

Potere Risolutivo di un microscopio ottico composto

Il massimo potere risolutivo di un microscopio ottico composto è di $0.2 \mu\text{m}$ con luce di illuminazione del preparato blu. Per migliorare il contrasto (attenuazione della luce diffusa dal preparato) o migliorare la risoluzione rispetto al microscopio in campo chiaro si hanno tra gli altri:

Microscopi a Polarizzazione

Microscopi a interferenza o a contrasto di fase

Microscopi Confocali a fluorescenza

Microscopi a Raggi X (SEM e TEM)

Microscopi a effetto tunnel

Microscopi a Forza Atomica

Pur correggendo opportunamente le aberrazioni delle lenti, non è conveniente aumentare l'ingrandimento di un normale microscopio a causa della diffrazione. Infatti l'immagine di un punto fornita dal microscopio non ha dimensioni nulle (punto) bensì un diametro finito, tanto più piccolo quanto minore è il rapporto tra la lunghezza d'onda usata e le dimensioni trasversali dell'obiettivo.

Detta PR la minima distanza fra due punti che possono essere visti distinti, PR è detto potere risolutivo del microscopio.

Si può dimostrare che PR è legato alla lunghezza d'onda λ , all'indice di rifrazione n del mezzo interposto tra oggetto e obiettivo e all'angolo massimo α che un raggio luminoso proveniente dall'oggetto e raccolto dall'obiettivo forma con l'asse ottico di quest'ultimo, dalla formula :

$$PR = \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha}$$

A causa del potere risolutivo finito un ingrandimento superiore a circa 2500x non consente di

guadagnare ulteriormente in dettaglio. Allo scopo di migliorare il potere risolutivo si può agire in tre direzioni:

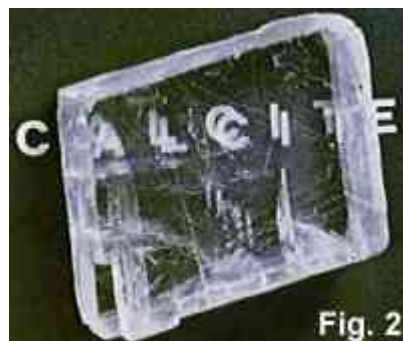
*** diminuire λ usando ad esempio luce ultravioletta;**

*** aumentare α , con notevole complicazione dei sistemi di lenti per ridurre l'aberrazione;**

*** aumentare n : si usano a tale scopo obiettivi ad immersione in bagno d'olio.**

Parliamo per primo del microscopio polarizzatore. E' in effetti un microscopio ma con due filtri posti sul percorso della luce, il polarizzatore prima degli obiettivi e l'analizzatore (che e' un altro filtro polarizzatore ma per la funzione che ha viene detto analizzatore) posto dopo il campione e prima degli oculari e il sistema di rilevamento ottico. Nella microscopia in luce polarizzata, l'oggetto trasparente e' messo in evidenza sfruttandone la birifrangenza.

Ricordiamo che la birifrangenza e' l'anisotropia del mezzo rispetto alla luce. Se si prende per esempio un cristallo di calcite e lo si appoggia su un testo, si vede che l'immagine del testo risulta sdoppiata: se si prende un polarizzatore si vede che ciascuna immagine ha una polarizzazione lineare a 90 gradi l'una rispetto all'altra.



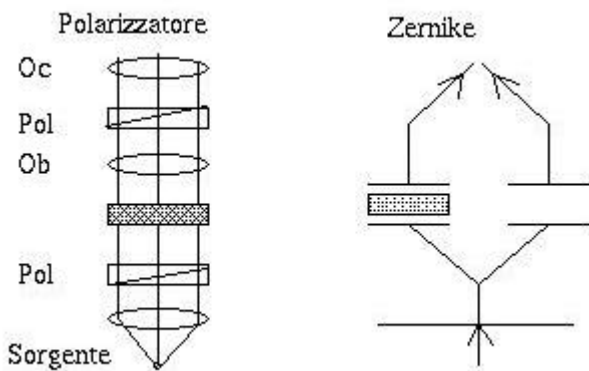
Ovviamente i mezzi ordinari sono isotropi e la luce quando li attraversa vede che lungo tutte le direzioni ha le stesse proprietà. I mezzi isotropi sono caratterizzati da un unico indice di rifrazione e i raggi di luce incidendo sul materiale seguono la legge di Snell.

L'onda elettromagnetica invece che arriva nel mezzo anisotropo viene scissa in due onde: ordinaria e straordinaria. L'onda ordinaria segue la legge di Snell ed ha un indice di rifrazione detto ordinario; l'onda straordinaria non segue la legge di Snell ed ha un indice di rifrazione che dipende dall'orientazione relativa dell'analizzatore (nient'altro che un filtro polarizzatore).

L'analizzatore produce l'interferenza di queste due onde e di conseguenza la comparsa del colore.

Siccome l'interferenza dipende dalla differenza di cammino ottico tra il raggio ordinario e straordinario, l'analisi della luce permette di determinare gli indici di rifrazione ordinario e straordinario del campione.

Con l'ausilio di lamine supplementari e dell'immagine processing si può avere quella che in gergo viene detta la POL quantitativa.



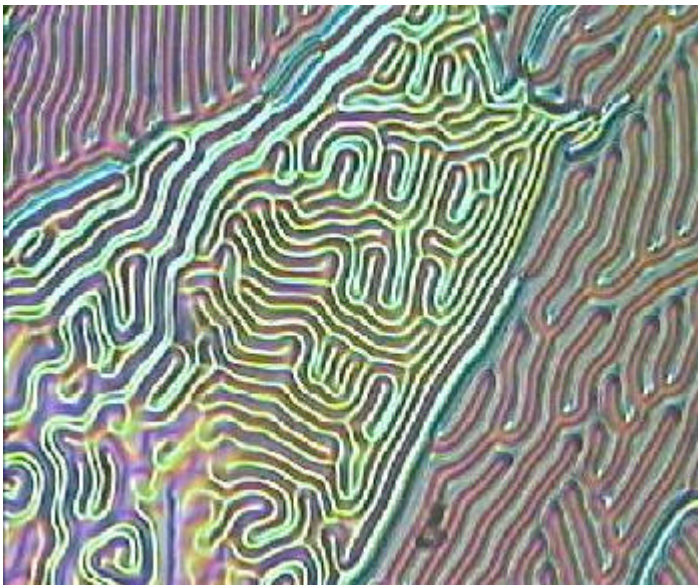
Microscopio

polarizzatore ed interferenziale

Per rendere visibili oggetti trasparenti si utilizza anche il microscopio a contrasto di fase che mette in evidenza il contorno degli oggetti.

Il microscopio ad interferenza infine, inventato da Zernike nel 1953, premio Nobel per questo, e' un microscopio in cui la luce segue due cammini diversi.

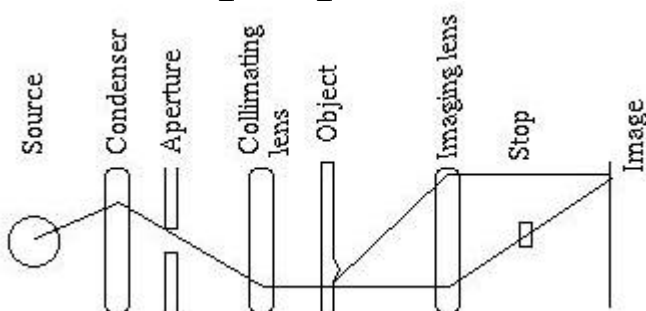
Quella che viene osservata e' quindi l'interferenza tra il raggio che passa attraverso il materiale ed il raggio di riferimento. Ricordiamo che la microscopia lavora anche in riflessione.



La figura mostra cio' che vede il microscopio polarizzatore, nell'osservare un cristallo liquido colesterico. Lato 1 mm.

Ci sono poi le tecniche schlieren che permettono di mostrare le variazioni nella lunghezza del cammino ottico della luce che passa attraverso un oggetto trasparente. La zona dove il cammino ottico e' diverso appare come una zona luminosa. La parola Schlieren e' tedesca e significa striatura ed indica come appare l'immagine all'osservatore.

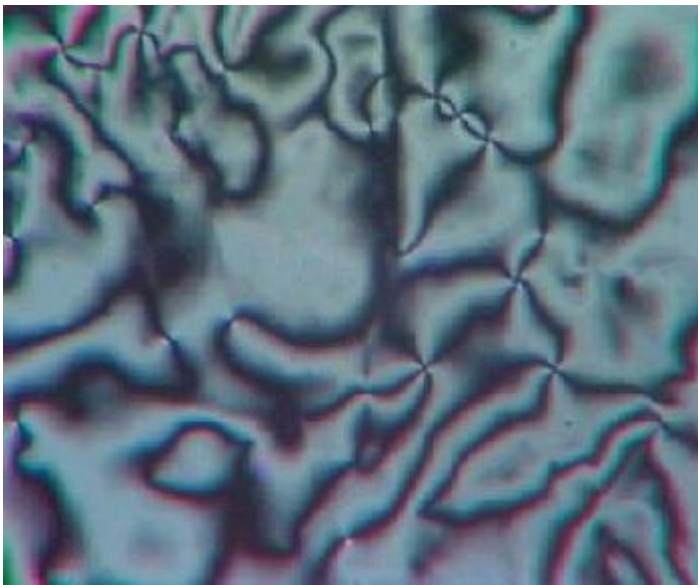
Con questo termine si indicano anche alcune tessiture dei cristalli liquidi osservati al microscopio polarizzatore.



Sistema schlieren.

Il metodo è stato inventato per saggiare i componenti ottici. Il sistema che è in figura mostra un tipico schema a campo scuro. Una immagine della sorgente è creata dal condensatore sullo stop. La luce passa attraverso l'oggetto da studiare che è nominalmente piano parallelo. Se l'oggetto è effettivamente piano parallelo il campo di osservazione appare scuro perché lo stop blocca l'immagine. Se invece l'oggetto ha alcune regioni che deviano la luce, appariranno delle regioni chiare nel campo visivo.

Per rendere un'idea di come appare uno schlieren potete vedere l'immagine di un cristallo liquido nematico: la disposizione delle molecole non è uniforme e quindi compaiono queste "ombre" che partono da punti di difetti che sono detti disclinazioni.

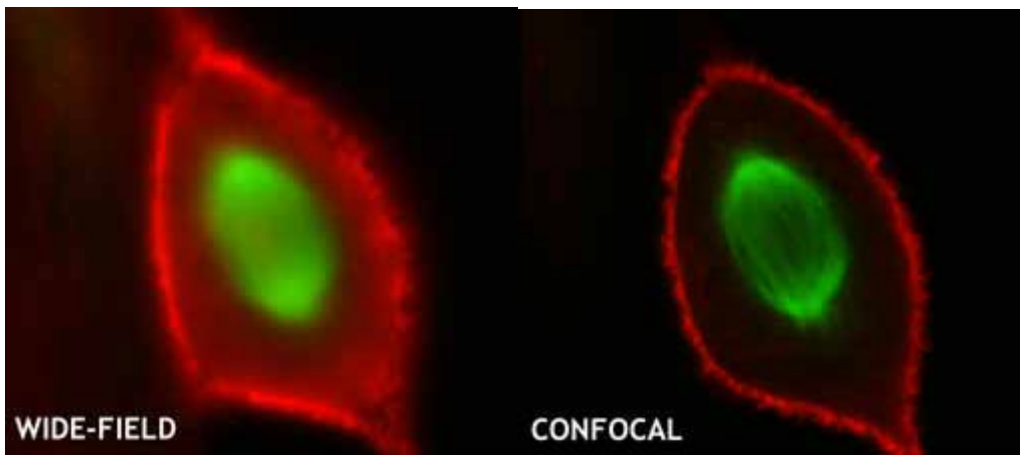


Tessitura schlieren di un cristallo liquido nematico.

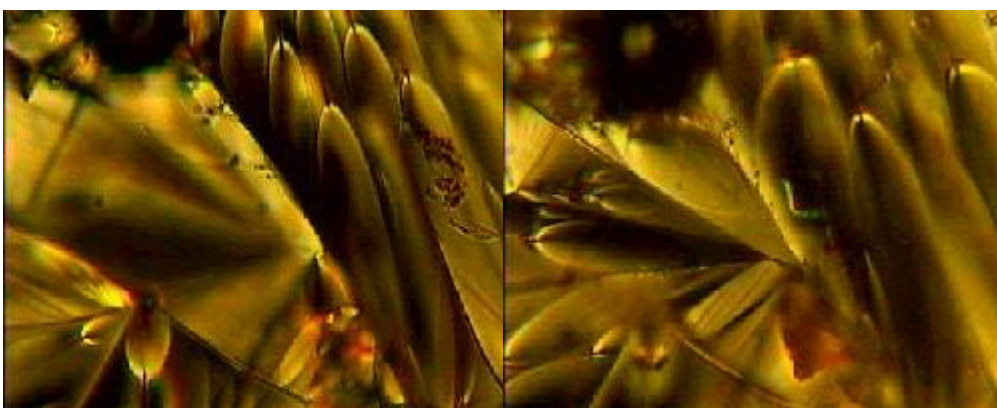
Parliamo ancora di un microscopio, che ha bisogno del supporto dell'elaborazione digitale delle immagini per essere veramente utile.

Parliamo del Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM, detto anche CSLM, Confocal Scanning Laser Microscope): e' uno strumento adesso molto usato per avere come gia' detto delle immagini ad alta risoluzione e con la possibilita' di avere una ricostruzione tridimensionale di cio' che viene osservato. E' usato specialmente per preparati biologici.

La figura mostra il confronto tra il "wide-field" (microscopia ordinaria) e quello che vede il confocale.



Nella microscopia convenzionale, una lente che funge da condensatore e' usata per illuminare uniformemente una grande area e volume del campione (da qui il termine "wide-field" microscopy). Nel preparati spessi, cio' porta ad avere luce che proviene anche da piani diversi dal piano focale, ossia dai piano sopra e sotto il piano focale. Questa luce out-of-focus riduce il contrasto e la risoluzione. Per ridurre questo problema si fanno preparati molto sottili.

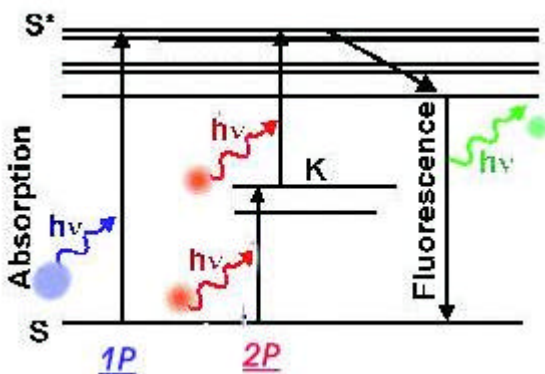


Ma anche se si prendono preparati sottili, come si vede dalle figure precedenti di un cristallo liquido smettico, la luce fuori fuoco non puo' essere

eliminata. Si vedono nelle immagini prese mettendo a fuoco il microscopio a distanze leggermente diverse la traccia in ciascuna immagine di ciò che si vede nell'altra.

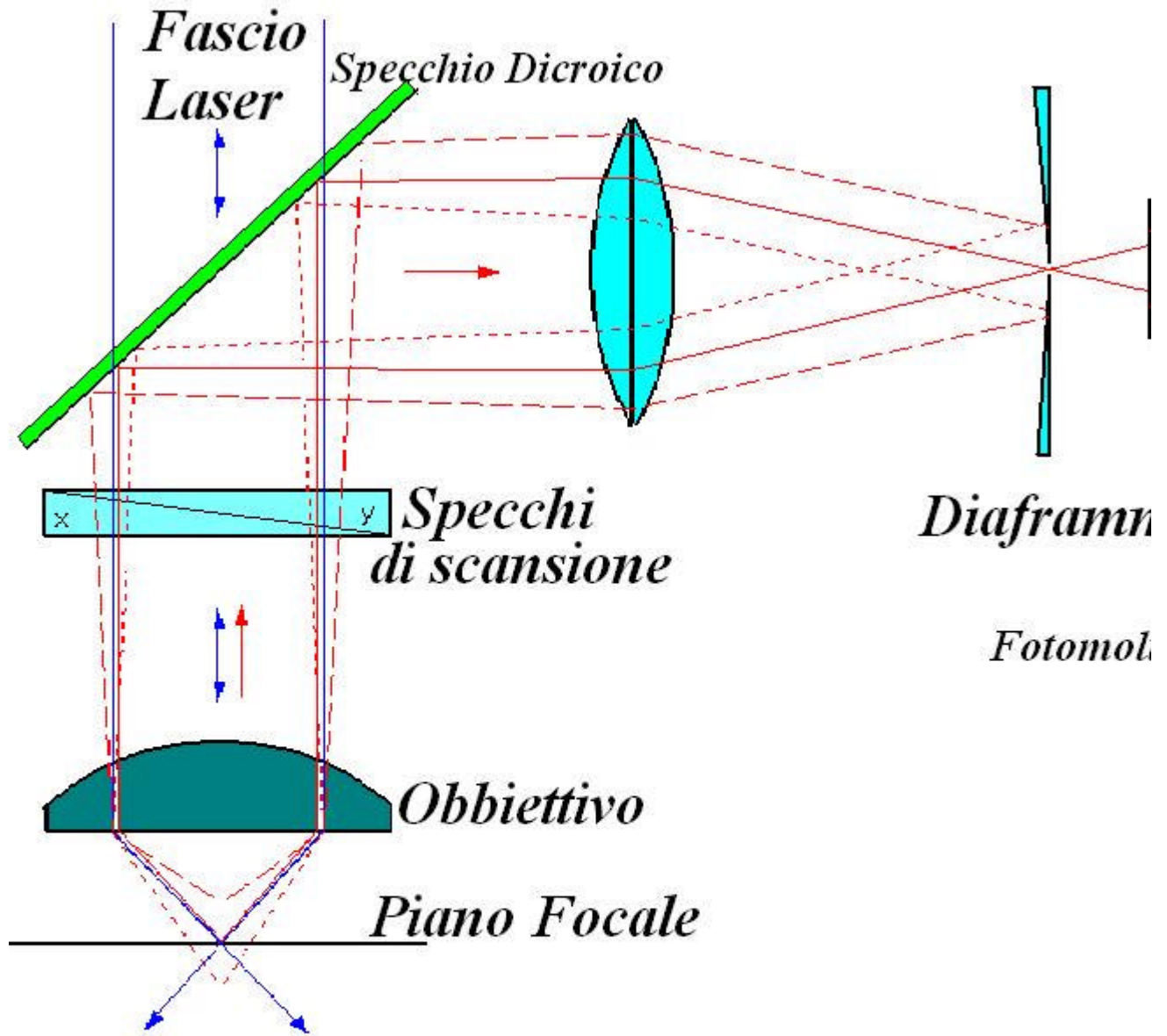
Nel microscopio laser confocale, il fascio laser è espanso in modo da renderne ottimale il suo uso per l'ottica dell'obiettivo del microscopio. Un meccanismo di deflessione x-y del fascio permette di ottenere un fascio di scansione, focalizzato in un piccolo spot dalla lente dell'obiettivo sul campione fluorescente. La luce riflessa e emessa per fluorescenza è catturata dallo stesso obiettivo e rimandata focalizzata sul ricevitore tramite un beam-splitter.

Una piccola nota sulla fluorescenza: se si irradia un atomo, si può vedere luce di diversi colori emessa dall'atomo. L'atomo assorbe luce ad alta energia (blu) e salta ad un livello energetico superiore. Un po' di energia viene persa ma poi è riemessa dall'atomo a frequenza minore (verde).



Il vantaggio della fluorescenza è che si possono

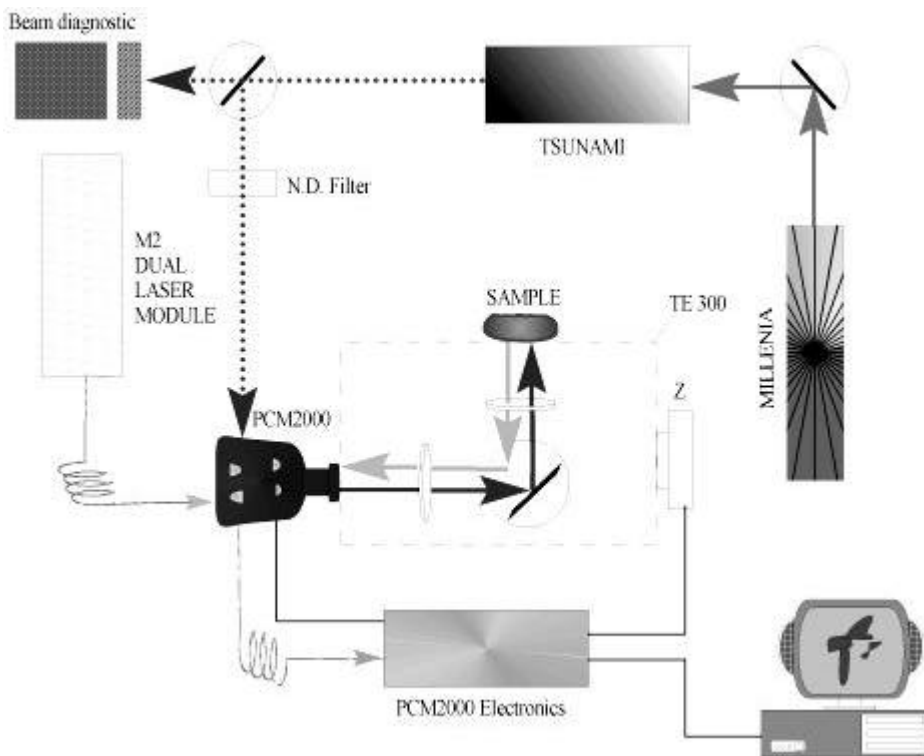
aggiungere al preparato da studiare dei dyes fluorescenti e vedere solo i pezzi di molecole che interessano.



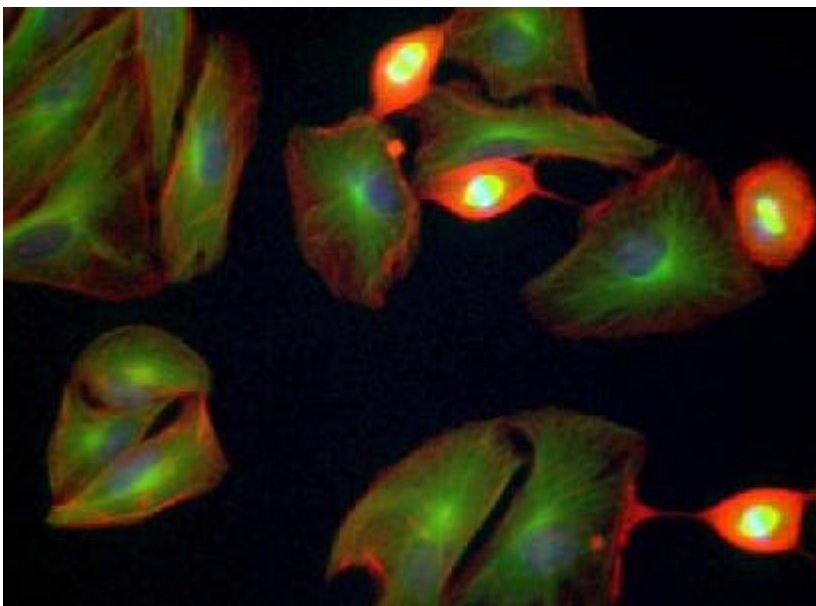
La luce riflessa dal campione torna indietro verso

la sorgente, mentre la luce dovuta alla fluorescenza e' deviata dal beam-splitter e arriva all'apparato per la rilevazione. Una apertura (pinhole) e' piazzata prima del detector (detta apertura confocale) elimina la luce che proviene dai punti del campione che non sono nel piano focale (out-of-focus light) della luce laser. In questo modo, tutta l'informazione out-of-focus e' notevolmente ridotta. Cio' e' molto utile se si vogliono studiare campioni spessi e permette di ottenere serie di immagini a vari piani focali.

Con la scansione del piano focale si ottiene infatti una mappa 2-dim del segnale analogico del fotorilevatore. L'insieme delle mappe a diverse distanze focali permette di ottenere una mappa 3-dim dell'oggetto e con un rendering spaziale si ottiene l'immagine 3-dim.



L'immagine mostra delle cellule osservate con il microscopio confocale.



MICROSCOPIO ELETTRONICO

Il microscopio elettronico si colloca nella prima modalità (diminuire l). La scoperta del fatto

che gli elettroni si comportano come radiazioni di brevissima lunghezza d'onda ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri risolutivi molto più elevati. Con questa soluzione Kausch e Ruska nel 1939 poterono eseguire la prima fotografia di virus, aprendo un campo inaccessibile al microscopio ottico.

In linea di principio un microscopio elettronico opera come un microscopio comune, ma dato che i dispositivi ottici non deviano il fascio di elettroni si ricorre a lenti magnetiche o elettrostatiche. Questo strumento consta essenzialmente di una sorgente elettronica di conveniente intensità e di un sistema di griglie di accelerazione e focalizzazione, alimentate da tensioni elevate, dell'ordine di 80kV. In tali condizioni λ assume valori compresi tra 5 e 10 pm ($1 \text{ pm} = 10^{-9} \text{ m}$), quindi appartiene alla gamma dei raggi X.

Pur non raggiungendo i limiti teorici si ottengono ingrandimenti superiori a 100000x, con potere risolutivo dell'ordine del nm. Il fascio di elettroni passa attraverso l'oggetto e all'interno dei dispositivi di deflessione citati, e incide su uno schermo fluorescente, o su una lastra fotografica. Per assicurare la

propagazione degli elettroni un sistema di pompe assicura che tutta l'apparecchiatura si trovi sotto vuoto.

Data l'elevata energia degli elettroni non è consentita l'osservazione di organismi viventi. Si ricorda inoltre che l'immagine ricavata non corrisponde ad un'immagine ottica vera e propria, dato che gli spettri di assorbimento e riflessione delle sostanze in esame, che ne determinano le caratteristiche cromatiche e di trasparenza,

non corrispondono a quelli propri dell'immagine ricavata alla luce visibile.

