

# Il microscopio ottico

La parola ***microscopio*** è stata coniata dai membri dell'Accademia dei Lincei di cui faceva parte anche Galileo Galilei

# Ingrandimento

Un oggetto può essere visto a fuoco se posizionato ad una distanza non inferiore a circa 250 mm

L'ingrandimento di un oggetto a 250 mm è considerato 1x

Individui giovani che possono mettere a fuoco a distanza inferiori di 250 mm, potendo così portare l'ingrandimento a circa 2x,

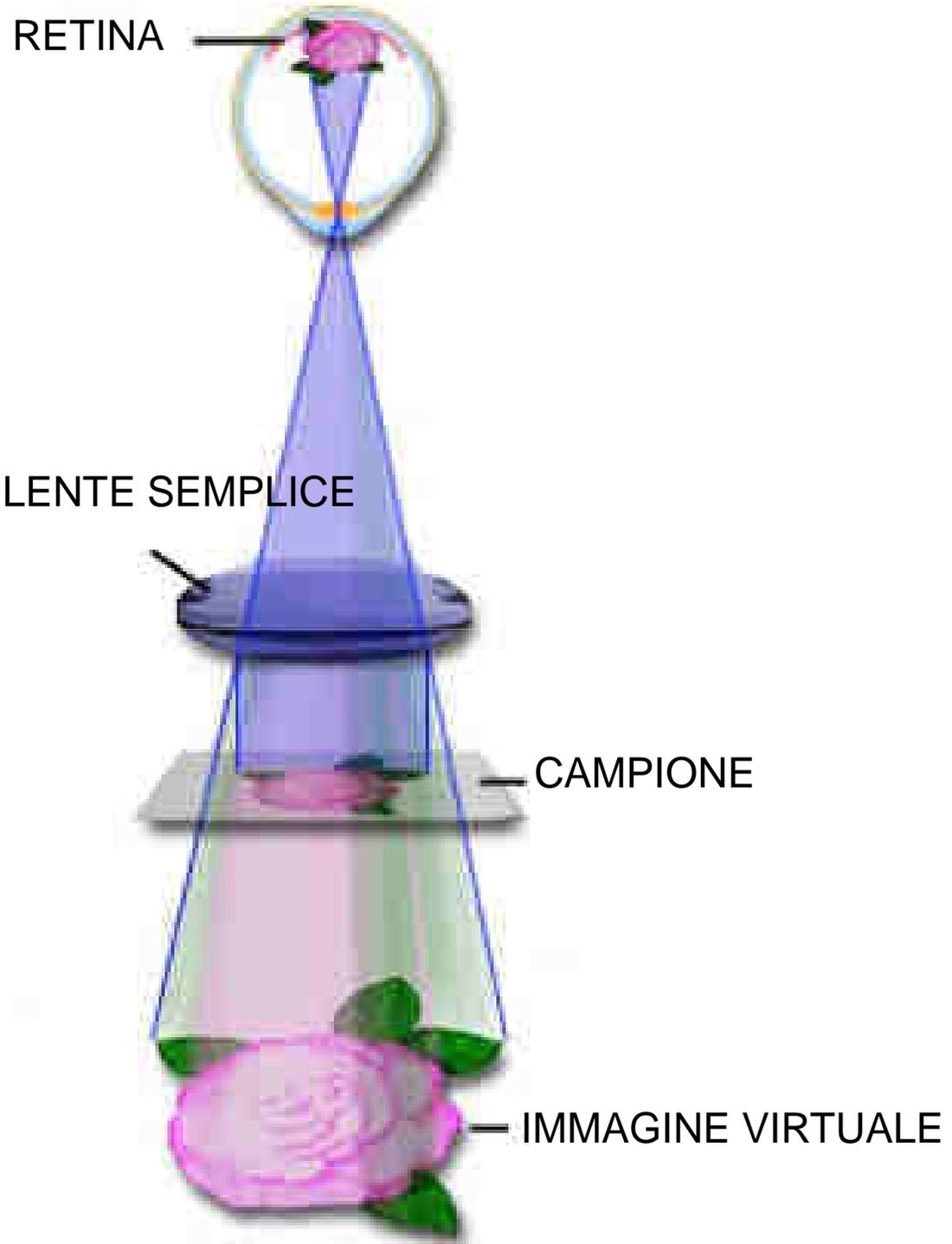


IMMAGINE I

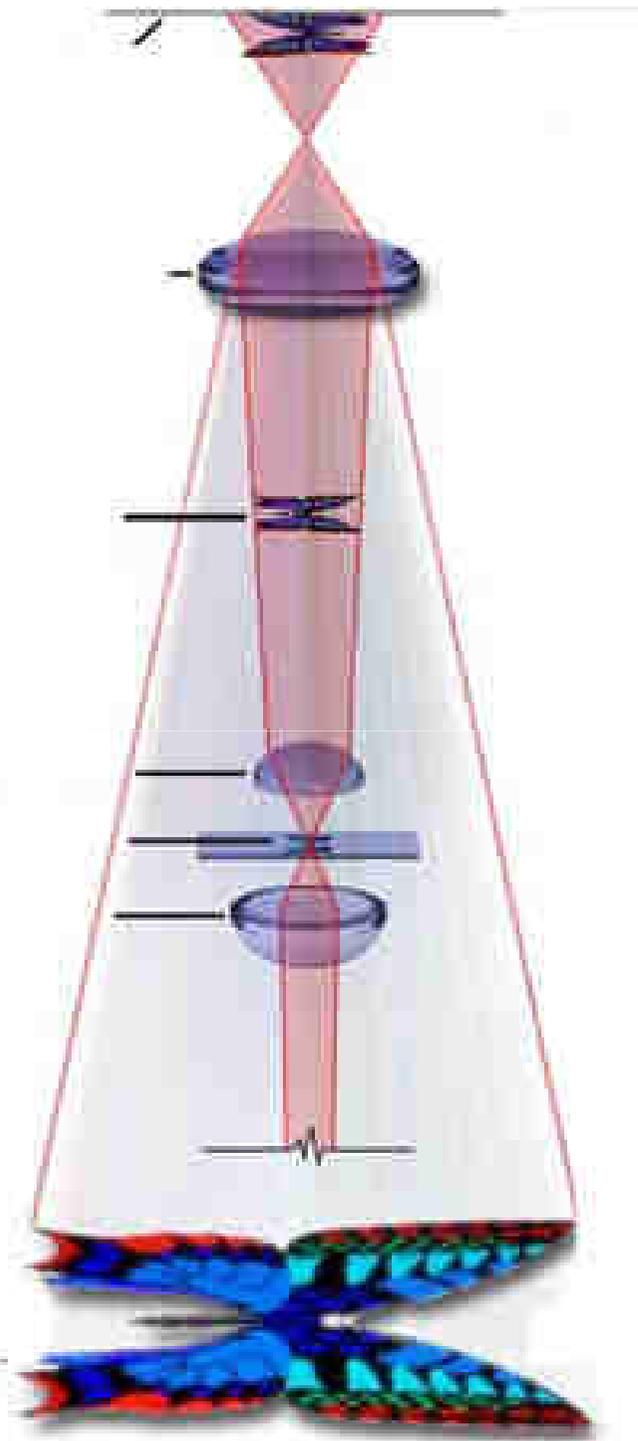
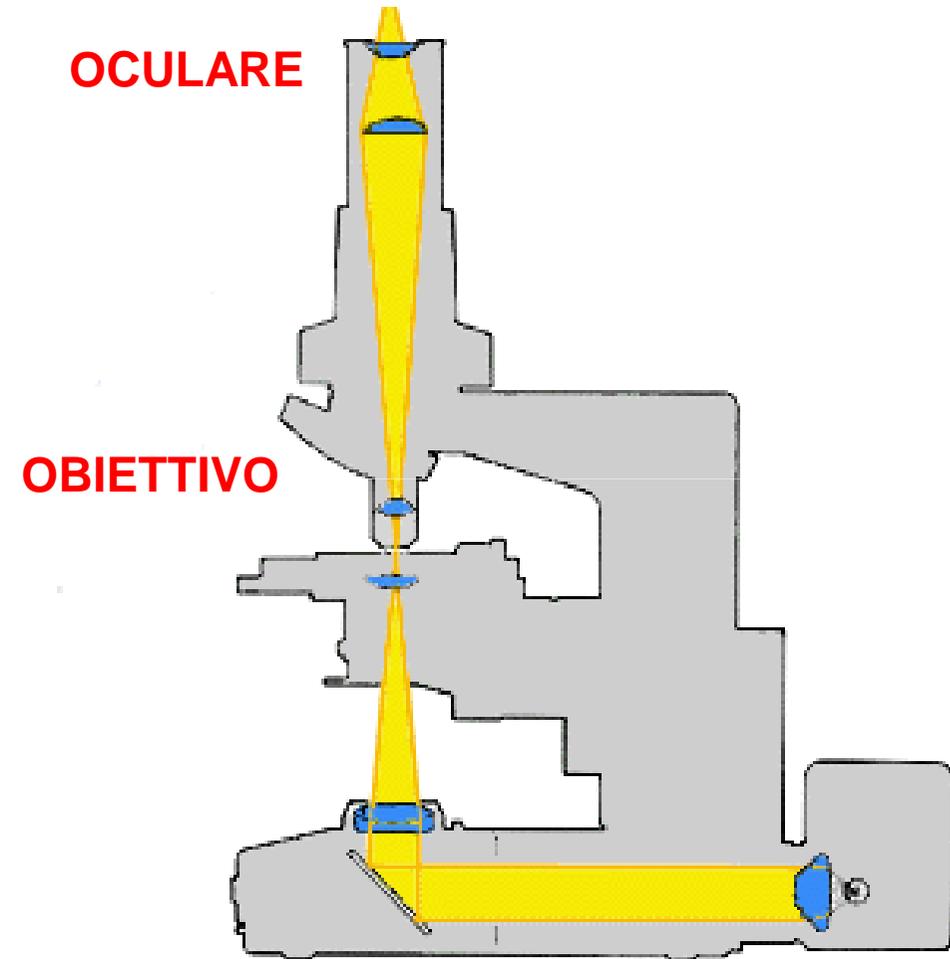


IMMAGINE V

Su questo principio si  
basa il  
microscopio  
composto.



Ingr. totale =

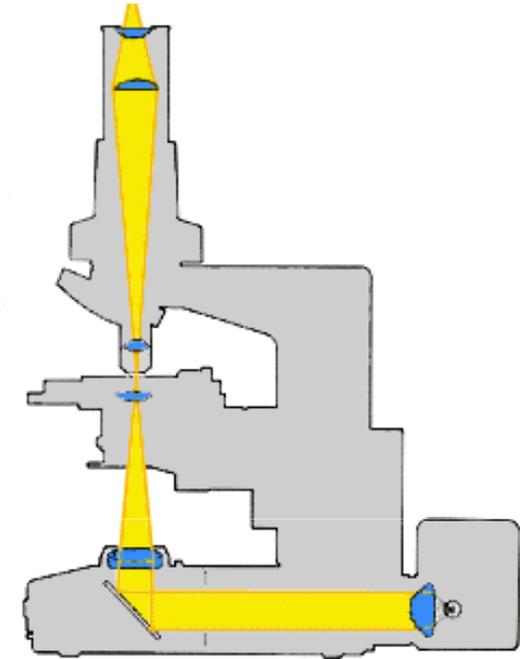
Ingr. oculare

X

Ingr. obiettivo

Anche il microscopio ha dei limiti:  
non basta infatti ingrandire per  
potere risolvere due oggetti vicini.

L'ingrandimento eccessivo porta  
all'ingrandimento a vuoto: gli oggetti  
risultano più grandi ma non meglio risolti.

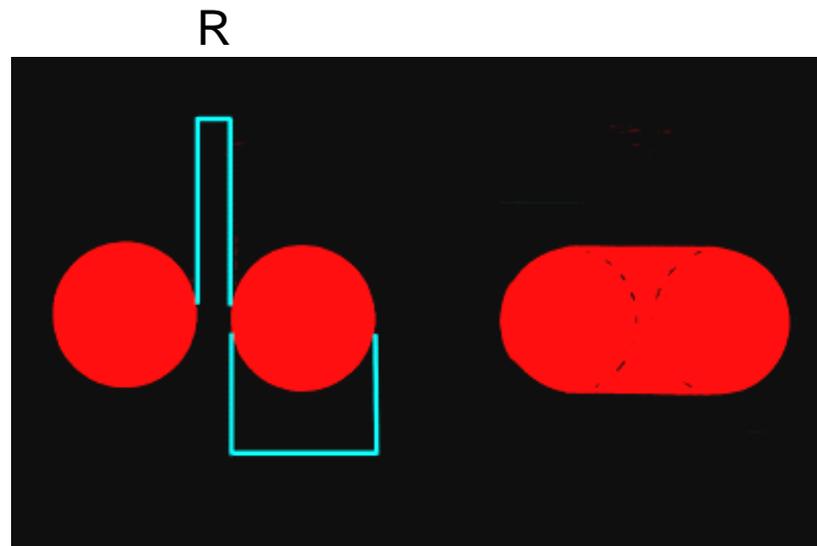


# Il potere di risoluzione

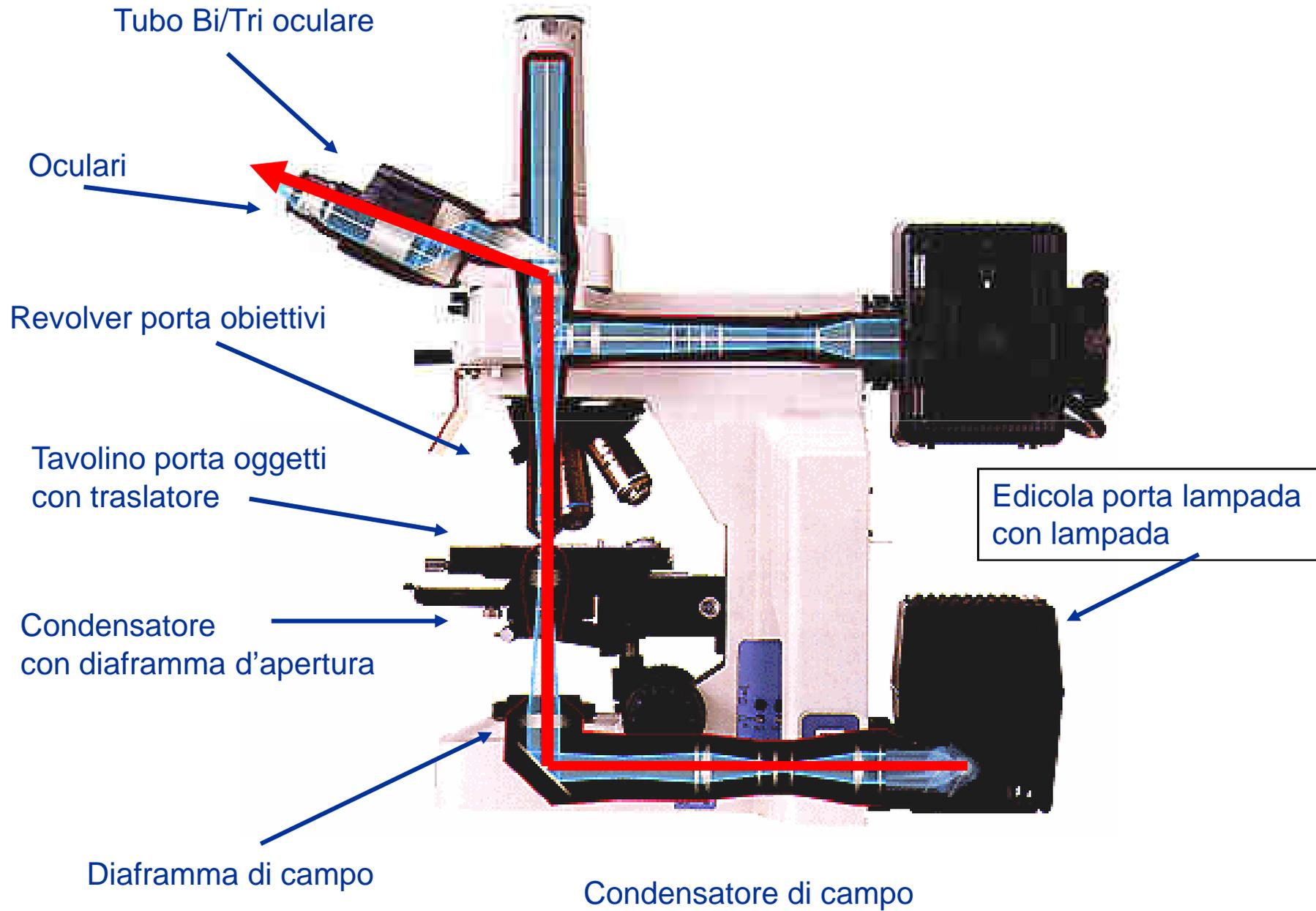
Potere di risoluzione (R): la minima distanza tra due oggetti a cui i due oggetti si vedono distinti

Per quello che riguarda l'occhio umano:  $R=50\text{mm}$

Per quello che riguarda il microscopio ottico:  $R=250\text{nm}$



# Il microscopio in campo chiaro



# Gli obiettivi

Sistema di lenti a corta focale, responsabili del primo ingrandimento dell'immagine



# N.A.

Indice di qualità dell'obiettivo: potere di risoluzione,  
luminosità ecc.

La risoluzione del microscopio dipende da:

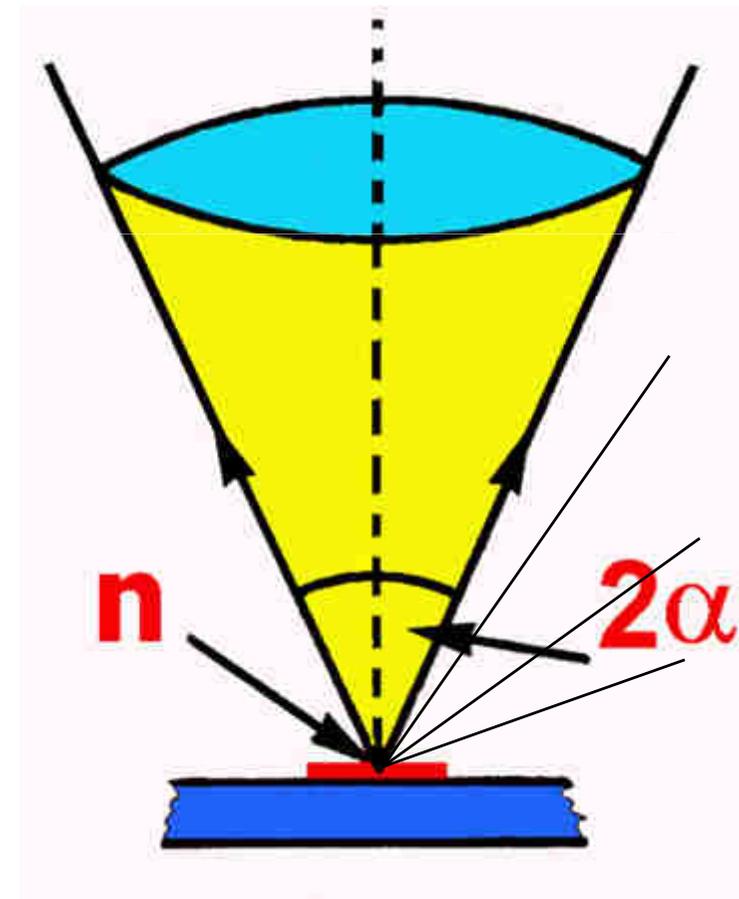
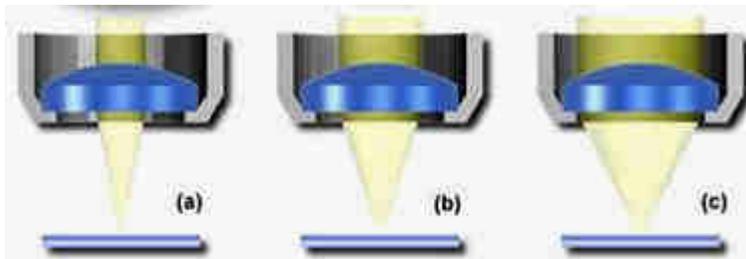
- lunghezza d'onda della luce utilizzata;
- apertura numerica (N.A.) dell'obiettivo.

$$R = 0,61 \lambda / N.A.$$

$$N.A. = n \sin \alpha$$

Descritta per la prima volta da Ernest Abbe e Carl Zeiss  
E' un parametro della qualità dell'obiettivo

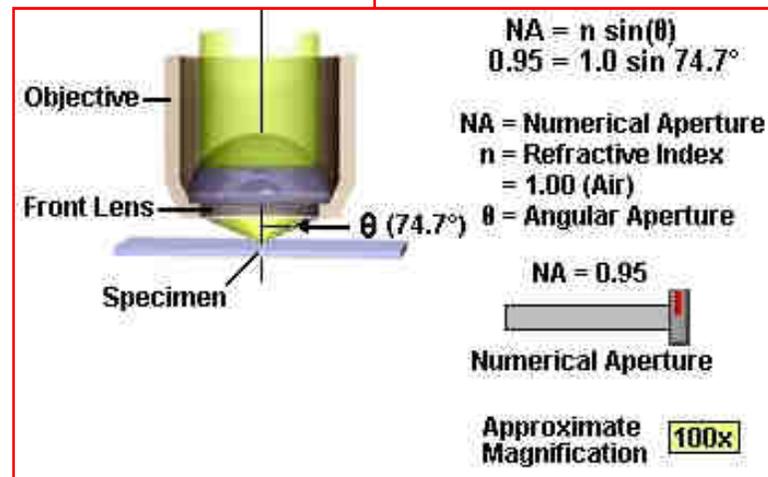
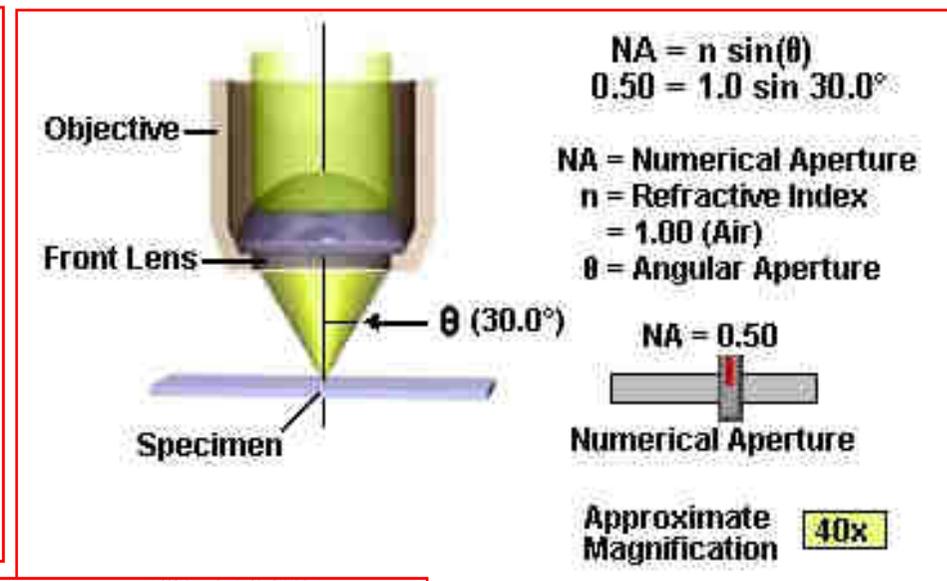
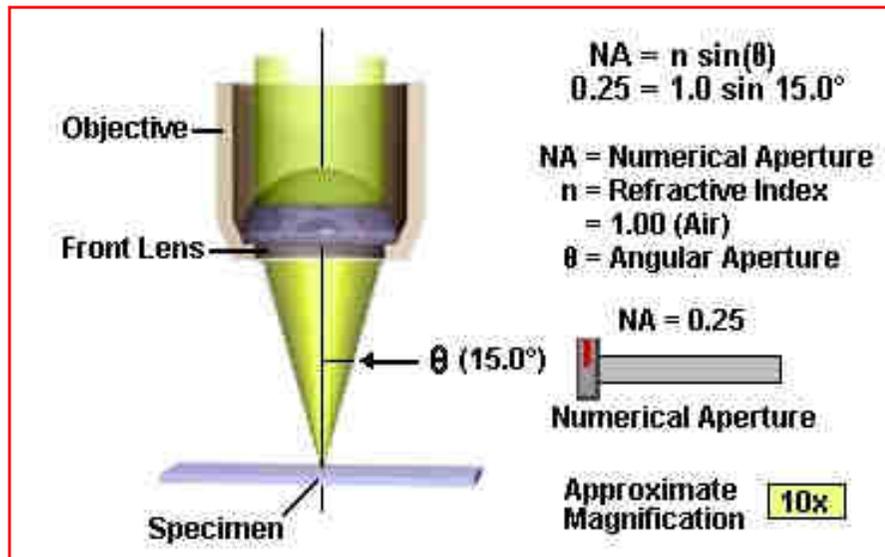
$\alpha$  sempre inferiore a  $90^\circ$



$$R = 0,61 \lambda / n \sin a$$

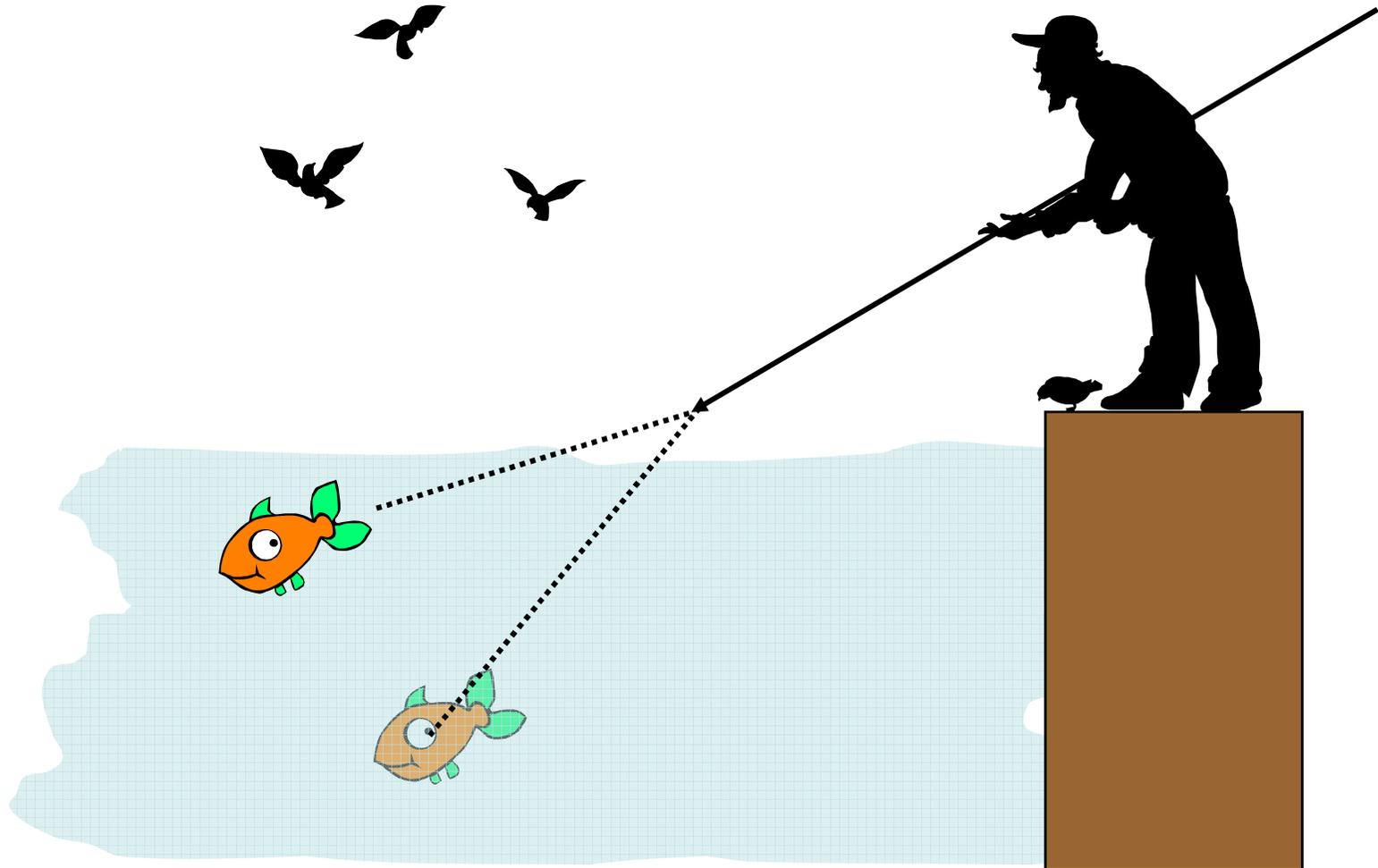
- Maggiore è l'angolo con cui l'obiettivo è in grado di raccogliere la luce maggiore è il potere di risoluzione
- Maggiore è N.A. minore è la distanza di lavoro

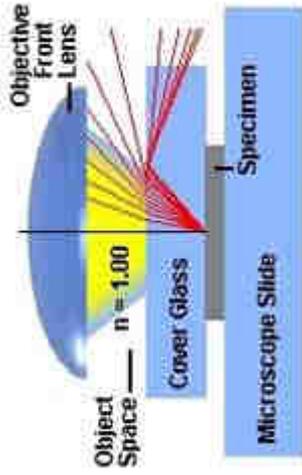
$$R = 0,61 \lambda / n \sin a$$



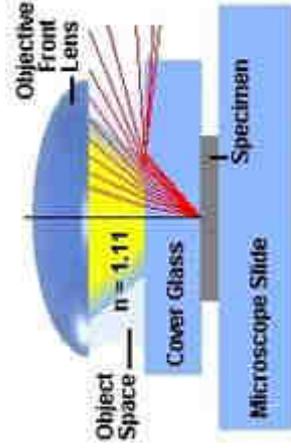
	<b>N.A</b>	<b>Resolution (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>4x</b>	<b>0.13</b>	<b>2.12</b>
<b>10x</b>	<b>0.30</b>	<b>0.92</b>
<b>20x</b>	<b>0.50</b>	<b>0.55</b>
<b>40x</b>	<b>0.75</b>	<b>0.37</b>
<b>60x</b>	<b>0.85</b>	<b>0.32</b>
<b>100x</b>	<b>1.30</b>	<b>0.21</b>

# Rifrazione

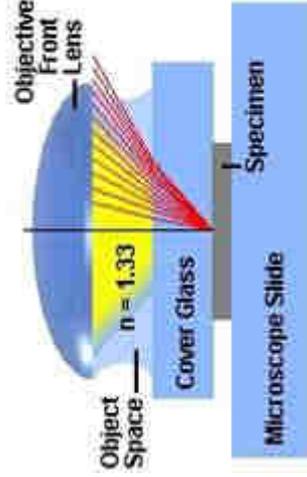




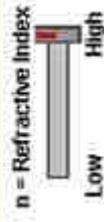
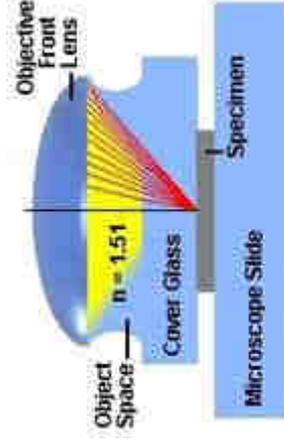
Numerical Aperture (NA) =  $n \sin(\theta)$   
 $NA = 1.00 \sin(65^\circ)$   
 $0.90 = 1.00 \sin(65^\circ)$   
 $\theta =$  Angular Aperture =  $65^\circ$



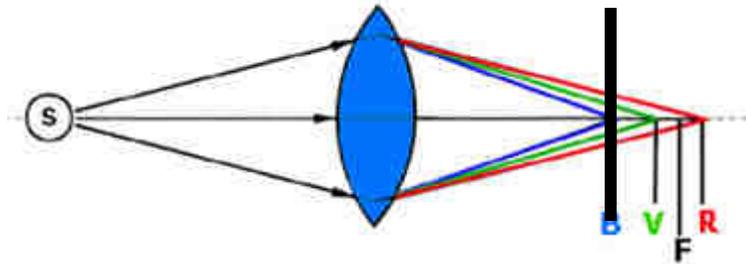
Numerical Aperture (NA) =  $n \sin(\theta)$   
 $NA = 1.11 \sin(65^\circ)$   
 $1.00 = 1.11 \sin(65^\circ)$   
 $\theta =$  Angular Aperture =  $65^\circ$



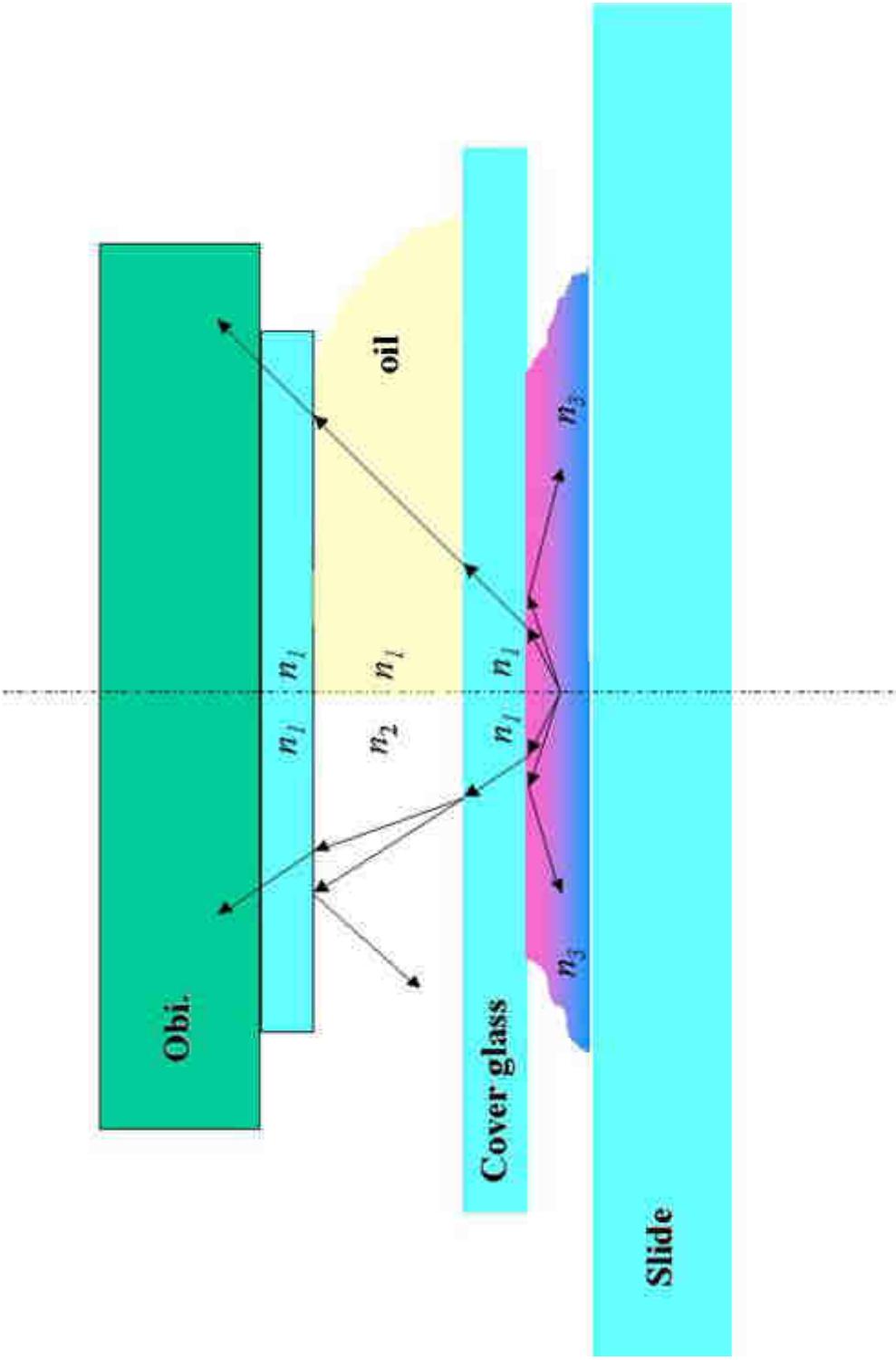
Numerical Aperture (NA) =  $n \sin(\theta)$   
 $NA = 1.33 \sin(65^\circ)$   
 $1.20 = 1.33 \sin(65^\circ)$   
 $\theta =$  Angular Aperture =  $65^\circ$



Numerical Aperture (NA) =  $n \sin(\theta)$   
 $NA = 1.51 \sin(65^\circ)$   
 $1.38 = 1.51 \sin(65^\circ)$   
 $\theta =$  Angular Aperture =  $65^\circ$

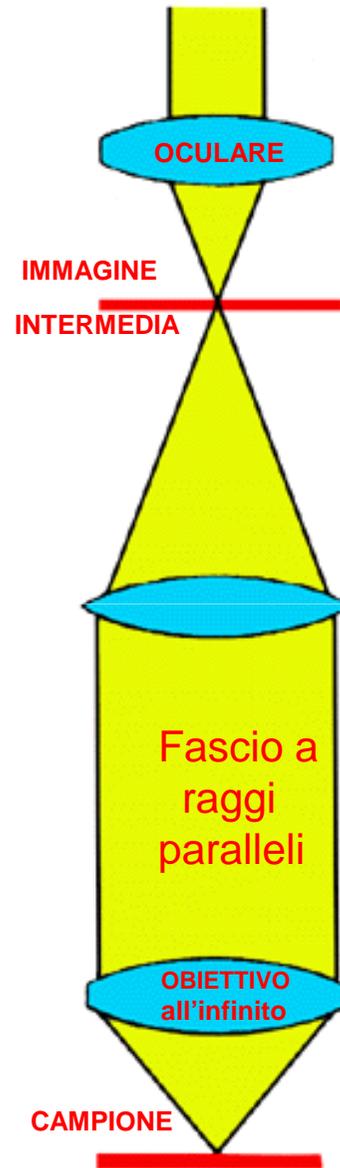
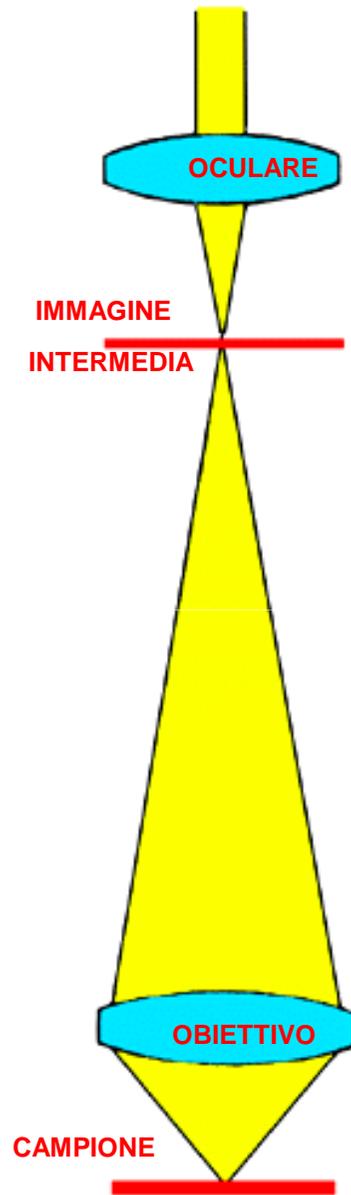


Magnification	Plan Achromat		Plan Fluorite		Plan Apochromat	
	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20



# Gli obiettivi all'infinito



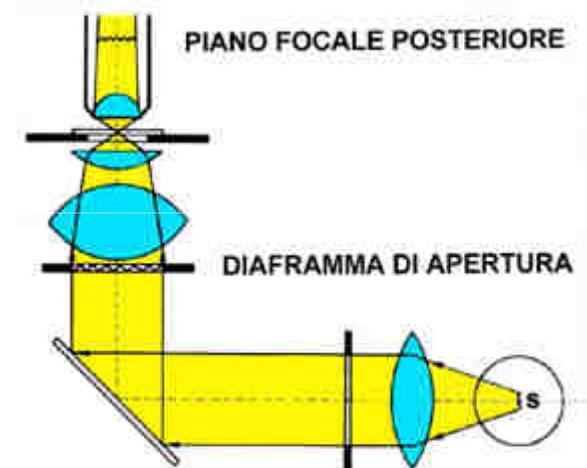
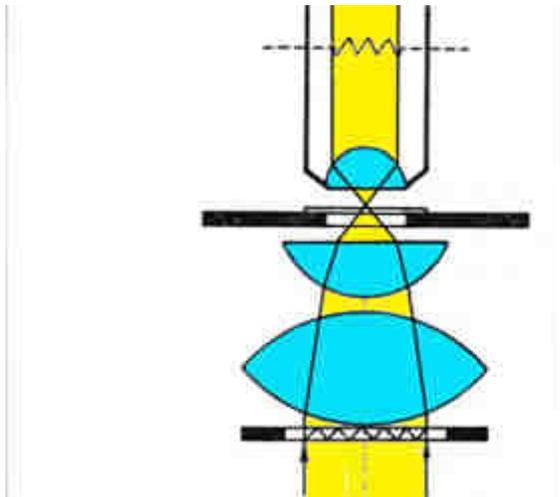


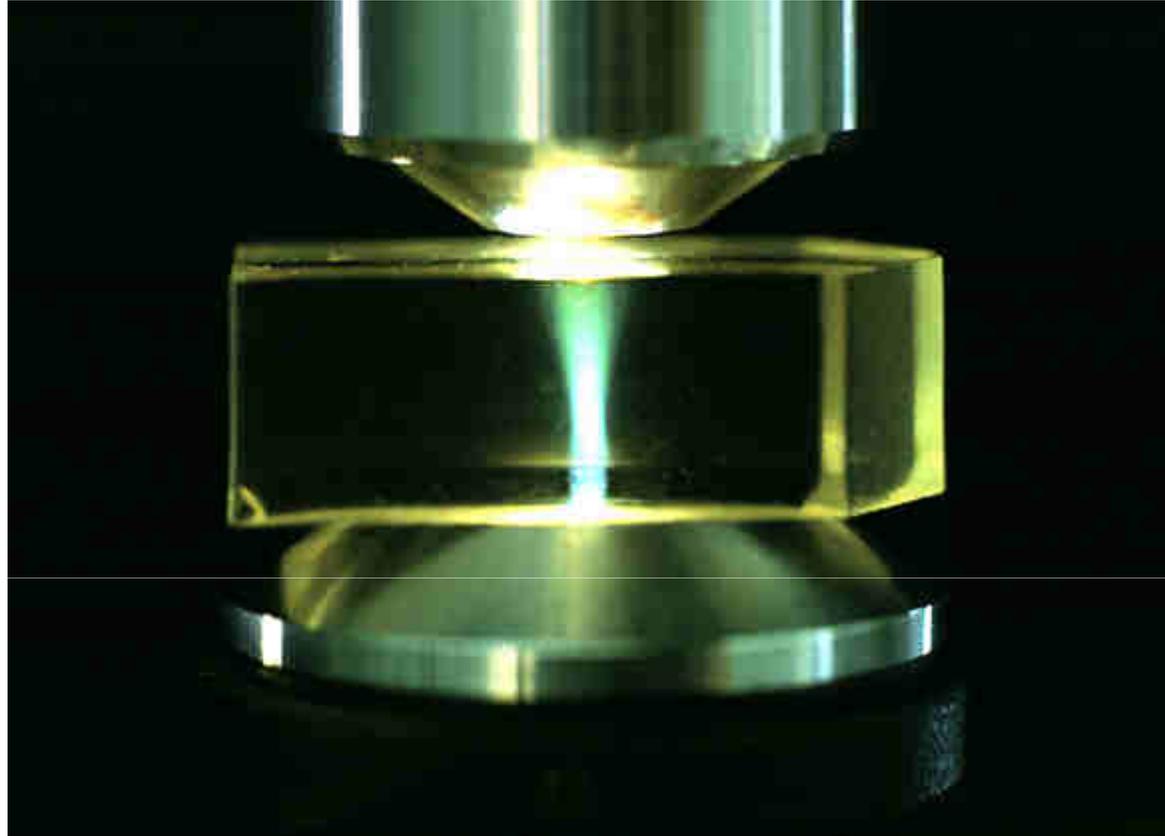
# Il condensatore

Il condensatore è posto sotto al tavolino del microscopio.

E' un sistema di lenti che converge la luce proveniente dal condensatore di campo all'obiettivo

E' fornito di un diaframma: il diaframma di apertura





Il diaframma di apertura, invia nell'obiettivo un cono di luce più o meno ampio a seconda dell'N.A. dell'obiettivo. Permette quindi di sfruttare al massimo il potere di risoluzione del microscopio.

## Le tre regole del buon condensatore

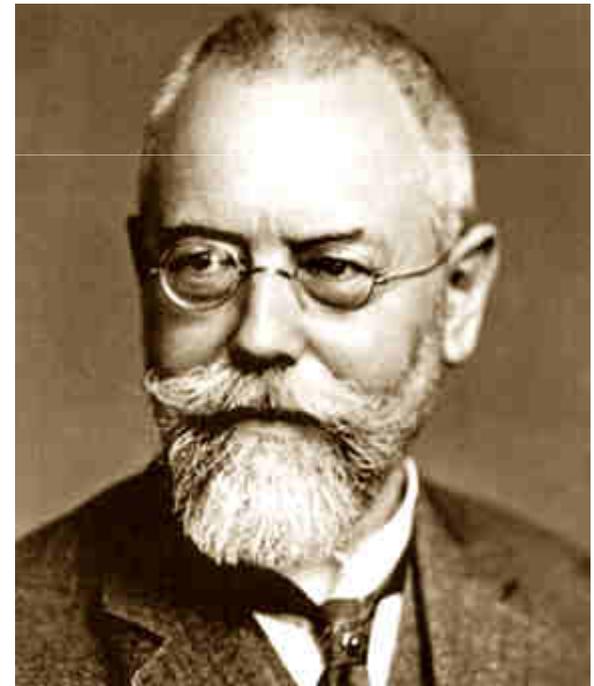
Il condensatore deve essere di massima qualità, paragonabile a quella dell'obiettivo.

Il condensatore deve avere la stessa apertura numerica dell'obiettivo. Per questo esiste il diaframma di apertura.

In “teoria” il miglior condensatore per un dato obiettivo è l'obiettivo stesso.

# La regolazione secondo Kohler

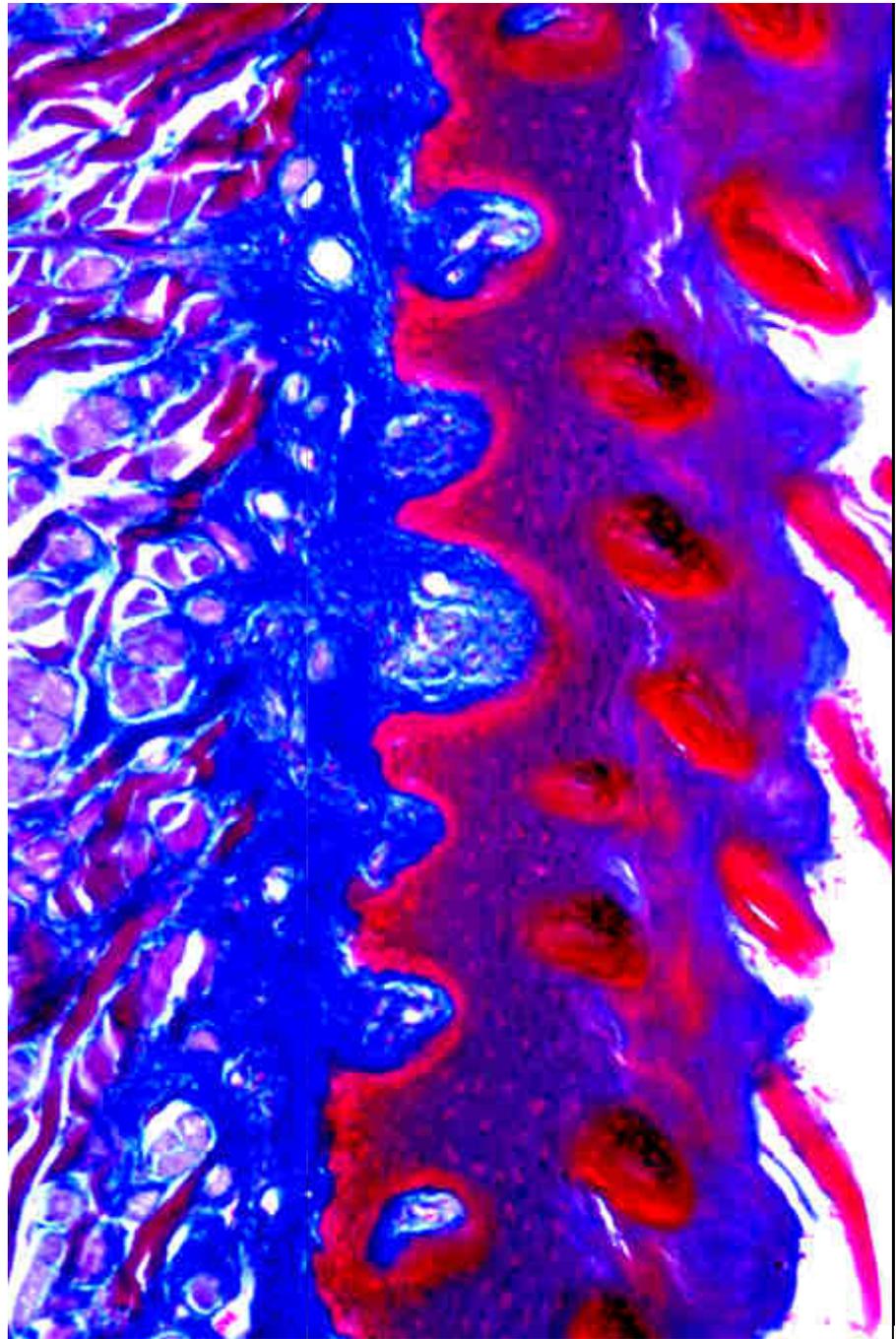
1. La distribuzione uniforme della luce su tutto il campo
2. Il massimo sfruttamento dell' A.N dell'obiettivo
3. L'eliminazione di raggi marginali e di luce diffusa che possono ridurre la qualità dell'immagine
4. La riproducibilità delle condizioni di osservazione



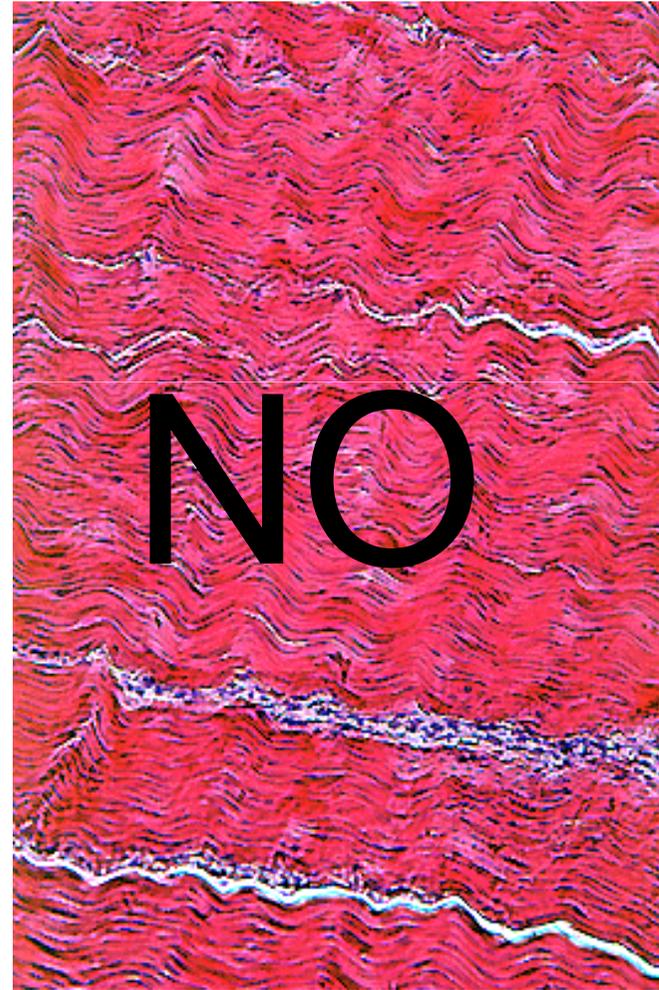
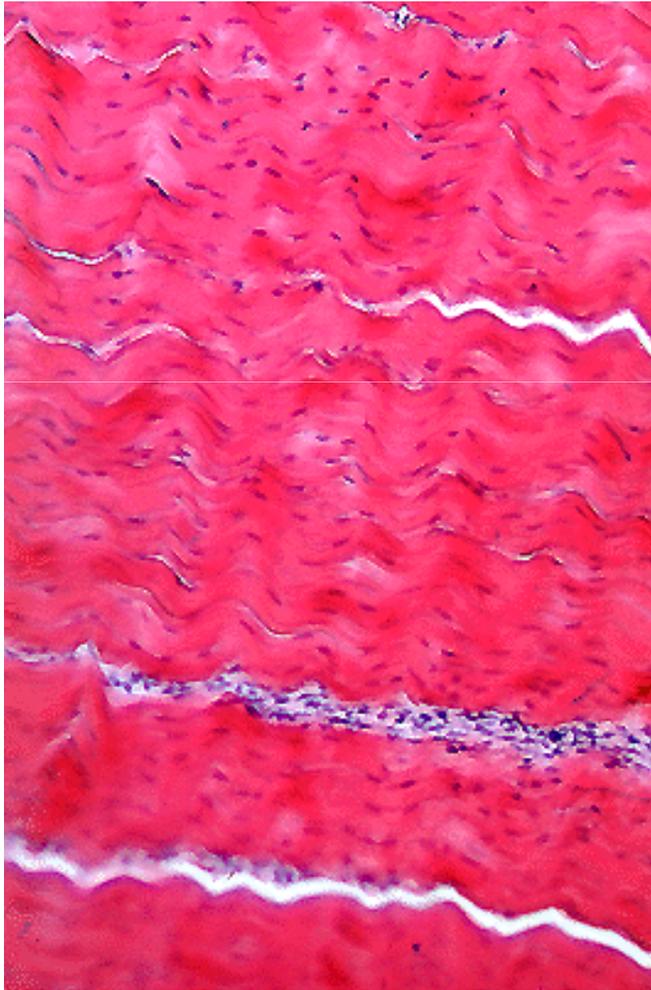
Il metodo di Kohler si applica in tre momenti successivi:

1. Centratura e regolazione in altezza del condensatore.
2. Regolazione del diaframma di campo.
3. Regolazione del diaframma di apertura.

I punti 2 e 3 vanno attuati ad ogni cambio di obiettivo.



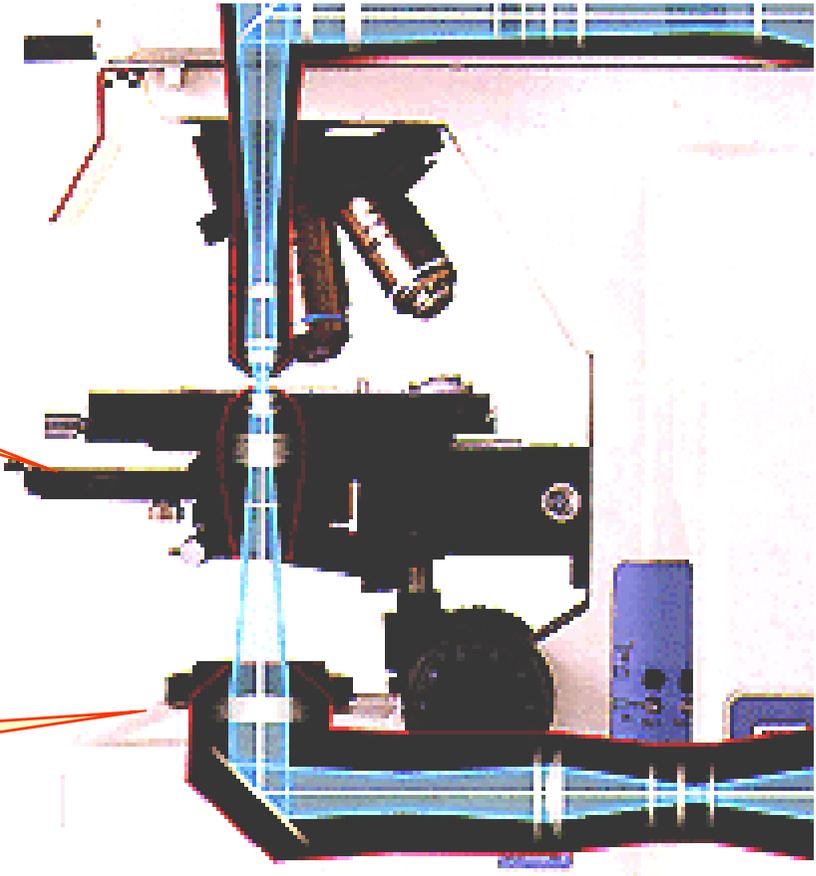
### 3°: REGOLAZIONE DEL DIAFRAMMA DI APERTURA.

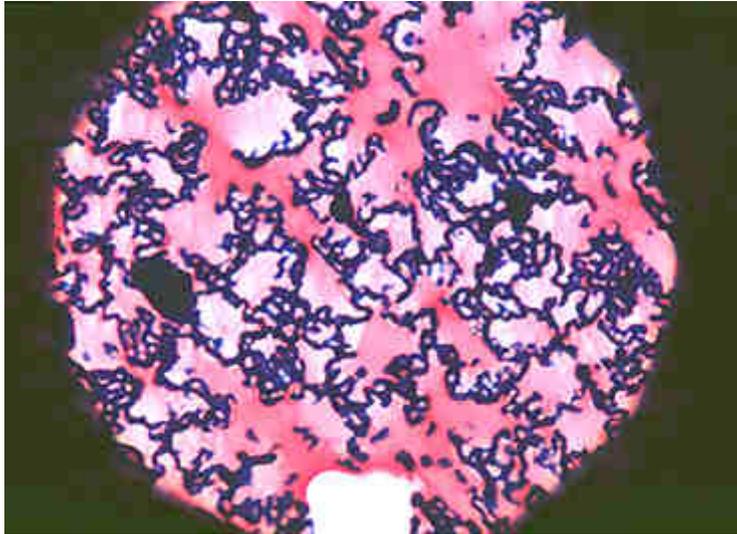


Vale la pena di sottolineare ulteriormente la funzione dei diaframmi di campo e di apertura.

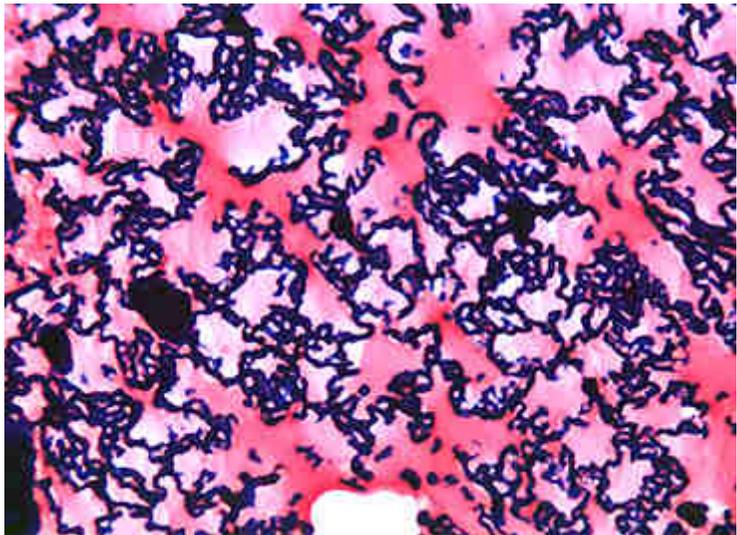
**DIAFRAMMA  
DI APERTURA**

**DIAFRAMMA  
DI CAMPO**

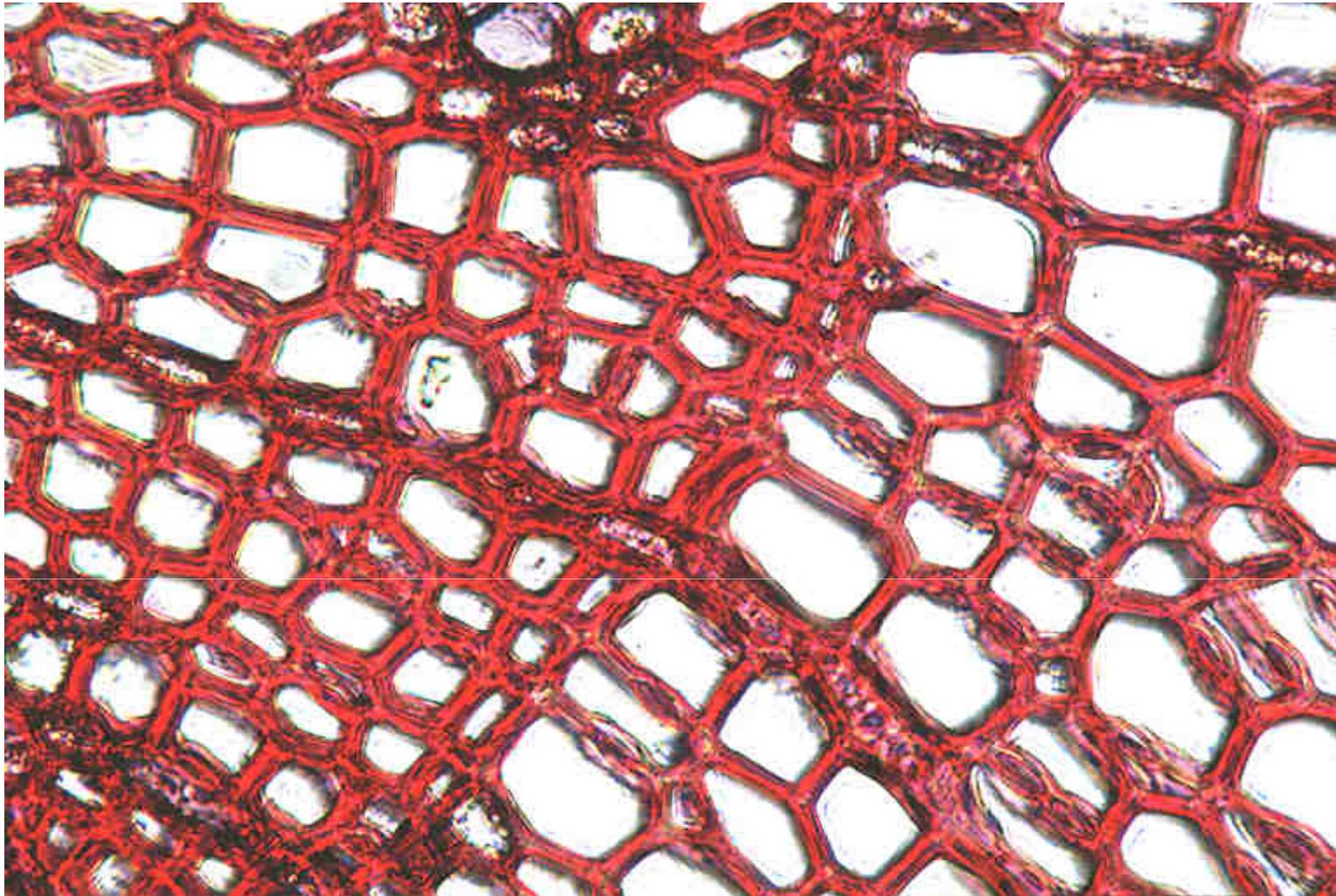




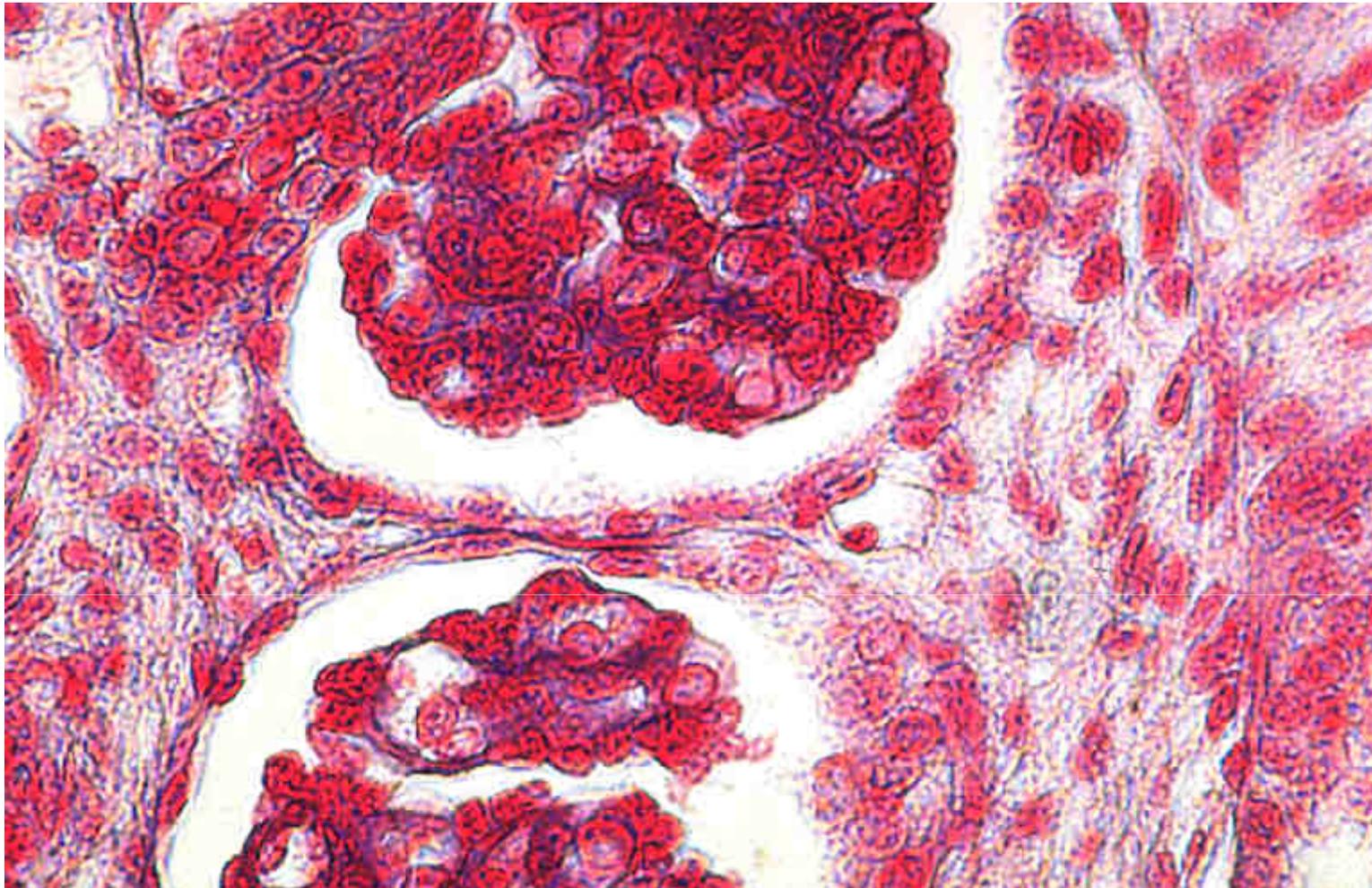
Il diaframma di campo varia la sezione del fascio ottico, illuminando superfici più o meno ampie del campo microscopico.



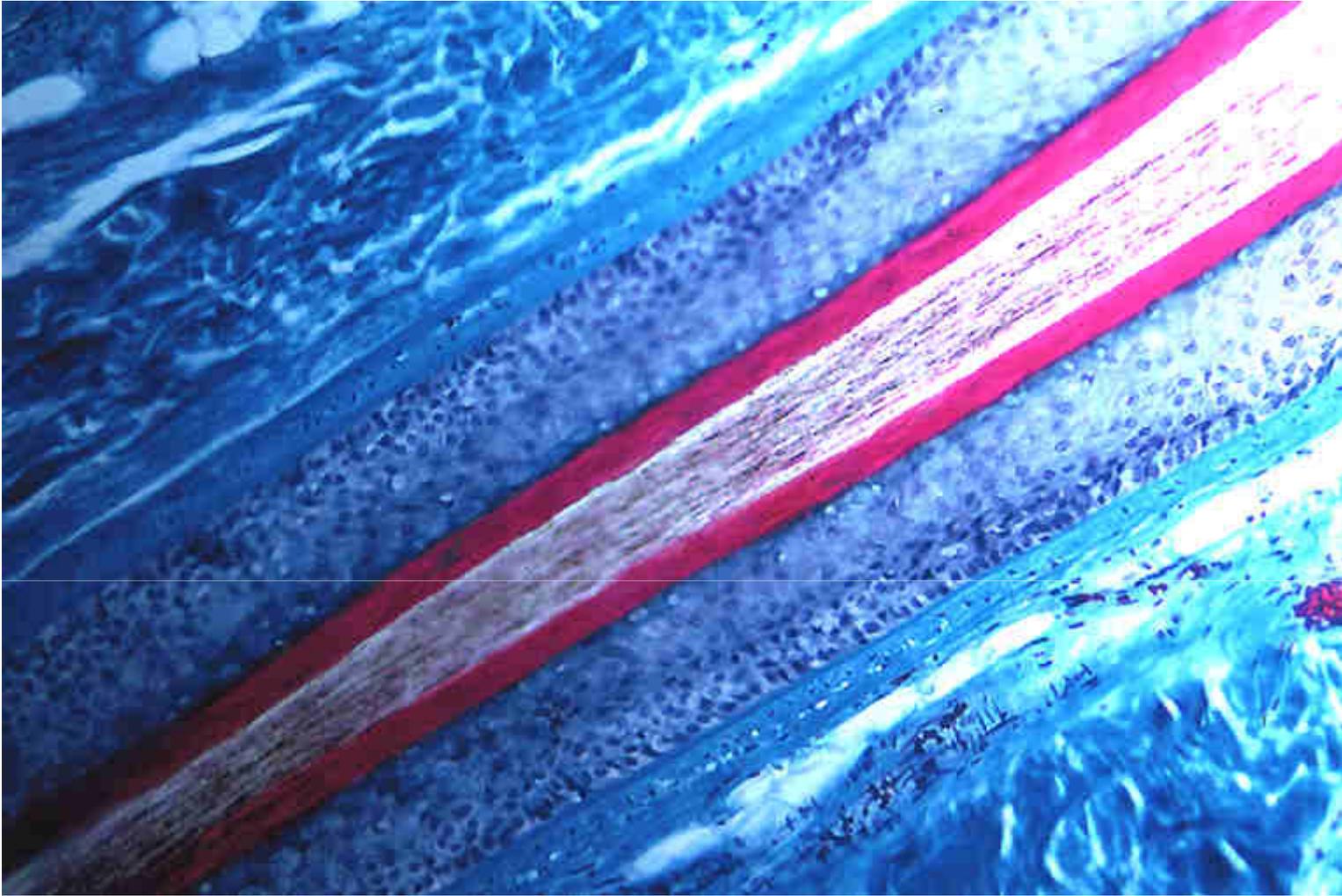
La sua regolazione, in funzione dell'obiettivo usato, permette di inviare sul campione solo la luce necessaria ad illuminare il campo visto da quell'obiettivo.



Fotomicrografia di qualità scadente a causa del condensatore tenuto troppo basso.



Fotomicrografia di pessima qualità a causa del diaframma di apertura troppo chiuso, che determina una forte riduzione del potere di risoluzione.



Il condensatore dovrà essere accuratamente centrato, pena la difformità di illuminazione del campo.