguri ai volenterosi, dunque: le tecniche informatiche di oggi rendono possibile pubblicare a costi quasi nulli. Perché non approfittarne? Se poi qualcuno provvede ad una stampa su carta, tanto di cappello!

Giovanni Pietro Sini

SOMMARIO

<i>Presentazione</i>	<i>Pag. 3</i>
<i>Note dell' autore</i>	<i>Pag. 6</i>
<i>Introduzione</i>	<i>Pag. 7</i>

PRIMA PARTE

<i>Capitolo 1</i>	<i>Pag. 9</i>
L'occhio come strumento ottico	Pag. 9
Le lenti convergenti	Pag. 11
L'ingrandimento lineare	Pag. 15
Messa a fuoco ed accomodazione	Pag. 16
La lente di ingrandimento e le immagini virtuali	Pag. 17
<i>Capitolo 2</i>	<i>Pag. 22</i>
Il microscopio composto	Pag. 22
Risoluzione ed apertura	Pag. 25
<i>Capitolo 3</i>	<i>Pag. 29</i>
Il microscopio stereoscopico	Pag. 29
Le applicazioni	Pag. 34
Cenni storici	Pag. 34

SECONDA PARTE

Indice analitico dei capitoli da 4 a 14

<i>Capitolo 4</i>	<i>Pag. 40</i>
I coloranti in microscopia	
<i>Capitolo 5</i>	<i>Pag. 46</i>
Gli stomi	

Capitolo 6	Pag. 49
Vita in una radice di cipolla	
Capitolo 7	Pag. 54
Osserviamo le spore dei funghi	
Capitolo 8	Pag. 59
Diatomee, meraviglie al microscopio	
Capitolo 9	Pag. 82
Un micromanipolatore “home made”	
Capitolo 10	Pag. 89
Il campo scuro, un modo per vederci chiaro	
Capitolo 11	Pag. 97
La luce polarizzata	
Capitolo 12	Pag. 105
Come effettuare misurazioni al microscopio	
Capitolo 13	Pag. 111
Fotografare con lo stereomicroscopio	
Capitolo 14	Pag. 117
Colore e fotografia digitale	

Informazioni utili

Glossario

Bibliografia

IMPORTANTE!!!

Nella seconda parte dedicata alle esperienze osservative, vengono descritte alcune procedure che implicano l'utilizzo di prodotti chimici di facile reperibilità e di libera vendita i quali, tuttavia, soprattutto se usati in modo improprio, possono dare origine ad incidenti anche gravi.

Consiglio, pertanto, di eseguire in modo scrupoloso dette procedure e declino ogni responsabilità circa l'uso improprio dei prodotti chimici impiegati.

INTRODUZIONE

Un libro di facile comprensione, quasi un quaderno di appunti, rivolto a tutti coloro che si avvicinano per la prima volta al mondo della microscopia ed a chi vuole compiere qualche nuova osservazione cimentandosi nella costruzione di nuovi accessori per il proprio microscopio.

Nei primi tre capitoli viene affrontato in modo molto semplice il funzionamento del microscopio, svelando i segreti della lente di ingrandimento che, opportunamente posizionata, permette di osservare particolari altrimenti invisibili ad occhio nudo.

I successivi capitoli sono dedicati alle osservazioni, alla preparazione dei vetrini, ad alcuni accorgimenti tecnici per l'auto costruzione di accessori e ad elementi di fotografia al microscopio.

Nulla di esaustivo, in effetti, semplicemente qualche consiglio per ampliare le propri conoscenze e districarsi nel mondo della microscopia, accessibile a tutti quelli che lo desiderano anche con modeste strumentazioni e senza spendere follie.

Spero che queste pagine vi accompagnino per qualche tempo durante le osservazioni al microscopio e suscitino in voi la curiosità di approfondire l'argomento, rimandandovi a letteratura più specifica che approfondisca il campo della microscopia.

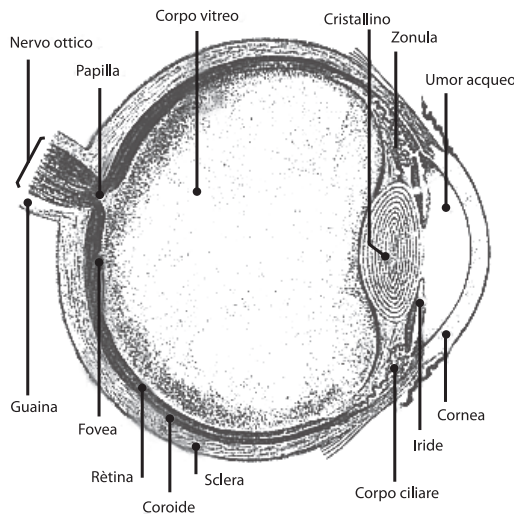
Infine ringrazio particolarmente il Prof. G. P. Sini per il suo indispensabile aiuto ed i suoi preziosissimi consigli.

CAPITOLO 1

L'OCCHIO COME STRUMENTO OTTICO

Tutti sanno che l'occhio umano, e di quasi tutti i Vertebrati, si comporta come una macchina fotografica: in esso infatti è presente un sistema di lenti, la “cornea” (che è la parte sporgente e trasparente) ed il “cristallino” (una piccola lente biconvessa che sta subito dietro la pupilla); tale sistema si comporta come l'obiettivo di una macchina fotografica in quanto proietta un'immagine rimpicciolita e rovesciata del mondo circostante su una superficie sensibile alla luce.

Nella fotocamera, la superficie sensibile è una pellicola, oppure uno strato di microscopici elementi elettronici; nell'occhio vi è una superficie sensibile (la “rètina”) che è costituita da minuscole cellule nervose: i “coni”, sensibili al colore, ed i “bastoncelli” assai più numerosi, insensibili al colore ma molto più sensibili alla luce rispetto ai coni e producono immagini in B/N.



Da: “Enciclopedia della Scienza e della Tecnica”,
Mondadori, Milano, 1963, modif.

Come nella fotocamera, anche nell'occhio vi è un diaframma a diametro variabile (la pupilla) al centro di uno schermo opaco (l' "iride"), una scatola di protezione annerita dentro (sclerotica e corioide), un coperchio dell'obiettivo (palpebre).

Oltre allo strato sensibile, tutto l'occhio è costituito da materiali organici, ma il principio di funzionamento è assai simile a quello della fotocamera.

Ma torniamo alle lenti. Anche in un proiettore vi è una lente, l'obiettivo, che proietta un'immagine della pellicola su uno schermo diffondente, ma questa volta l'immagine è ingrandita, sempre rovesciata. Se poi osserviamo una lente d'ingrandimento, anch'essa produce un'immagine ingrandita, ma questa è dritta e non la si può raccogliere su uno schermo: solo il nostro occhio la percepisce.

Eppure sono tutte lenti "convergenti". Vogliamo capirci qualcosa?

LE LENTI CONVERGENTI

Per i nostri fini consideriamo solo le lenti sferiche, ossia quei corpi trasparenti limitati da due superfici sferiche convesse oppure da una superficie convessa ed una piana.

Cominciamo con una qualunque “lente d’ingrandimento”.

Supponiamo di rivolgere un tale oggetto verso una sorgente lontana, come il sole. Se, dalla parte opposta rispetto al sole, poniamo un qualunque pezzo di carta, vedremo una piccola immagine del sole. Se, all’interno di una stanza, poniamo la lente presso una parete dalla parte opposta alla finestra, possiamo muovere la lente fino ad ottenere sulla parete un’immagine impiccolita (e rovesciata) della finestra.

In una fotocamera avviene qualcosa di simile.

Mettiamo ora la nostra lente vicino ad una lampadina da tavolo od alla fiamma di una candela: sulla parete vicina possiamo formare un’immagine della lampadina, sempre rovesciata, ma questa volta ingrandita. Eppure la lente è la stessa. In un proiettore da diapositive avviene, anche qui, qualcosa di simile.

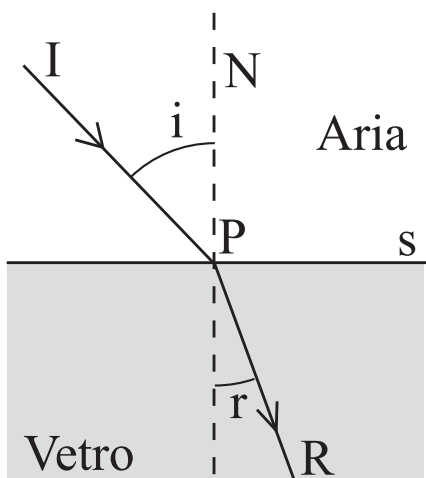
Se ora partiamo dall’ultima condizione realizzata (immagine della lampadina ingrandita), ed avviciniamo la lente alla lampadina, l’immagine diviene sempre più confusa e scompare. Se non fosse per l’abbagliamento, potremmo vedere attraverso la lente un’immagine ingrandita della lampadina, ma questa volta diritta.

Ancora la stessa lente, ma con un altro tipo di immagine. L’abbiamo usata come “lente d’ingrandimento”. Da cosa dipende questa differenza di risultati?

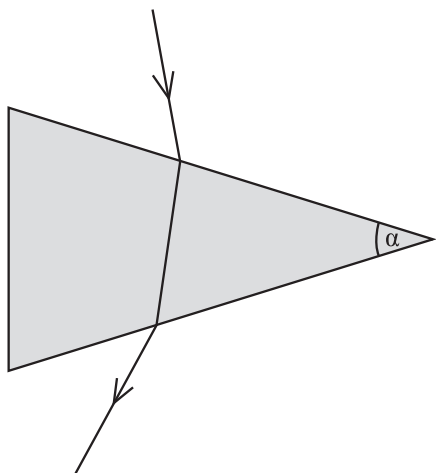
È solo questione di distanze.

Partiamo da un semplice fenomeno: immergiamo un oggetto diritto e sottile, come la cannuccia di una bibita, in un pentolino d’acqua. Se guardiamo di lato, vedremo la cannuccia come se fosse spezzata presso la superficie aria-acqua.

Schematicamente, avviene che qualunque “raggio” o fascio di luce, quando attraversa la superficie di separazione fra mezzi trasparenti diversi, viene deviato, “rifratto” (fig. a sinistra).



Il raggio in arrivo, “incidente” (I in figura) prosegue come raggio “rifratto” (R), ma non in linea retta. Fa eccezione il caso di un raggio incidente che arriva sulla superficie “s” perpendicolarmente (direzione N in figura). In questo caso non vi è deviazione.



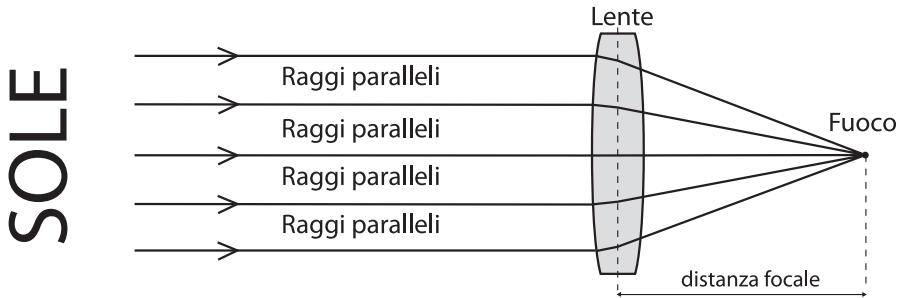
Se ora pensiamo ad un prisma di vetro, un blocco trasparente limitato da due superfici formanti un angolo acuto (figura a lato), un raggio incidente viene rifratto due volte e le due deviazioni si sommano.

lo fra le superfici è variabile, e che crea quindi una deviazione variabile.

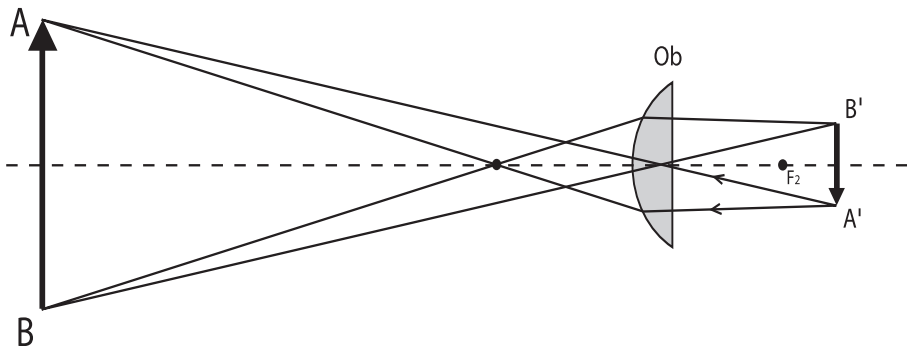
Se la lente riceve un fascio di raggi paralleli, li fa deviare secondo angoli variabili e, semplificando molto, tutti i raggi convergeranno in un punto solo detto “fuoco” (per l’esattezza: “secondo fuoco”; vedi la figura di pagina accanto).

La distanza fra il fuoco e la lente (se la lente è sottile, fra il fuoco ed il centro della lente) è detto “distanza focale” o, per gli amici, “la focale”.

Ebbene, questa figura schematizza ciò che avviene quando rivolgiamo la nostra lente d'ingrandimento verso il sole.



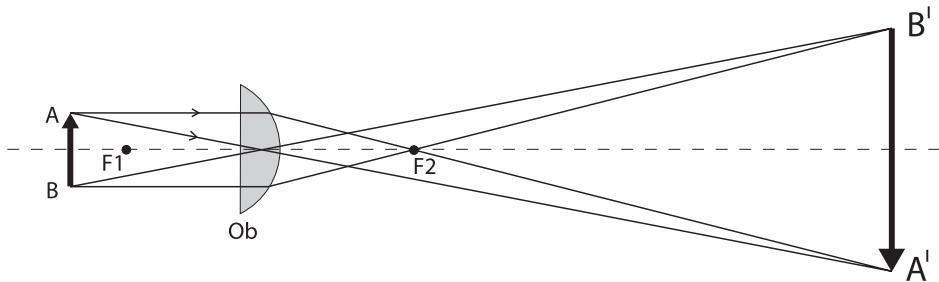
Se però la nostra sorgente non è così lontana come il sole, supponiamo che si voglia fotografare il nostro gatto, allora l'immagine del gatto non si formerà nel fuoco, ma un po' più in là (vedi la figura sotto). È quanto avviene nel caso dell'obiettivo fotografico, ma anche l'obiettivo del cannocchiale o del binocolo funzionano così: l'unica differenza è che, invece che una pellicola o un CCD (c.f.r. Capitolo 14), a raccogliere l'immagine c'è un'altra lente (l'oculare).



In questa figura, AB rappresenta il gatto, $A'B'$ è la sua immagine proiettata dall'obiettivo Ob sulla pellicola o sul CCD. Dunque: immagine rovesciata e rimpiccolita.

Abbiamo realizzato questa condizione avvicinando una lente d'ingrandimento ad un muro, dalla parte opposta ad una finestra.

Ora consideriamo un proiettore da diapositive, oppure la nostra lente avvicinata al filamento di una lampadina da tavolo. Questa volta la sorgente (la diapositiva illuminata da dietro, oppure la nostra lampadina) si trova assai più vicina alla lente e l'immagine si forma assai più lontano: immagine ancora rovesciata, ma ingrandita. La lente è la stessa, ma sono cambiate le distanze.



Qui vediamo lo stesso schema della figura precedente, ma rovesciato. AB è il filamento della lampadina, A'B' la sua immagine sul muro. Si noti che la sorgente, l'oggetto (AB), è un po' al di là del primo fuoco della lente (F1). Fra le due figure, le distanze dell'oggetto e dell'immagine rispetto alla lente si sono invertite. Dal loro rapporto dipendono le dimensioni dell'immagine.

Lo schema dell'ultima figura illustra anche il comportamento dell'obiettivo del microscopio. Ne ripareremo fra poco.

Ma ora dobbiamo precisare un fatto: in tutti questi casi (il sole a distanza infinita, il gatto un po' più vicino, la lampadina ancora più vicina) l'immagine si può raccogliere su uno schermo, visto che è formata dalla convergenza dei raggi che emergono dalla lente. Si parla allora di "immagine reale".

L'INGRANDIMENTO LINEARE

Stando così le cose, è facile misurare la distanza fra due punti nell'oggetto, per es. l'altezza del filamento della lampadina, e la distanza fra i due punti corrispondenti nell'immagine proiettata sul muro. Lo stesso si fa nei disegni meccanici e nella stesura di una carta topografica: il rapporto fra la lunghezza di un segmento nel disegno e del corrispondente segmento nella realtà si chiama "rapporto di scala" o semplicemente "scala" e si indica come in una divisione:

per esempio, "1 : 1.000" significa che un metro sulla carta corrisponde ad un Km sul terreno. C'è riduzione e quindi il rapporto è minore di 1 (in questo caso, 1/1.000). In un disegno ingrandito, invece, l'immagine è più grande dell'oggetto ed il rapporto sarà maggiore di 1. Per es., l'indicazione "5 : 1" significa che il disegno è linearmente cinque volte più grande dell'oggetto rappresentato. Qui si ha ingrandimento ma, per estensione, si parla di "ingrandimento" (minore di 1) anche quando vi è riduzione.

Poiché questa espressione dell'ingrandimento è un rapporto di segmenti, di lunghezze, si parla di ingrandimento "lineare" e si indica colla lettera M . Se, su un obiettivo da microscopio, si vede scritto, per es., 25, significa che quel sistema di lenti fornisce, in opportune condizioni, un'immagine reale di un certo oggetto 25 volte più grande, naturalmente più grande in lunghezza, non in superficie. Sarà allora da indicare: " $M = 25:1$ " oppure " $25:1$ " o, semplicemente, "25" (mai " $25 \times$ ", come vedremo). (Nella figura a pag 14), $M = A'B' / AB$.

“MESSA A FUOCO” ED ACCOMODAZIONE

Se qualcuno, con una semplice lente d'ingrandimento o con l'obiettivo del suo proiettore, ha realizzato gli schemi di cui sopra (lente davanti ad una finestra, lente vicino ad una lampadina), si sarà accorto che, per avere un'immagine più o meno nitida della finestra o della lampadina, occorre regolare bene la distanza fra lente e muro, oppure fra lente e lampadina (sarebbe teoricamente corretto anche spostare la finestra od il muro, ma non sarebbe altrettanto comodo).

Dunque, occorre “mettere A FUOCO” il sistema. Infatti, se è fissa la distanza fra oggetto e lente, risulta determinata anche la distanza lente-immagine, e viceversa; se cresce l'una, cala l'altra. Si suppone che sia fissa anche la focale della lente. Non per niente, quelle due distanze si chiamano “coniugate”: almeno loro, vanno sempre d'accordo.

In una macchina fotografica, la messa a fuoco si ottiene variando la distanza fra lente e pellicola; in un cannocchiale, la distanza fra obiettivo ed oculare. Dunque, quando è invariabile la focale della lente, si mette a fuoco usando mezzi meccanici per variare una distanza. Anche negli obiettivi “zoom”, a focale variabile, in realtà si varia la distanza fra due o tre lenti.

E nell'occhio? Supponendo di parlare dell'occhio umano e della maggioranza dei Vertebrati, la natura ha seguito una strada diversa: avendo evoluto organi e tessuti molli, ha preferito non spostare la lente interna dell'occhio, quella che abbiamo chiamato “cristallino”, ma variarne la curvatura, e quindi la focale.

Questa variazione viene operata da un sistema di fibre muscolari a disposizione radiale e circolare che si trovano nel “corpo ciliare”, un anello fibroso che circonda il cristallino (vedi la figura di pag. 9). Queste modificazioni del cristallino consentono la messa a fuoco dell'occhio, entro certi limiti, e vanno sotto il nome di “accomodazione”.

L'occhio in condizioni di riposo, con il minimo impegno delle

fibre muscolari del corpo ciliare, è focalizzato “all’infinito”, cioè su un piano a grande distanza, almeno qualche decina di metri (l’infinito in ottica è sempre relativo). Quando è “accomodato”, l’occhio può mettere a fuoco per una distanza minima (“punto prossimo”) che inizia da pochi centimetri nei giovanissimi, per salire a decine di metri nell’anziano; a quel punto, l’accomodazione è praticamente inesistente e si parla di “presbiopia” (che non ha alcun rapporto con la miopia).

LA LENTE D’INGRANDIMENTO E LE IMMAGINI VIRTUALI

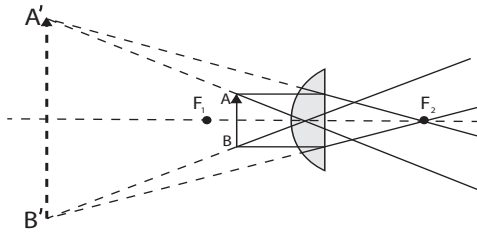
Torniamo alle lenti convergenti. Nelle pagine precedenti si è visto come si definisce il secondo fuoco (fig. pag. 13 e14): il punto di convergenza dei raggi che, viaggiando paralleli all’asse ottico della lente, si incontrano in un punto dall’altra parte della lente. Se si immagina di far provenire i raggi da destra sulla stessa lente, si può definire a sinistra di essa il “primo fuoco”. Nell’ultima figura si è visto il caso dell’oggetto molto vicino alla lente, al suo “primo fuoco”, e della relativa immagine, assai più lontana.

Ma se poniamo la sorgente, l’oggetto, proprio nel primo fuoco, che succede? L’immagine si forma a distanza infinita poiché i raggi emergenti dalla lente sono paralleli; non si può più parlare di immagine “reale” poiché non si saprebbe dove mettere lo schermo per raccoglierla. È un caso limite.

E se poniamo l’oggetto ancora un po’ più vicino alla lente, un po’ al di qua del primo fuoco?

Come si vede dalla figura seguente, da ogni punto dell’oggetto si possono tracciare dei raggi divergenti che la lente (in virtù del suo potere convergente) rende meno divergenti, ma pur sempre divergenti. Nessuna immagine reale. Allora questa lente, usata così, è inutile?

No, e per merito del nostro occhio. Esso infatti, nell'uso normale, è in grado di mettere a fuoco i fasci divergenti che provengono dagli oggetti davanti a noi, dunque anche i fasci divergenti prodotti dalla lente d'ingrandimento.



In questa figura, l'oggetto osservato (AB) è posto rispetto alla lente un po' più vicino del primo fuoco (F_1) e da ogni punto di esso emergono raggi divergenti che emergono ancora divergenti dalla lente (linee intere); però il nostro occhio, posto in F_2 (secondo fuoco) non riesce a capire il trucco ed interpreta i fasci divergenti prodotti dalla lente come se provenissero da un punto virtuale (A' per A, B' per B, ecc.), che si costruisce sulla base del prolungamento all'indietro dei raggi reali (linee tratteggiate). A questo punto, sulla nostra retina si forma un'immagine a fuoco di $A'B'$, ma $A'B'$ non è un oggetto reale, è solo l'immagine virtuale creata dalla lente che il nostro occhio "vede", mentre non può più vedere AB, nascosto dalla lente.

Dunque $A'B'$ non è un'immagine reale ma VIRTUALE. La stessa lente convergente, semplicemente perché è variata la distanza oggetto-lente, produce non più un'immagine reale rovesciata (ingrandita o impiccolita, dipende dalle distanze), ma un'immagine sempre ingrandita e dritta. È questo il comportamento della lente d'ingrandimento.

Si potrebbe, col calcolo, misurare le dimensioni di questa immagine virtuale e ricavarne un valore di ingrandimento come sopra spiegato. Ma non conviene: alla minima variazione della distanza oggetto-lente, varia di molto la posizione e la dimen-

sione dell'immagine e quindi il valore dell'ingrandimento. Perciò si preferisce seguire un altro concetto.

Nella figura di pag. 20, l'oggetto AB è posto ancora presso il primo fuoco della lente e l'occhio "vede" l'immagine virtuale A'B', ma la vede secondo l'angolo "a'"; se invece osservasse lo stesso oggetto alla distanza convenzionale di 250 mm (si considera quella la normale distanza d'osservazione), lo vedrebbe secondo l'angolo "a", assai più piccolo.

Volendo esprimere un ingrandimento indipendente dalla posizione dell'immagine virtuale, si esprime allora l'ingrandimento di essa come rapporto di angoli (non più di lunghezze), lo si chiama "ingrandimento visuale" ("ingrandimento angolare" significa un'altra cosa) e lo si indica colla lettera V :

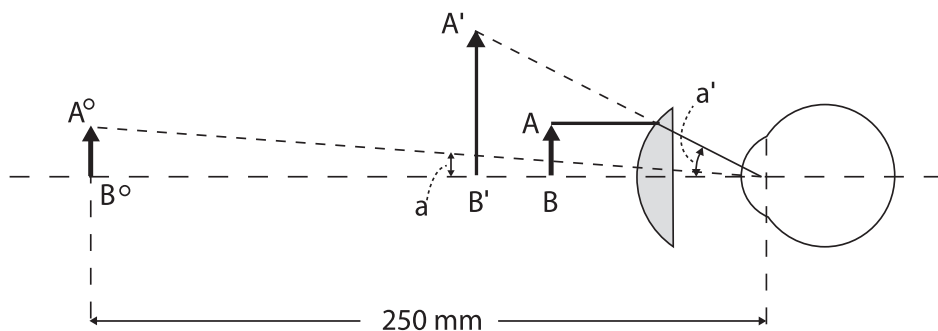
$$V = a' / a$$

Il valore numerico di V, per distinguerlo dall'ingrandimento lineare sopra definito, si fa seguire dal segno "per" (\times). Una lente d'ingrandimento da $3 \times$, ad es., mostra gli oggetti posti presso il suo primo fuoco sotto un angolo tre volte maggiore di quanto avverrebbe ad occhio nudo alla distanza di 250 mm.

Se si conosce la focale "f" di una lente, è possibile calcolarne l'ingrandimento visuale con una semplice formula: $V = 250 / f$ ("f" va espresso in mm); viceversa, dato l'ingrandimento, si calcola la focale:

$$f = 250 / V$$

La focale "f" si misura orientando la lente verso il sole e raccogliendone l'immagine su un pezzo di carta (possibilmente nera). In condizioni di miglior fuoco, la focale è pari alla distanza fra la carta ed il centro della lente (il discorso è semplificato, è esatto solo nel caso di una lente di spessore trascurabile).



L'oggetto AB è posto presso il primo fuoco della lente, troppo vicino per poterlo mettere a fuoco ad occhio nudo. L'occhio riceve il raggio rifatto (a linea intera) e lo interpreta come se venisse dal punto (virtuale) A' (linea tratteggiata); l'oggetto gli appare allora sotto un angolo " a' ". Se invece si pone l'oggetto alla distanza convenzionale di 250 mm (A°B°) esso ci apparirà sotto un angolo " a ". L'ingrandimento visuale della lente sarà allora $V = a'/a$, un rapporto di angoli.

In vista di quanto segue, occorre precisare che la lente d'ingrandimento opera allo stesso modo se, invece di un oggetto concreto, si pone presso il suo fuoco un'immagine reale come quella fornita da un obiettivo. Ciò consente di vedere ingrandita l'immagine (reale) che si forma sopra l'obiettivo del microscopio o del binocolo: stiamo anticipando il discorso sull'oculare. Prima di chiudere il capitolo, è bene precisare che, per lenti di modesta potenza, il potere convergente (o divergente) di una lente si può esprimere non solo attraverso la focale, ma con l'inverso di essa, espressa in metri, e la grandezza che se ne ricava si chiama, appunto, "potenza" o "convergenza", indicata con P:

$$P = 1 / f \quad \text{da cui:} \quad f = 1 / P$$

L'unità di misura di P è la “diottria” (“D”). Una potenza di una diottria (1 D) è quella di una lente con focale $f = 1$ m.

Con una focale di mezzo metro, $f = 0,5$ m, la potenza sarà:

$$P = 1/0,5 = 2 \text{ D.}$$

Se una lente ha una potenza $P = 3$ D, ad es., la sua focale sarà:

$$f = 1/3 = 0,33 \text{ m.}$$

CAPITOLO 2

IL MICROSCOPIO COMPOSTO

Anche se la lente d'ingrandimento è costituita da più lenti, al fine di migliorarne le prestazioni, il suo funzionamento si può sempre ricondurre ad una singola lente semplice. La si può chiamare quindi "microscopio semplice".

Il normale microscopio è invece costituito da almeno due sistemi, ognuno riconducibile ad una lente semplice, ma sempre due sistemi distinti; il termine esatto è quindi: "microscopio composto".

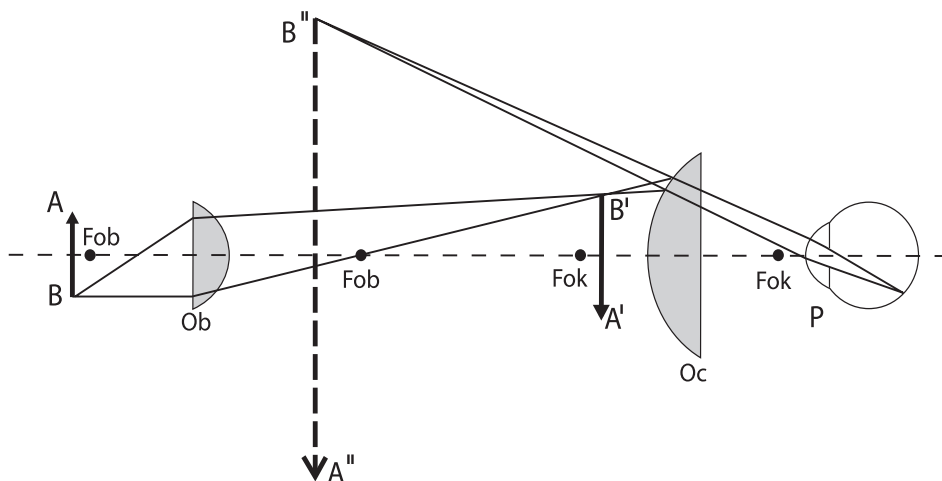
In esso, il sistema che "guarda" l'oggetto (obiettivo) funziona con lo schema della figura a pag. 14: produce dell'oggetto un'immagine reale, rovesciata ed ingrandita. Tale immagine, detta "immagine intermedia", si forma all'interno del tubo del microscopio, generalmente a 10 mm sotto l'orlo di esso.

Per quanto detto sopra, tale immagine intermedia, che è "reale", può funzionare da oggetto per ciò che sta dietro, e precisamente per un altro sistema convergente, di focale fra 50 e 15 mm circa, detto "oculare", sopra al quale si pone l'occhio.

In altre parole, l'obiettivo del microscopio si comporta come l'obiettivo del proiettore (immagine reale ingrandita e rovesciata) e l'oculare come una lente d'ingrandimento (immagine virtuale ingrandita e diritta): alla fine, nell'oculare si vedrà un'immagine ingrandita in due stadi, virtuale e rovesciata. (Vedi fig. pagina accanto)

Si noti: l'oggetto AB è posto un po' prima del primo fuoco dell'obiettivo (F_{ob}) e quindi produce un'immagine intermedia ($A'B'$) reale, rovesciata ed ingrandita; l'oculare è posto ad una distanza tale che l'immagine intermedia cade un po' dopo il suo primo fuoco (F_{ok}) e quindi produce un'immagine virtuale

(A''B'') ulteriormente ingrandita, diritta rispetto l'immagine intermedia, ma rovesciata rispetto l'oggetto.



Esprimendo l'ingrandimento dei due sistemi nel modo sopra indicato (per es.: obiettivo 20:1 ed oculare 10 \times), l'ingrandimento totale sarà il prodotto dei due (20 \times 10 = 200 \times) e sarà indicato da un numero seguito da “ \times ” in quanto l'immagine finale è virtuale. Si parla ancora di “ingrandimento visuale” del microscopio.

In molti strumenti, il sistema ottico del microscopio è più complesso (obiettivi a seconda coniugata infinita, lenti di tubo, sistemi intermedi, ecc.) ed il calcolo dell'ingrandimento diventa più complicato. In certi modelli, l'immagine finale appare diritta rispetto l'oggetto.

I valori previsti dai vari costruttori per l'ingrandimento degli obiettivi non seguono alcuna regola. Le regole ci sarebbero (per es. le norme DIN), ma quasi nessuno le osserva.

Per gli oculari, i valori più comuni sono 10 \times e 15 \times , ma attenzione: in molti strumenti esistono sistemi intermedi, specialmente nei tubi binoculari e trioculari, che aggiungono un fattore d'ingrandimento supplementare (“fattore di tubo”) che può andare da 0,8 \times a 2,5 \times . Tale fattore va aggiunto nel calcolo dell'ingrandimento totale.

A questo punto c'è da chiedersi: fino a che punto conviene ingrandire? Posso pensare di aumentare il “potere risolutivo” del mio strumento adottando gli obiettivi e gli oculari più forti?

E qui conviene chiarire qualche altro concetto.

Prendiamo una figura da qualche libro, per es. un panorama con degli alberi.

Possiamo ingrandire quella figura con una lente o anche con un microscopio, in misura quasi illimitata, in modo che una foglia d'albero diventi grande quanto un tavolo. Ma siamo sicuri che in quell'immagine vedremo le nervature, i peluzzi, le cellule o i cloroplasti?

Dunque ogni immagine, anche quella offerta dal microscopio, può essere ingrandita fino ad un certo punto in modo da facilitarne la lettura, ma oltre quel punto è inutile andare: non aumenta il numero e la finezza dei dettagli visibili. Si può parlare di “ingrandimento a vuoto”.

Detto altrimenti: il nostro occhio offre delle prestazioni eccellenti, ma ha dei limiti; nessuno può distinguere i cloroplasti osservando una foglia ad occhio nudo. Se presento all'occhio un'immagine o un oggetto con dettagli troppi fini (una foglia, con tutte le sue microstrutture, ad es.), non li apprezzerò: la risoluzione delle strutture realmente presenti nella foglia è superiore a quella del mio occhio. Viceversa, se io ingrandisco una figura di un libro per mille volte, posso guardarla anche con l'occhio male accomodato, e non ho nulla da perdere: la risoluzione del mio occhio sarà sempre superiore a quella della figura ingrandita 1.000 volte.

Dunque, uno strumento ben progettato deve presentare all'occhio un'immagine con una risoluzione simile a quella dell'occhio, nulla di più e nulla di meno. Si parlerà di “ingrandimento utile”. Se ingrandisco di più, avrò un ingrandimento a “vuoto”. Ne riparleremo più avanti.

RISOLUZIONE ED APERTURA

Si chiama “risoluzione” il potere di un sistema ottico, ivi compreso il nostro occhio, di mostrare distinti i vari punti presenti nell’oggetto osservato. Se indichiamo con “ d ” la distanza minima che il sistema ci mostra distinta, la risoluzione corrispondente (R) sarà l’inverso di “ d ”:

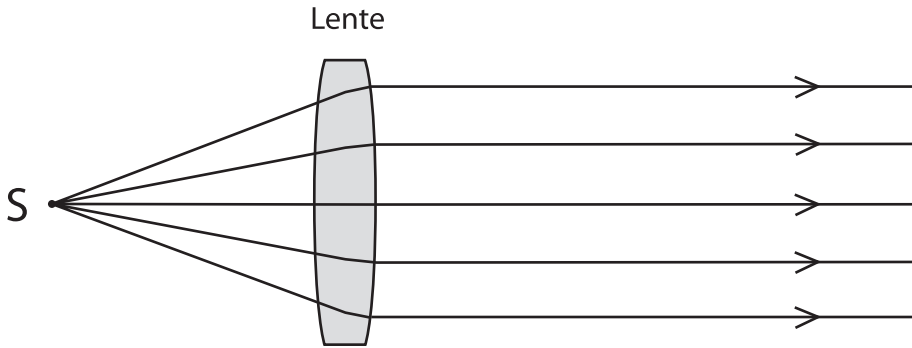
$$R = 1 / d$$

In altre parole, risoluzione R elevata significa piccola distanza “ d ” fra i punti più vicini che il mio sistema mi consente di vedere distinti.

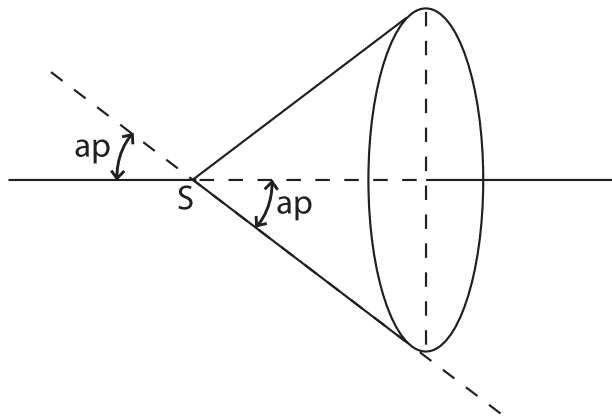
Nel campo della microscopia, il valore di “ d ” e di altre grandezze si esprime in millesimi di mm (simbolo: μ , pron. “micron”, lettera “m” minuscola dell’alfabeto greco). $1 \mu = 0,001$ mm.

La valutazione della risoluzione dipende da vari fattori di disturbo (sfocature, aberrazioni, cattiva pulizia o altri difetti delle lenti, scarso contrasto nell’oggetto, ecc.). Tutti questi fattori sono “di disturbo” in quanto possono abbassare la risoluzione, ma non aumentarla. Occorre allora valutare qual è il valore massimo di R e da quali fattori esso dipende.

Il principale fattore è l’apertura del sistema ottico. Chiariamo. Ogni punto dell’oggetto, se opportunamente illuminato, invia verso una lente che gli sta davanti un ampio fascio divergente che, salvo ostacoli, occupa tutta la superficie utile della lente. Se la lente è circolare, caso molto frequente, il fascio sarà conico, con vertice nel punto dell’oggetto che abbiamo considerato. Se guardiamo la prima figura della prossima pagina, essa può rappresentare un obiettivo da proiettore o da microscopio davanti al quale esiste un oggetto composto da infiniti punti, uno dei quali è indicato con S .



Da S emerge un fascio conico che occupa tutta la superficie della lente. Ebbene, in tale fascio, come in ogni cono, si definisce “apertura angolare” (“ap” in figura) l’angolo fra l’asse del cono ed una generatrice, che per noi è il raggio estremo del fascio.



Per ragioni di calcolo, in fotografia si definisce “apertura relativa” il rapporto fra l’altezza del cono ed il diametro della sua base.

In microscopia, nella tecnica delle fibre ottiche ed in altri casi si preferisce invece usare la funzione “seno” (rapporto fra il raggio della base del cono ed un segmento compreso fra il vertice ed un punto della circonferenza di base). Si parla allora di “apertura numerica” ($NA = \text{Numerical Aperture}$, in inglese).

$$NA = \text{sen } ap$$

Di solito, gli angoli si indicano con lettere greche minuscole; in luogo di “ap” andrebbe quindi indicata la lettera “alfa” (α). Se però si usano i cosiddetti “obiettivi ad immersione”, per i quali si pone una goccia di liquido fra il vetrino e l’obiettivo, i fenomeni di rifrazione impongono di tener conto dell’indice di rifrazione di tale liquido, che si indica colla lettera n ; perciò avremo:

$$NA = n \sin \alpha$$

Nel caso del microscopio, quando si parla di apertura s’intende quella dell’obiettivo lato oggetto e quando si parla di risoluzione s’intende quella nel piano dell’oggetto.

Chiarito ciò, si dimostra che la risoluzione di un obiettivo, e quindi quella dell’intero microscopio (l’oculare non può aggiungere nulla, al massimo peggiora), dipende da due fattori: la NA e la lunghezza d’onda della luce utilizzata. Per quest’ultima si usa ancora un simbolo preso dall’alfabeto greco, la lettera “lambda” (λ).

Il valore della NA è di solito inciso sulla montatura dell’obiettivo, e se non vi è inciso nulla, diffidate; per il valore della λ si considera di solito il valor medio dello spettro ottico ($0,5 \mu$).

Ebbene, la distanza minima risolta “d” risulta, approssimando: $d = 0,6 \lambda / NA$; se si assume $\lambda = 0,5$, sarà $d = 0,3/NA$ naturalmente esprimendo “ λ ” e “d” in micron (μ).

Si noti che la risoluzione (R), essendo inversamente proporzionale a “d”, sarà direttamente proporzionale all’apertura numerica.

Tanto per fare un esempio, un obiettivo con la notazione “40/0.65” (M = 40:1, apertura NA = 0,65) avrà una distanza minima risolta $d = 0,3 / 0,65 = 0,46 \mu$. Con gli obiettivi più forti, come quelli ad immersione, il valore di “d” può scendere a $0,22 \mu$.

A questo punto, tutti correranno a cercare obiettivi a forte apertura. D'accordo, sarebbero anche più luminosi, a parità d'ingrandimento, ma bisogna pensare alle controindicazioni:

- l'ingrandimento sarà in genere maggiore, e c'è sempre il rischio di superare l'ingrandimento utile;
- l'apertura in genere non cresce nella stessa misura dell'ingrandimento e la risoluzione lato immagine sarà minore; lo stesso discorso vale per la luminosità dell'immagine;
- la profondità di campo diminuisce, fino a meno di un micron;
- la “distanza di lavoro” (fra la punta dell'obiettivo ed il vetrino) scende anche a meno di 0,2 mm;
- la piccola focale, e quindi il piccolo diametro delle lenti, pongono dei problemi alla produzione che lasciano qualche segno nel risultato finale.

Avendo chiarito il concetto di apertura ed i suoi legami con la risoluzione, possiamo ora calcolare l'ingrandimento “utile” sopra definito, relativo al microscopio nel suo complesso: considerato che l'occhio umano ha una risoluzione media di circa 80μ , relativamente ad un oggetto osservato da 250 mm di distanza, e che la risoluzione del microscopio è stata sopra calcolata in funzione dell'apertura dell'obiettivo, un buon strumento dovrà fornire immagini con risoluzione paragonabile a quella dell'occhio. Un valore maggiore andrebbe perduto: l'occhio non se ne accorgerebbe. Fatti i calcoli, risulta che l'ingrandimento utile non deve superare circa: $V_{\text{utile}} \leq 1.000 \text{ NA}$

Per un obiettivo 10/0,25 , si avrà:

$$V_{\text{utile}} \leq 0,25 \times 1.000 = 250 \times ;$$

per un obiettivo ad immersione, 100/1,25 , sarà:

$$V_{\text{utile}} \leq 1,25 \times 1.000 = 1.250 \times .$$

Un produttore che promette ingrandimenti maggiori, o non ha capito, o fa il furbo, od entrambe le cose.

CAPITOLO 3

IL MICROSCOPIO STEREOSCOPICO

Molto lavoro su piante inferiori, fiori, insetti, micro-fossili, cristalli, ecc. può essere svolto ad ingrandimento modesto, anche con una lente d'ingrandimento, ma è assai più pratico un microscopio "stereoscopico", e qui conviene scendere in qualche dettaglio.

Un microscopio "normale", cioè munito di un solo obiettivo, tende a fornire la massima risoluzione per consentire i più alti ingrandimenti; e questo è necessario in molti campi della biologia e della medicina. Ma la massima risoluzione si ottiene solo a prezzo della massima apertura dell'obiettivo. Questo porta alla maggior luminosità possibile dell'immagine, ma abbassa in proporzione la profondità di fuoco e la distanza di lavoro (distanza fra obiettivo ed oggetto).

Per es., un obiettivo del tipo più comune ("a secco") può avere una risoluzione massima di $0,32 \mu$, pari a 3.125 linee/mm nel piano oggetto, il che consente un ingrandimento "utile" fino a $1.000 \times$ circa, ma con una profondità di fuoco inferiore a $0,5 \mu$ ed una distanza di lavoro di circa 0,2 mm, il che è chiaramente molto critico.

In queste condizioni, l'oggetto deve essere liscio come uno specchio o, se è trasparente, molto sottile. Questo comporta che, tranne rari casi (sospensioni liquide di cellule, microrganismi o particelle, che si possono stendere in strati sottili, ecc.), l'oggetto va tagliato o sezionato in fette sottili in modo da presentare superfici ben piane. Spesso occorre anche una colorazione ed altri trattamenti. Si deve poi confezionare un "preparato" o "vetrino", racchiudendo l'oggetto fra lamelle di vetro di spessore normalizzato (1 mm e 0,17 mm, rispettivamente dal lato

inferiore e superiore: vetrino “porta-oggetti” e “copri-oggetti”). Questi microscopi per uso biologico inoltre richiedono spesso una lampada speciale ed una presa di corrente. L’immagine da essi fornita è rovesciata. Anche se vi sono diversi obiettivi montati su una calotta girevole (detta “revolver”), l’obiettivo utilizzato di volta in volta è unico, ed anche quando gli oculari sono due (microscopi “bi-oculari”) le due immagini presentate ai due occhi sono identiche. Non è quindi possibile la percezione del rilievo.

Ma la maggioranza degli oggetti naturali non richiede un’osservazione a forte ingrandimento e non è sempre possibile applicare raffinate tecniche di preparazione. L’ideale sarebbe uno strumento che permettesse di osservare oggetti anche di grandi dimensioni e di forma irregolare, senza preparazioni particolari, maneggiandoli con le mani, come si può fare durante una gita.

Ciò presuppone :

- percezione del rilievo (“stereoscopia”, dal greco “stereon” = solido, a tre dimensioni);
- immagine diritta;
- distanza di lavoro di parecchi cm;
- profondità di fuoco di uno o più millimetri;
- immagine abbastanza luminosa da permettere l’osservazione con luce ambiente.

Proprio per soddisfare queste esigenze, da oltre un secolo esistono i “microscopi stereoscopici” o “binoculari” (non confondere con “bi-oculari”, come detto sopra).

Il termine “binoculare” allude al fatto che vi sono due sistemi ottici identici ed indipendenti, quindi due obiettivi, come in un binocolo: le due immagini presentate ai due oculari sono diverse, poiché i due obiettivi guardano l’oggetto da due punti di vista diversi, con i due assi ottici inclinati fra loro di circa 15° , e si rende così possibile la visione del rilievo.

Le condizioni sopra elencate sono soddisfatte e la praticità dello strumento è sorprendente.

Ma questo a prezzo di una riduzione dell'apertura e dell'ingrandimento totale: generalmente non superiore a $100 \times$.

Questi strumenti stereoscopici non costano molto meno di quelli normali poiché, in base a quanto si è detto, il sistema ottico deve essere doppio e deve includere due sistemi di prismi per raddrizzare le due immagini.

Con questi strumenti, le operazioni di messa a punto sono solo due: 1) la regolazione della distanza fra gli oculari: come in ogni binocolo, i due corpi porta-oculari sono incernierati fra loro per adattare la distanza fra gli oculari alla distanza inter-pupillare dell'osservatore e la visione deve avvenire con entrambi gli occhi senza muovere la testa; 2) la messa a fuoco, con una delle manopole poste ai due lati. Quest'ultima operazione diviene superflua se l'oggetto, invece di essere poggiato sulla base dello strumento, viene tenuto in mano: mentre lo si orienta, si può facilmente "tenerlo a fuoco".

Anche con modesti ingrandimenti (10 o $20\times$), si allarga il campo delle osservazioni naturalistiche in modo imprevedibile; sotto uno strumento stereoscopico si può infilare qualunque cosa, anche un pizzico di terriccio, e la varietà delle forme viventi che possono apparire è incredibile.

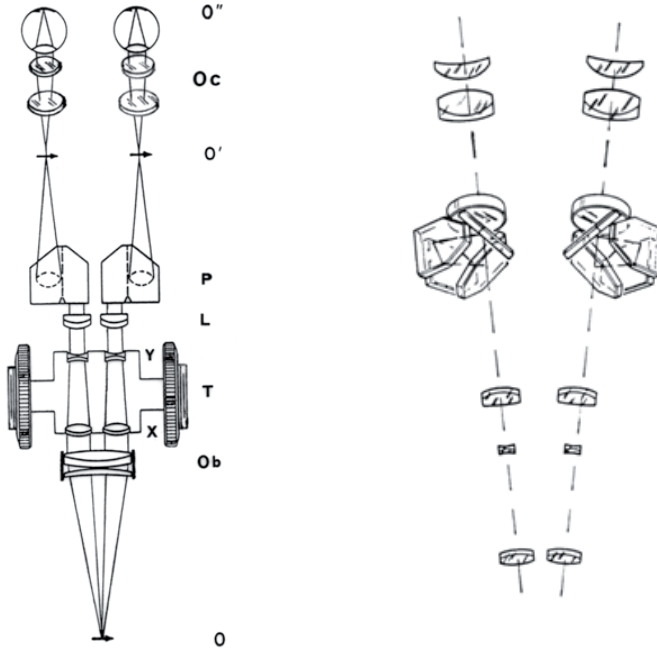
La manipolazione dell'oggetto direttamente con le mani e l'immagine diritta permettono l'osservazione anche alle persone più sprovvedute. La distanza di lavoro di molti centimetri rende possibile pure l'osservazione all'interno di oggetti cavi, come le corolle dei fiori.

La sola precauzione da prendere è evitare di sforzare l'occhio, cioè di "accomodarlo" come quando si osserva da vicino: l'occhio deve rimanere rilassato, come se guardasse un panorama lontano. Chi si stanca o prova mal di testa al microscopio ha inconsciamente accomodato l'occhio, cioè sforza inutilmente il muscolo ciliare; per evitare questa sterile fatica, il microscopio è sempre progettato per fornire immagini "virtuali" poste a distanza molto grande; ma un'errata focalizzazione da parte

dell'osservatore porta subito ad un inconscio sforzo di accomodazione.

La maggior parte dei modelli disponibili è costruita sullo schema "CMO", in cui i due obiettivi sono rappresentati da due regioni periferiche della stessa lente: si riconoscono guardando dentro l'obiettivo da sotto, poiché si vede un'unica lente del diametro di 30 - 50 mm (Ob nella figura a sinistra).

Il tipo CMO, ad obiettivo comune, è più adatto per oggetti piani ed il cambiamento dell'ingrandimento è molto semplice, in genere a mezzo di un tamburo rotante su un asse orizzontale (T in figura). La distanza di lavoro è di solito fra 8 e 10 cm, e non cambia variando l'ingrandimento. Questo lo fa preferire in molti casi. C'è però una serie di limitazioni ottiche per cui la "nitidezza" dell'immagine è modesta e l'ingrandimento non dovrebbe superare 40 - 50 \times .



Da catalogo Zeiss, Oberkochen,
RFT, G 40 - 705

Da catalogo American Optical Corp., Buffalo,
N.Y., SB 560 3/75

In altri modelli, “sistema Greenough”, vi sono due obiettivi distinti, di solito visibili guardando sempre da sotto.

In questo modello “Greenough”, ad obiettivo doppio, si hanno difficoltà di focalizzazione per oggetti piani e la distanza di lavoro può scendere sotto ad 1 cm, ma la bontà dell’immagine consente di arrivare ad un ingrandimento totale di $100\times$.

Il cambiamento d’ingrandimento si ottiene di solito sostituendo il blocco dei due obiettivi,

NB: in entrambi i modelli, sotto gli oculari, sono presenti due prismi o gruppi di specchi che servono a raddrizzare l’immagine.

In tempi relativamente recenti, ad entrambi i modelli sono stati applicati i sistemi “zoom”, a focale variabile, in modo da consentire di variare l’ingrandimento in maniera continua, colla semplice rotazione di una manopola.

Concludendo, quando si studia la forma e l’aspetto esterno di un oggetto senza arrivare al livello delle cellule od altre strutture fini, cioè a basso ingrandimento, allora è preferibile il microscopio stereoscopico ed il suo uso risulta assai più facile.

Quando invece si devono osservare oggetti o strutture molto fini (cellule e loro strutture, polline, spore, microrganismi, ecc.) non si può fare a meno di un microscopio “normale” o “biologico” e della tecnica di preparazione del “vetrino”. Come si è detto, ciò permette i massimi ingrandimenti e la massima risoluzione possibile.

I due tipi fondamentali di strumenti sono dunque complementari: ciò che si fa con l’uno non si può fare con l’altro e viceversa.

LE APPLICAZIONI

Da quanto si è detto sulla struttura degli oggetti, dovrebbe risultare chiaro come siano poche le categorie di oggetti che non possano esser meglio conosciute attraverso l'osservazione al microscopio.

Vi sono intere branche di studio e di applicazione che non esisterebbero senza il microscopio o sono nate solo dopo la sua introduzione: la microbiologia (studio dei microrganismi), la citologia (studio della struttura delle cellule), ecc.

Impossibile dunque elencare tutte le applicazioni, ma almeno si deve ricordare che, anche a piccolo ingrandimento, la maggioranza degli oggetti naturali può venir compresa appieno solo con l'uso del microscopio.

CENNI STORICI

Probabilmente, il vetro fu prodotto accidentalmente dall'uomo quando accese il fuoco su una base di sabbia silicea; manipolando il vetro fuso formato sotto le fiamme, gli deve essere accaduto di lasciar cadere una goccia di impasto su una superficie liscia. Il vetro si è rappreso in forma di goccia, piana di sotto e convessa di sopra; questa calotta sferica di vetro aveva forma di lenticchia, donde il nome di "lenticchie ("lenti") di vetro": "lente" è una variante di "lenticchia". La cattiva qualità di quel vetro ne limitava molto le applicazioni in ottica, ma da lungo tempo l'uomo ha imparato a lavorare i cristalli naturali, a volte molto omogenei e trasparenti, utilizzando polvere di altri minerali più duri (smeriglio, ad es.) per fabbricare lenti adatte a correggere alcuni difetti della vista: si sono trovate queste lenti negli scavi di Ninive (l'antica capitale degli Assiri) e si sa che Nerone, notoriamente miope, "osservava i combattimenti dei gladiatori attraverso uno smeraldo".

Ma col vetro fuso l'uomo ha imparato certamente presto anche a produrre oggetti in vetro soffiato: immergendo un tubo di metallo nel vetro fuso e soffiandovi dentro è possibile ottenere delle bocce cave, dei palloni in vetro. Riempiendo questi palloni con acqua si ottiene una rudimentale lente convergente che può essere utilizzata per concentrare i raggi solari ed accendere il fuoco. Accenni di questa applicazione si trovano nella commedia "Le Nuvole" dello scrittore greco Aristofane, nelle opere di Plinio e di Seneca. Una boccia di vetro piena d'acqua può essere utilizzata anche come una modesta lente d'ingrandimento.

Nel corso del medioevo, poi, molti artigiani avevano acquistato la capacità di lavorare specchi concavi: sfregando un cristallo od un pezzo di vetro o di metallo con un tampone intriso di polvere abrasiva, si ricava facilmente una superficie concava. Un tale specchio può ugualmente essere usato per produrre immagini virtuali ingrandite, come si fa con certi specchi concavi "da barba".

Il fiorentino Rucellai (1475 - 1525) impiegò uno specchio concavo per studiare l'anatomia dell'ape e pubblicò un'opera con le sue illustrazioni, ottenute a quel modo.

Ma in quell'epoca si cominciavano a fabbricare lenti per occhiali in vetro, convergenti e divergenti. Combinando una lente di un tipo con una dell'altro è possibile ottenere un cannocchiale, sia pure di modeste caratteristiche; è probabilmente ciò che fece qualche artigiano olandese (Hans e Zacharias Janssen ?) e che divenne presto una cosa normale. Può darsi che non sia stato il primo in questa invenzione, ma certamente G. Galilei perfezionò questo cannocchiale e lo applicò allo studio dell'astronomia. Già Galilei e poi Keplero ed altri ottennero risultati migliori utilizzando due lenti convergenti, una più debole rivolta verso l'oggetto ("obiettivo") ed una più forte verso l'occhio ("oculare"); e questa formula è ancora largamente utilizzata, nonostante il fatto che produca un'immagine rovesciata e richieda un ulteriore sistema di prismi o lenti per il raddrizzamento.

Se come obiettivo si usa una lente sempre più forte, è possibile avvicinare sempre più l'oggetto e l'ingrandimento aumenta. A questo punto è già realizzato in essenza il microscopio composto. Anche questo ritrovato non si sa bene a chi sia venuto in mente per primo, ma probabilmente agli stessi uomini che inventarono il cannocchiale, poiché il passaggio da cannocchiale a microscopio è breve: basta aumentare la potenza dell'obiettivo. Questi strumenti iniziali erano però quasi inservibili: alcuni fenomeni legati alla rifrazione, che rendono poco "nitida" l'immagine formata da una lente semplice (le "aberrazioni"), sono relativamente tollerabili in un cannocchiale, ma diventano preponderanti nel microscopio, poiché le lenti devono aver maggiore potenza. E così, fino alla fine del '700, il microscopio composto non era stato preso molto sul serio, proprio a causa della cattiva qualità delle immagini. I suoi perfezionamenti avvenivano quasi solo nelle parti meccaniche.

Ma, per opera di artigiani inglesi (in quel paese, il problema dei cannocchiali da marina era molto sentito e vi era un forte impulso al perfezionamento tecnico), verso la metà del '700 si arrivò alla correzione della principale aberrazione, quella "cromatica". Si fa spesso il nome di J. Dollond, anche se pare che egli abbia imitato risultati ottenuti da altri suoi compatrioti. Solo all'inizio del secolo successivo questa innovazione fu applicata all'obiettivo da microscopio, sempre da artigiani inglesi, forse al seguito dello stesso Dollond; un altro inglese (A. Ross) riuscì poco dopo a correggere anche l'aberrazione "sferica".

Poi, intorno al 1860, le officine C. ZEISS a Jena (Germania) assunsero un giovane fisico dell'Università locale e gli affidarono una revisione di tutte le basi teoriche e tecniche della microscopia. Questo vero e proprio genio, Ernst Abbe, riuscì in pochi anni a rivoluzionare tutta l'ottica, e non solo quella del microscopio, e da allora i microscopi prodotti dagli stabilimenti Zeiss e poi imitati da altri costruttori, divennero assai perfezionati poiché la loro costruzione era basata su principi teorici ri-

gorosi e su accorgimenti tecnici raffinati.

Anche i costruttori inglesi e quelli francesi, come gli Chevalier, ottennero ottimi risultati; l'italiano G.B. Amici ideò la "immersione" degli obiettivi, poi perfezionata dai francesi e da Abbe.

Va notato infine come il perfezionamento tecnico e gli sviluppi scientifici teorici siano andati di pari passo: mentre i costruttori fornivano ai ricercatori, soprattutto biologi, medici e naturalisti, strumenti sempre più perfezionati per l'osservazione e la raccolta dei dati, e ponevano ai fisici stessi sempre nuovi quesiti circa i fondamenti teorici dell'ottica, dall'altra parte la scienza, la fisica e la matematica, offrivano ai costruttori sempre nuove idee e strumenti di calcolo.

Vi sono scienze, come la Microbiologia, che non sarebbero nate senza lo sforzo dei costruttori di microscopi, ed altre, come la biologia, che sarebbero rimaste ad uno stato molto arretrato. Si può dire che molte malattie infettive, come la tubercolosi, sono state sconfitte solo dopo che l'osservazione al microscopio ha consentito l'individuazione del batterio patogeno che le provoca.

SECONDA PARTE

Indice analitico dei capitoli da 4 a 14

Capitolo 4.....	Pag. 40
I coloranti in microscopia	Pag. 40
Origine e natura dei coloranti	Pag. 41
Preparazione dei coloranti in microscopia	Pag. 43
Coloriamo una fetta di patata	Pag. 44
La colorazione negativa	Pag. 45
Una colorazione da Nobel	Pag. 45
Capitolo 5.....	Pag. 46
Gli stomi	Pag. 46
Osservare gli stomi al microscopio	Pag. 47
Capitolo 6.....	Pag. 49
Vita in una radice di cipolla	Pag. 49
L'esperienza	Pag. 50
Capitolo 7.....	Pag. 54
Osserviamo le spore dei funghi	Pag. 54
Le spore	Pag. 54
Prelievo delle spore nei basidiomiceti	Pag. 55
Le spore al microscopio	Pag. 56
Le ornamentazioni	Pag. 57
Capitolo 8.....	Pag. 59
Diatomee, meraviglie al microscopio	Pag. 59
Prelevare le diatomee	Pag. 63
Le diatomee al microscopio	Pag. 65
Alcune caratteristiche delle diatomee	Pag. 67
Osservare il frustulo delle diatomee	Pag. 68
L'attrezzatura - Come si procede	Pag. 69
La verifica	Pag. 71
Il frustulo evanescente delle diatomee	Pag. 72
Indici di rifrazione	Pag. 73
Quattro soluzioni possibili per osservare al meglio i frustuli delle diatomee	Pag. 74

Riconoscere le diatomee	Pag. 79
<i>Surirella spiralis</i> , la regina delle diatomee	Pag. 80
Capitolo 9	Pag. 82
Un micromanipolatore “home made”	Pag. 82
Costruzione di un semplice micromanipolatore a singolo asse di spostamento Z	Pag. 85
Tecnica di micromanipolazione	Pag. 87
La gelatina di fissaggio e come pretrattare il vetrino coprioggetto	Pag. 88
Capitolo 10	Pag. 89
Il campo scuro, un modo per vederci chiaro	Pag. 89
Esempi pratici	Pag. 89
Il campo scuro episcopico	Pag. 91
Il campo scuro diascopico	Pag. 92
Capitolo 11	Pag. 97
La luce polarizzata	Pag. 97
I display a cristalli liquidi	Pag. 99
Polarizzatori incrociati	Pag. 100
Birifrazione	Pag. 101
Osservazioni al microscopio in luce polarizzata	Pag. 102
Effetti multicolor	Pag. 104
Capitolo 12	Pag. 105
Come effettuare misurazioni al microscopio	Pag. 105
Misurazioni con una precisione di circa 0,2 micron	Pag. 106
Come tarare la scala graduata dell'oculare micrometrico	Pag. 107
Il valore delle misurazioni al microscopio	Pag. 110
Capitolo 13	Pag. 111
Fotografare con lo stereomicroscopio	Pag. 111
Capitolo 14	Pag. 116
Colore e fotografia digitale	Pag. 116
Vari tipi di sensore	Pag. 118

CAPITOLO 4

I COLORANTI IN MICROSCOPIA

Sin da quando è stato inventato il microscopio, si è subito sentita l'esigenza di colorare alcuni tipi di oggetti di osservazione perchè altrimenti invisibili. I coloranti in microscopia sono stati usati per la prima volta nel XVIII secolo: lo zafferano per tingere le fibre muscolari e poco dopo il carminio per tingere preparati vegetali.

L'utilizzo della colorazione dei preparati microscopici, grazie alle esperienze ed al progredire della chimica, è diventato fondamentale per l'analisi istologica, in quanto i nuovi coloranti, che via via si sono perfezionati, sono in grado di colorare solo alcune parti del preparato, lasciandone incolore o tingendone di un altro colore, altre (coloranti metacromatici). Oggigiorno le tecniche di colorazione sono indispensabili in microscopia; la quantità dei reagenti e dei coloranti disponibili è veramente notevole e ad ogni colorante o insieme di coloranti, corrispondono protocolli con procedure di utilizzo rigidissime, che difficilmente è possibile attuare se non si dispone di un laboratorio attrezzato.

Per protocollo si intende tutto l'insieme di trattamenti e procedure da eseguire rigorosamente sul campione da osservare e per la preparazione dei reagenti. Il metodo di allestimento di un campione per l'osservazione microscopica e scientifica deve essere sempre lo stesso al fine di ottenere risultati certi, ripetibili e comparabili.

ORIGINE E NATURA DEI COLORANTI

I coloranti possono essere estratti sia dal regno animale che da quello vegetale, anche se per la maggior parte sono prodotti di sintesi.

I principali coloranti naturali sono:

- 1) **Zafferano** estratto dal fiore dello zafferano;
- 2) **Carminio** estratto dal corpo e dalle uova di una cocciniglia, la *Dactylopius coccus* originaria dell'America centrale, parassita di alcune cactacee, che è anche un colorante alimentare (E120, E124) e viene utilizzato nell'industria cosmetica;
- 3) **Ematossilina**, estratta dal legno della pianta *Haematoxylon campechianum*.

L'argomento in esame è molto complesso e le tecniche della colorazione vanno ben oltre le mie competenze, comunque cercherò di dare alcuni suggerimenti, grazie ai quali potrete districarvi in questo difficile campo.

Un primo problema pratico che si trova a dover affrontare un neofita della microscopia è la reperibilità dei coloranti. Il loro costo, inoltre, è elevato e le quantità vendute sono spesso eccessive per un uso amatoriale. È bene ricordare, infatti, che per effettuare una colorazione bastano poche gocce e che i coloranti hanno una scadenza, dopo la quale diventano inutilizzabili.

Alcuni coloranti sono facilmente reperibili in farmacia o in negozi di acquari, celati sotto nomi di diversi prodotti, come alcuni disinfettanti, il cui principio attivo è proprio il colorante. Certamente questi sostituti non hanno la purezza delle sostanze utilizzate nei laboratori d'analisi, ma ci consentono ugualmente di raggiungere il nostro scopo.

I tre coloranti generici più usati e facilmente reperibili sono:

- 1) **BLU DI METILENE**;
- 2) **EOSINA**;
- 3) **TINTURA DI IODIO**;

Prima di illustrare le loro proprietà, funzioni, nonché modalità di impiego, passo ora, brevemente, a dare alcune indicazioni pratiche su dove e come possono essere reperiti.

BLU DI METILENE: si può facilmente acquistare in alcune farmacie; ha l'aspetto di polvere blu/nera che deve essere opportunamente preparata prima del suo utilizzo. Nel caso in cui la ricerca nelle varie farmacie sia infruttuosa, vi consiglio di recarvi in un negozio di acquari.

Il *blu di metilene* viene infatti impiegato per la cura di una malattia dei pesci chiamata volgarmente “ittio”. Qualora il negoziante ne sia sprovvisto, potete comunque farvi dare un qualsiasi altro farmaco per la cura di questa malattia, infatti il principio attivo utilizzato per la cura dell’ “ittio”, non è altro che il *blu di metilene*.

EOSINA: è reperibile in farmacia in polvere rossa, ma se il farmacista ne è sprovvisto allora dovrete sostituirla con un qualsiasi disinfettante cutaneo a base di *eosina*.

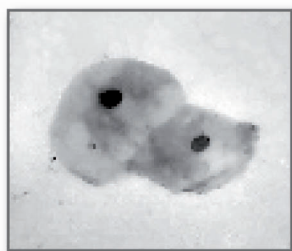
TINTURA DI IODIO: è anch'essa reperibile in farmacia, quale principio attivo di diversi farmaci disinfettanti; anche in questo caso potrete chiedere consiglio al farmacista.

Passiamo ora alla preparazione dei coloranti e al loro utilizzo differenziandolo in base ai nostri scopi ed a ciò che vogliamo osservare.

PREPARAZIONE DEI COLORANTI IN MICROSCOPIA

Mi occuperò, ora, della preparazione dei coloranti e del loro utilizzo, variabile in base al fine, nonché all'oggetto di osservazione.

BLU DI METILENE: È un colorante generico indispensabile che viene utilizzato principalmente per mettere in evidenza il nucleo delle cellule. (vedi foto mucosa della bocca). La sua preparazione è



Cellule di sfaldamento della mucosa della bocca

semplice: la polvere va sciolta in acqua demineralizzata ed il prodotto va poi conservato in un recipiente ben chiuso. Viene utilizzato normalmente all' 1% (un grammo di polvere è sufficiente per 100 grammi di soluzione) ma si può usare anche più diluito, prolungando poi il tempo di immersione o di permanenza del preparato nel colorante.

Nel caso in cui non abbiate trovato il colorante in polvere e dobbiate utilizzare, in sua sostituzione, un farmaco acquistato in farmacia, potete usarlo puro senza diluizioni.

EOSINA: È un colorante generico che colora però prevalentemente il citoplasma della cellula. Si usa in concentrazione dell' 1%, oppure, si può alternativamente utilizzare il disinfettante acquistato in farmacia senza diluizioni.

TINTURA DI IODIO: Questo colorante serve per mettere in evidenza eventuali granuli di amido che si coloreranno di un colore bruno/violaceo.

Prima di qualsiasi colorazione è fondamentale trattare correttamente il campione da osservare; possiamo, tuttavia, effettuare un semplice esperimento, senza alcuna preventiva preparazione, per renderci facilmente conto del diverso comportamento dei coloranti sopra illustrati.

COLORIAMO UNA FETTA DI PATATA

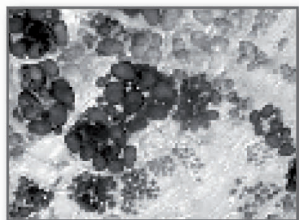
Prendiamo tre fettine sottilissime di patata e mettiamole in tre “vetri da orologio” (i vetri da orologi sono recipienti in vetro con una leggera concavità *vedi foto a lato*, chi non ne disponesse può usare un bicchierino di plastica da caffè) contenenti i diversi coloranti. Attendiamo circa dieci minuti, sciacquiamo



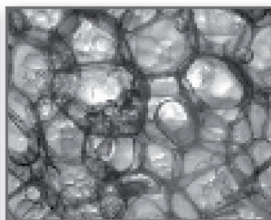
le fettine, con acqua fredda, sotto il getto di un rubinetto e dopo averle poste su tre vetrini distinti, coprendole con un vetrino copri-oggetto, aggiungiamo una goccia d'acqua e passiamo all'osservazione al microscopio. Anche

se non abbiamo ottenuto un vetrino perfetto a causa dell'elevato spessore della fetta, questo ha poca importanza ai fini dell'esperimento, purché nell'osservazione non vengano superati i 40 - 100 ingrandimenti.

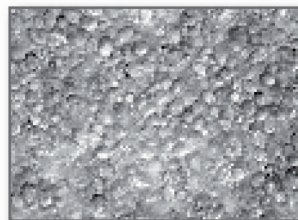
Le foto delle fettine di patata tinte con i tre diversi coloranti sono state scattate a 100 ingrandimenti (al microscopio). Si notano, in particolare: nella prima i granuli di amido tinti di blu scurissimo dalla tintura di iodio; nella seconda le pareti cellulari della polpa della patata, tinte con il blu di metilene, mentre nella terza, il citoplasma della cellula, tinto con l'eosina.



Patata tinta con
tintura di iodio



Patata tinta con
blu di metilene



Patata tinta con
eosina

In queste tre foto il nucleo delle cellule è quasi invisibile perchè nascosto dall'amido

LA COLORAZIONE NEGATIVA

La colorazione negativa è un particolare tipo di colorazione che viene utilizzata amatorialmente per mettere in evidenza su un campo nero i batteri (vedi foto sottostante). Per effettuarla è sufficiente diluire in due gocce di **inchiostro di china**, poste a lato di un vetrino, una piccolissima goccia di acqua contenente batteri. Sarà sufficiente effettuare “uno striscio” di questa goccia nera su tutta la superficie del vetrino ed attendere che l’inchio-



stro si secchi perfettamente. A questo punto si copre il tutto con un vetrino coprioggetto e si può procedere all’osservazione. Si noteranno i batteri come corpuscoli luminosi in evidenza su di un campo scuro.

UNA COLORAZIONE DA NOBEL

Al fine di mettere in evidenza le cellule nervose, Camillo Golgi scoprì nel 1873 la colorazione cromo-argentina denominata “reazione nera”. Questo tipo di colorazione, che impiega sali di cromo e di argento, permise di mettere in evidenza, per la prima volta, i dettagli e le ramificazioni delle cellule nervose tingendole di nero.

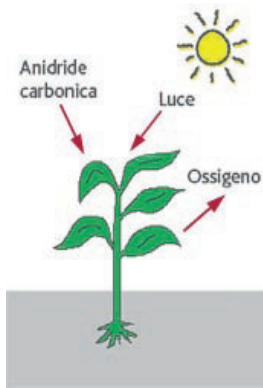
Nel 1906 Camillo Golgi, grazie anche a questa scoperta, vinse il premio Nobel per la medicina.

CAPITOLO 5

GLI STOMI

Tutti noi abbiamo una precisa visione del mondo che ci circonda, ma cosa accadrebbe se di colpo diventassimo piccolissimi? Come cambierebbe la percezione dell'ambiente?

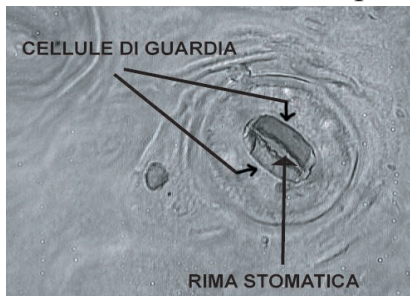
Le piante producono ossigeno grazie alla fotosintesi clorofilliana; come possa accadere e come le piante interagiscono con l'ambiente per molti risulta ancora poco chiaro.



Sul "sussidiario" delle elementari tutti avremo, probabilmente, visto il classico schema raffigurante lo scambio di CO_2 e O_2 che avviene grazie alle piante (vedi figura a lato).

Questa immagine mi è rimasta talmente impressa che una delle prime cose osservate al microscopio è stata una foglia, in particolare una foglia di geranio.

Gli stomi si trovano in prevalenza nella pagina inferiore di una foglia e sono gli apparati che fisicamente permettono lo scambio di anidride carbonica e ossigeno fra l'ambiente esterno e la pianta.

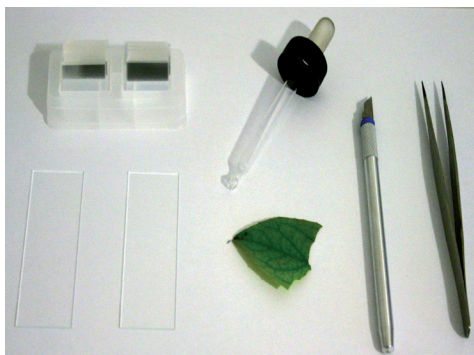


Lo stomato è composto da due cellule di guardia, a forma di fagiolo che arginano un'apertura chiamata rima stomatica. Questa cavità è l'accesso alla camera sottostomatica, che è in contatto con i piccoli spazi fra le altre cellule della foglia.

Dobbiamo immaginare le cellule di guardia come dei veri e propri guardiani che gonfiandosi o sgonfiandosi aprono e chiudono la rima stomatica. Quando le cellule di guardia sono "gonfie" aprono la rima stomatica mentre quando sono "sgonfie" chiudono l'apertura. Il sistema è di grandissima efficacia e la sua

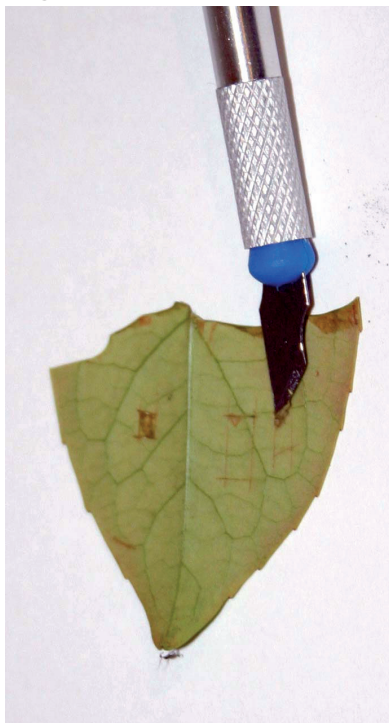
meccanica è regolata da processi osmotici ed ambientali. Generalmente, gli stomi sono aperti di giorno e si chiudono di notte e nei periodi di siccità; in quest'ultimo caso impediscono alla pianta di perdere le proprie riserve idriche.

OSSERVARE GLI STOMI AL MICROSCOPIO



Prima di cominciare dobbiamo procurarci pochi ma indispensabili attrezzi quali un taglierino con punta fine, una pinzetta, un contagocce, vetrini portaoggetti e coprioggetti e una foglia, meglio se di ciclamino o geranio.

Bisogna staccare dalla pagina inferiore della foglia la sottile pellicina superficiale e per far questo dobbiamo procedere nel seguente modo.

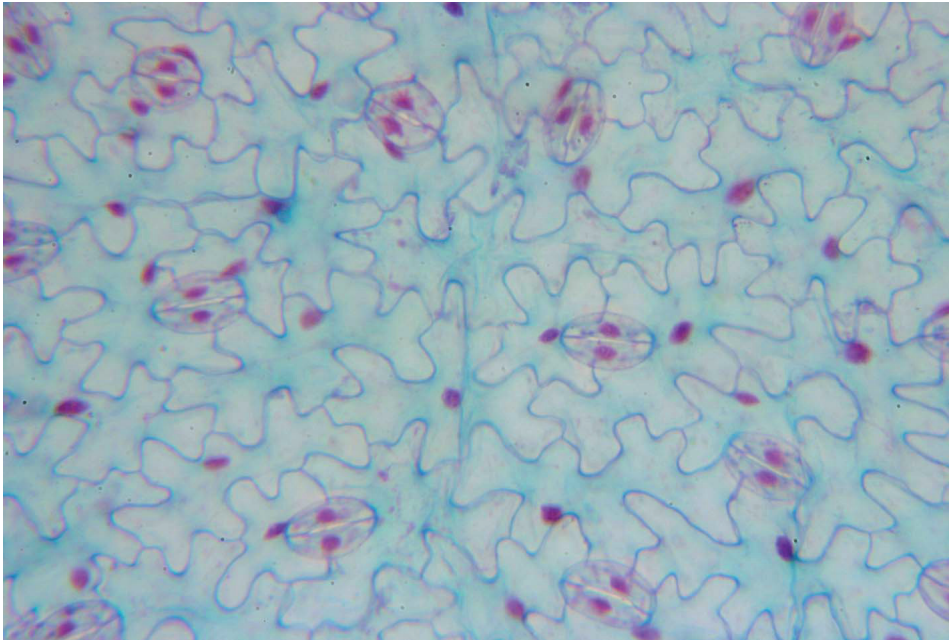


Tracciamo un quadrato di circa 3 x 3 mm incidendo leggermente la faccia inferiore, senza tagliare quella superiore, e con l'aiuto della punta del taglierino e della pinzetta stacciamo questo piccolo quadratino e lo posizioniamo sul vetrino portaoggetti, mantenendo il lato superiore verso di noi. Aggiungiamo una goccia d'acqua con il contagocce e copriamo il tutto con il vetrino coprioggetti. Questa procedura è abbastanza delicata e richiede manualità e precisione; con un pizzico di calma ed un po' di pratica chiunque può riuscirci.

Preparato il vetrino, lo poniamo sul microscopio e possiamo cominciare l'osservazione. In principio utilizziamo 100 ingrandimenti, per apprezzare la disposizione cellulare rassomigliante ad un puzzle (specie se stiamo osservando una foglia di ciclamino).

Con questo ingrandimento scorgiamo anche gli stomi, che ci appaiono come delle piccole bocche che si distinguono nell'intricata superficie.

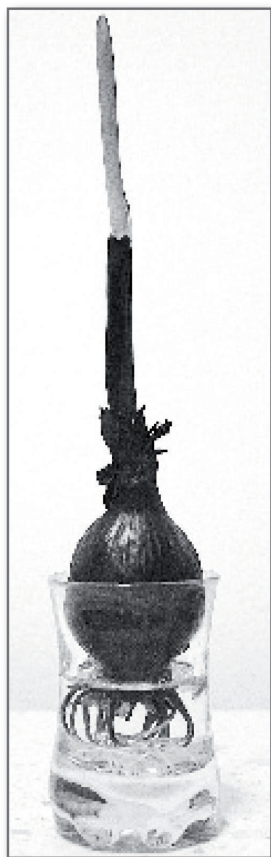
Passiamo poi ai 200 ingrandimenti, quindi ai 400, per visualizzare i dettagli dello stoma che ci apparirà, come già detto, simile ad una bocca semiaperta, lasciandoci carpire tutti i dettagli della sua semplice ma funzionale architettura.



Foglia di ciclamino osservata a 100 ingrandimenti

CAPITOLO 6

VITA IN UNA RADICE DI CIPOLLA LA DUPLICAZIONE CELLULARE



La primavera è da sempre sinonimo di vita, la natura si risveglia ed è in gran fermento generando nuove piante e fiori che rendono quasi magico questo periodo dell'anno. Questo spettacolo meraviglioso resta tale anche se visto su piccola scala, ma è solo sotto le lenti di un microscopio che è possibile cogliere i piccoli tasselli che svelano parte del mistero della vita.

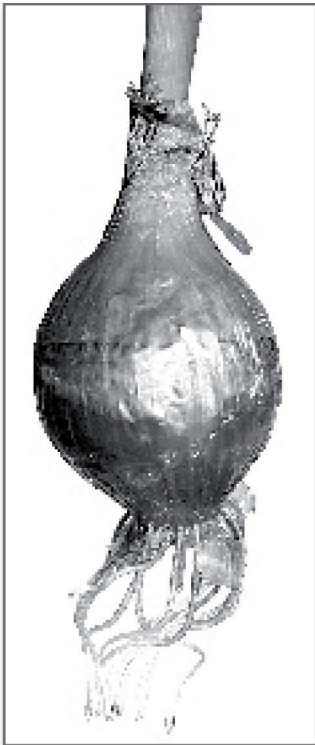
Sicuramente avrete già sentito parlare della mitosi (termine che indica una serie di processi finalizzati alla duplicazione delle cellule eucariote, cioè quelle cellule che presentano un citoplasma che contiene il nucleo). In questo breve articolo cercherò di illustrarvi come poter osservare questo fenomeno nel dettaglio, individuandone con precisione le varie fasi, così da rendere più familiari i nomi che caratterizzano questo processo. Per

fare questo ci serviremo di una cipolla, che farà da “cavia” per le nostre osservazioni, di un bicchiere o di un piccolo vasetto, di alcune gocce di acido cloridrico commerciale (reperibile presso qualsiasi supermarket), di acqua distillata e del blu di metilene. Saranno altresì necessari, oltre al microscopio, 4 tappi di plastica (ideali quelli delle bibite), una pinzetta, uno stuzzicadenti ed alcuni vetrini porta e coprioggetto.

L'esperienza che effettueremo richiede qualche giorno di tempo.

Poniamo la nostra cipolla su di un bicchiere riempito d'acqua, in modo tale da farle sviluppare le radici. Normalmente in 4 o 5 giorni compaiono numerosi formazioni radicali della lunghezza di qualche centimetro, di cui ci serviremo per condurre la nostra esperienza.

L'ESPERIMENTO



Per cominciare disponiamo 4 tappi di plastica in fila e riempiamoli come segue: il primo con qualche goccia di acido cloridrico diluito al 50% con acqua; il secondo con acqua distillata; il terzo con qualche goccia di blu di metilene; il quarto con acqua distillata.

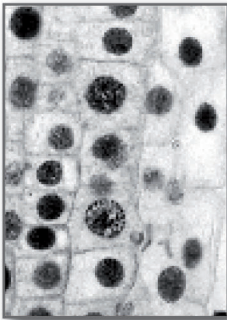
Tagliamo 4 o 5 apici di radici lunghi circa 1 cm e poniamoli nel primo tappino contenente l'acido cloridrico diluito, per circa 15 minuti. Questa fase ha lo scopo di indebolire la membrana cellulare, per permettere al colorante di penetrare bene e colorare il nucleo e i cromosomi delle cellule. La radice diventa molto più morbida e floscia; a questo punto deve essere spostata delicatamente con la pinzetta, nel tappino n° 2, contenente acqua distillata, per essere risciacquata dall'acido. Dopo un paio di minuti è necessario trasferire la radice nel tappino n°3, contenente il colorante, e lasciarla in immersione per altri 15-20 minuti, affinché diventi di un colore blu scuro; in seguito, immergiamo la radice nel 4° tappino, per un brevissimo risciacquo. Poniamola ora su di un vetrino portaoggetti, e copriamola con un vetrino coprioggetto esercitando una leggera pressione ed aiutandoci con uno stuzzicadenti per appiattirla il più possibile.

Questa fase è molto delicata e le seguenti operazioni devono essere fatte con molta cura ed attenzione, pena la rottura del vetrino coprioggetto. Infine, se necessario, inseriamo una piccola goccia d'acqua in modo tale da far fuoriuscire l'aria rimasta all'interno.

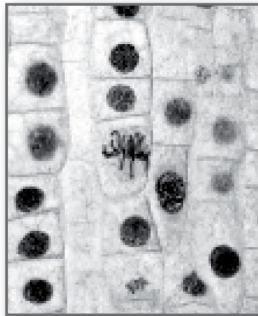
Passiamo ora all'osservazione al microscopio del vetrino con l'obiettivo 10 per poi passare al 20. Risaltano immediatamente le cellule che compongono la radice della cipolla, il loro nucleo e la membrana cellulare. La nostra attenzione è però focalizzata sulle varie fasi della divisione cellulare; per individuarle dobbiamo far scorrere il vetrino in lungo e in largo sotto l'obiettivo. Una volta individuato ciò che ci interessa, possiamo utilizzare l'obiettivo 40 per osservare nel dettaglio la fase che interessa.

Possiamo così osservare la mitosi cellulare che si suddivide, convenzionalmente, in 5 distinte fasi.

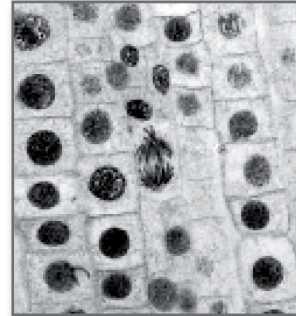
- 1) **Profase:** all'interno del nucleo si cominciano ad evidenziare i cromosomi formati da due cromatidi.
- 2) **Metafase:** i cromosomi si portano sul piano centrale della cellula, ognuno di esso è ripiegato a V.
- 3) **Anafase:** ogni cromatide migra verso la direzione opposta del suo gemello.
- 4) **Telofase:** la cromatina si organizza per la formazione dei due nuovi nuclei cellulari e incomincia a formarsi la membrana cellulare che dividerà le due cellule neonate.
- 5) **Citodieresi:** è la fase finale del processo, una parete trasversale neo-formata divide definitivamente le due cellule ormai dotate di nucleo completamente formato.



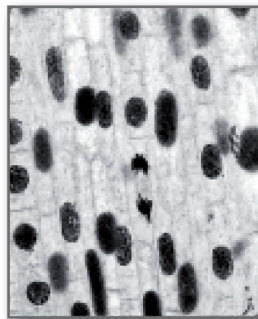
PROFASE



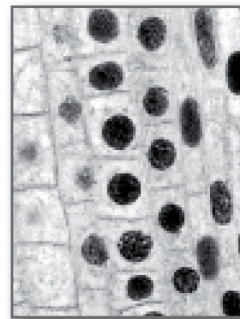
METAFASE



ANAFASE



TELOFASE



CITODIERESI

Questo semplice ed interessante esperimento ci fa capire come si possano nascondere anche fra le parole difficili della biologia degli eventi estremamente affascinanti.

Tengo a precisare che la mitosi è un processo del tutto “imprevedibile” legato a diversi fattori ambientali quali la temperatura, la luce ed, a volte, pur avendo eseguito minuziosamente tutte le fasi, è possibile che nessuna cellula della radice osservata si trovi in questa fase. È opportuno, pertanto, ripetere l’esperimento in un altro momento della giornata quando le condizioni di accrescimento saranno più propizie.

NOTA DI COLORAZIONE

Per ottenere risultati di colorazione migliori di quelli ottenibili con il blu di metilene è possibile usare il colorante **GIEMSA** o meglio ancora il **BLU DI TOLUIDINA**, ma la reperibilità di questi coloranti risulta essere più difficoltosa.

ATTENZIONE!

L'acido cloridrico è pericoloso e pertanto deve essere maneggiato con attenzione per non causare danni a persone o cose.

Leggere le avvertenze riportate sull'etichetta della confezione. Porre attenzione anche nell'uso del blu di metilene, che macchia fortemente tessuti e cose ed è tossico, sia per ingestione che per contatto con la pelle.

CAPITOLO 7

OSSERVIAMO LE SPORE DEI FUNGHI

In queste poche righe, lontane dal fornire una trattazione completa sull'argomento, cercherò di incuriosirvi su di una piccola parte del fungo: la spora.

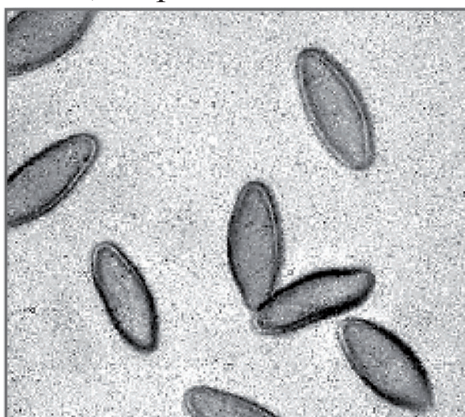
La micologia è molto complessa e le spore dei funghi sono solo delle piccolissime parti che ci possono aiutare nella classificazione dei funghi. In micologia il dubbio è d'obbligo e questo breve articolo non deve essere considerato esaustivo, ma semplicemente un'introduzione alla tematica delle spore.

LE SPORE

Il termine spora deriva dal greco e significa seme. In qualche modo possiamo considerare le spore i "semi" dei funghi, anche se in realtà la riproduzione non avviene esattamente come nelle piante ma è molto più complessa.

Come detto prima, le spore dei funghi sono importanti per la loro classificazione; infatti, su numerosi testi che trattano di questo argomento in modo scientifico, è riportata la loro descrizione o in alcuni casi anche un disegno delle stesse.

Le spore, infatti, non sono tutte uguali ma, come i semi delle piante, differiscono da fungo a fungo con forme e ornamentazioni differenti che ci aiutano a classificarli.

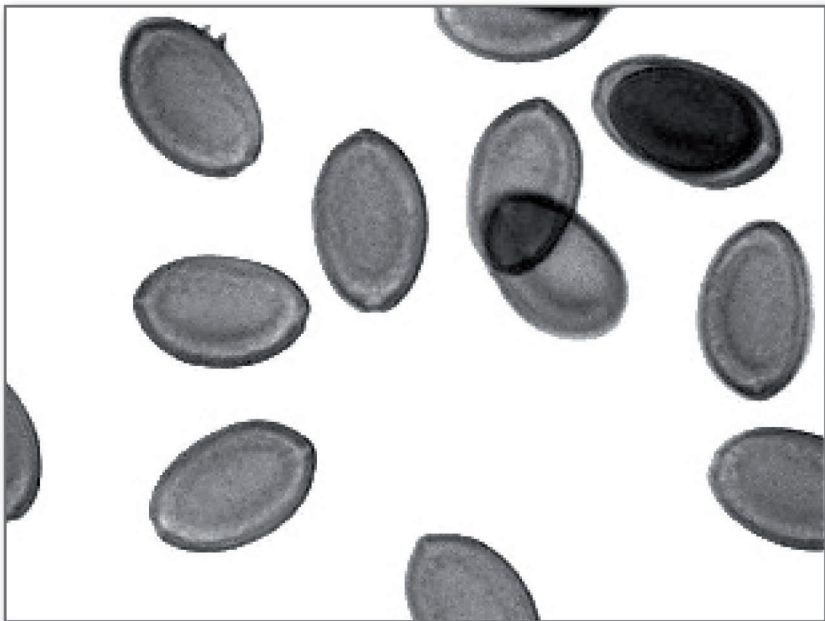


Chroogomphus helveticus

PRELIEVO DELLE SPORE NEI BASIDIOMICETI

La raccolta delle spore dei funghi è semplicissima. È sufficiente prendere il cappello del fungo, dividerlo in 3 parti in modo da formare tre fette di torta, appoggiarne una parte su un foglio di carta bianca, una su di un foglio nero e una sulla superficie di un vetrino da microscopio. Bisogna attendere poi qualche ora e successivamente rimuovere i pezzi di fungo con molta attenzione, cercando di toglierli verticalmente.

Il perché dei 3 prelievi contemporanei è molto semplice; infatti, oltre agli aspetti microscopici (prelievo fatto su vetrino) è necessario verificare anche i caratteri macroscopici della “sporcata”, determinandone il colore. Poiché alcuni funghi hanno spore chiare ed altri scure, in molti casi, non potendo determinare a priori se le spore sono chiare o scure, i fogli di carta di colore bianco e nero ci aiuteranno a migliorare il contrasto della sporcata e a valutarne il colore con maggiore precisione.



Stropharia semiglobata

LE SPORE AL MICROSCOPIO

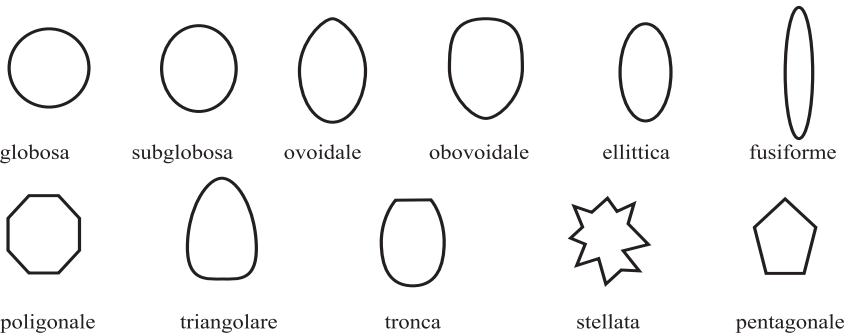
Osservare le spore al microscopio non è particolarmente complicato; è sufficiente aggiungere una piccola goccia d'acqua alle spore depositate sul vetrino che abbiamo utilizzato per il prelievo e ricoprire il tutto con il vetrino copri oggetto.

Purtroppo alcune spore diventano completamente trasparenti e la loro visione risulta evanescente. Se ciò accade dobbiamo tentare di colorarle usando un colorante specifico per micologia come il "rosso congo" oppure tentare con il comune blu di metilene. Tengo a precisare che questi tipi di colorazione utilizzati in modo non specifico mettono in evidenza solo alcune peculiarità della spora.

In questo articolo ci limiteremo alla descrizione della morfologia della spora. In alternativa alla colorazione possiamo utilizzare, se ne disponiamo, il contrasto di fase.

L'osservazione delle spore va fatta a forte ingrandimento, possibilmente utilizzando l'obiettivo 100 ad immersione e "focheggiando" sui vari piani per scorgerne bene tutti i particolari. Nell'osservazione di una spora è indispensabile determinarne le misure (vedi la sezione dedicata alle misurazioni con il microscopio) facendo una media di almeno una decina di spore (a scopo scientifico la media dovrebbe essere calcolata almeno su 30 misurazioni di spore) non tenendo conto delle ornamentazioni.

Rappresentazione schematica della forma delle spore



LE ORNAMENTAZIONI

La superficie della spora non è sempre liscia ma può avere delle escrescenze caratteristiche. È molto importante saperle riconoscere attribuendo loro la terminologia adatta perché, in molti libri di funghi, sono descritte solo a parole, senza alcuna immagine che le rappresenti.

Ornamentazioni delle spore



liscia



punteggiata



verrucosa



alata



pustulosa



reticolata



aculeata



costolata



rugosa



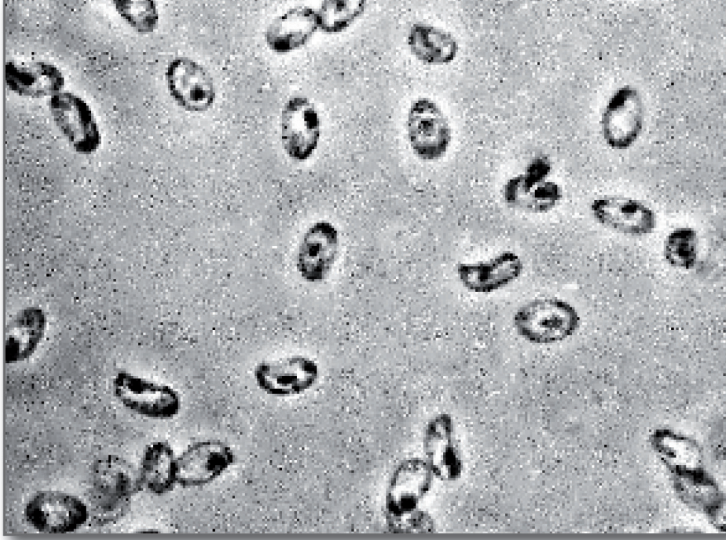
echinulata

L'AMILOIDIA

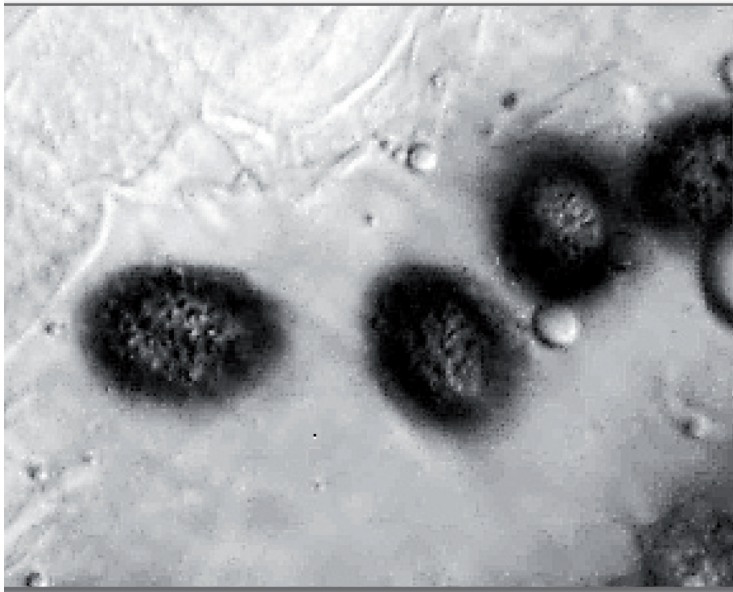
In micologia sono molto importanti le reazioni chimiche che permettono di determinare l'appartenenza ad una specie, di mettere in evidenza alcuni caratteri, di escludere o di accertare se il fungo/campione sia proprio quello che crediamo o se al contrario sia uno simile.

A questo punto è doveroso un cenno al reagente di Melzer. L'amiloidia è una particolare reazione chimica che si ottiene con il reattivo di Melzer dal momento che riguarda in particolar modo le spore dei funghi. Il Melzer è un reattivo di color bruno

che può colorare o non colorare la spora o parte di essa; non solo: anche il colore che assume la spora è determinante. Ad es. l'*Amanita phalloides*, fungo velenoso mortale per eccellenza, ha spore amiloidi mentre l'*Amanita vaginata* presenta spore non amiloidi.



Lepista Glaucocana



Cortinarius Hercynicus

CAPITOLO 8

DIATOME E MERAVIGLIE AL MICROSCOPIO

Cosa sono le diatomee? Probabilmente questa è la prima volta che sentite questa parola ma, scavando nel passato di scolaro, ciascuno di noi si ricorderà, forse, di aver sentito questo termine durante l'ora di biologia.



Gomphonema

Eppure le diatomee ci circondano, si può affermare che ovunque vi sia acqua, salata o dolce che sia, questi organismi sono presenti e contribuiscono in buona parte al fabbisogno di ossigeno del nostro pianeta.

Detto molto semplicemente le diatomee sono alghe, piante contenenti clorofilla, che vivono in acqua e sono di forma variabile.

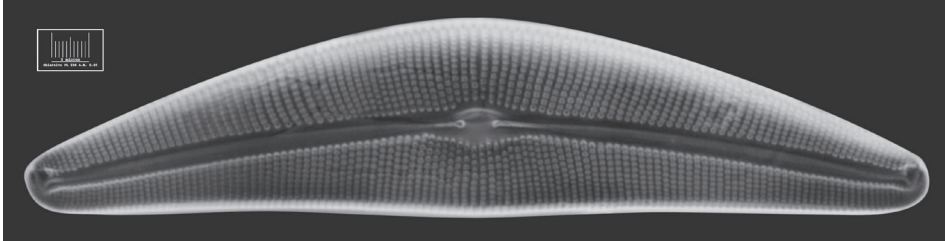
Sono **organismi unicellulari** appartenenti al regno vegetale, che a differenza delle altre alghe hanno il protoplasma cellulare e i suoi costituenti (la cellula così come la conosciamo dai libri di scuola) racchiusi in un guscio trasparente simile al vetro, di composizione silicea.

Oltre a questa peculiarità, le diatomee, in particolare le pennali, sono in grado di muoversi liberamente e questo le rende ancora più curiose durante l'osservazione in vivo al microscopio.

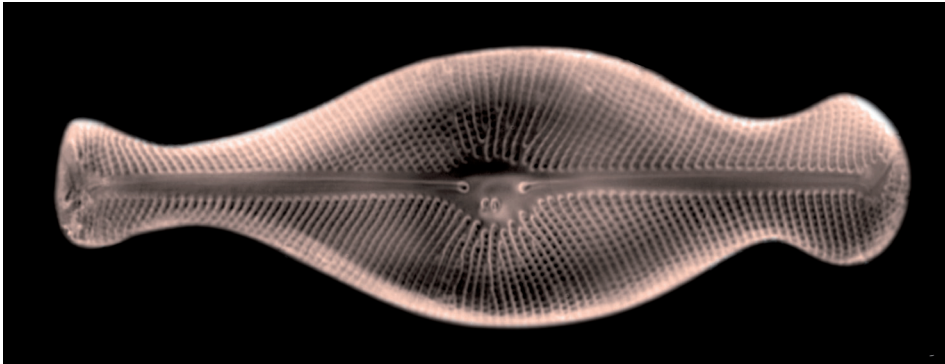
La cosa che le rende interessantissime all'os-

servazione al microscopio biologico è però la forma del **guscio trasparente** (frustulo) in quanto è proprio grazie ad esso che si è in grado di classificarle.

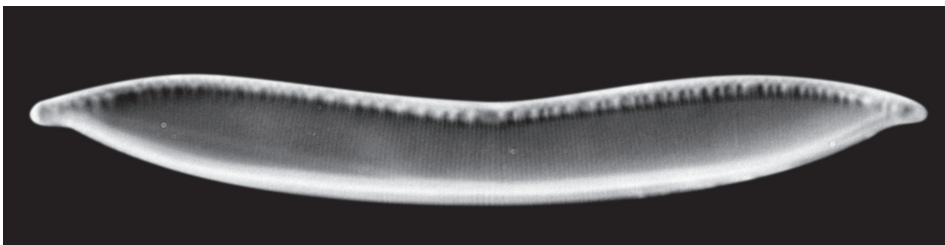
Alcuni magnifici frustuli di diatomee osservati al microscopio



Cymbella cistula



Didymosphenia geminata



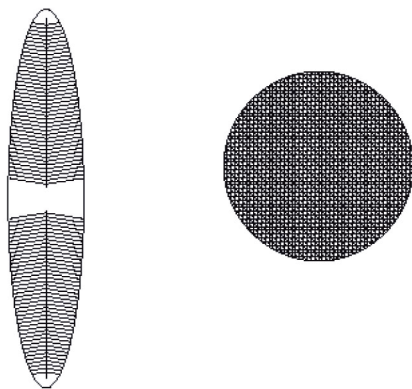
Hantzschia amphioxys

La classificazione delle diatomee non è cosa semplice visto che ne esistono oltre 6000 specie diverse, fortunatamente divise in sottofamiglie di più facile individuazione.

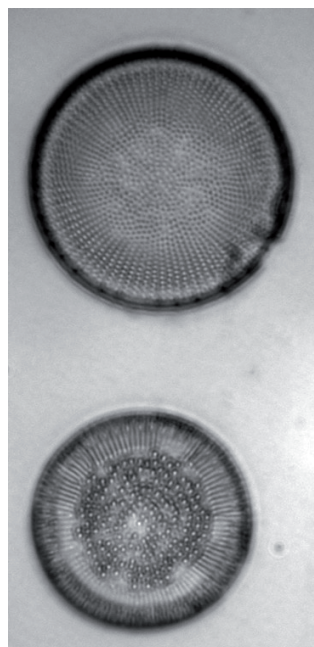
Le diatomee si dividono in due grandi ordini a seconda della loro forma: le *Pennales*, e le *Centrales*.

Come potete intuire dal nome, le diatomee *Pennales* sono molto simili ad una penna di uccello e sono quindi caratterizzate da una linea centrale, o meglio da una fessura, e da tante striature che si irradiano da essa.

Le *Centrales*, invece, sono molto simili a cerchietti, stelle o altre figure geometriche iscritte in un immaginario cerchio. Come abbiamo detto nelle pagine precedenti, le diatomee si trovano ovunque vi sia acqua e quindi umidità costante; possono, infatti, sia flottare o galleggiare sul pelo dell'acqua, che trovarsi, molto più frequentemente, sul fondo di fontane, laghi, fiumi o zone paludose ed in terreni particolarmente umidi.



Il cerchio rappresenta la diatomea Centrales, mentre la forma allungata la diatomea Pennales.



Due splendidi esemplari di diatomee Centrales, notare la differenza con quelle Pennales di pagina a lato.

Generalmente le diatomee *Centrales* sono flottanti e meno numerose in natura rispetto alle *Pennales* che sono molto più abbondanti e si possono facilmente trovare tra i sedimenti presenti sui fondali di aree acquatiche.

È opportuno ricordare che esistono giacimenti di diatomee fossili. Le diatomee fossili si presentano sotto forma di polvere bianca chiamata farina fossile.

La farina fossile, grazie alla sua particolare granulometria, viene opportunamente lavata e trattata per essere utilizzata come materia prima per la fabbricazione di filtri per piscine o per il filtraggio del vino nelle fasi di travaso.

PRELEVARE LE DIATOMEE

Ora che sappiamo dove e come vivono le diatomee, incominciamo ad organizzare una “battuta di caccia” per poi poterle osservare al microscopio.

Il luogo più facile per fare un bel prelievo di queste alghe è una fontana. Infatti, tutte le incrostazioni rossicce che si trovano ai bordi della fontana, con molta probabilità, saranno costituite da diatomee. Con un po' di organizzazione ed ingegno possiamo fare anche un prelievo sul fondo della fontana stessa, facendo attenzione, ovviamente, a non farci il bagno.

Allo scopo, risulta molto utile munirsi di qualche semplice attrezzo; potranno risultare particolarmente preziosi, ad esempio, alcuni strumenti facilmente reperibili come: una siringa, uno spazzolino da denti in disuso ed un recipiente per il trasporto (un barattolino possibilmente in vetro, con tappo).

Con lo spazzolino solleveremo l'incrostazione e con la siringa provvederemo poi ad aspirarne la sospensione svuotandone poi il contenuto nel recipiente.

Ripeteremo più volte questa operazione finché il recipiente non sarà pieno di acqua e diatomee, che ad occhio nudo appaiono come una “fanghiglia rosso bruna”.

Effettuato il prelievo avremo qualche ora di tempo per rincasare ed analizzare subito il frutto della nostra escursione alla fontana. La prima cosa da fare arrivati a casa è togliere il coperchio al barattolo contenente il prelievo e lasciare decantare la sospensione per 1 o 2 ore. Quando sul fondo del nostro recipiente si sarà formato un sedimento bruno-rossastro e l'acqua sarà sufficientemente limpida, potremo dare il via alle osservazioni.

Procuriamoci una buona **lente di ingrandimento** e cominciamo a perlustrare attraverso il vetro del barattolo il fondo, i bordi da

cima a fondo ed il pelo dell'acqua.

Con questo sistema non siamo in grado di scorgere alcuna diatomea ma possiamo sicuramente renderci conto delle numerose specie viventi che popolano il nostro prelievo.

Forme larvali, grossi parameci, rotiferi, idre sono visibili già con una lente di ingrandimento di buona qualità e questo tipo di osservazione ci fornirà notizie utili su come questi organismi si muovono in uno spazio relativamente molto grande. Annotiamo questa osservazione descrivendo nei minimi dettagli ciò che accade nel barattolo. Ci accorgeremo di come un intero mondo sia racchiuso in una così piccola quantità d'acqua.

LE DIATOMEE AL MICROSCOPIO

Iniziamo ora l'osservazione al microscopio di queste straordinarie alghe unicellulari.

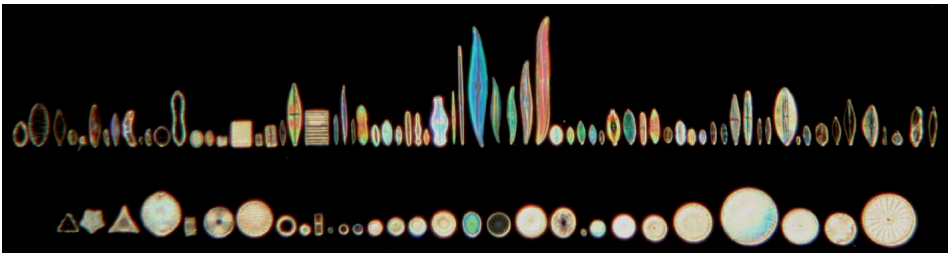
Aiutandoci con un contagocce, facciamo un prelievo d'acqua e fango dal fondo del nostro barattolo, contenente il campione che abbiamo deciso di osservare.

Poniamo una goccia abbondante di questa fanghiglia al centro di un vetrino portaoggetti e copriamo il tutto con un vetrino coprioggetto.

Se la quantità d'acqua è troppo scarsa aggiungiamone mezza goccia a lato del vetrino coprioggetto; se invece è troppo abbondante, basta avvicinare un lembo di carta da cucina sempre a lato dello stesso per toglierne l'eccesso.

Mettiamo ora il nostro vetrino sul tavolino del microscopio e iniziamo l'osservazione con l'obbiettivo 4.

Compiere un'indagine a largo campo del vetrino è fondamentale... e non mancheranno le sorprese!



*100 diatomee; preparazione di Klaus Kemp
Campo scuro - Obiettivo PL 4 proiezione di oculare 10X
Foto Canon Eos 300D*

Anellidi, parameci, copepodi, rotiferi, larve, idre, amebe e altre forme viventi cominceranno a svelare la loro morfologia e continueranno la loro vita, ignare di trovarsi fra due vetrini da microscopio. Anche le forme vegetali cominceranno a rivelare la loro forma. Spirogire e *Closterium* già con un obiettivo 4 saranno perfettamente visibili e cominceremo a scorgere anche le diatomee. Le diatomee ci appariranno come delle barchette che si muovono avanti ed indietro, cambiando repentinamente direzione senza alcuno schema.

Passiamo ora ad osservare il nostro prelievo con l'obiettivo 10 e successivamente con il 25.

Man mano che l'ingrandimento aumenta, anche la quantità dei dettagli osservabili cresce e ci accorgeremo dell'esistenza di altre forme di vita prima del tutto invisibili.

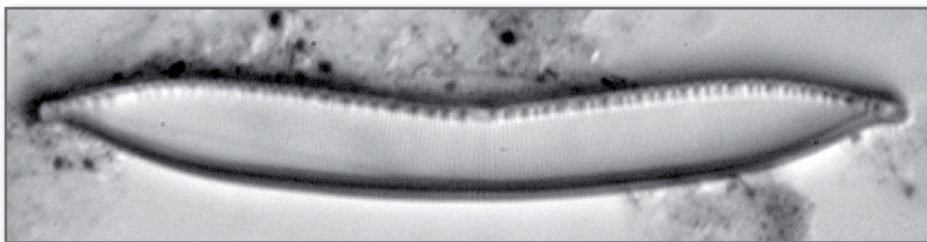
Durante le osservazioni al microscopio è facile perdersi in una goccia d'acqua; quando si è attratti da strane forme viventi e dal loro aspetto curioso, i minuti passano velocemente; così il sottile strato d'acqua intrappolato fra i due vetrini, evaporando, lascia spazio all'aria e il peso del sottilissimo coprioggetti comincia a schiacciare alcuni organismi. Per far in modo che questo non accada, teniamo sempre a portata di mano il barattolo del prelievo da analizzare ed eventualmente aggiungiamo, con la tecnica sopra descritta, dell'acqua per compensare quella evaporata e continuare con entusiasmo la nostra piccola avventura nel microcosmo.

ALCUNE CARATTERISTICHE DELLE DIATOMEE

Torniamo ora alle diatomee e soffermiamoci ad osservarle nel loro aspetto. Possiamo notarne due diverse caratteristiche:

- 1) Il colore che va dal verde al bruno dato dai cloroplasti i quali attuano il processo fotosintetico e fanno parte del protoplasma cellulare che assicura tutte le funzioni vitali della cellula e il movimento della stessa
- 2) Il guscio siliceo che lo contiene che appare invece trasparente.

Notiamo anche la differenza di forma fra le diverse specie, alcune sono fatte a barchetta, altre a guscio di noce, altre ancora sono immobili e sembrano ruote d'un carro. Non è detto, però, che ciò accada sempre; a volte si ha la "sfortuna" di trovare un'unica specie nel prelievo da noi fatto e questo ci impedisce di renderci conto della biodiversità che ho descritto sopra, anche se non rende meno interessante questo viaggio nell'incredibilmente piccolo che tanto ci attrae.



Hantzschia amphioxys
Opittivo PL 60 proiezione di oculare 10X
Foto Canon Eos 300 D

OSSERVARE IL FRUSTULO DELLE DIATOMEE

Affronteremo il problema del lavaggio delle diatomee al fine di poter osservare il frustulo in tutta la sua bellezza.

Tutte le procedure di lavaggio del frustulo (ne esistono molteplici) impiegano prodotti chimici pericolosi e pertanto è bene proteggersi le mani ed il viso con guanti ed occhiali ed operare in ambiente ben ventilato.

ATTENZIONE!

Tengo a precisare che anche la procedura descritta non è priva di rischi e deve essere eseguita solo da persone adulte con nozioni base di chimica. La regola fondamentale per chi si accinge a fare osservazioni al microscopio è quella di non sottovalutare mai i pericoli derivanti dall'uso di sostanze e reagenti necessari al trattamento dei campioni ai fini osservativi. Leggere sempre l'etichetta con le indicazioni riportate sulle confezioni dei reagenti e prendere le misure di sicurezza necessarie ci permette di evitare incidenti pericolosi per la nostra salute e danni alle cose che ci circondano. E' inoltre necessario tenere l'attrezzatura ben ordinata e annotare tutta la procedura passo passo su un taccuino al fine di evitare pericolose omissioni di passaggi nella procedura.

Descriverò ora solo la procedura più semplice e meno pericolosa per ottenere dei buoni risultati con le diatomee di acqua dolce, utilizzando prodotti chimici facilmente reperibili sul mercato.

L'ATTREZZATURA

L'attrezzatura necessaria è composta da: **guanti di protezione** (quelli per lavare i piatti vanno benissimo), **ipoclorito di sodio** (candeggina non profumata), **acido cloridrico** (acido muriatico), **acqua distillata**, due **recipienti in vetro** di circa 4 – 5 cm di diametro per 15 di altezza, un **colino** in plastica con fori da circa mezzo millimetro ed una **siringa** da 10 ml.

COME SI PROCEDE

Per prima cosa mettiamo il prelievo nel barattolino di vetro; trascorse circa 12 ore con la siringa **aspiriamo quasi tutta l'acqua** dal recipiente facendo molta attenzione a non aspirare i sedimenti che si trovano nel fondo.

A questo punto ci trasferiamo in un ambiente ben areato, indossiamo i guanti ed aspiriamo dalla bottiglia dell'acido cloridrico circa 10 ml di prodotto che, molto lentamente (goccia a goccia) metteremo nel recipiente.

Questa procedura serve per **eliminare i carbonati** che eventualmente si trovano nel sedimento. L'acido cloridrico reagisce con i carbonati, eventualmente presenti, in modo abbastanza violento con formazione di gas (CO_2) e schiuma; pertanto dobbiamo stare molto attenti nel dosare lentamente questo acido, pena la fuoriuscita del prelievo dal recipiente assieme al pericoloso acido.

La reazione dell'acido cloridrico continuerà per circa altre 12 ore e durante questo periodo è indispensabile che il barattolo si

trovi **all'esterno e SENZA COPERCHIO** in modo che il gas possa uscire liberamente.

Trascorse le prime 12 ore trasferiamo il tutto in un altro recipiente, filtrando il contenuto attraverso un colino in plastica. Ne attendiamo altre 24, aspiriamo con la siringa e gettiamo via quanto più acido possibile senza smuovere il sedimento.

ATTENZIONE! L'acido cloridrico rovina le cromature dei rubinetti e intacca l'acciaio dei lavelli della cucina.

Riempiamo il recipiente di acqua distillata e dopo ulteriori 24 ore togliamone e gettiamone il più possibile, sempre aiutandoci con una siringa, per poi riempire nuovamente il recipiente con acqua distillata.

Ripetiamo questa operazione per quattro volte.

Giunti al quarto lavaggio riempiamo il recipiente di ipoclorito di sodio. Questa fase della procedura costituisce il lavaggio vero e proprio; noteremo infatti che nel giro di poche ore il sedimento lentamente comincia a diventare più chiaro.

Attendiamo 48 ore, al massimo 72, pena il deterioramento anche delle diatomee, e poi procediamo con 4 risciacqui in acqua distillata con la stessa tecnica descritta per eliminare l'acido.

A questo punto le diatomee dovrebbero essere pulite, cioè prive del loro protoplasma cellulare e mostrare solo il frustulo siliceo.

Come avrete notato il procedimento è piuttosto lungo e noioso ma è assolutamente indispensabile rispettare i tempi e le procedure indicate facendo sempre molta attenzione a non eliminare il sedimento ricco di diatomee che ad ogni passaggio diventa sempre più "leggero" e facile da perdere involontariamente durante le fasi di risciacquo.

LA VERIFICA

Al fine di osservare se tutta la procedura di lavaggio è andata a buon fine, agitiemo leggermente il barattolo contenente le diatomee ed aspiriamo, da circa metà livello del liquido, una piccola goccia aiutandoci con una pipetta. Poniamo la goccia sul vetrino portaoggetti, copriamo con un coprioggetto e osserviamo il tutto al microscopio con un obiettivo 4 e poi 10 e 20.

Se abbiamo rispettato i tempi e non ci siamo fatti prendere dalla frenesia dovremmo riuscire ad osservare i frustuli delle diatomee in tutta la loro bellezza anche se spesso saranno mescolati a sabbia indesiderata con la quale dovremo imparare a convivere.

ATTENZIONE!

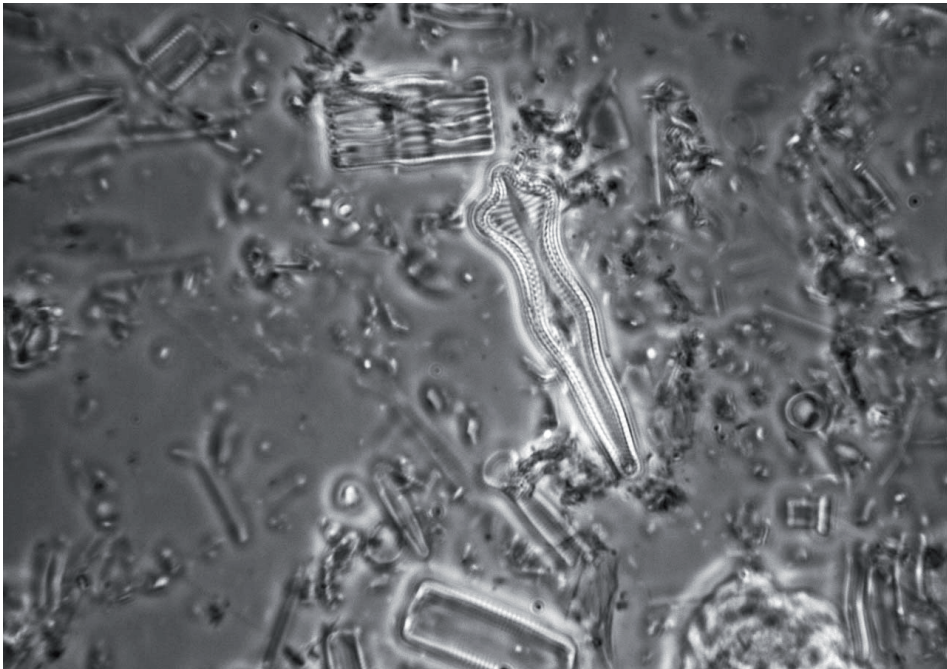
Non mescolare mai l'ipoclorito (candeggina) con l'acido cloridrico (o muriatico): la reazione è molto pericolosa e sviluppa gas tossici.

IL FRUSTULO EVANESCENTE DELLE DIATOMEES

Ci occuperemo ora dell'osservazione del frustulo di queste straordinarie alghe dopo il lavaggio per l'eliminazione del protoplasma cellulare. Saremo così appagati dalla visione di una minuscola architettura al limite delle capacità ottiche del nostro microscopio.

Anche in questa fase gli inconvenienti non mancano, ma grazie a particolari accorgimenti e/o a tecniche ottiche all'avanguardia riusciremo a carpire i più fini dettagli dei gusci silicei delle diatomee.

Se avete già compiuto qualche osservazione delle diatomee post lavaggio vi sarete subito accorti che appaiono all'oculare evanescenti e poco contrastate. Questo non ci deve far pensare di avere fallito con il lavaggio, perché tutto ciò è normalissimo ed è dovuto all'indice di rifrazione del particolare tipo di silice di cui sono composte, che è abbastanza vicino a quello dell'acqua.



Diatomee fotografate in contrasto di fase con IMAGINGSOURCE DMK41AF02.AS

INDICI DI RIFRAZIONE

Aria	1.000294
Acqua	1.33
Acetone	1.359
Etanolo	1.36
Etere etilico	1.352
Cloruro di sodio	1.53
Vetro comune	1.579
Plexiglas	1.48
Diamante	2.465
Glicerolo	1.474
Olio di legno cedro	1.515
Balsamo del Canada	1.530
Entellan (montante sintetico)	1.49/1.5

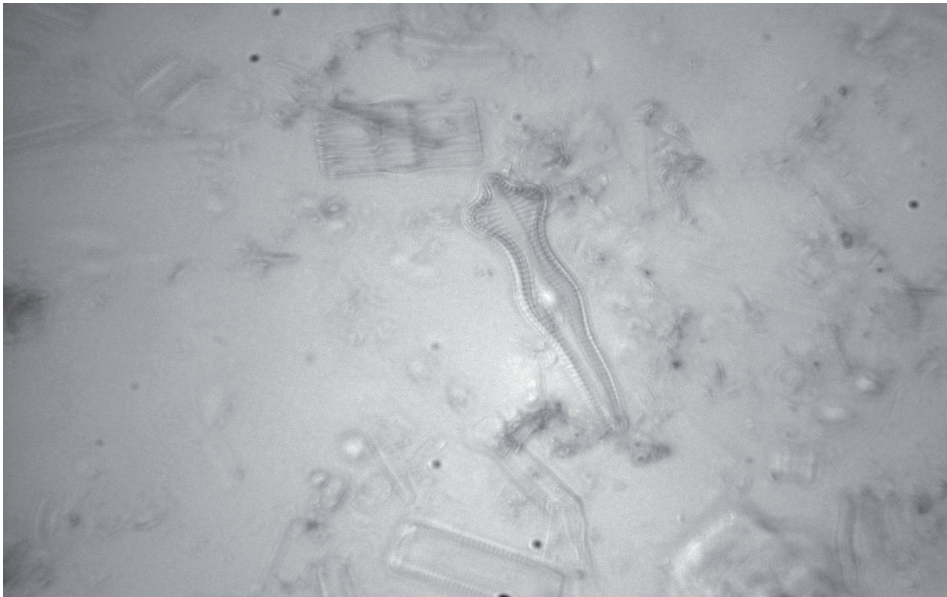
Teniamo sempre presente che, quando la luce passa da un mezzo trasparente ad un altro, cambia di velocità e direzione; tale cambiamento è in funzione dell'indice di rifrazione dei mezzi considerati e dell'angolo tra il raggio luminoso e la linea perpendicolare alla superficie di separazione dei mezzi attraversati dalla luce. Il rapporto tra la velocità di propagazione della luce nell'aria e la velocità di propagazione nel mezzo considerato è chiamato indice di rifrazione (n) del mezzo.

Per quanto riguarda i frustuli di diatomea che sono costituiti da silice con indice di rifrazione prossimo a quello del vetro ci rendiamo subito conto che dovremo utilizzare montanti ad alto indice di rifrazione per scostarci il più possibile da quello della diatomea.

QUATTRO SOLUZIONI POSSIBILI PER OSSERVARE AL MEGLIO I FRUSTULI DELLE DIATOMEE

1) L'OSSERVAZIONE IN ACQUA

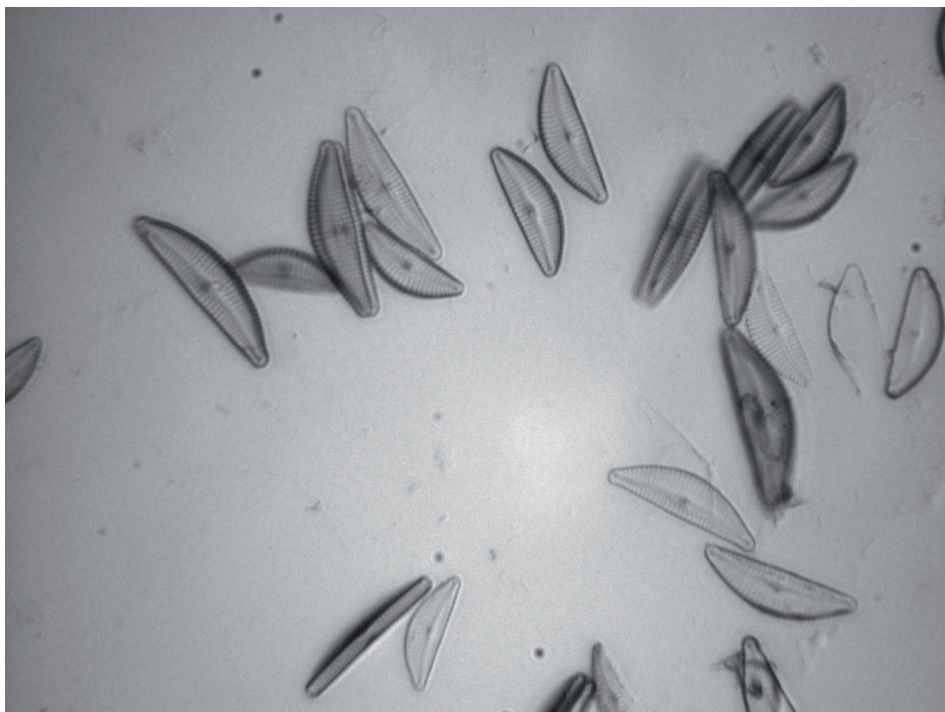
La prima soluzione è quella di osservare i frustuli nell'acqua. L'acqua ha un indice di rifrazione che, per quanto poco, si scosta da quello della diatomea e riusciremo pertanto a scorgere comunque una buona quantità di dettagli. Il principale vantaggio di questa soluzione è il costo zero e la facilità di preparazione del vetrino. Gli svantaggi invece sono la non conservabilità del vetrino, la difficoltà dell'osservazione con gli obiettivi ad immersione e lo scarso contrasto.



*Diatomee fotografate in acqua con IMAGINGSOURCE DMK41AF02.AS
(stesso soggetto di pag. 72)*

2) L'USO DI MONTANTI SPECIFICI

La seconda soluzione (è quella che consiglio vivamente a tutti quelli che desiderano dedicarsi a questo tipo di osservazione) è quella di dotarsi di montanti (colla per vetrini) ad alto indice di rifrazione. In commercio esistono montanti come il Naphrax e lo Zrax con indice di rifrazione prossimi o superiori a 1.7 che permettono di ottenere vetrini permanenti con un ottimo contrasto.



Diatomee montate in ZRAX fotografate con IMAGINGSOURCE DMK41AF02.AS

Questi montanti sono piuttosto costosi e difficilmente reperibili in Italia, ma i risultati che si ottengono sono eccezionali. Il montaggio dei frustuli con questa tecnica deve essere effettuato secondo questa procedura:

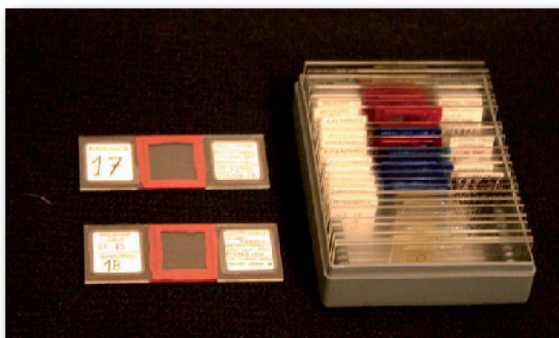
1. Porre una goccia di acqua e diatomee sul vetrino coprioggetto (a differenza di quello che si fa di solito) ed attendere che tutta l'acqua sia evaporata.
2. Mettere poi una goccia di montante sul vetrino portaoggetto; quindi appoggiarvi sopra il coprioggetto con le diatomee che dovranno andare a contatto con il montante stesso.
3. Riscaldare infine il vetrino a 100°C fino a che il montante non cominci a bollire (in questo modo le bolle d'aria eventualmente presenti spariranno) ed attendere che il vetrino si raffreddi.
4. Una volta terminata questa operazione, è consigliabile porre il vetrino sopra un calorifero per un paio di giorni affinché il solvente del montante evapori completamente. Anche in questo caso bisogna avere pazienza ed attendere il tempo necessario per l'essiccazione del montante, pena la distruzione del vetrino preparato ed il pericoloso imbrattamento di montante sulle ottiche che, con ogni probabilità, diventeranno inservibili a meno che non si provveda ad una rapida ed accurata pulizia.
5. Al termine di questa procedura, lutare il vetrino (contornare e incollare il bordo del coprioggetto) con smalto per unghie al fine di sigillarlo.

È importante ricordare che tutti i montanti usano come solvente il TOLUENE o lo XILENE che sono idrocarburi aromatici PERICOLOSI per la nostra salute. È pertanto necessario utilizzare tutte le precauzioni necessarie.

In conclusione, per quanto laboriosa, questa tecnica risulta essere la migliore e ci permette di collezionare vetrini permanenti di facile osservazione e ottima fattura.

Per una semplice ma pur sempre utile catalogazione è importante, infine, etichettare il vetrino con i seguenti dati:

- luogo e data di prelievo;
- tipo di lavaggio;
- data di inclusione;
- montante utilizzato.



3) I DISPOSITIVI OTTICI PARTICOLARI

La terza soluzione è quella che si propone di utilizzare montanti come il balsamo del canadà, sopperendo al basso contrasto con dispositivi ottici.

I dispositivi ottici utilizzati sono abbastanza complessi, (il più usato è il **contrasto di fase**) che sfrutta la sfasatura d'onda fra l'oggetto e il montante per accentuare il contrasto nell'immagine.

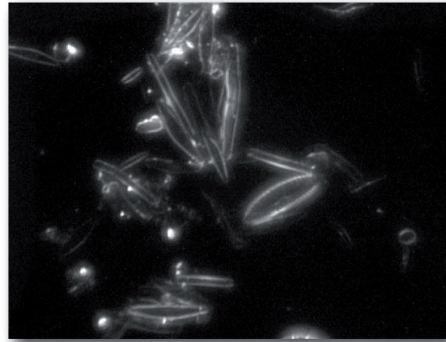
Purtroppo un discreto kit (obiettivi di fase e relativo condensatore) per contrasto di fase è molto costoso e poco adatto all'osservazione delle diatomee, in quanto crea aloni nei contorni e all'interno del frustulo che ne deteriorano la visione.

Il contrasto di fase risulta invece di particolare utilità per l'osservazione di oggetti poco contrastati quali batteri, protozoi e in tutti quei casi in cui l'osservazione stessa del preparato non per-

metta colorazioni, pena l'uccisione del campione da analizzare. Un altro dispositivo ottico per l'accentuazione del contrasto è il DIC (contrasto interferenziale differenziale) che permette di ottenere immagini migliori rispetto al contrasto di fase perché non genera il fastidioso alone attorno agli oggetti. Anche il sistema DIC è delicato e costosissimo e solo pochi micro-amatori se lo possono permettere.

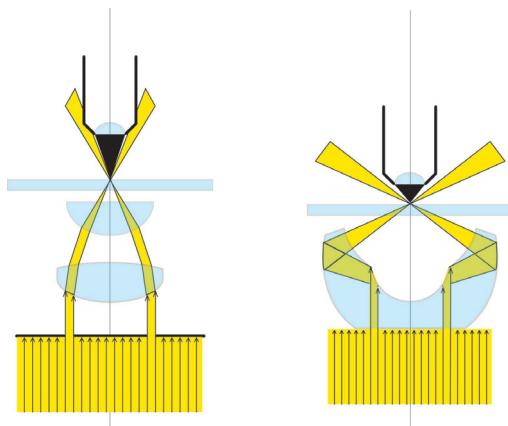
4) IL CAMPO SCURO

Quarta soluzione è l'osservazione delle diatomee in campo scuro. Il campo scuro si ottiene centrando dei dischetti di cartone nero, di diverso diametro a seconda dell'obiettivo sotto il condensatore in modo da far passare solo lateralmente la luce oppure dotando il microscopio di un apposito condensatore per campo scuro.



Diatomee montate in Entellan osservate in campo scuro

La tecnica del campo scuro regala immagini di altissimo valore estetico ma viene poco utilizzata in campo scientifico.



Condensatore con disco di cartone

Cardioide

Schema ottico di due condensatori per campo scuro. Queste due soluzioni si adattano ad obiettivi a secco con A.N. inferiore a circa 0,7. Nel caso si voglia utilizzare il campo scuro con obiettivi ad apertura numerica superiore a 0,7 è necessario orientarsi verso un particolare tipo di condensatore ad immersione specifico per campo scuro.

Il condensatore ad immersione per campo scuro può essere utilizzato anche con obiettivi a secco di apertura numerica inferiore a 0,7.

La procedura di immersione in olio del condensatore richiede una certa attenzione in quanto è facile imbrattare stativo e tavolino del microscopio di olio.

ATTENZIONE! Dopo aver utilizzato l'olio per immersione è necessario eseguire una scrupolosa pulizia delle ottiche secondo le procedura indicata nel manuale d'uso del microscopio.

RICONOSCERE LE DIATOMEE

Come è stato già spiegato in precedenza, le diatomee si dividono in due grandi ordini: le pennali e le centriche.

Ogni ordine è poi diviso per famiglia a seconda della forma del frustulo ed ogni famiglia è poi divisa per genere, specie e varietà.

Non è difficile classificare le diatomee per genere, mentre molto più complesso è attribuire ad esse la specie e la varietà.

Ogni dettaglio è importantissimo e non deve essere trascurato nell'osservazione.

Purtroppo, per questo tipo di classificazione i testi sono molto costosi e non ci sono traduzioni in lingua italiana, anche se fortunatamente c'è una discreta bibliografia in lingua inglese.

Per chi volesse dilettersi con la classificazione delle diatomee, consiglio vivamente di ordinare a poche sterline tramite internet il seguente libro. "A guide to the morphology of the diatom frustule" di H. G. Barber e E.Y. Haworth, il quale con semplici disegni introduce il lettore nel coinvolgente mondo di queste splendide microscopiche alghe.

Surirella Spiralis, LA REGINA DELLE DIATOMEE

La peculiarità di questa diatomea è di presentare una torsione nel frustulo tale da farla somigliare ad un papillon; viene inoltre descritta come estremamente rara e reperibile solo in pochi esemplari in acque particolarmente pure, in prossimità di torbierre acide ad altitudini elevate (intorno ai 2000 mt).

Trovare questa diatomea in qualche ruscello, nei boschi a me più noti che frequento regolarmente durante le mie escursioni, è diventato un obiettivo, per dimostrare a tutti che anche in Italia esistono ancora territori incontaminati che possono riservare magnifiche sorprese a chi è in grado di apprezzarle.

Le ricerche sono iniziate, quindi, in Trentino Alto Adige nel periodo primaverile e sono proseguite facendo prelievi ovunque ritenevo ci fosse la possibilità di trovare questo esemplare di diatomea; in particolare ho concentrato le ricerche nei ruscelli, ben sapendo che la terra acida dei boschi poteva rappresentare un fattore determinante nel rinvenimento della *S. spiralis*.



Surirella spiralis

La ricerca è stata interessantissima, infatti nei vari prelievi ho sempre trovato qualche microrganismo curioso, qualche genere di diatomea che non avevo mai osservato, o forme larvali mai viste. Purtroppo però della stupenda *S. spiralis* nessuna traccia, e questo fino alla fine dell'estate quando finalmente in un prelievo ho osservato un unico frustulo dell'alga che stavo cercando.

Successivamente a questo ritrovamento, non mi sono perso d'animo; ritornando nello stesso bosco dove avevo fatto il primo fortunato prelievo, ho sistematicamente raccolto altri campioni sia a monte che nei vari ruscelli immissari di quello principale.

È così che, grazie alla mia cocciutaggine e metodologia utilizzata, ho rinvenuto in una goccia d'acqua decine di *S. spiralis*. Non potevo credere ai miei occhi, per ogni vetrino che facevo ce n'erano 4 o 5, a testimonianza che avevo trovato la “nursery nostrana” di una delle diatomee più rare.

CAPITOLO 9

UN MICROMANIPOLATORE “HOME MADE”

Dopo aver visto cosa sono le diatomee, come osservarle e come creare vetrini permanenti con i loro frustuli, spiegheremo come si possono ottenere vetrini preparati con diatomee allineate e disposte con un ordine tale da formare figure geometriche.

Inizio subito col dire che non vi sono trucchi o fotoritocchi nelle immagini sotto riportate; si tratta di un allineamento di frustuli fatto manualmente al microscopio, con l'ausilio di uno strumento chiamato micromanipolatore.

L'idea di realizzare tali vetrini mi è venuta osservando le bellissime opere di Klaus Kemp, che da anni produce con estrema perizia vetrini scientifici ed artistici di diatomee ed altri microscopici oggetti. Dopo una breve ricerca sul web mi sono reso conto che Kemp è una delle poche persone al mondo a produrre vetrini di questo genere e che per tentare di imitare le sue opere era necessario disporre di un micromanipolatore.

Il costo di un micromanipolatore base è di oltre 600 euro e pertanto, visto il prezzo, ho inizialmente rinunciato all'impresa, dedicandomi comunque alla realizzazione di vetrini contenenti una singola diatomea, perfettamente pulita.



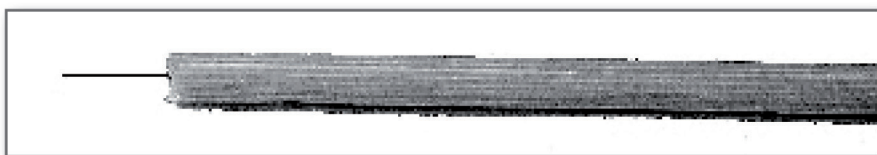
11 diatomee Cymbella montata a fiore.

Dimensione dell'intera composizione 0,3x0,73 mm.

Montaggio in ZRAX

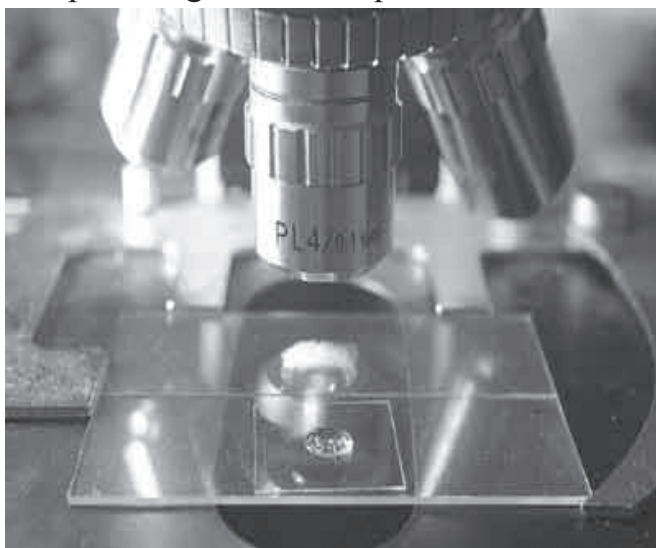
Anche questa operazione però non è semplice, e sebbene sia sufficiente avere una mano estremamente ferma, è anche importante costruirsi un piccolo attrezzo chiamato: punta di micromanipolazione.

Nelle mie ricerche, studiando l'argomento, ho scoperto che molti microscopisti utilizzano come punta una ciglia attaccata ad uno stuzzicadenti. Ho subito realizzato tale rudimentale strumento e mi sono messo al microscopio con un obiettivo 4 ed un oculare da 10x per provarlo.



Ciglia attaccata allo stuzzicadenti

Per realizzare una micromanipolazione dobbiamo porre una goccia di prelievo, perfettamente lavato e pulito, su di un vetrino portaoggetti ed attendere la totale evaporazione dell'acqua. Bisogna, quindi, predisporre un secondo vetrino sul quale appoggiare un vetrino coprioggetto ed al cui centro mettere poi una piccola goccia di acqua demineralizzata.



A questo punto, si possono sistemare i due vetrini sul tavolino traslatore del microscopio; con l'ausilio della punta di micromanipolazione cercheremo ora di prendere una diatomea del primo vetrino e di collo-

carla sulla goccia d'acqua posta sul coprioggetto.

Tale goccia staccherà immediatamente dalla punta la diatomea che, una volta evaporata l'acqua, si troverà attaccata al coprioggetto. Si procede poi con la normale procedura di montaggio.

Come avrete intuito, questa procedura richiede moltissima pazienza e mano ferma. Il mio consiglio è quello di impraticarsi con diatomee piuttosto grandi e di non demordere dopo i primi insuccessi. Difficoltà nello staccare le diatomee dal vetrino con il prelievo, rottura del loro frustulo, perdita dell'oggetto dell'osservazione durante il trasporto dall'uno all'altro vetrino, sono solamente alcuni normali inconvenienti che si verificano le prime volte, ma che con la pratica andranno sicuramente diminuendo.

I vetrini con una singola diatomea non sono solo un vezzo da microscopista. La tecnica della micromanipolazione permette di fare dei montaggi in cui le diatomee o gli altri oggetti di osservazione risultano liberi da sabbia ed impurità varie regalando all'osservatore il meglio di sé.

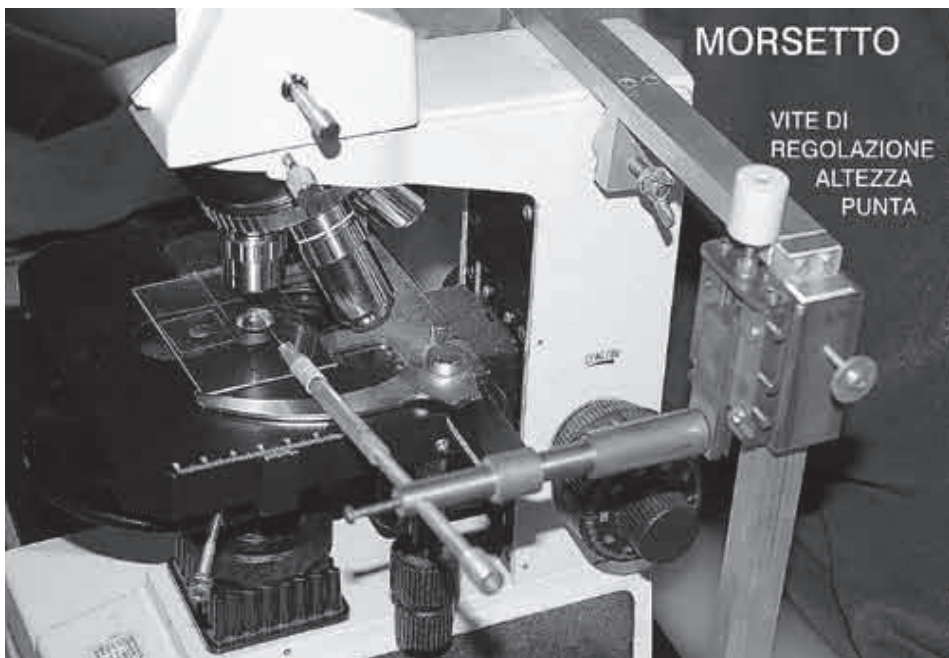
La tecnica sopra descritta, senza l'uso di uno strumento appropriato, come si può ben immaginare, è fortemente limitata.

Risulta infatti evidente come sia particolarmente difficile poter fare montaggi di diatomee "piccole" e così ho deciso di "auto-costruire" un micromanipolatore.

COSTRUZIONE DI UN SEMPLICE MICROMANIPOLATORE A SINGOLO ASSE DI SPOSTAMENTO Z

Spostare un oggetto da un piano ad un altro comporta tre direzioni di movimento nello spazio: due sugli assi X ed Y del piano e uno sull'asse Z, in altezza, per poterlo sollevare. Costruire uno strumento con tre assi di spostamento, in cui la precisione dei movimenti deve essere di qualche centesimo di millimetro, è un'impresa ardua per un amatore; se andiamo a sfruttare il movimento del tavolino traslatore ci accorgiamo però che è sufficiente costruire uno strumento che ci permetta di compiere il solo spostamento sull'asse Z.

Lo strumento è dunque composto da uno stativo che dovrà essere fissato al microscopio, da un sistema a vite per consentire lo spostamento in altezza della punta e dalla punta di micromanipolazione.



Per quanto riguarda la costruzione dello stativo possono essere utilizzate diverse soluzioni tecniche a seconda della marca e del modello di microscopio. La soluzione da me adottata prevede un sistema a morsetto, che va applicato al corpo principale del microscopio, e da un sistema a vite, per lo spostamento in altezza della punta.

Benché il micromanipolatore per così dire a “ciglia” ci sia stato molto utile, soprattutto nel farci capire quanta pazienza e precisione ci vogliano per diventare pseudo seguaci di Klaus Kemp, la punta risulterebbe ora inadeguata per il nuovo micromanipolatore meccanico; questa volta deve essere molto più precisa, rigida e flessibile allo stesso tempo.

Dopo aver tentato diversi espedienti, sono riuscito ad ottenere una punta di solo un millesimo di millimetro allungando con una fiamma una bacchetta di vetro e ricavando così, dal filo che ne deriva, la vera e propria punta, che poi ho fissato con smalto per unghie sul foro di un ago di siringa. Questa operazione, che potrebbe sembrare complicata, è in realtà semplicissima e richiede solo un minimo di attenzione, per non bruciarsi, e un po' di pazienza nel montare la punta.



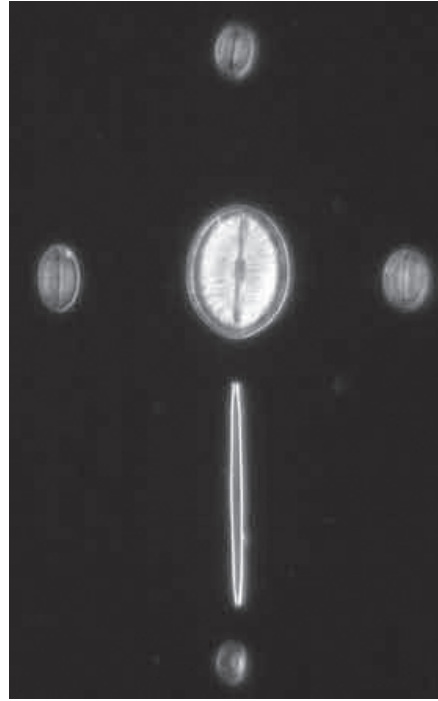
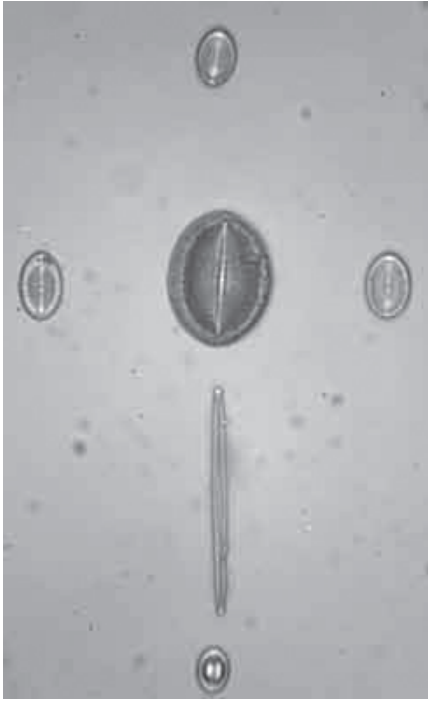
Una volta terminato l'assemblaggio del nuovo strumento, è stato sufficiente centrare e mettere a fuoco la punta lavorando sempre al microscopio con l'obiettivo 4.

TECNICA DI MICROMANIPOLAZIONE

Disporre le diatomee secondo un ordine ben preciso è il frutto della coordinazione tra i movimenti del tavolino traslatore e quello in altezza della punta. I concetti base sono identici a quelli descritti sopra per il micromanipolatore a "ciglia", con la differenza che al posto della goccia d'acqua posta sul vetrino coprioggetto si va ad utilizzare un coprioggetto pretrattato con l'apposita gelatina di fissaggio.

Collocata la diatomea come si desidera, la si fissa alitando delicatamente sul vetrino. Il vapore acqueo del fiato andrà a sciogliere, per un breve istante, la gelatina, fissando così la diatomea in modo stabile e sicuro. Si procederà poi allo stesso modo con la seconda, con la terza e così via. Terminata questa serie di operazioni si può procedere ad incollarle definitivamente con il montante desiderato.

La preparazione di vetrini con diatomee micromanipolate e disposte in forme ben precise richiede, come si può facilmente intuire, moltissima pazienza ed ore di lavoro. Ci vogliono settimane di pratica, prima di ottenere i primi risultati accettabili, ma la soddisfazione di essere riusciti a realizzare "grandi", o forse è meglio dire "piccole" vere e proprie opere d'arte vi ricompenserà delle ore passate al microscopio.



*5 diatomee Cocconeis + 1 Synedra montate a forma di croce.
Dimensione dell'intera composizione 0,22x0,37 mm.
Montaggio in ZRAX -Foto in campo chiaro e in campo scuro*

LA GELATINA DI FISSAGGIO E COME PRETRATTARE IL VETRINO COPRIOGGETTO

La gelatina di fissaggio può essere facilmente prodotta in casa sciogliendo 1g. di gelatina alimentare (colla di pesce) in 10g. di aceto di vino bianco.

Depositare quindi una piccola goccia di detta gelatina e distribuirla sul vetrino coprioggetto. Ad essiccazione avvenuta il vetrino è pronto per l'uso.

CAPITOLO 10

IL CAMPO SCURO UN MODO PER VEDERCI CHIARO

Il campo scuro è un sistema d'osservazione impiegato quotidianamente da tutti per risolvere alcuni problemi di visione, in quanto migliora il contrasto delle immagini.

ESEMPI PRATICI

Poniamo ad esempio di dover cercare un ago che accidentalmente ci è caduto sul pavimento. Se il pavimento è nero, l'operazione di localizzazione dell'ago sarà semplicissima mentre, se il pavimento è di colore bianco-grigio, l'operazione potrebbe richiedere anche parecchi minuti.

Altro esempio, (poco simpatico, soprattutto a chi è addetto alle pulizie in casa), è l'osservazione della superficie di un mobile illuminato lateralmente dalla luce solare. In questa particolare condizione di luce possiamo verificare che, per quanto pulita sia la superficie, su di essa sono comunque sempre presenti granuli di polvere che, ad una attenta osservazione, si moltiplicano a vista d'occhio. Fortunatamente, è sufficiente che cambi l'angolo di illuminazione e il mobile ci apparirà perfettamente pulito.

Un terzo ed ultimo esempio, (in realtà ce ne sarebbero molti altri), è costituito dall'osservazione delle ragnatele. Ogni ragnatela, costituita da fili sottilissimi e trasparenti, è praticamente invisibile ed evanescente: ma se poniamo dietro ad essa un cartoncino nero, ad una distanza di una decina di centimetri, essa ci apparirà nitidissima e chiara su fondo nero.

Condensatore catadiottrico specifico per campo scuro da applicare allo stereomicroscopio



Condensatore "cardioide" specifico per campo scuro a secco da applicare al microscopio biologico

Analizzando nel dettaglio questi tre esempi possiamo comprendere che il campo scuro è una semplice tecnica che permette di aumentare il contrasto mettendo in evidenza l'oggetto. Gli esempi riportati, pur riferendosi tutti alla medesima tecnica, ci illustrano principi di funzionamento differenti, che ora analizzeremo nel dettaglio ed in seguito applicheremo alla microscopia.

Il caso dell'ago da cucito su superficie nera non è un vero e proprio campo scuro ma rappresenta un semplice contrasto tra superficie ed oggetto.

Questo tipo di contrasto è impiegato nel microscopio stereoscopico; all'interno della confezione d'acquisto viene infatti fornito un disco nero che serve per mettere in risalto il campione da appoggiare su di esso offrendo un'immagine suggestiva dell'oggetto.



Prenderemo ora in esame gli esempi della polvere e della ragnatela, che risultano molto più interessanti in quanto rappresentano, macroscopicamente, il funzionamento del campo scuro.

Esistono due tipi di campo scuro, quello episcopico e quello diascopico.

IL CAMPO SCURO EPISCOPICO

Il campo scuro episcopico si ottiene attraverso particolari tipi di microscopio che provvedono all'illuminazione del preparato attraverso un complesso sistema di specchi e prismi; l'oggetto viene illuminato dall'alto attraverso un cono di luce cavo, e l'osservazione avviene su quella parte del preparato illuminata dalla punta del cono.

Se l'oggetto osservato è perfettamente liscio, si ottiene un'immagine completamente nera; se vi sono in esso irregolarità, la luce diffusa o riflessa da queste entrerà nel campo dell'obiettivo rendendole visibili.

Il campo scuro episcopico è particolarmente utile per le analisi delle superfici opache come pietre, metalli, insetti e tutti quegli oggetti che non permettono il passaggio della luce attraverso di essi.

Possiamo paragonare, con buona approssimazione, il campo scuro episcopico all'esempio della polvere. La polvere è appoggiata su una superficie opaca ed è l'illuminazione laterale, proveniente dal fianco, a renderla visibile.

La tecnica del campo scuro episcopico, come detto prima, richiede l'utilizzo di strumenti abbastanza complessi e pertanto mi limito esclusivamente a questo breve cenno.

IL CAMPO SCURO DIASCOPICO

Analizziamo ora il sistema del campo scuro diascopico, che risulta essere un sistema di contrasto molto interessante e di facile realizzazione con qualsiasi microscopio biologico meglio se dotato di illuminazione secondo Köhler.

Nell'esempio della ragnatela è nascosto il segreto di questo secondo tipo di campo scuro; gli invisibili fili vengono messi in evidenza dalla luce proveniente dall'ambiente dalla parte opposta all'osservatore e messi in risalto dal cartone nero posto dietro di essa.

Se effettuiamo l'esperimento di osservazione della ragnatela quando i raggi del sole passano attraverso lo spazio che c'è tra il cartoncino e la tela del ragno, ci accorgiamo che l'effetto di contrasto è ancora maggiore; cercheremo ora di riprodurre questo fenomeno con il nostro microscopio.

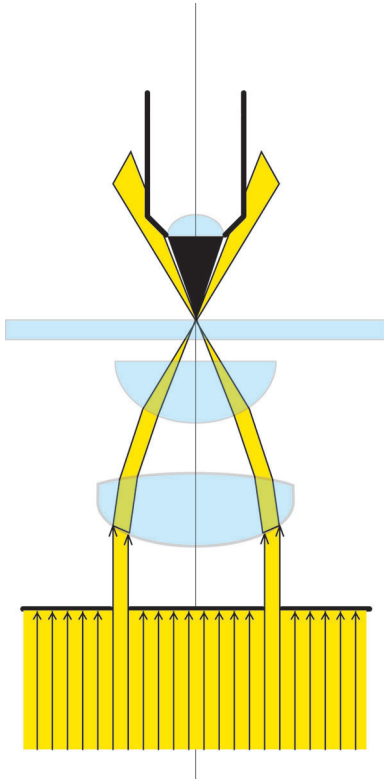
Riassumendo, dobbiamo posizionare la fonte di luce in modo che provenga dal basso ed illumini il preparato (trasparente o semitrasparente) attraverso un cono di luce cavo, con vertice nel punto che andiamo ad analizzare.

Per ottenere questo fenomeno è sufficiente porre centralmente un semplice disco di cartoncino nero, appena sotto il condensatore, e più precisamente sul porta filtri posto sotto di esso.

Le dimensioni del disco nero devono essere appropriate al tipo di obiettivo impiegato, tenendo presente che questo sistema è limitato ad obiettivi con apertura numerica piuttosto bassa e pertanto fruibile con obiettivi a basso ingrandimento generalmente non superiore al 20.

Un disco di acetato trasparente, posto sul portafiltri del condensatore, è un ottimo appoggio per il disco di cartoncino nero che collocheremo al centro del disco trasparente. Una volta trovato il giusto diametro del cartoncino nero, lo possiamo incollare sul

disco di acetato per avere a disposizione un campo scuro valido per l'obiettivo che abbiamo scelto.

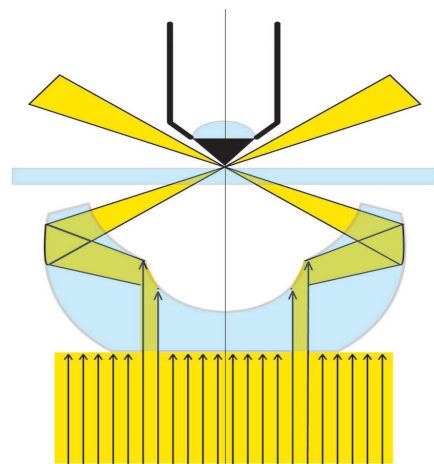


Condensatore con disco di cartone

Il costo dei condensatori dedicati al campo scuro è generalmente elevato, ed è per tale motivo che la maggior parte dei microscopisti amatori utilizza il sistema sopra descritto (dischi di cartone), nonostante le immagini ad alto ingrandimento offerte dai condensatori per campo scuro siano incredibilmente suggestive.

Nel fare queste operazioni è opportuno tener presente che l'apertura numerica del cono cavo di luce, proveniente da condensatore, deve essere sempre superiore all'apertura numerica dell'obiettivo, in modo che la luce che illumina il preparato non entri nell'obbiettivo.

A tal fine, per ottenere ingrandimenti con obiettivi superiori al 20 con buona risoluzione d'immagine, esistono condensatori appositamente creati per il campo scuro. Questi tipi di condensatori, talvolta, sono detti "cardioidi" e sono costituiti da un sistema di specchi che permette di ottenere aperture numeriche abbastanza elevate.



Schema di funzionamento di un condensatore "cardioide"

Diatomee, ciliati, rotiferi, polline, ali di farfalla e piccole forme larvali sono alcuni esempi di campioni che in campo scuro offrono immagini contrastate e ricche di particolari.

Piccola nota riguardo il campo scuro diascopico per microscopi stereoscopici.

Sono molto diffusi in commercio, a prezzi non troppo elevati, opportuni condensatori per campo scuro progettati per l'utilizzo con il microscopio stereoscopico.

Tali strumenti, molto simili ai condensatori "cardioidi", racchiudono al loro interno un sistema di specchi e il cono di luce cavo in uscita risulta più che sufficiente per essere sfruttato con i bassi ingrandimenti utilizzati dal microscopio stereoscopico. È opportuno comunque dare alcuni suggerimenti circa il loro utilizzo, che deve essere implementato dall'ausilio di un semplicissimo strumento chiamato volgarmente "la terza mano". (nella figura in basso al posto della "terza mano" è stato utilizzato uno spezzone di cavo telefonico per rialzare l'oggetto).

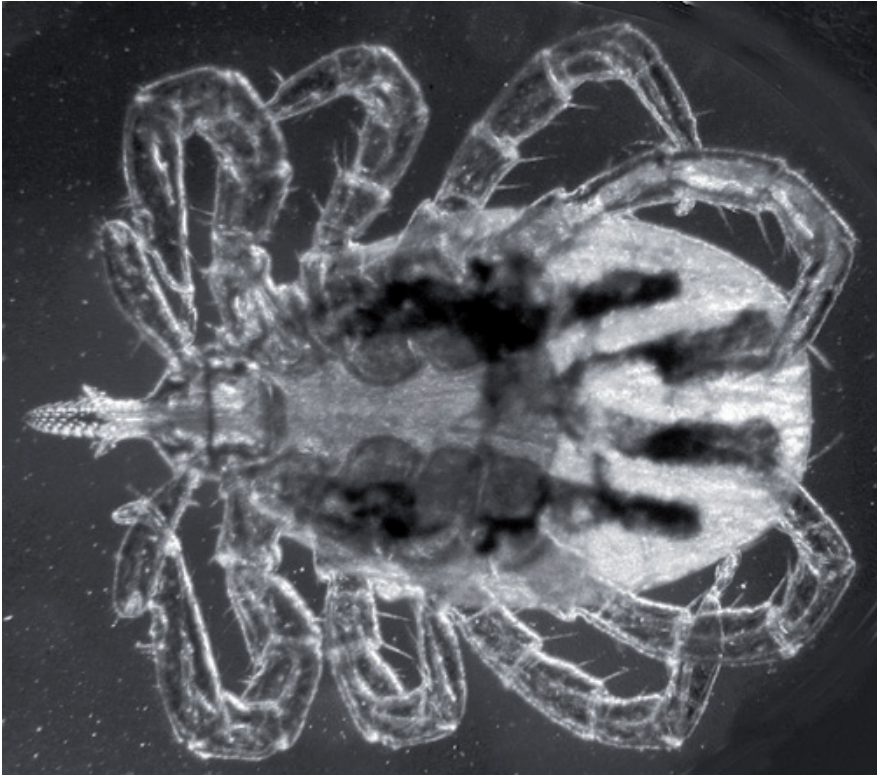


Per ottenere il massimo da questi tipi di condensatore è infatti necessario porre il campione da osservare centralmente ad essi e sollevarlo, rispetto al bordo superiore dello stesso, di circa 0,5 – 1,5 cm.

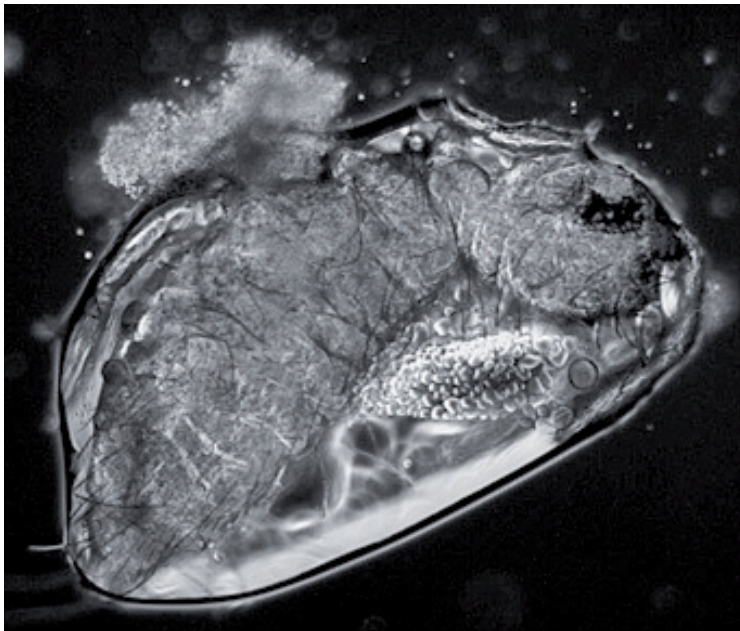
Ecco come procedere per trovare l'altezza esatta di posizionamento del campione. Accendiamo la lampada sotto il piano del microscopio e poniamo sopra il condensatore un foglio di carta bianco; sul foglio viene così proiettato un anello luminoso al cui centro compare un disco nero. Allontaniamo quindi lentamente il foglio dalla posizione iniziale, fino ad ottenere un punto centrale luminoso circondato da un anello nero (distanza di posizionamento corretta); sollevando ulteriormente il foglio ritroveremo la condizione iniziale, cioè anello chiaro e centro scuro.

L'eventuale sottile anello periferico visibile sul foglio non è influente al fine dell'osservazione ed è dovuto alle ampie tolleranze di lavorazione impiegate in questi tipi di condensatori. La profondità di campo offerta dal microscopio stereoscopico, unitamente all'utilizzo del campo scuro, permette l'osservazione di oggetti trasparenti quali cristalli, fiori e piccoli oggetti evanescenti con un contrasto inimmaginabile rispetto alle normali tecniche di osservazione generalmente effettuate tramite questo tipo di microscopio.

Nella pagina seguente sono riportate due splendide immagini riprese in campo scuro.



Zecca



Larva di crostaceo - probabilmente una pulce d'acqua

CAPITOLO 11

LA LUCE POLARIZZATA

Questo breve articolo vuole essere una piccola introduzione alla luce polarizzata e al suo utilizzo nel campo della microscopia amatoriale. La polarizzazione della luce è un fenomeno molto complesso e di rilevante importanza, sia nella vita quotidiana, sia in ambito scientifico. Cercherò ora di descriverlo con esempi semplici, sicuramente non privi di approssimazione, ma con l'intento di illustrare almeno qualche concetto basilare. Quando si parla di luce, dobbiamo immaginarci un'onda che vibra

in un piano, e si propaga nello spazio. Usando una metafora "gastronomica" immaginiamo la luce come un mazzo di spaghetti, o meglio di linguine, ognuna delle quali rappresenta un'onda luminosa ed il suo piano di vibrazione. Osservando con attenzione il mazzo di pasta, ci accorgiamo che non tutte le linguine giacciono sullo stesso piano, ma hanno un orientamento del tutto casuale.



Possiamo ora pensare al polarizzatore come ad un filtro che fa passare solo la luce orientata in un determinato modo, impedendo il passaggio di quella orientata in modo diverso.

Se osserviamo un filtro polarizzatore, ci accorgiamo che esso appare di color grigio neutro e che, guardandoci attraverso, la luce risulta attenuata di circa il 50%. Questo fatto è riconducibile all'esempio del mazzo di linguine; infatti statisticamente solo il 50% di esse riesce ad attraversare la schiumaiola (mestolo forato che nel nostro esempio funge da polarizzatore). Le linguine uscenti sono pertanto orientate tutte allo stesso modo e possiamo definirle polarizzate.



Il fenomeno della polarizzazione della luce è comunemente presente anche in natura e per poterlo osservare è sufficiente disporre di un filtro polarizzatore.

Se, ad esempio, osserviamo il cielo, in particolare al mattino o al tramonto, attraverso un filtro polarizzatore e lo ruotiamo fra le mani ci accorgiamo che il colore del cielo varia dal celeste ad un blu molto intenso, contrastando moltissimo le eventuali nuvole. Il fenomeno risulta molto più accentuato quando il sole si trova a 90° rispetto alla direzione di osservazione.

Tale tipo di fenomeno è chiamato polarizzazione per diffusione ed è dovuto alla miriade di molecole di gas che compongono l'atmosfera che oscillano in direzione perpendicolare ai raggi solari. Poiché la luce è un'onda trasversale la luce diffusa da esse prevalentemente oscillerà nello stesso piano.

Altro esempio di polarizzazione naturale lo possiamo trovare nella riflessione della luce da parte dell'acqua o del vetro, o in genere, dalla superficie di un oggetto trasparente. Il fenomeno della riflessione, su questo tipo di superfici, infatti, causa la polarizzazione della luce. Se disponiamo di un filtro polarizzatore e lo ruotiamo fra le mani, osservando tali oggetti, è possibile eliminare quasi completamente i riflessi.

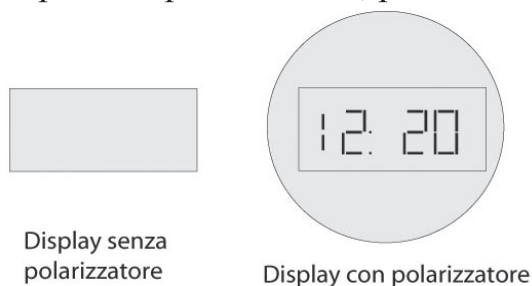
I DISPLAY A CRISTALLI LIQUIDI

Un esempio quotidiano di sfruttamento della luce polarizzata riguarda i display a cristalli liquidi. I segmenti scuri che formano le cifre o le lettere nascono da un sofisticato gioco di filtri.

Sotto il vetro di protezione di questi display si trova un filtro polarizzatore in plastica (del tipo "Polaroid"). Ancora più sotto, è situato uno strato semi-liquido di materiali organici contenenti molecole allungate dotate di estremità elettricamente cariche. Infine, uno specchio leggermente diffondente.

Lo strato liquido è affiancato da entrambi i lati da sottilissimi elettrodi trasparenti, cioè strati conduttori ma trasparenti, che ricalcano i segmenti che si oscureranno. Quando lo strato liquido è "a riposo", si comporta come indifferente alla luce polarizzata. Quando invece fra gli elettrodi è applicata una tensione continua di alcuni volt, le molecole del liquido si orientano secondo una direzione preferenziale ed il liquido acquista alcune delle proprietà ottiche di un reticolo cristallino (ecco perché si chiamano "cristalli liquidi").

Ora, la luce non polarizzata che proviene dall'ambiente attraversa prima il polarizzatore, poi lo strato liquido, poi viene riflessa dallo specchio e ripercorre il cammino a ritroso. Nessun fenomeno particolare si verifica se il circuito è "spento". Il display appare grigio uniforme.



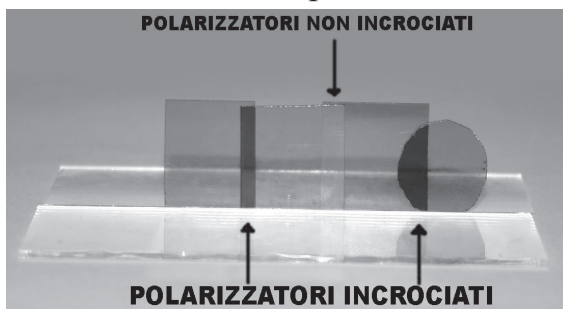
Se però giunge tensione a qualcuno degli elettrodi trasparenti, lo strato liquido diventa birifrangente e provoca uno sfasamento di $\frac{1}{4} \lambda$ fra i due raggi bi-rifratti. Dopo la riflessione, la luce riattraversa lo strato liquido e si crea un altro sfasamento di $\frac{1}{4} \lambda$. Totale: $\frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{1}{2} \lambda$.

Alla fine, i due fasci riflessi riattraversano il polarizzatore, ma con uno sfasamento reciproco di $\frac{1}{2} \lambda$ e qui interferiscono. Il risultato è quello di un unico fascio col piano di vibrazione ruotato di 90° rispetto a prima. Tale fascio ruotato viene bloccato dal polarizzatore ed in quel punto il display appare nero.

POLARIZZATORI INCROCIATI

Utilizzando due filtri polarizzatori posti uno sopra l'altro si possono verificare due situazioni: se i filtri sono orientati entrambi allo stesso modo sembrerà di avere fra le mani un unico filtro; se i filtri sono orientati in modo incrociato si avrà l'estinzione pressoché totale della luce, che non riuscirà a passare.

Tale disposizione dei filtri viene detta "incrocio" ed il suo utilizzo risulta particolarmente utile nell'osservazione e nell'analisi di ciò che vi si pone in mezzo.



BIRIFRAZIONE

Quando un raggio di luce attraversa un oggetto trasparente, ad esempio l'acqua o il vetro, esso subisce una deviazione del suo percorso. Questa deviazione è detta rifrazione ed è facilmente osservabile immergendo un cucchiaino in un bicchiere pieno d'acqua. Il cucchiaino, nel punto di incontro tra aria ed acqua, sembra piegarsi bruscamente per poi proseguire diritto nella nuova direzione, fino al fondo del bicchiere.

In natura alcuni materiali trasparenti o semitrasparenti presentano un'ulteriore proprietà: la birifrangenza; la luce attraverso questi materiali o oggetti viene, infatti, rifratta in due.

Questa caratteristica si può facilmente osservare ponendo l'oggetto birifrangente fra due polarizzatori incrociati e facendolo ruotare fra i filtri.

Se l'oggetto è birifrangente ci accorgiamo che, ruotandolo, mostrerà una certa colorazione, variabile a seconda della sua posizione; questo fenomeno è legato all'interferenza che si genera fra i raggi incidenti sul secondo polarizzatore. L'analisi di questi colori risulta molto interessante e di particolare utilità; in questa sede tuttavia ci preoccuperemo solo dell'aspetto estetico rimandando il lettore a letterature specifiche.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO IN LUCE POLARIZZATA

Il microscopio polarizzatore è uno strumento studiato espressamente per osservazioni ed analisi petrografiche e biologiche con questo particolare tipo di illuminazione.

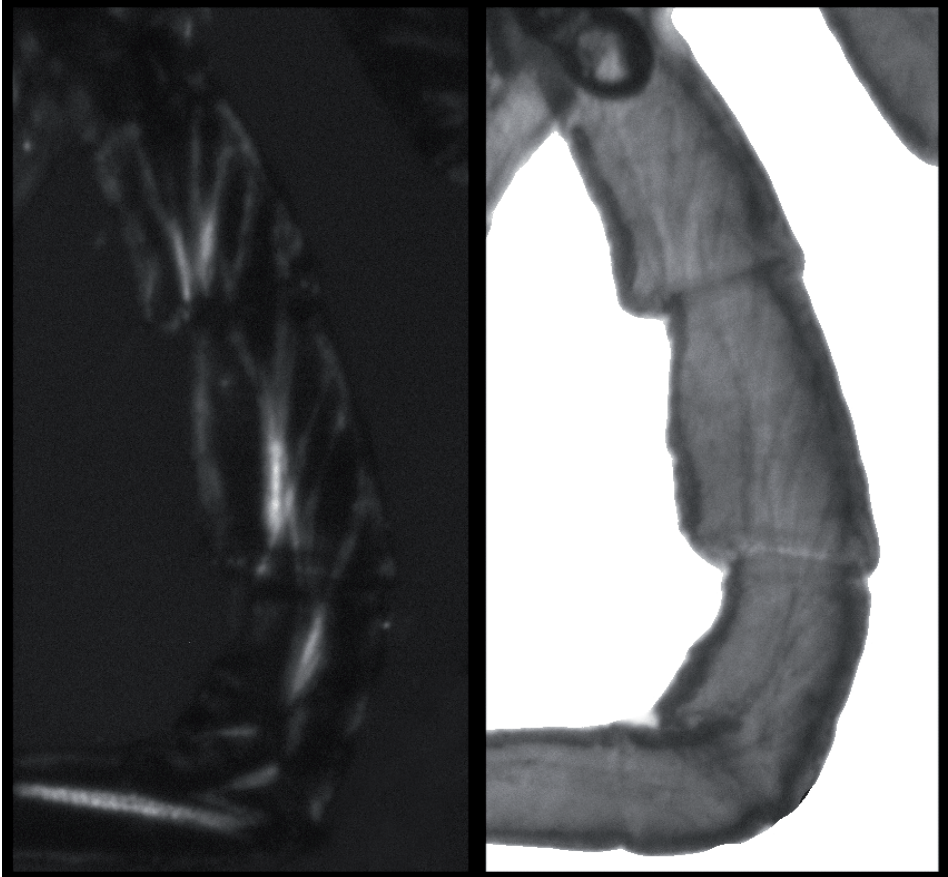
Il costo e la specificità dello strumento lo rendono prerogativa di laboratori ed istituti di ricerca, e ben pochi amatori ne possono disporre. Tuttavia, senza grosse pretese, è possibile trasformare il proprio strumento per l'osservazione in luce polarizzata. Nei negozi di ottica sono facilmente reperibili coppie di polarizzatori per l'uso in astronomia o al microscopio. Il loro utilizzo è molto semplice: è sufficiente porre il primo filtro sotto il condensatore del microscopio, mentre il secondo fra l'obiettivo e l'oculare e, più precisamente, prima del tubo porta oculari.



Ruotando il filtro posto sotto al condensatore è possibile variare l'angolo di incrocio ed ottenere, agevolmente, la “condizione di incrocio” dei due filtri.

La luce polarizzata trova una valida applicazione in microscopia, non solo per quanto riguarda i minerali e la petrografia, ma anche per l'osservazione di tessuti animali e vegetali.

Nella foto è riportata la stessa immagine di una zampa di insetto ripresa in luce normale e in luce polarizzata. Si noti che in luce polarizzata vengono messi in evidenza i muscoli, altrimenti invisibili.

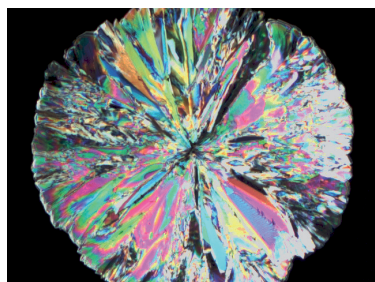


Anche l'osservazione della polpa di patata in luce polarizzata risulta interessante, perché vengono messi in evidenza i granuli di amido in essa contenuti. Fibre tessili, capelli, insetti, sezioni vegetali, preparati istologici animali, osservati con questo particolare sistema, offrono nuovi spunti di ricerca.

L'osservazione dei preparati in luce polarizzata è spesso snobbata e i polarizzatori per microscopio vengono frequentemente dimenticati in un cassetto ma, a mio avviso, vale in ogni caso la pena di provare questo particolare tipo di illuminazione con qualsiasi vetrino preparato.

EFFETTI MULTICOLOR

Un semplice esperimento, di grande effetto cromatico, è dato dall'osservazione in luce polarizzata dell'acido citrico. Per far questo dobbiamo sciogliere qualche cristallo di acido citrico in una goccia d'acqua. Poniamo poi la goccia su di un vetrino portaoggetto e copriamo il tutto con un coprioggetto. Attendiamo qualche ora, affinché l'acqua evapori, ed osserviamo il preparato al microscopio in luce polarizzata. Gli effetti cromatici e geometrici saranno di una bellezza ineguagliabile.



Cristallo di acido citrico osservato in luce polarizzata

L'acido citrico è facilmente reperibile in farmacia; allo stesso scopo possono essere usati anche i più comuni farmaci antinfluenzali che contengono l'acido acetilsalicilico.

In commercio sono reperibili anche i filtri polarizzatori per fotografia. Questi, generalmente molto costosi e chiamati polarizzatori circolari, sono progettati per macchine fotografiche tipo reflex, hanno un solo verso di funzionamento, e, pertanto, non sono indicati per l'uso in microscopia dove è da preferirsi il filtro chiamato polarizzatore lineare.

Per chi fosse interessato a maggiori approfondimenti sulla luce polarizzata, consiglio la lettura del manuale "Introduzione alla microscopia in radiazione polarizzata" del Dott. Giovanni Pietro Sini, liberamente scaricabile dal sito web www.funsci.com, dove si possono trovare numerosi altri articoli dello stesso autore riguardanti il microscopio e l'ottica.

CAPITOLO 12

COME EFFETTUARE MISURAZIONI CON IL MICROSCOPIO

Conoscere le dimensioni dei campioni che si vanno ad osservare a volte è indispensabile per la determinazione dell' oggetto che stiamo analizzando al microscopio, e la precisione è d'obbligo, pena incorrere in gravi errori che possono portare a classificazioni sbagliate.

Misurare oggetti piccoli è abbastanza semplice, ed il righello è lo strumento che fa al caso nostro; quando invece gli oggetti hanno dimensioni inferiori al millimetro, le cose si complicano un po'.

Se disponiamo di uno stereomicroscopio il sistema più semplice ed approssimativo per definire le dimensioni degli oggetti è quello di porre un disco di carta millimetrata sul piano di appoggio del microscopio e porvi sopra il campione da osservare. In questo modo sarà abbastanza semplice stimarne la dimensione confrontandolo con la griglia millimetrata della carta sul quale poggia, con un'approssimazione di circa 0,2 - 0,25 mm.

Questo tipo di misurazione, pur nella sua semplicità, risulta essere di grande aiuto per la maggior parte delle osservazioni che faremo con questo tipo di microscopio, senza ricorrere alla tecnica dei micrometri, "oculare" ed "oggetto", descritta nel prossimo paragrafo, indispensabile se si dispone di un microscopio biologico.

La tecnica di misurazione attraverso il micrometro oculare è applicabile anche al microscopio stereoscopico e fornisce informazioni immediate e precise.

MISURAZIONI CON UNA PRECISIONE DI CIRCA 0,2 MICRON

Per effettuare misurazioni precise di oggetti piccolissimi è necessario disporre di due strumenti; il micrometro oggetto ed il micrometro oculare.

Il micrometro oggetto è un vetrino sul quale è stato “inciso” un microscopico righello suddiviso in tacche da 0,01 mm. (I modelli più economici hanno una lunghezza totale di appena un mm ma ve ne sono anche di lunghezze maggiori).

Il micrometro oggetto viene utilizzato una sola volta per la taratura di ogni obiettivo impiegato, poi non serve più, ma deve essere custodito per tarature di altri obiettivi o microscopi che utilizzeremo in futuro.



Immagine ingrandita della scala graduata del micrometro oggetto

L'oculare micrometrico è un oculare speciale al cui interno viene fissato un vetrino con incisa una scala graduata.

Generalmente questa scala è lunga un centimetro, con divisioni di 0,1 mm. Questo particolare oculare dispone anche di una ghiera per la corretta messa a fuoco della scala graduata.

COME TARARE LA SCALA GRADUATA DELL'OCULARE MICROMETRICO

Per svolgere questa operazione si deve collocare il micrometro oggetto sul tavolino traslatore del microscopio e, se non già predisposto dal costruttore, coprire la scala graduata con un vetrino coprioggetto.

(ATTENZIONE! Non graffiare la delicata scala graduata)

A questo punto, si deve sostituire l'oculare del microscopio con il micrometro oculare, e mettere a fuoco la scala del micrometro oculare con l'apposita ghiera. La fase successiva consiste nel mettere a fuoco il micrometro oggetto posto sul tavolino del microscopio, proprio come se fosse un comune preparato, facendo in modo che le due scale, quella del micrometro oggetto e quella del micrometro oculare si sovrappongano.

Supponendo di possedere un micrometro oggetto con divisioni di 0,01 mm, la formula matematica per determinare quanto misura una tacchetta del micrometro oculare è la seguente:

LUNGHEZZA ASSOLUTA DI UN CERTO TRATTO DEL MICROMETRO OGGETTO

**NUMERO DI TACCHETTE DEL MICROMETRO OCULARE CHE
CORRISPONDONO ALLO STESSO TRATTO DI CUI SOPRA**

Il valore così trovato è anche detto costante micrometrica o “valore micrometrico”.

Per ridurre gli errori da distorsione, conviene lavorare nella parte centrale del micrometro oculare, per esempio nel tratto compreso fra 2 e 7 mm.

Sebbene questa operazione non sia complicata, (in effetti si tratta di una semplice divisione) ho voluto riportare numerosi esempi poiché, nella pratica, è facile commettere errori di distrazione e confondersi con la lettura delle scale graduate.

Obiettivo 4

Poniamo ad esempio che 10 tacchette del micrometro oculare misurino 25 tacchette del micrometro oggetto; quindi 10 tacche corrispondono a 250 micrometri dell'oggetto che stiamo osservando; pertanto, ogni singola tacca del micrometro oculare avrà un valore di 25 micron per l'obiettivo 4.

Obiettivo 10

Poniamo ad esempio che 100 tacchette del micrometro oculare misurino 98 tacchette del micrometro oggetto; quindi 100 tacche dell'oculare corrispondono a 980 micrometri dell'oggetto che stiamo osservando; pertanto, ogni singola tacca del micrometro oculare avrà un valore di 9,8 micron per l'obiettivo 10.

Obiettivo 25

Poniamo ad esempio che 40 tacchette del micrometro oggetto misurino 98 tacchette del micrometro oculare; quindi 98 tacche dell'oculare corrispondono a 400 micrometri dell'oggetto che stiamo osservando; pertanto, ogni singola tacca del micrometro oculare avrà un valore di 4,08 micron per l'obiettivo 25.

Obiettivo 40

Poniamo ad esempio che 100 tacchette del micrometro oculare misurino 25 tacchette del micrometro oggetto; quindi 100 tacche dell'oculare corrispondano a 250 micrometri dell'oggetto che stiamo osservando; pertanto, ogni singola tacca del micrometro oculare avrà un valore di 2,5 micron per l'obiettivo 40.

Proseguendo così per tutti gli obiettivi, con i risultati ottenuti possiamo redigere una semplice tabella come quella sotto riportata, da tenere sempre a portata di mano e che resterà sempre invariata per gli obiettivi così tarati, salvo sostituzione o alterazione di qualche organo intermedio: tubo-porta oculari, tubi intermedi, distanza pupillare, ghiera di regolazione dei tubi porta-oculari, etc.

Obiettivo	Misura di ogni tacca del micrometro oculare
4	25 micron
10	9,8 micron
25	4,08 micron
40	2,5 micron



Micrometro oggetto e oculare micrometrico

IL VALORE DELLE MISURAZIONI AL MICROSCOPIO

Misurare ciò che stiamo osservando ci permette di comprendere una cosa ovvia, sì, ma certamente non banale ovvero che oltre al mondo visibile che ci circonda ne esiste un altro, piccolissimo, ma anch'esso misurabile.

I dati fornitici dalle misurazioni al microscopio non devono essere valutati sempre su scala assoluta.

Mi spiego meglio: spesso, un'unica misurazione non ci consente di classificare con certezza l'oggetto che stiamo osservando. Poniamo ad es. di effettuare delle misure su spore di fungo. In questo caso, per essere il più precisi possibile, dobbiamo compiere diverse misurazioni e calcolarne la media.

Lo stesso vale per moltissimi altri oggetti, dal momento che in natura i valori assoluti sono pochi e le variabili che intervengono possono essere moltissime.

CAPITOLO 13

FOTOGRAFARE CON LO STEREOMICROSCOPIO

Effettuare fotografie con lo stereomicroscopio è una procedura abbastanza delicata che può regalare grandi soddisfazioni anche a chi non possiede microscopi dotati del terzo tubo.

Con la fotografia si perde però lo spettacolare effetto 3D che si ha invece osservando con questo tipo di microscopio; le foto prodotte sono tuttavia egualmente belle e costituiscono una valida documentazione dell'oggetto ripreso.

PROBLEMI

Il problema principale nella fotografia con lo stereomicroscopio è quello di ottenere un'immagine dell'intero campo inquadrato. La cosa può sembrare ovvia, ma appena si prova ad effettuare una ripresa con una normale web cam, priva dell'obiettivo e messa al posto dell'oculare, ci si rende conto che il campo inquadrato risulta piccolissimo e l'ingrandimento esagerato. Per ovviare a questo problema, alcuni costruttori di web cam ad uso microscopico inseriscono davanti al sensore una lente; generalmente questa soluzione è appannaggio solo di telecamere professionali e la qualità di quelle economiche lascia spesso a desiderare.



Gasteropode



Streblus beccarii

SOLUZIONI

Il miglior sistema per ottenere scatti di tutto rispetto con stereomicroscopi semplici è quello telecentrico. Per far ciò dobbiamo disporre esclusivamente di una macchina fotografica, meglio se digitale e dotata di un obiettivo zoom.

Sarà infatti sufficiente accostare, con un po' di attenzione, l'obiettivo all'oculare cercando di non urtarlo e scattare la foto. Semplicissimo ma... ecco alcuni accorgimenti affinché il tutto possa funzionare a dovere.

- ✓ Togliere le conchiglie paraluce dagli oculari;
- ✓ Dopo aver acceso la macchina fotografica impostarla in modo da disabilitare il flash;
- ✓ Se la macchina fotografica è dotata di zoom utilizzarlo fino a quando non sarà sparita un'eventuale vignettatura. (eventualmente usare lo zoom digitale di cui alcune macchinette sono dotate);
- ✓ Se disponibile utilizzare la messa a fuoco manuale;
- ✓ Se la macchina è dotata del settaggio degli ISO impostarla su 400;
- ✓ Fare molta attenzione a non urtare mai con l'obiettivo della macchina fotografica l'oculare del microscopio;
- ✓ Utilizzare un piccolo cavalletto per agevolare gli scatti ed evitare foto mosse.
- ✓ Se disponibile la funzione è importante mettere il diaframma in "Av" (priorità d'apertura) ed aprirlo tutto.



Fin qui tutto semplice ma, se non siamo fortunati, ecco un'ulteriore inconveniente che probabilmente ci si trova a dover affrontare quando si utilizza il metodo afocale: la probabile vignettatura che potrà comparire sull'inquadratura e quindi sulla fotografia.

Per risolvere questo problema è opportuno avvicinare o allontanare l'obiettivo della macchina fotografica dall'oculare del microscopio e cercare il punto dove questo fenomeno sarà il più ridotto possibile; eventualmente zoomare il più possibile anche se in questo modo si ottiene un restringimento del campo ed un ingrandimento che potrebbe essere eccessivo.

Se, però, la vignettatura persiste anche dopo questo accorgimento, occorre cercare di non rovinare lo scatto con una forte sovraesposizione della fotografia. Una buona macchina fotografica digitale, anche se compatta, dovrebbe essere dotata di almeno 3 tipi di lettura dell'esposizione: spot, ponderata al centro e automatica su tutta l'inquadratura. Se disponete di tali funzioni impostate la macchina su "ponderata al centro", in caso contrario è necessario agire sul controllo dell'esposizione sottoesponendo di 1, 2 o nella peggior situazione di 3 stop.



Foto con vignettatura

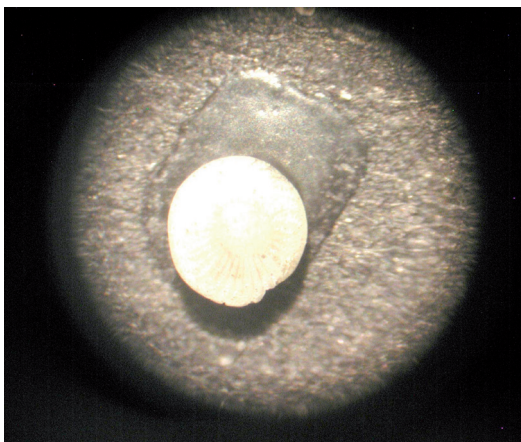


Foto sovraesposta con vignettatura

Nel caso in cui la vostra macchina non disponga neppure di quest'ultima funzione, si deve ricorrere all'espedito della lampadina, cioè occorre illuminare lateralmente l'obiettivo della macchina, in modo da "ingannare" l'esposizione automatica. Questa tecnica è abbastanza delicata e compromette inevitabilmente il contrasto dell'immagine inoltre necessita di alcune prove, affinché l'illuminazione sia ottimale ed i riflessi non rovinino lo scatto.

Fortunatamente, grazie alla fotografia digitale, queste procedure sono molto più semplici di una volta e si può avere un immediato riscontro dell'operato osservando la fotografia a video. Altrettanto semplice è elaborare la foto al computer ritagliando la vignettatura ed eliminandola definitivamente dall'immagine anche se si perde risoluzione.

Questi stessi metodi sono utili per la fotografia al microscopio biologico.



STOP DETTO ANCHE “SCATTO DEL DIAFRAMMA”

In fotografia, si chiama “Legge di reciprocità” un principio empirico secondo cui l'effetto fotografico, in particolare l'annerimento di un'emulsione negativa in bianco-nero (N), è proporzionale al prodotto fra illuminazione (I) e tempo d'esposizione (t).

Dunque, l'effetto (N) è costante se è costante il prodotto $I \times t$. In un sistema fotografico, a parità di sorgente, l'illuminazione è

proporzionale al quadrato dell'apertura del diaframma, per cui gli "scatti" della ghiera dell'apertura sono calcolati in modo da differire l'uno dall'altro di un fattore pari a $\sqrt{2} \approx 1,41$. Uno "scatto" quindi fa variare l'apertura di $\sqrt{2}$ e l'illuminazione di 2. Se dunque si raddoppia il tempo d'esposizione, si può dimezzare di pari misura l'illuminazione (uno scatto del diaframma) senza alterare l'effetto finale, e viceversa.

Se si varia l'apertura di uno "scatto" senza variare il tempo d'esposizione, si varia l'illuminazione e l'effetto fotografico di un fattore 2. Ovvero, si sovraespone o si sottoespone di un fattore 2.



Elphidium crispum

Essendo i pixel molto vicini tra loro è possibile, tramite algoritmi matematici di interpolazione, ottenere immagini a colori facendo una media fra la quantità di luce che colpisce il singolo pixel e quella che colpisce i pixel attigui. Trattandosi però di una stima, è possibile che vi siano errori nella registrazione di tali dati con relativa creazione di immagini artefatte.

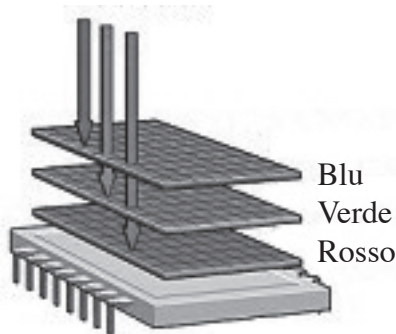
In microscopia, dove spesso si prendono in esame particolari con minuziosi dettagli, questo effetto è particolarmente fastidioso e purtroppo non ci possiamo fare nulla.

È da tenere presente che, utilizzando questo sistema, la risoluzione è dimezzata di circa il 50%; pertanto un sensore a colori da 6 milioni di pixel lavora circa come un sensore b/n da 3 milioni.

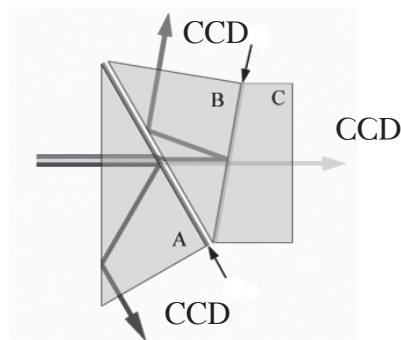
Altri sistemi di ripresa sono oggi allo studio e sicuramente anche questo inconveniente verrà in futuro risolto.

Due eccellenti esempi di registrazione di immagini a colori in modo perfetto sono: i sistemi a prisma dicroico con 1 CCD per ogni colore ed il nuovo sensore FOVEON® che utilizza tre sensori fatti con particolari materiali semitrasparenti impilati uno sull'altro.

Luce bianca



Schema di un sensore Foveon®



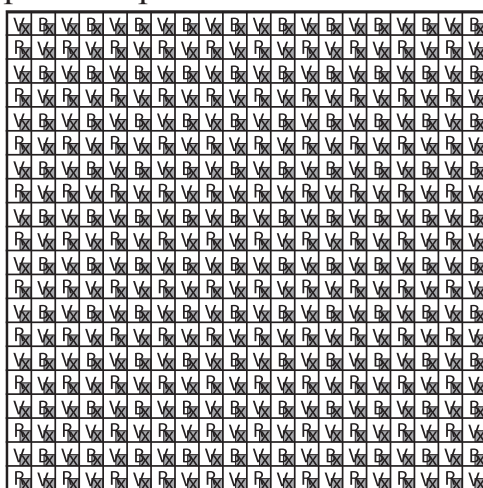
Schema di un sistema a prismi

VARI TIPI DI SENSORE

I sensori digitali di immagine si dividono in due grandi categorie i CCD (Charge Coupled Device) e i CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) che si differenziano per il tipo di tecnologia costruttiva impiegata, per il loro tipo di funzionamento elettronico, per la qualità ed anche per il prezzo.

Il CCD sfrutta l'intera superficie del pixel portando l'informazione registrata da una riga di pixel alla successiva fino al bordo del sensore, dove un'apposita circuiteria elettronica provvede alla conversione digitale dell'immagine. Viene costruito in aziende con macchinari dedicati, la qualità è eccellente, il rumore (disturbo) basso, ma il prezzo è piuttosto elevato.

Il CMOS (vedi figura a lato) sfrutta solo parzialmente la superficie sensibile in quanto parte dell'area di ogni singolo pixel è destinata alla circuiteria elettronica di trasporto dell'informazione al convertitore digitale. Viene costruito nelle stesse fabbriche dei normali microprocessori con macchinari non dedicati, la qualità attualmente risulta buona ed il suo costo non è elevato.



In questi ultimi anni il progressivo miglioramento dei sensori CMOS è dovuto all'utilizzo di elettronica dotata di filtri antirumore, tarati su ogni singolo sensore.

Questa ultima parte, apparentemente non attinente all'argomento di cui tratta il libro, è in realtà di estrema importanza se si vogliono fare delle buone fotografie. È come conoscere il sistema operativo di un computer, sembra che non serva a nulla, ma qualsiasi operazione fatta dai programmi è supportata da esso.

Grazie a queste poche ed elementari conoscenze, infatti, siamo in grado di scegliere liberamente il sensore di immagine più idoneo, cercando di evitare grossolani errori dettati da acquisti non ponderati.

Non tutti gli apparecchi sono progettati per essere collegati meccanicamente al microscopio, nè tutti i microscopi sono predisposti per essere utilizzati con sistemi di “cattura” delle immagini.

Spesso, però, dobbiamo fare i conti con l’attrezzatura a nostra disposizione ingegnandoci sul come poter scattare foto o riprendere immagini, scendendo spesso a compromessi che comunque ci permettono di raggiungere il nostro intento.

Se vogliamo ottenere fotografie con il microscopio, ci potrà consolare il fatto che qualsiasi apparecchio fotografico digitale o di ripresa video può essere adattato al nostro scopo così come qualsiasi microscopio può essere utilizzato come sistema ottico di ripresa delle immagini.

Non volendo o non potendo usare sistemi di ripresa dedicati è bene dare due basilari consigli che torneranno utili sia nell’ambito della fotografia al microscopio che nell’utilizzo per il quale l’apparecchio è stato progettato.

1) Non acquistare MAI apparecchi con zoom digitale. Spesso in commercio vengono proposte fotocamere economiche ad ottica fissa con zoom digitale generalmente 3X. Il sistema di ingrandimento in questione ingrandisce l’immagine ma compromettendone enormemente la qualità in quanto l’ingrandimento è ottenuto sfruttando i pixel centrali del sensore, interpolandone l’ingrandimento con conseguente formazione di sgranatura dell’immagine. Spendendo una decina di euro in più è possibile

avere strumenti con zoom ottico molto più funzionali e di qualità senz'altro superiore.

2) Quando si acquista qualsiasi sistema di ripresa, sia esso macchina fotografica o web cam, guardare bene il manuale di istruzione ed accertarsi che la risoluzione pubblicizzata sulla scatola sia corrispondente a quella fisica del sensore. Troppo spesso viene pubblicizzata a caratteri cubitali, specialmente nelle web cam, la risoluzione interpolata e non quella nominale del sensore. A noi interessa solo ed esclusivamente la risoluzione reale del sensore!

GLOSSARIO

ACCOMODAZIONE (PROCESSO ACCOMODATIVO): meccanismo autonomo dell'apparato visivo, attuato attraverso la deformazione del cristallino, che permette di creare sulla retina immagini a fuoco di oggetti posti a diversa distanza rispetto al punto remoto; tale processo consente di aumentare il potere diottrico di una struttura interna quale il cristallino.

BIRIFRANGENZA: scomposizione di un raggio di luce in due raggi, tale fenomeno avviene quando un raggio attraversa particolari mezzi.

CCD: (acronimo di Charge-Coupled Device) consiste in un circuito integrato formato da una riga, o da una griglia, di elementi semiconduttori in grado di accumulare una carica elettrica (charge) proporzionale all'intensità della radiazione elettromagnetica che li colpisce; tali elementi sono accoppiati (coupled) in modo che ognuno di essi, sollecitato da un impulso elettrico, possa trasferire la propria carica ad un altro elemento adiacente; il CCD costituisce il cuore delle moderne macchine fotografiche e videocamere digitali.

CORNEA: porzione anteriore della tonaca fibrosa dell'occhio, costituita da cinque strati successivi; è sprovvista di vasi sanguigni e la sua funzione è quella di permettere il passaggio della luce verso le strutture interne dell'occhio.

CRISTALLINO: lente naturale trasparente e biconvessa dell'occhio, che, insieme alla cornea, consente di mettere a fuoco i raggi luminosi sulla retina; il cristallino è flessibile e la sua curvatura è controllata dai muscoli ciliari; con l'avanzare degli anni perde la sua capacità di accomodazione, ed è per questa ragione che insorge la presbiopia, la quale impedisce di vedere bene da

vicino se non si ricorre a una correzione adeguata.

DIATOMEA: microalga eucariota unicellulare provvista di un astuccio siliceo formato da due gusci o teche, di cui quello superiore è più grande e ricopre quello inferiore come il coperchio di una scatola; il guscio superiore è detto epiteca quello inferiore ipoteca; all'interno di questo astuccio si trova il protoplasma cellulare; le diatomee hanno diverse forme e strutture, si possono trovare isolate o raggruppate in colonie e si possono dividere in 2 ordini: le *Pennales* e le *Centrales*; la differenza tra questi due tipi sta soprattutto nella forma (quelle *Centrales* hanno una simmetria centrale mentre quelle *Pennales* una forma allungata) e nel tipo di acqua in cui vivono. Nelle acque marine costituiscono una delle componenti principali del fitoplancton.

DIATOMITE (O FARINA FOSSILE): è il residuo fossile di microscopiche alghe della famiglia delle diatomee, viene comunemente utilizzata per le sue proprietà abrasive (ad esempio nei dentifrici) o come elemento filtrante (nelle piscine, in enologia durante la filtrazione del vino e per l'acqua potabile).

FOCHEGGIARE: mettere a fuoco uno strumento ottico, cioè regolarlo affinché dia immagini nitide.

FRUSTULO: le diatomee sono caratterizzate dalla presenza di un rivestimento siliceo esterno detto frustulo, scolpito e caratterizzato da varie "decorazioni" ed ornamenti come *punctae*, *alveoli*, *canaliculi* e *costae*.

INDICE DI RIFRAZIONE di un materiale: parametro macroscopico, solitamente indicato col simbolo n , che rappresenta il fattore numerico per cui la velocità di propagazione di una radiazione elettromagnetica viene rallentata, rispetto alla sua velocità nel vuoto, quando questa attraversa un materiale; essendo

funzione della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica e della natura del materiale attraversato, la sua misura in condizioni controllate può essere usata per identificare i materiali stessi.

LENTE: elemento ottico che ha la proprietà di concentrare o divergere i raggi di luce, di norma realizzato in vetro o in materiali plastici; le immagini osservate attraverso una lente non sono mai perfette dal momento che si possono generare delle alterazioni, più propriamente dette aberrazioni ottiche; tali effetti negativi possono essere ridotti grazie all'uso di materiali speciali ed a particolari soluzioni progettuali, lavorando ad esempio in modo particolare le ottiche o accoppiando componenti diversi, ecc...

MITÒSI : riproduzione per divisione equazionale della cellula eucariote (con nucleo ben definito e isolato dal resto della cellula nel quale è racchiuso la maggior parte del materiale genetico); il termine deriva dal greco *mítos*, che significa “filo”, nome dovuto all'aspetto filiforme dei cromosomi durante la metafase; la durata media della divisione cellulare è variabile e tale processo è generalmente suddiviso in 4 fasi: profase - metafase - anafase – telofase.

RIFRAZIONE: deviazione subita da un'onda che ha luogo quando questa passa da un mezzo fisico ad un altro (ciò genera una variazione di velocità di propagazione apparente, dovuta al ritardo tra assorbimento e ri-emissione per i singoli atomi o molecole del mezzo); la rifrazione della luce è l'esempio più comunemente osservato, ma ogni tipo di onda può essere rifratta (per es. onde sonore o le onde dell'acqua).

SENSORE DI IMMAGINI O SENSORE OTTICO: dispositivo che converte un'immagine ottica in un segnale elettrico, utilizzato soprattutto nelle fotocamere digitali, nelle telecamere e in

altri dispositivi che trattano elettronicamente immagini.

VIGNETTATURA: riduzione della luminosità dell'immagine alla periferia rispetto al centro.

L'effetto della vignettatura può essere usato intenzionalmente per effetti creativi usando specifici filtri.

BIBLIOGRAFIA

Riccardo Mazza (2004), “Funghi lo spettacolo della natura”
Arti Grafiche Saturnia s.a.s. - Roncafort di Trento

M.T. Basso (2005), “Manuale di Microscopia dei funghi” Alas-
sio, Libreria Mykoflora

H. Steble e D. Krauter (1984), “Atlante dei microrganismi ac-
quatici” Franco Muzzo Editore - Padova

H.G. Barber e E. Y. Haworth (1981) “A guide to the morpholo-
gy of the diatom frustule”

Risorse Internet

Sini Giovanni Pietro (2006), “Introduzione alla microscopia in
radiazione polarizzata” INFN Sezione di Bologna, Dipartimen-
to di Fisica Università degli Studi di Bologna, [http://www.fun-
sci.com](http://www.funsci.com)

Sini Giovanni Pietro (1996), “Il microscopio stereoscopico”, in
Natura Modenese, Vol. 3, pp. 57 - 60, <http://www.funsci.com>

Sini Giovanni Pietro (2005), “Problemi Tecnici della microsco-
pia ottica”, INFN Sezione di Bologna, Dipartimento di Fisica
Università degli Studi di Bologna, <http://www.funsci.com>

Siti web utili

www.wikipedia.org

www.funsci.com

www.naturamediterraneo.it

www.fmboschetto.it

