

## IL CAMPO ILLUMINATO DEL MICROSCOPIO

L'oggetto che si osserva al microscopio, di solito, va illuminato, e ne va illuminata almeno quella porzione che è visibile negli oculari. Non è sempre facile, specialmente se si pretende la maggior omogeneità possibile in questa illuminazione.

Senza entrare in dettagli che sono descritti in altri testi presenti sul medesimo sito, limitiamoci a richiamare alcuni termini e fenomeni essenziali nel campo della microscopia.

Dato un generico sistema ottico convergente, per es. un obiettivo da microscopio, davanti ad esso sta un “**oggetto**”, supponiamo sottile, piano e perpendicolare all'asse ottico. Per noi potrebbe essere una sezione di tessuto su un porta-oggetto. Dall'altra parte del sistema convergente vi sarà l'**immagine** reale dell'oggetto, generalmente ingrandita, teoricamente piana, sottile ed anch'essa perpendicolare all'asse. Se l'immagine è virtuale, sta dalla stessa parte dell'oggetto.

In un microscopio, abbiamo l'oggetto in senso stretto (il preparato), che è l'oggetto per l'obiettivo. L'immagine di esso, per l'obiettivo, è l'immagine intermedia. A sua volta, l'immagine intermedia funziona da oggetto per l'oculare; l'immagine finale fornita dall'oculare, per l'osservazione, è virtuale e si trova davanti all'osservatore, ad una distanza che dipende dalla messa a fuoco.

La porzione del piano oggetto<sup>1</sup> che è utilizzata dal sistema ottico si chiama “**campo oggetto**” (campo lineare, più propriamente, per distinguerlo dal campo angolare); la porzione utilizzata del piano immagine sarà il “**campo immagine**”. Se l'immagine è virtuale, come nell'osservazione attraverso un oculare, non si può parlare di campo immagine lineare<sup>2</sup>, ma di **campo “angolare”**, espresso dall'angolo sotteso da un diametro dell'immagine ed avente il vertice nella pupilla dell'osservatore. Il campo angolare di un oculare è la misura dell'ampiezza del “campo visuale” dell'oculare stesso, così come appare all'occhio.

In un microscopio composto, vi è un solo diaframma<sup>3</sup> che limita il campo visuale durante l'osservazione: il **diaframma di campo visivo** contenuto nell'oculare. Chi mette l'occhio ad un oculare, la sola cosa che è sicuro di vedere è un'immagine (virtuale) di quel diaframma. Se l'oculare è “positivo”, fra il diaframma e l'obiettivo non vi è altro elemento ottico essenziale: eventuali “lenti di tubo”, filtri, prismi, ecc. non hanno rilevanza per il nostro discorso. Se invece l'oculare è negativo, fra diaframma ed obiettivo vi è la “lente di campo” (la lente inferiore dell'oculare stesso), quasi sempre convergente, che serve a contrarre l'immagine intermedia, aumentare il campo angolare dell'oculare, ecc. Ciò significa che, in un oculare positivo, il diametro del diaframma di campo visivo corrisponde al diametro effettivamente utilizzato dell'immagine intermedia ( $s'$ )<sup>4</sup>; in un oculare negativo, invece, la porzione utile dell'immagine intermedia è un po' più grande del diametro del diaframma.

Ma, a parte questa sottigliezza, è chiaro che la porzione di immagine intermedia che è visibile nell'oculare rappresenta il “campo oggetto” per l'oculare, e l'oculare serve a dare all'occhio un'immagine virtuale ingrandita di questo “oggetto”.

A questo punto, risulta dunque che quanto è visibile nell'oculare corrisponde ad una parte dell'immagine intermedia, parte limitata dal diaframma di campo visivo. Questo

<sup>1</sup> per l'esattezza, il suo diametro

<sup>2</sup> lo si potrebbe fare in teoria, ma in pratica la posizione e quindi il diametro dell'immagine finale sono assai mutevoli poiché dipendono dalla messa a fuoco. Il campo angolare è invece indipendente dalla messa a fuoco poiché, al variare di quella, diametro e distanza dell'immagine finale variano nella stessa misura.

<sup>3</sup> In microscopia, un diaframma è costituito in genere da una lamina forata perpendicolare all'asse: foro circolare centrato. Tale foro limita il diametro del fascio che l'attraversa.

<sup>4</sup> Il diametro dell'immagine intermedia utilizzata dall'oculare è chiamato “indice di campo” ed indicato con  $s'$ .

diaframma limita dunque il campo immagine dell'obbiettivo ed allo stesso tempo il campo oggetto dell'oculare. Ma tale "campo" corrisponde ad una parte dell'oggetto, del vetrino (l'oggetto dell'obbiettivo); il diametro di tale parte misura il campo oggetto dell'obbiettivo (e si indica con  $s$ ).

Dopo queste acrobazie concettuali, veniamo al problema: quanto è grande il campo oggetto dell'obbiettivo, cioè del microscopio, che va omogeneamente illuminato? In altre parole: quanta parte del piano del vetrino si vede nell'oculare? Ovvero, di quanto può variare  $s$ ?

È ovvio che  $s$  è pari ad  $s'$  diviso l'ingrandimento dell'obbiettivo<sup>5</sup> ( $M_{ob}$ ), visto che i due piani sono coniugati:

$$s = s' : M_{ob} \quad \text{ovvero} \quad s' = s \times M_{ob} \quad (1)$$

Occorre allora sapere entro quali limiti possono variare sia  $s'$  sia  $M_{ob}$ . Si noti che entrambi i valori sono sempre dichiarati dai costruttori seri.

$s'$  dipende dalla struttura dell'oculare ma, nel calcolo, il progettista tiene conto del campo entro il quale egli riesce a ridurre ad un livello accettabile le aberrazioni dell'obbiettivo. A parte gli elementi soggettivi legati a quel "livello accettabile", in pratica l'indice di campo  $s'$  è minore negli oculari più forti (può scendere a 5 – 6 mm) e sale a 18/20 mm negli oculari classici deboli, per superare 26 mm in certi oculari moderni "a grande campo".

$M_{ob}$  può variare da 4:1 negli obbiettivi classici<sup>6</sup> fino a 100:1 in quelli ad immersione<sup>7</sup>.

Il limite inferiore di  $s = s' : M_{ob}$  si ha quindi con i valori minimi di  $s'$  (6 mm, ad es.) e massimi di  $M_{ob}$  (per es. 100:1):  $s = 6 : 100 = 0,06$  mm. Il limite superiore di  $s$  si ha invece dal massimo di  $s'$  (26 mm, per es.) e dal minimo di  $M_{ob}$  (4:1, ad es.):  $s = 26 : 4 = 6,5$  mm.

**Il rapporto fra valore massimo e minimo di  $s$  è pari dunque a  $6,5 : 0,06 = 108,3$ .**

Questo calcolo non è gratuito: infatti, se l'oggetto osservato dall'obbiettivo deve essere uniformemente illuminato, occorre che anche il fascio illuminante abbia un diametro che varia da 0,06 a 6,5 mm. È questo l'argomento di questo saggio.

Di primo acchito si potrebbe dire: nessun problema; basta creare un fascio illuminante di diametro pari ad almeno 6,5 mm, e quello andrà bene per tutte le condizioni. Ma ...

Un fascio illuminante di diametro superiore allo stretto necessario comporta qualche inconveniente; tutta la radiazione che non contribuisce direttamente alla formazione dell'immagine provoca:

-- radiazione diffusa all'interno dell'oggetto; tale radiazione viene almeno in parte accolta dall'obbiettivo e, in un modo o nell'altro, si sparpaglia nel piano dell'immagine intermedia ed abbassa il contrasto nell'immagine;

-- riflessi interni nelle montature delle lenti, data la sua eccessiva obliquità;

-- le porzioni dell'oggetto esterne al campo effettivamente osservato vengono sottoposte ad un inutile irraggiamento e ciò provoca riscaldamento, decolorazione di molti coloranti (generalmente si tratta di coloranti organici termolabili e sensibili anche all'ultravioletto), uccisione di cellule o microrganismi viventi.

Per questi motivi, i migliori sistemi illuminanti per microscopio sono costruiti secondo lo schema di Köhler, che prevede appunto la limitazione del campo illuminato al minimo necessario. Per i dettagli su questo schema, vedi: "Problemi tecnici della microscopia ...", cap. 8, ed altri testi nel medesimo sito.

È dunque preferibile che il diametro del campo illuminato<sup>8</sup> non sia fissato sul valore massimo, ma possa variare fra 0,06 e 6,5 mm.

Consultando l'articolo n° 2 ("Sguardo generale ai metodi ..."), apparirà chiaro che i

<sup>5</sup> Nel calcolo di  $M_{ob}$  si tiene ovviamente conto della presenza della eventuale lente di tubo, di sistemi intermedi col relativo "fattore di tubo", ecc.

<sup>6</sup> Può scendere ad 1:1 in certi obbiettivi speciali.

<sup>7</sup> Anche in questo caso, vi sono eccezioni: sono stati costruiti obbiettivi fino a 250:1.

<sup>8</sup> Nel testo, supponiamo tacitamente che il diametro del campo oggetto  $s$  e del campo illuminato  $s_i$  coincidano.

metodi di illuminazione in trasparenza (o diascopea) e quelli in riflessione (o episcopia) hanno in comune parecchio, in quanto l'obbiettivo in episcopia funge da condensatore ed ha proprietà simili a quelle di un normale condensatore da diascopea. Dunque, il discorso che faremo si applica in genere ad entrambi i campi di osservazione.

Dalla lettura dei testi citati appare anche chiaro che il fascio illuminante che incide, da sotto o da sopra, sul piano oggetto deve possedere un'apertura simile a quella dell'obbiettivo; anche questa somiglianza nei valori di apertura accomuna obbiettivo e condensatore<sup>9</sup>.

Allora, come si ottiene un fascio illuminante del diametro di 0,06 – 6,5 mm, con un'apertura massima di 0,9 (a secco) o 1,25 almeno (in immersione doppia)?

Ebbene, a fornire l'apertura richiesta provvede un sistema convergente a corta focale e forte apertura chiamato “condensatore” che si trova, rispetto al piano oggetto, dalla parte opposta e simmetricamente disposto nei confronti dell'obbiettivo (in diascopea), oppure dalla stessa parte e come immagine riflessa dell'obbiettivo (in episcopia).

E per variare il diametro nella misura descritta? Ecco il problema.

Se, ad una distanza superiore al doppio della sua focale (a pochi centimetri, in pratica), si pone davanti al condensatore un oggetto luminoso, che possiamo genericamente chiamare “sorgente”, il condensatore ne fornirà un'immagine reale, impiccolita e rovesciata, secondo il noto schema (fig. 1). Vedremo fra poco in cosa consiste questa “sorgente”, ma intanto si può costruire uno schema generale di illuminazione, secondo la fig. 2 o 3.

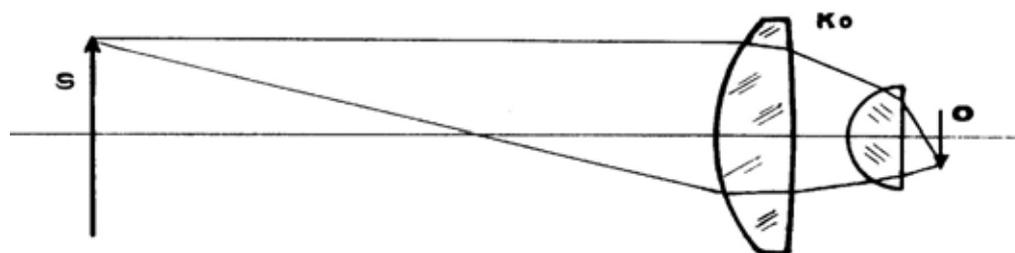


Fig. 1 – Schema di funzionamento di un condensatore per microscopio. S è la sorgente; Ko è il condensatore; in O il piano del preparato, ove si forma l'immagine di S.

Torniamo allora alla conclusione di cui sopra: il campo oggetto dell'obbiettivo ( $s$ ) può variare fra circa 0,06 e 6,5 mm; se si suppone che esso debba coincidere col diametro del campo illuminato (indicato con  $s_i$ ), da cosa dipende il valore di  $s_i$ ? In uno schema come quello di figura 1, esso è pari alle dimensioni (diametro) della sorgente S moltiplicato l'ingrandimento del condensatore (chiamiamolo  $M_k$ ). Ed  $M_k$  da cosa dipende? Dalla focale del condensatore ( $f_k$ ) e dalla distanza fra sorgente S e condensatore stesso (a):

$$M_k = f_k : a. \quad (\text{formula approssimata}) \quad (2)$$

A questo punto, non occorre stabilire i valori massimi e minimi: calcoliamo i valori medi, relativi ad un condensatore tipico, costruito secondo lo schema di Abbe, contenente una lente inferiore biconvessa (convessità maggiore in basso) ed una “frontale” quasi emisferica, colla superficie piana in alto, di minor diametro. La focale si aggira sui 12 mm.

Valori minori ridurrebbero troppo la “distanza frontale” o “distanza libera di lavoro”, cioè la distanza fra la superficie superiore del condensatore ed il piano in cui si forma l'immagine della sorgente (in cui deve stare il preparato): poiché i preparati per microscopio si appoggiano di solito su un “vetrino portaoggetto” dello spessore medio di 1 mm, deve esservi spazio per un tale vetrino sopra il condensatore. Valori maggiori della focale  $f_k$  porterebbero ad eccessivi valori nel diametro delle lenti. Ogni costruttore cerca il miglior compromesso.

<sup>9</sup> Stiamo parlando dell'apertura massima del condensatore; in certi casi, conviene ridurla con l'apposito “diaframma d'apertura”, ma il valore massimo deve essere sempre raggiungibile.

Anche la distanza  $a$  fra sorgente e condensatore deve obbedire a molte esigenze di ingombro e compatibilità colle altre parti dello strumento. Prendiamo un valore medio di 100 mm. Allora sarà, secondo la (2):  $M_k = f_k : a = 12 : 100 = 1 : 8,3$  circa. Se l'ingrandimento, che sarebbe poi una riduzione, operato dal condensatore è di oltre 8 volte, un campo illuminato di 0,06 mm esige un diametro della sorgente di  $0,06 \times 8,3 = 0,5$  mm circa. Al valore massimo di  $s_i$ , che è di 6,5 mm nel nostro esempio, il diametro della sorgente dovrà essere  $6,5 \times 8,3 = 54$  mm circa.

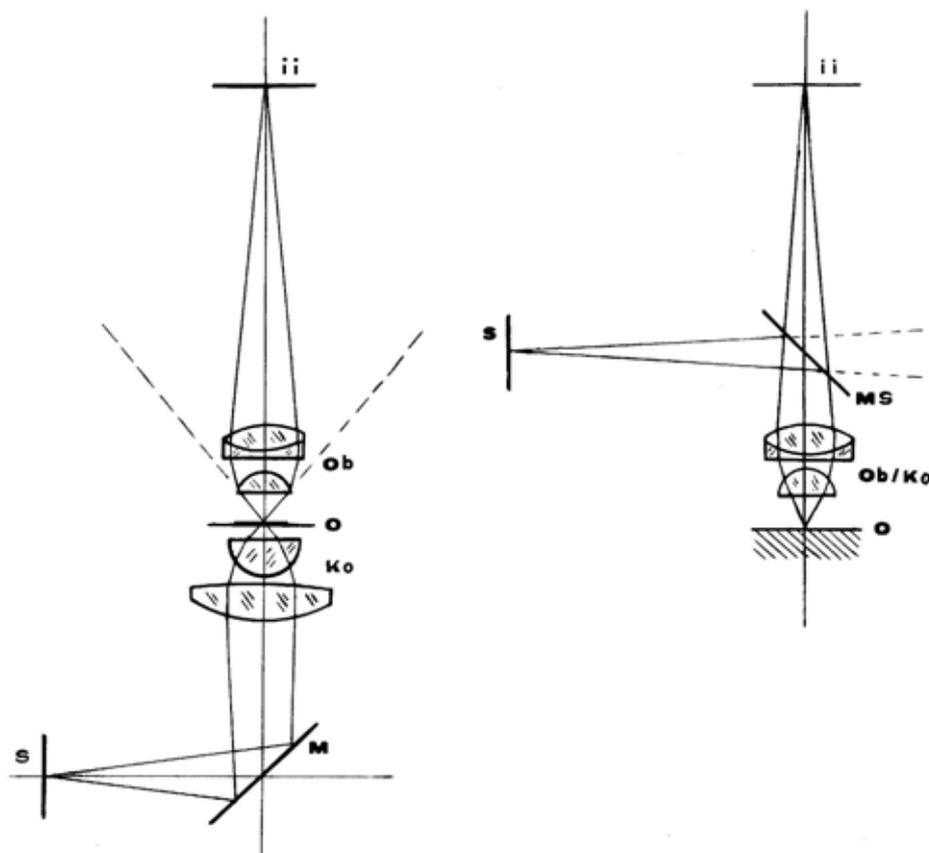


Fig. 2 e 3 – Schema generico di sistema illuminante per la diascopeia (sinistra) e l'episcopia (destra). S = sorgente; M = specchio; MS = semiriflettente; Ko = condensatore; O = piano oggetto; Ob = obiettivo; ii = immagine intermedia.

Ora sappiamo che la “sorgente” la cui immagine deve illuminare l'oggetto, deve avere un diametro variabile fra 0,5 e 54 mm, indicativamente.

Come si ottiene una tale sorgente a diametro variabile? Ritorniamo alla fig. 1. Il segmento S rappresenta il diametro di qualcosa che emette luce in direzione del condensatore, con una brillantezza ragionevolmente uniforme ed un diametro compreso fra 0,5 e 54 mm.

Il sistema più semplice di variare S è di porre, davanti alla sorgente vera e propria, un diaframma regolabile, del tipo “ad iride”, come si usa negli obiettivi fotografici. Tale diaframma limiterà le dimensioni utili della sorgente e quindi della sua immagine (creata dal condensatore) e quindi del campo illuminato. Il suo nome ufficiale è “diaframma di campo illuminato”; in breve: “**diaframma di campo**”.

Ma la variazione del diametro di un tale diaframma è sufficiente a coprire l'intervallo fra 0,5 e 54 mm, intervallo che è superiore a 100:1?

Per ragioni meccaniche (l'incrocio delle lamelle dell'iride), il diametro di un diaframma ad iride difficilmente scende sotto 2 mm; per ragioni di ingombro, difficilmente supera 40 mm. Il rapporto massimo/minimo dunque difficilmente supera  $40:2 = 20$ .

Ecco un altro problema: il solo diaframma di campo non basta a far variare il diametro utile della sorgente, e quindi del campo illuminato, nella misura richiesta. Quali i rimedi?

Cominciamo a ridimensionare il problema. La maggioranza delle osservazioni in campo medico e biologico vengono eseguite con obbiettivi di ingrandimento fra 10:1 e 100:1. Se l'oculare è fisso (il normale 10 ×), il rapporto massimo/minimo del diametro del campo illuminato si riduce a 10:1. A questo punto, un normale diaframma ad iride sarebbe sufficiente, ed è ciò che avviene nella maggioranza degli strumenti.

I problemi nascono in due casi. Il meno grave si presenta quando si usano oculari forti, con indice di campo  $s'$  inferiore ad 8 ed obbiettivi forti, es. 100:1. Il campo oggetto diviene, nel nostro esempio,  $8 : 100 = 0,08$  mm; con un ingrandimento del condensatore  $M_k$  pari, abbiamo supposto, ad 1:8,3 circa, il diametro del diaframma di campo dovrebbe essere  $0,08 \times 8,3 = 0,664$  mm, troppo piccolo per una normale "iride". Questa situazione viene in genere tollerata, nel senso che il campo illuminato sarà sensibilmente superiore a quanto necessario e si perderà qualcosa in termini di luce diffusa e di contrasto. Pazienza ...

La situazione opposta è invece intollerabile: supponiamo un oculare "grandangolare" con indice di campo  $s' = 25$  mm ed un obiettivo di ingrandimento  $M_{ob} = 4:1$  (caso non improbabile). Il campo oggetto è di  $25 : 4 = 6,25$  mm. Se  $M_k$  è ancora 8,3, il diametro del diaframma posto presso la sorgente dovrà essere  $6,25 \times 8,3 = 51,9$  mm circa. Troppo.

Risultato: guardando nell'oculare, si vedrà illuminato l'oggetto al centro, circondato da un anello buio. Il campo illuminato è insufficiente. E qui occorre qualche rimedio.

**1** – Supponendo di disporre di un normale condensatore del tipo "di Abbe", eliminare la microlampada col suo diaframma di campo e procurarsi una sorgente di diametro superiore a 50 mm, con brillantezza uniforme. Occorre che sul piede dello stativo, sia possibile montare un normale specchietto rotondo piano, su supporto snodato, capace di rimandare verso il condensatore il fascio prodotto dalla sorgente, ovunque questa si trovi, con qualche limite, s'intende. Vedi la fig. 5, a sinistra. Qualche esempio pratico.

**1.1** – Usare una normale lampadina ad incandescenza del tipo "opale", con bulbo diffondente, color latte, della potenza, per es., di 40 W. Qualche problema riguardo alla temperatura di colore in caso di fotografia a colori, ma va bene nell'osservazione in campo chiaro ad ingrandimenti deboli e medi.

Evitare le lampadine a bulbo smerigliato poiché difficilmente la loro brillantezza è omogenea.

**1.2** – Disporre, in luogo della sorgente, un cartoncino bianco. Illuminare quest'ultimo con un "faretto" del tipo "spot".

In commercio, viene indicata col termine "spot" (che significa "punto" in inglese) qualunque lampadina capace di fornire un fascio più o meno concentrato. Per noi, serve un fascio più concentrato possibile. Sono ottime le moderne lampadine "alogene" o "al quarzo-iodio" dotate di specchio (fig. 4). Lo specchio può essere paraboloidico od ellissoidico; il filamento si trova nel fuoco o in uno dei fuochi. La divergenza del fascio è in genere indicata sulla confezione (nel caso della fig. 4 è dichiarata "10°", ma si tratta ovviamente di un dato approssimato poiché i confini del fascio sono molto sfumati). La lampadina citata fornisce alla distanza di 10 – 15 cm un fascio di qualche cm di diametro, accettabile per illuminare il cartoncino di cui sopra. Non è possibile usare direttamente il "faretto" come sorgente poiché la sua brillantezza è fortemente inomogenea.

I migliori "spot" con specchio sono forniti di uno specchio dicromatico (comunemente chiamato "dicroico", ma è scorretto, visto che il dicroismo fa riferimento a fenomeni legati alla direzione di vibrazione della luce polarizzata); lo specchio dicromatico ha il vantaggio di trasmettere all'indietro l'infrarosso (IR) e l'ultravioletto (UV), mentre in avanti viene riflessa solo la radiazione ottica ("visibile") che risulterà "fredda", nel senso che contiene meno IR di quanto si avrebbe con uno specchio normale.

**1.3** – Rivolgere lo specchietto mobile di fig. 5 (a sin.) verso una sorgente naturale: un cielo uniformemente nuvoloso o, in assenza di nuvole, un cielo sereno, anche se "tira al blu". Va bene anche un muro bianco illuminato dal sole. Evitare oggetti opachi interposti (telaio

della finestra, rami di alberi, pali, ecc.). Anche qui, è probabile che la brillantezza sia insufficiente ai maggiori ingrandimenti. NB: mai usare la luce diretta del sole: a parte l'abbagliamento, il suo diametro angolare è minimo (inferiore ad  $1^\circ$ ).

Tali sorgenti naturali saranno in genere anche più estese del necessario. Con esse, è anche possibile usare lo specchio concavo che si trova in genere montato sulla faccia opposta dello specchio piano snodato sopra citato. Se le focali dello specchio concavo e del condensatore, nonché la distanza specchio-condensatore, sono opportune, si può realizzare lo schema di fig. 5, a destra, il cui principio è intuitivo.



Fig. 4 - Lampada "alogeno" del tipo "spot", con specchio, Sylvania FTE 35 W, 12 V,  $10^\circ$ .

Ma lo specchio concavo si può usare anche senza condensatore: il fascio da esso prodotto avrà un'apertura modesta (al massimo 0,3) ma può bastare per obiettivi dal 10:1 in giù.

Si ricordi che le sorgenti naturali e lo specchietto sono preziose nel lavoro "sul campo" o comunque dove non è disponibile un'alimentazione elettrica.

**1.4** – Utilizzare una sorgente a fiamma: candela, lampada a petrolio, lampada ad acetilene, lampada a gas, spesso munita di "reticella Auer", che ne aumenta di molto la brillantezza.

Tali lampade, con tutti i loro limiti, sono ancora preziose in mancanza di alimentazione elettrica, ma possono anche dare buoni risultati dal punto di vista ottico, sia per brillantezza, sia per omogeneità.

Certe lampade a fiamma possono avere dimensioni sufficienti per ingrandimenti non troppo piccoli.

Va notato però che queste ultime sorgenti rappresentano dei veri e propri "corpi luminosi", non un'immagine virtuale del corpo stesso, come avviene in altri schemi assai più diffusi. In altre parole, nel piano del vetrino il condensatore proietta una vera immagine reale della fiamma o della candela. Questo è lo schema dell'**illuminazione "critica"** (fig. 6); invece, nella diffusissima illuminazione secondo Köhler, come vedremo meglio, la sorgente è costituita da un'immagine virtuale ingrandita, più o meno sfocata, del corpo luminoso (di solito, il filamento di un'ampolla ad incandescenza). Tale immagine è fornita da un apposito sistema convergente, detto "collettore" (Cl in fig. 7).

A volte, lo schema dell'illuminazione critica è stato usato anche con corpi luminosi piccoli (ampolle ad incandescenza a filamento concentrato). Il rendimento fotometrico può essere elevato, ma le inhomogeneità del corpo luminoso (le spire del filamento) si ritrovano sul piano oggetto. Migliore è l'omogeneità con lampade "a nastro" di tungsteno o ad "arco di zirconio", tutte ormai introvabili.

Però lo schema "critico" raramente è sufficiente per avere un campo illuminato grande.

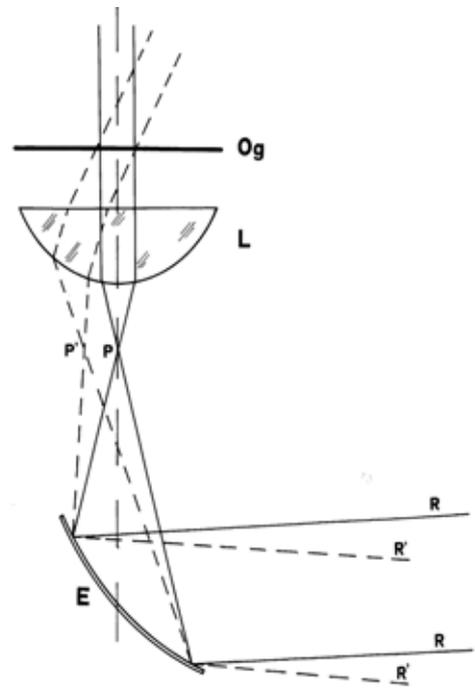
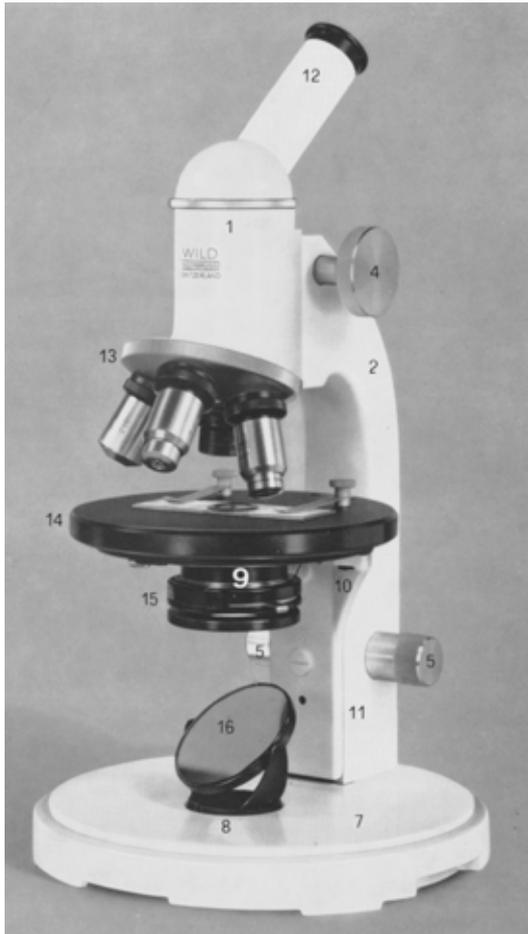


Fig. 5 - S sinistra: Stativo compatto, “da viaggio”, M 11 della WILD, con specchio orientabile (16) sulla base. (9) è il condensatore. (15) è un portafiltri estraibile. Da stampato Wild M2 120.  
A destra: possibile schema di funzionamento dello specchio concavo con condensatore.

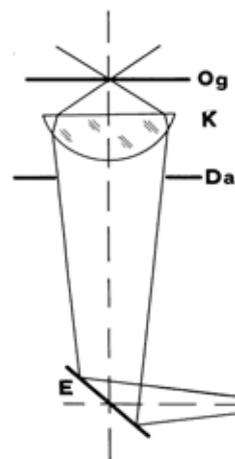


Fig. 6 - Schema di illuminazione critica con solo condensatore (K). La sorgente S è costituita da un vero e proprio corpo luminoso, la cui immagine si ritrova nel piano dell'oggetto Og. Da è il diaframma d'apertura.

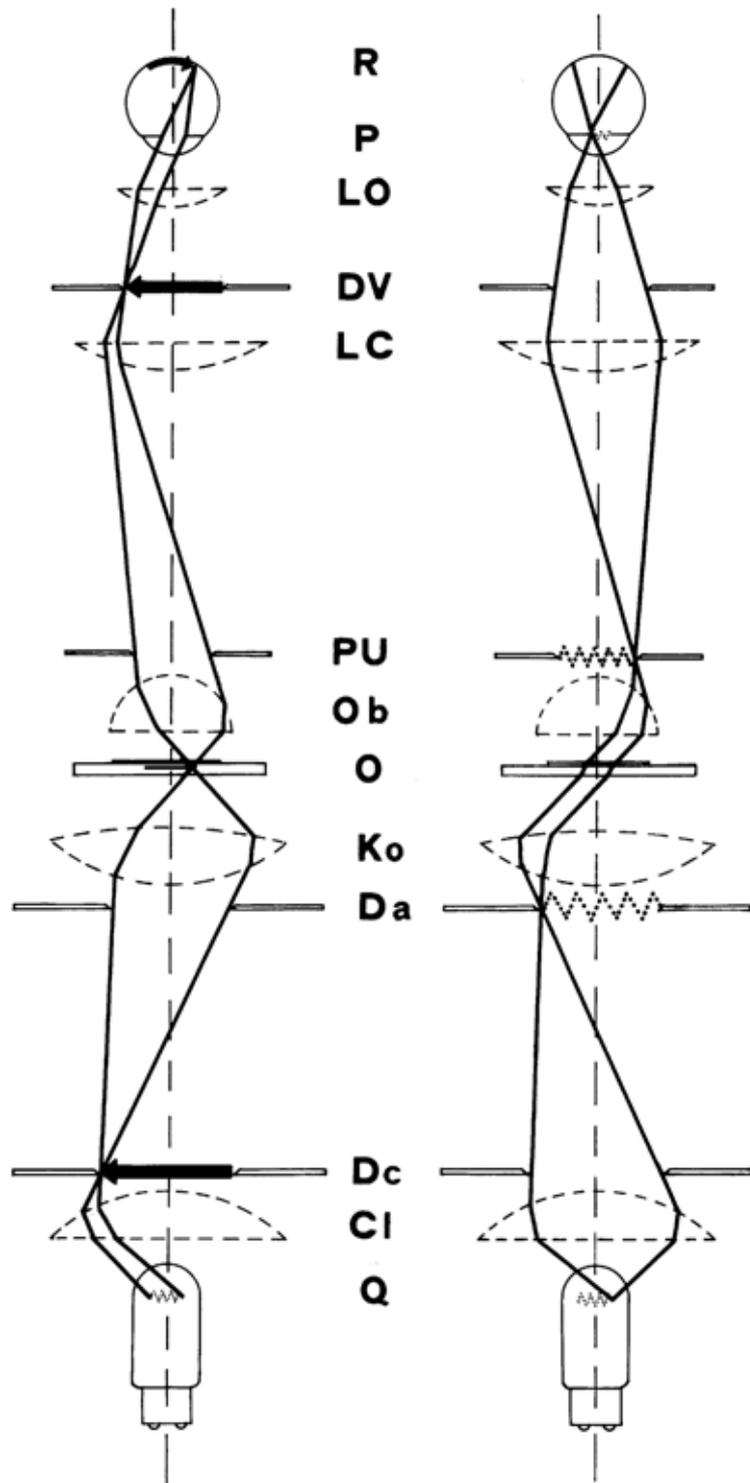


Fig. 7 - Schema generale dell'illuminazione sec. Köhler. A sinistra, le immagini coniugate dell'oggetto (freccia nera): diaframma di campo Dc - oggetto O - immagine intermedia DV - retina dell'occhio R; a destra, le immagini coniugate del filamento (linea punteggiata a zig-zag): filamento Q - diaframma d'apertura Da - pupilla d'uscita dell'obbiettivo PU - pupilla d'uscita dell'oculare P. **Cl è il collettore**; Ko il condensatore; Ob l'obbiettivo; Lc ed Lo la lente di campo e la lente oculare dell'oculare (di tipo negativo); R è la retina dell'occhio.  
 Il punto qualificante di questo schema è che l'immagine reale di Q non si forma nel piano oggetto ma in Da.

Aggiungendo un collettore, cioè una forte lente convergente, presso il filamento, il rendimento migliora molto, ed è questo lo schema della "illuminazione critica con collettore"

come si vede nella fig. 8 in cui, sotto il condensatore (10), si vede la lampada “critica” (11) con l’ampolla sferica ed il collettore, visibilmente asferico al fine di ridurne l’aberrazione sferica (vedi la didascalia della fig. 14).

L’aggiunta del collettore fa apparire assai simili queste lampade “critiche” alle lampade sec. Köhler, ma la differenza è nella funzione delle varie parti: in una vera lampada critica, il filamento si trova nel fuoco del collettore, il quale ne dà un’immagine virtuale a distanza infinita; il condensatore ne riforma un’immagine reale nel piano dell’oggetto, con le relative inomogenità. Invece, nell’illuminazione sec. Köhler, il collettore produce un’immagine del filamento nel piano del diaframma d’apertura: l’illuminamento nel piano dell’oggetto ne risulta così molto più omogeneo. Vedi anche la fig. 9.

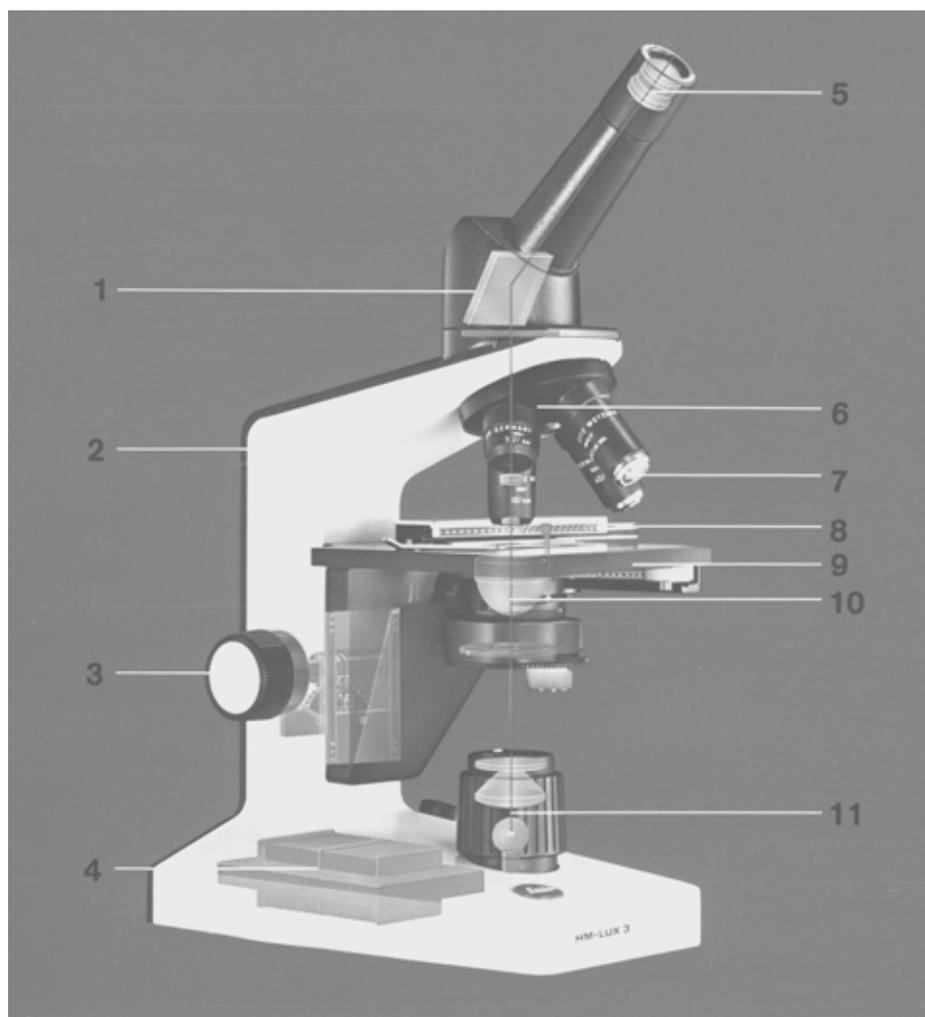


Fig. 8 - Illuminatore “critico” con lampada ad incandescenza e collettore, senza diaframma di campo. Microscopio LEITZ HM-LUX 3. (Da prospetto Leitz 355.512-164).

## 2 – Lo schema di Köhler

Finora, si è sempre supposto di risolvere il problema del campo illuminato troppo piccolo disponendo di una “sorgente” estesa, naturale o artificiale, del diametro di almeno 30 – 40 mm, di cui si può ridurre la porzione utile a mezzo di un diaframma di campo. Si è anche supposto di disporre di un condensatore di caratteristiche “normali”.

Ma di solito si dispone di una sorgente non abbastanza estesa, nel caso assai comune di una lampadina ad incandescenza a filamento di tungsteno, del tipo classico o “ad alogeni”,

che è circa lo stesso<sup>10</sup>.

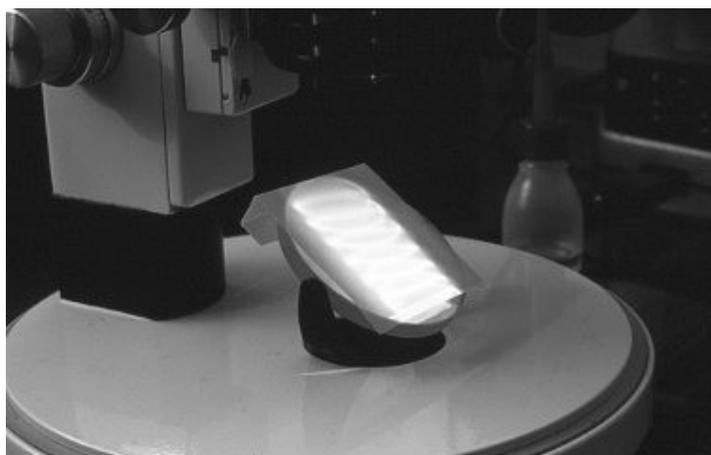


Fig. 9 – Immagine del filamento proiettata da una microlampada di Köhler sul condensatore, immagine visibile anche sullo specchio che gli sta sotto.

Il filamento può essere esteso, come nel caso delle normali lampadine, con forma a zig-zag o a semicerchio ed in questo caso non è omogeneo; oppure può essere “concentrato”, a forma di elica compatta di poche spire. I **filamenti compatti** possono essere ragionevolmente omogenei e di forma quadrata e rettangolare (l’ideale sarebbe una forma circolare, ma non si può avere tutto). In questo caso però il filamento è corto, di poche spire e quindi di bassa resistenza e va alimentato in genere a bassa tensione (da 4 a 12 V, AC o DC).

Le dimensioni dei filamenti compatti sono però piccole: da  $1,5 \times 3$  a  $3 \times 10$  mm circa.

In questo caso, non si può usare come sorgente il filamento stesso, ma una sua immagine virtuale molto ingrandita, creata da un forte sistema convergente, il già citato **collettore**. Si arriva così allo schema dell’illuminazione secondo Köhler, già accennato. Non possiamo entrare nei dettagli poiché dovremmo ripetere quanto è illustrato nel Cap. 8.8 del testo “Problemi tecnici ...”, presente nello stesso sito. Vogliamo solo sottolineare che il condensatore “vede”, “guardando” in direzione della microlampada<sup>11</sup>, un’immagine virtuale ingrandita del filamento, piuttosto sfuocata, immagine che occupa tutta la superficie della lente colletttrice.

In pratica, va ricordato che il collettore potrebbe essere coniugato col piano oggetto e cioè la sua immagine si ritroverebbe a fuoco in quel piano. Ma vi si troverebbe anche ogni irregolarità della superficie della lente, a cominciare dalla polvere. Occorre allora che il piano coniugato dell’oggetto sia non la lente ma il diaframma di campo, e che questo non si trovi proprio sul collettore, ma qualche centimetro avanti (in direzione del condensatore). Poiché il diaframma di campo è un diaframma, cioè un foro, non presenta alcuna superficie su cui possano depositarsi polvere o corpi estranei.

Ecco dunque che la famosa “sorgente” estesa, di cui siamo a caccia, viene ad essere nello schema di Köhler non un corpo luminoso, ma una sua immagine, sia pure sfuocata. Diciamo “sfuocata” poiché il filamento si trova dal collettore ad una distanza leggermente superiore

---

<sup>10</sup> Il caso delle lampade “fluorescenti” o (impropriamente) “al neon” non è molto utile in microscopia per vari motivi: - la sorgente è di grandi dimensioni, tubolare o, se avvolta a spirale, non omogenea; - la brillantezza è generalmente insufficiente, anche se il flusso totale è forte per via delle grandi dimensioni; - la temperatura di colore non è adatta alla fotografia a colori e comunque varia nel tempo ed è diversa da una lampada all’altra, anche se dello stesso tipo.

<sup>11</sup> Per “microlampada” o “illuminatore” intendiamo il complesso ottico: lampadina – (vetro smerigliato) – collettore – diaframma di campo, con tutto un corredo meccanico: involucro con meccanismi di raffreddamento – viti di centratura della lampadina o del collettore o del diaframma di campo – meccanismo di focalizzazione della lampadina o del collettore - (portafiltri) – parti elettriche, ecc.

alla focale di esso e pertanto la sua immagine è reale e si deve formare a fuoco ad una distanza superiore al doppio della focale, cioè nel condensatore (vedi la fig. 9 e lo schema di fig. 7 a destra, ove il filamento e le sue immagini coniugate sono schematizzate con linee punteggiate a zig-zag); ciò non toglie che, guardando dentro al collettore, si veda una traccia del filamento (fig. 10), particolarmente evidente se la focalizzazione del filamento (distanza filamento-collettore) non è corretta. Una traccia di questa immagine sfocata del filamento si trova poi nel piano-oggetto (fig. 11).

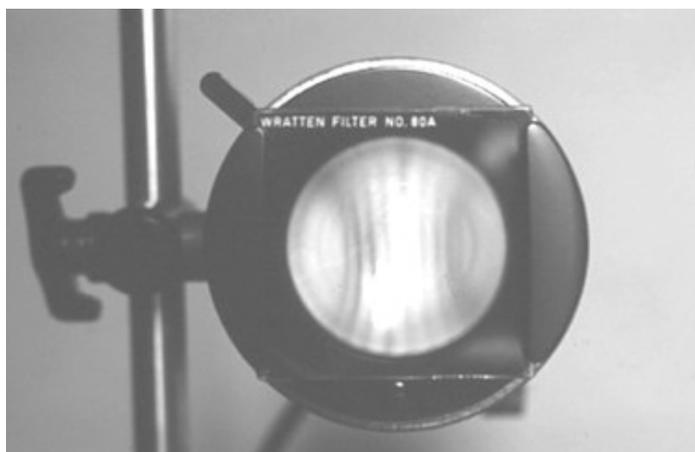


Fig. 10 – Immagine sfuocata del filamento, quale appare a livello del collettore di una normale microlampada di Köhler esterna allo stativo. A sinistra, l’asta di supporto. In alto a sinistra, la levetta di comando del diaframma di campo, che appare tutto aperto.

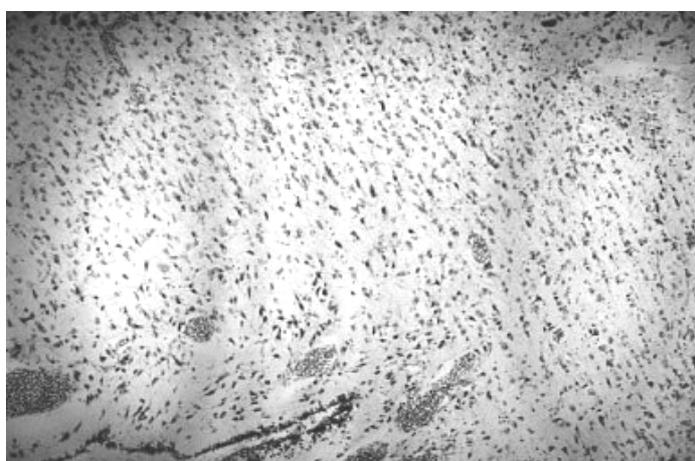


Fig. 11 – Immagine sfuocata del filamento sovrapposta all’immagine dell’oggetto, quale si presenta con una focalizzazione scorretta di una microlampada di Köhler. Sezione di encefalo di pulcino. Colorazione secondo Nissl. 100:1.

Riguardo all’omogeneità d’illuminazione, va poi anche notato che il filamento è un oggetto a tre dimensioni, ha uno spessore non nullo; se la sua immagine è ingrandita dal collettore, è ingrandita anche longitudinalmente, ossia ha uno spessore ingrandito anch’esso. L’ingrandimento “longitudinale” è circa il quadrato di quello “trasversale”; quindi, se il collettore ingrandisce, per es. 10 volte<sup>12</sup>, le dimensioni trasversali del filamento, ingrandisce circa 100 volte il suo spessore; in altre parole, l’immagine di un filamento di  $3 \times 3$  mm appare a fuoco più o meno per una lunghezza di 300 mm lungo l’asse, ovvero in piani anche molto lontani da quello teorico (il piano del diaframma d’apertura), e quindi anche nel piano

<sup>12</sup> Un filamento largo 3 mm può dare un’immagine di 30 mm, ad es.

oggetto.

A parte l'immagine geometrica del filamento, si deve anche pensare che ogni punto della superficie del collettore corrisponde ad una diversa direzione all'interno dell'apertura del collettore stesso (lato filamento). In altre parole, dal filamento emerge un fascio conico di "raggi" che riempie tutta la superficie utile del collettore; affinché questa superficie appaia uniformemente illuminata, occorre che ogni "raggio" abbia la stessa intensità o, più correttamente, che la brillantezza del filamento sia costante in tutte le direzioni. Questo non può verificarsi del tutto, se non altro perché le varie spire del filamento si fanno ombra l'un l'altra.

Per tutti questi motivi, l'omogeneità d'illuminazione fornita da una microlampada di Köhler non è sempre perfetta. Per rimediare a ciò, molti costruttori interpongono nel cammino ottico un diffusore, generalmente del tipo del vetro smerigliato, oppure rendono smerigliata una delle superfici delle parti in vetro, generalmente del collettore stesso.

Una superficie smerigliata crea sempre una certa perdita fotometrica<sup>13</sup>, se non altro poiché il fascio diffuso occupa un forte angolo solido, in teoria tutto lo spazio, e solo una parte del fascio diffuso può venir recuperata; però è possibile ridurre la perdita se la superficie smerigliata si trova fra filamento e collettore, in uno spazio dove, comunque, il fascio utile è a forte apertura.

Il vetro smerigliato ha poi un altro inconveniente: non è omogeneo, ha una sua "grana", una granulosità legata alla rugosità della superficie. Può accadere che tale rugosità risulti più o meno a fuoco assieme all'oggetto: si ha un'inomogeneità a piccola scala. Se ciò avviene, le cause sono due: o il costruttore ha messo il diffusore in una posizione scorretta, e qui è difficile porre rimedio, o il condensatore non è ben focalizzato. In questo caso, un ritocco dell'altezza del condensatore eliminerà il problema.

Per tutti questi motivi, è bene che il vetro smerigliato sia estraibile. Specialmente ai forti ingrandimenti, esso può diventare dannoso per via della perdita di illuminamento nell'immagine e del resto, proprio ai forti ingrandimenti, il problema dell'omogeneità su larga scala è meno sentito poiché il campo è piccolo.

Un'altra sorgente di inomogeneità del campo illuminato può risiedere nel condensatore. Infatti, sempre ritornando allo schema di Köhler della fig. 7, sappiamo che, se tutto è correttamente allineato e focalizzato, nel piano oggetto si trova un'immagine del diaframma di campo (fig. 12). Tale immagine dovrebbe essere limitata da bordi netti, ma il condensatore non è mai un sistema perfettamente corretto; anche i modelli "acromatici-aplanatici", teoricamente corretti da aberrazioni cromatiche e sferica<sup>14</sup>, creano sempre aloni sfumati e colorati, che si sovrappongono ai bordi dell'immagine del diaframma di campo. Quando si lavora con obiettivi forti, cioè quando questa immagine viene vista fortemente ingrandita, si può vedere un'immagine come quella di fig. 13.

#### ESEMPI di illuminatori secondo Köhler

Nella fig. 14 si vede lo schema del sistema illuminante sec. Köhler in uno stativo normale.

In fig. 15, uno schema di un sistema analogo. Si noti che la superficie inferiore della lente inferiore del condensatore non ha forma sferica per le ragioni spiegate nella didascalia della fig. 14.

---

<sup>13</sup> Vedi l'articolo n° 5: "La resa fotometrica nel microscopio..."

<sup>14</sup> Vedi il manuale "Problemi tecnici della microscopia...", Cap. 13.2 e 21.7.



Fig. 12 – Immagine del diaframma di campo proiettata dal condensatore nel piano oggetto. In luogo del vetrino si è posto un vetro smerigliato; subito sotto, si vede la lente frontale del condensatore.



Fig. 13 – Immagine del diaframma di campo, quale appare usando un obiettivo forte ed un condensatore di Abbe semplice. La sfumatura è dovuta all'aberrazione sferica del condensatore, i colori all'aberrazione cromatica. L'oggetto è costituito da un vetrino vuoto.

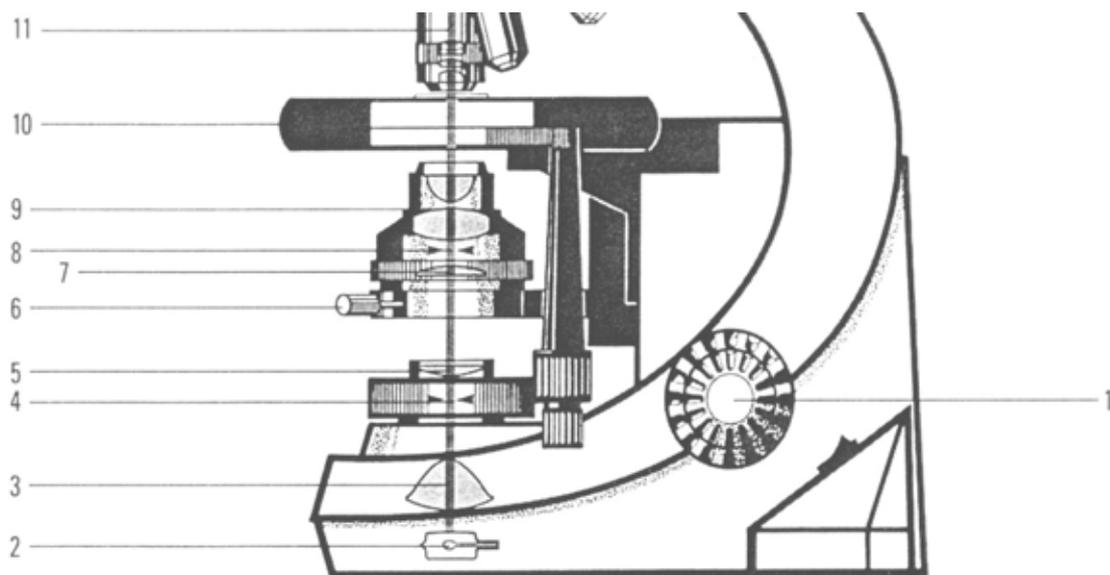


Fig. 14 - Illuminatore di Köhler compatto con ampolla alogena, inserito nel piede del modello LEICA DM LS. 2 = Ampolla "alogena"; 3 = collettore (asferico); 4 = diaframma di campo; 8 = diaframma d'apertura; 9 = condensatore. Una superficie asferica (di forma diversa da quella sferica) in una lente può correggere

l'aberrazione "sferica" della lente, se opportunamente progettata. L'aberrazione in questione si chiama "sferica" proprio perché è provocata dalla forma sferica delle superfici delle lenti.

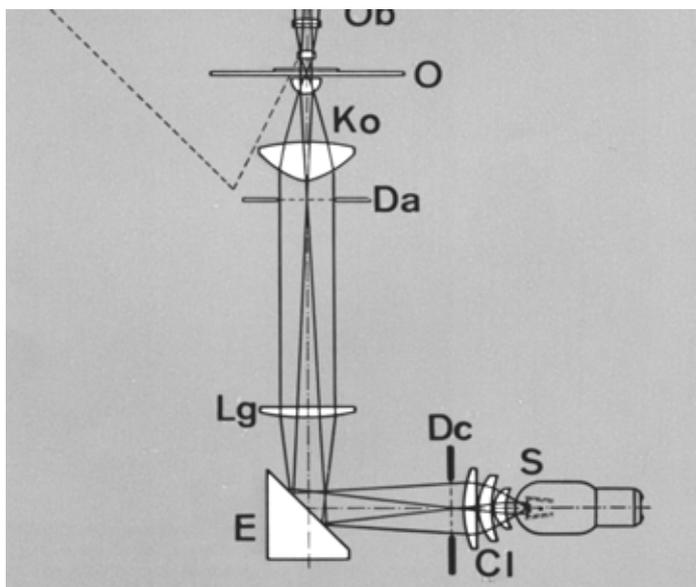


Fig. 15 - Microlampada di Köhler incorporata nel piede di uno stativo della WILD. Il collettore è a tre lenti (Cl), il diaframma di campo è indicato con (Dc); (E) è uno specchio secondario; (Lg) è una lente a grande campo centrabile, che serve alla centratura dell'immagine del diaframma di campo; (Da) è il diaframma d'apertura; (Ko) è il condensatore. L'ampolla è di tipo tradizionale, ormai introvabile. (Da stampato Wild Mi 624).

In fig. 16 una microlampada di Köhler di grandi dimensioni, capace di dissipare fino a 250 W: è infatti rappresentato (in 11) un "bruciatore", cioè una lampada ad arco compatto in xeno OSRAM XBO 162, da 162 W. Una tale lampada, per non trasmettere calore eccessivo al microscopio, deve forzatamente trovarsi all'esterno dello strumento ed il fascio illuminante sarà rinviato verso il condensatore da uno o più specchi.

Premesso tutto ciò, ecco che un buon illuminatore di Köhler fornisce una "sorgente" virtuale, che può essere omogenea (magari con l'aiuto di uno smerigliato), di diametro fra circa 2 e 40 mm circa. Ma non basta, di solito. Abbiamo calcolato sopra il diametro della sorgente ideale come compreso fra 0,5 e 54 mm, con un rapporto massimo/minimo superiore a 100:1. Normalmente, davanti al collettore si mette un diaframma di campo ad iride, ma si è già fatto notare che il suo diametro utile difficilmente scende sotto 2 mm e non può essere più grande del collettore (sarebbe inutile).

Ecco dunque che anche lo schema di Köhler non basta sempre, specie ai piccoli ingrandimenti.

A questo punto, non rimane che aumentare l'ingrandimento del condensatore ( $M_k$ ). Come si è visto nella formula (2), per far ciò si può ridurre la distanza fra microlampada e condensatore ( $a$ ), ma ciò comporta un radicale riassetto geometrico del sistema. Meglio aumentare la focale del condensatore ( $f_k$ ) oppure modificare la struttura del sistema illuminante. Ecco qualche soluzione.

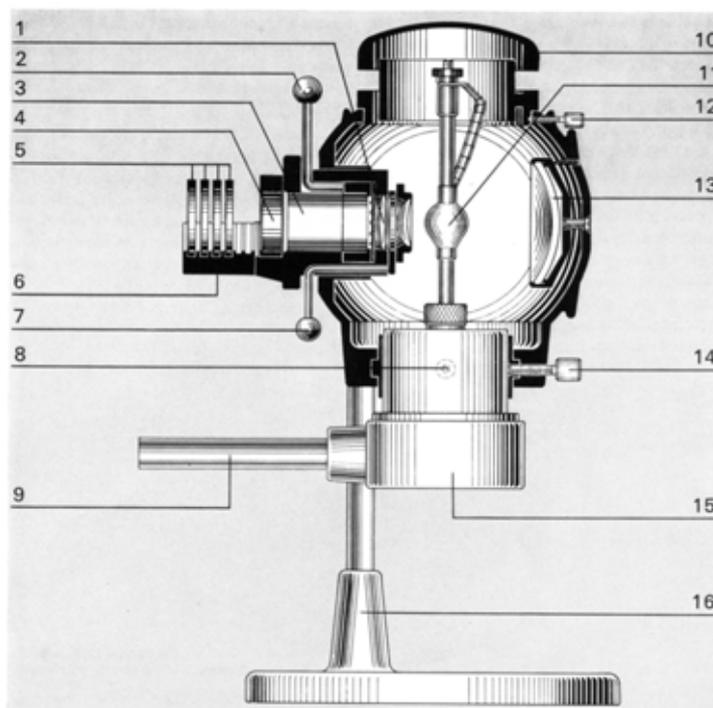


Fig. 16 - Lampada di Köhler esterna allo stativo, modello tradizionale WILD (da stampato Wild M1 302). In 11 la lampada ad arco compatto in atmosfera di xeno. In 7 la leva di comando del vetro smerigliato. In 2 la leva del diaframma di campo. 1 indica il collettore. 4 e 5 sono filtri estraibili. 13 è uno specchio sferico concentrico all'arco, che recupera e rimanda in avanti una parte del flusso che altrimenti andrebbe perduto.

**3** - Negli schemi 1 - 5 , all'interno della fig. 17, è schematizzato un semplice condensatore a due lenti di tipo Abbe, con forte apertura e piccolo campo (e piccola focale). A linea intera sono indicati i confini di un fascio proveniente dal centro del diaframma di campo; a linea tratteggiata un fascio proveniente dall'orlo di esso.

Il diaframma di campo, che verrà d'ora in poi abbreviato con Dc, non è rappresentato ma se ne può ricostruire la posizione prolungando i raggi diretti verso la sinistra della figura.

La freccia verticale a due punte indica il diametro del campo illuminato. Le lenti disegnate con linee tratteggiate indicano lenti che, in quella configurazione, sono state eliminate o spostate.

Il diaframma d'apertura è schematizzato solo nello schema 1, ma si suppone sempre presente.

Si noti che il campo illuminato è sempre più piccolo della lente frontale del condensatore, e questo a causa del piccolo campo angolare e della forte apertura del condensatore stesso.

Nello schema 1 è indicato il funzionamento normale del condensatore di Abbe semplice: la piccola focale porta ad una forte riduzione nell'immagine del Dc, quindi ad un piccolo campo illuminato; sempre a causa della piccola focale, la immagine di Dc è vicino alla lente frontale. L'apertura può superare 1,25 (in immersione s'intende<sup>15</sup>).

Nello schema 2, la lente frontale è stata tolta dal cammino ottico, o ruotando una leva (fig. 18) o svitandone la montatura (fig. 19).

Il campo illuminato è maggiore: il condensatore ha una focale maggiore e quindi l'immagine del Dc è meno impiccolita. Tale immagine è più alta rispetto a prima: occorre abbassare il condensatore affinché quell'immagine coincida ancora col piano oggetto<sup>16</sup>.

<sup>15</sup> Di solito, si tratta della "doppia immersione", nella quale l'olio da immersione va posto sia fra obiettivo e vetrino, sia fra vetrino (superficie inferiore) e condensatore.

<sup>16</sup> In certi strumenti, la corsa verticale del condensatore non è sufficiente per questa ri-focalizzazione. Ragioni

L'apertura è minore (maggiore focale) e questo concorda con le esigenze degli obiettivi deboli.

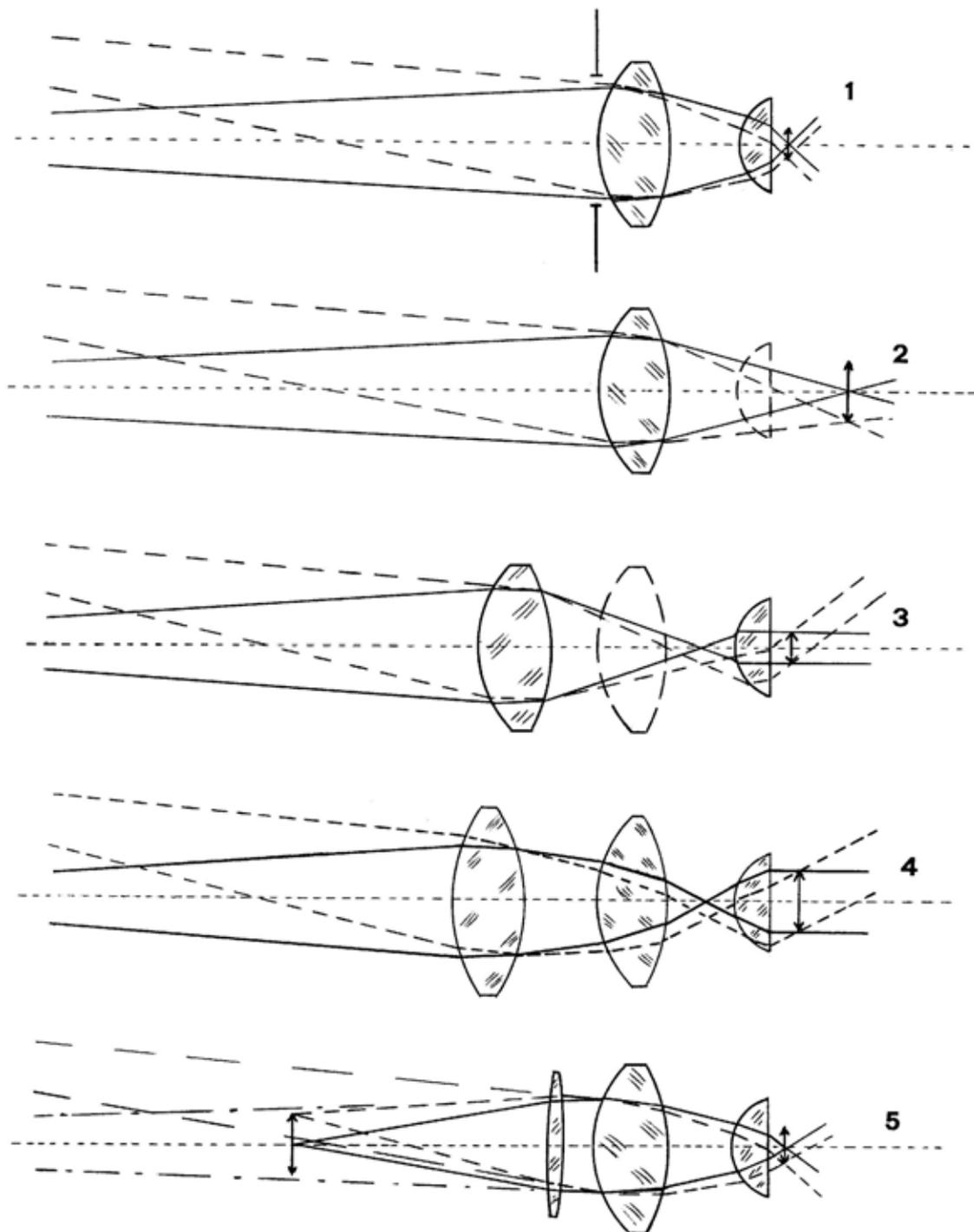


Fig. 17 – Vari meccanismi di modifica del condensatore, mirati ad un allargamento del campo illuminato.

E' un sistema largamente usato negli strumenti economici ma ha un inconveniente: le aberrazioni del condensatore possono (forse) essere corrette bene con oppure senza la lente frontale, ma non in entrambe le configurazioni.

La lente frontale montata su leva ruotante è detta, con un brutto francesismo,

---

di ingombro lo impediscono, ma allora l'illuminazione secondo Köhler non è pienamente realizzata.

"scamottabile"; meglio dire "estraibile".

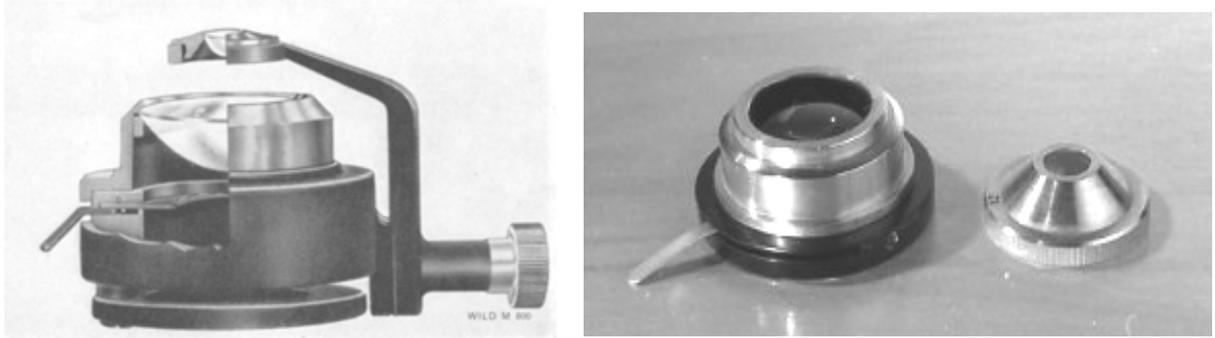


Fig. 18 e 19 - A sinistra: Condensatore di Abbe con lente frontale ribaltabile (tramite la manopola a destra); a sinistra, la levetta del diaframma d'apertura; sotto, un portafiltri estraibile. (Da catalogo M 20 WILD (M 800)). A destra: Condensatore di Abbe con lente frontale svitabile.

Nello schema 3, la lente inferiore viene abbassata in modo da creare un'immagine di Dc nel primo fuoco della lente frontale. Sopra quest'ultima si forma un'immagine più o meno sfocata della lente inferiore e del diaframma d'apertura (che assume così la funzione di Dc).

Questo sistema è in uso presso certi costruttori americani.

Nello schema 4 si ha un principio analogo, però l'immagine di Dc non viene creata dall'abbassamento della lente inferiore ma dall'aggiunta di una forte lente convergente sotto il condensatore. Anche qui, il campo illuminato è dato da un'immagine del diaframma d'apertura e come tale contiene una seconda immagine reale del filamento della lampadina. Per avere un campo omogeneo si può aggiungere perciò un vetro smerigliato, ma spesso ciò non è necessario poiché il sistema, in questa configurazione anomala, presenta molte aberrazioni ed inoltre l'immagine del filamento è generalmente sfocata.

Questo sistema era usato nei modelli per routine della casa Zeiss Jena ed altre.

Nello schema 5 si vede inserita sotto il condensatore una debole lente convergente ("lente a grande campo") che funziona, dal punto di vista del condensatore, come una lente d'ingrandimento offrendogli una immagine virtuale ingrandita di Dc. Tale lente è visibile nella figura 15 (Lg).

Con questo sistema, si ha un aumento modesto del campo illuminato; esso serve piuttosto per mettere a fuoco un Dc che si trovi troppo vicino al condensatore, per esempio nel piede dello stativo (vedi la lente 7 in fig. 14).

Si noti che, nello schema 5, il Dc si trova rappresentato in figura, appunto perché molto vicino al condensatore. Prolungando verso sinistra i raggi a tratteggio largo si ottiene la posizione dell'immagine virtuale di esso fornita dalla lente a grande campo.

E' un sistema usato spesso, assieme allo schema 2, da Zeiss, Leitz, ecc.

Tutti gli schemi, dal 2 al 5, alterano le coniugate del condensatore e come tali non possono fornire un'immagine del Dc ad elevata correzione (tranne forse lo schema 5). Si tratta quindi di soluzioni di ripiego.

4 - Ma non si creda che il problema del campo illuminato insufficiente sia definitivamente risolto: nessuno dei sistemi di fig.17 può coprire sempre il campo degli obbiettivi deboli, dal 5:1 in giù. Pertanto, con tali obbiettivi, un campo grande senza troppe aberrazioni si può ottenere solo da un condensatore appositamente progettato come si fa negli stativi da ricerca. Si parla di "condensatori a grande campo", che hanno una focale maggiore del normale. Si badi però che col termine "a lunga focale" si intendono di solito condensatori che debbono mostrare una maggiore "distanza libera di lavoro" (distanza fra superficie superiore del condensatore e piano oggetto) al fine di consentire la corretta illuminazione di oggetti di notevole spessore; questi condensatori avranno sì una focale

elevata, ma non è detto che forniscano un campo illuminato altrettanto elevato. Meglio assicurarsi che si tratti di modelli veramente studiati per il “campo grande”.

5 - Se però si rinuncia allo schema classico di Kohler o ad un illuminatore o ad un condensatore “ad hoc”, che non sono indispensabili ai piccoli ingrandimenti, si possono ottenere buoni risultati semplicemente togliendo il condensatore e sostituendolo con un vetro smerigliato, posto a qualche centimetro sotto il vetrino. Attraverso lo specchietto orientabile (16 in fig. 5), oppure direttamente se la microlampada è fissa nel piede dello strumento, tale filtro diffondente andrà illuminato dalla microlampada o da un faretto esterno.

Come si vede, le soluzioni più semplici possono essere le più efficaci, almeno in casi oculatamente selezionati.

Nel caso dell'episcopia, di cui abbiamo accennato all'inizio, la microlampada è generalmente integrata nel braccio o nella colonna dello stativo; sembra quindi che non sia possibile ricorrere ad uno specchietto orientabile e ad una sorgente esterna di grandi dimensioni, né a particolari interventi sul condensatore. Ciò è vero, ma il problema di un campo illuminato insufficiente in realtà non si presenta. Infatti, in episcopia il condensatore è costituito dall'obbiettivo stesso e quando si cambia quest'ultimo si cambia anche il condensatore con un altro che ha sempre la stessa focale dell'obbiettivo. Pertanto, nella stessa misura con cui cambia il diametro del campo oggetto dell'obbiettivo cambia anche il diametro del campo illuminato. I conti tornano sempre.

#### TIRIAMO LE SOMME

A questo punto, vediamo di riassumere e di capire qual è la miglior soluzione nei casi pratici.

**OBBIETTIVI FORTI**, dal 60:1 in su:

--- per la massima omogeneità d'illuminazione e per la miglior protezione del preparato, applicare il classico schema di Köhler, ove possibile. Aprire quasi al massimo il diaframma d'apertura e chiudere il più possibile il diaframma di campo. Foceggiare con cura il condensatore osservando il perimetro del diaframma di campo. Il filtro smerigliato sarà probabilmente inutile. L'eventuale lente frontale estraibile del condensatore andrà inserita. Eventuali lenti a grande campo, escluse.

In mancanza del diaframma di campo (quindi, fuori dallo schema di Köhler), vi sarà probabilmente un illuminatore con diffusore. La foceggiatura del condensatore è meno critica, ma la sua posizione ottimale sarà vicina al fine corsa superiore.

--- per la massima resa fotometrica: eliminare tutti i filtri non indispensabili; diaframma d'apertura tutto aperto ma, soprattutto, realizzare l'illuminazione critica. Se manca un illuminatore ad hoc, provare a modificare lo schema di Köhler: cominciare ad avvicinare il filamento della lampadina al collettore in modo che l'immagine del filamento sia nitida alla maggior distanza possibile. Verificare ciò dirigendo la microlampada contro un muro lontano; se la microlampada non è amovibile, togliere condensatore, obiettivo e tubo porta-oculari e proiettare l'immagine del filamento sul soffitto. In questa fase, può convenire di tenere mezzo chiuso il diaframma di campo. Poi alzare al massimo il condensatore ed osservare un vetrino qualunque. Se si riesce a vedere a fuoco il filamento assieme al vetrino, il gioco è fatto; riaprire il diaframma di campo. Altrimenti, è andata male: la struttura meccanica può non consentire un sufficiente avvicinamento del filamento al collettore o un sufficiente innalzamento del condensatore. Ovviamente, i diaframmi di campo e d'apertura andranno tenuti tutti aperti per “non perdere luce” e, in base allo schema stesso, non sarà possibile regolare il diametro del campo illuminato.

**OBBIETTIVI MEDI**, dal 40:1 al 10:1 :

In genere andrà bene lo schema di Köhler. Se l'illuminatore è del tipo economico (lampadina + diffusore + eventuale collettore), occorre rinunciare a limitare il campo illuminato.

**OBBIETTIVI DEBOLI**, dal 8:1 in giù:

Estrarre la lente frontale del condensatore, se possibile (§ 3, fig. 17 - 2). Se è presente una lente a grande campo (§ 3, fig. 17 - 4/5), inserirla. In genere, occorrerà abbassare molto il condensatore. Non è detto che si riesca più a focalizzare l'immagine del diaframma di campo (se presente). Qualche tassa va pagata.

Se si è baciati dalla fortuna e si dispone di un condensatore speciale "a grande campo", probabilmente sarà possibile conservare lo schema di Köhler.

Se il campo non è ancora abbastanza grande o non è omogeneo, inserire lo specchio snodato, se possibile. A questo punto, possono valere gli accorgimenti dei §§ 1.1 (lampada opale), 1.2 (cartoncino bianco illuminato da un faretto) od 1.3 (il cielo o un muro bianco).

Se tutti i precedenti accorgimenti non bastano, o non sono realizzabili perché la microlampada è incorporata nel piede e non c'è posto per lo specchietto mobile, togliere il condensatore e sostituirlo con un vetro smerigliato (§ 5). Come sostituto del vetro smerigliato, può andar bene spesso anche un pezzo di carta "da lucidi", che ha proprio l'aspetto di un vetro smerigliato.