

# Microscopio (strumento ottico)



## Potere risolutivo

- L'occhio umano ha un potere risolutivo di 0,025-0,1 mm, quindi significa che ad occhio nudo possono essere distinti come separati, due punti che si trovino ad una distanza tra loro di almeno 1/10-1/40 di mm; se la distanza è inferiore i due punti non possono essere più distinti e vengono confusi in uno solo.

- Da qui la necessita di uno strumento che permettesse di scoprire il mondo dell'infinitamente piccolo:

**il microscopio.**

L'oggetto (o preparato), viene per lo più ridotto in una lamina sottile e posto su una lastrina di vetro (vetrino) ed illuminato dal basso tramite un condensatore ottico (illuminazione per trasparenza o a campo chiaro) oppure lateralmente (illuminazione in campo scuro). Per ottenere una maggiore risoluzione può essere aggiunto, tra il preparato e l'obiettivo, un liquido rifrangente (obiettivo a immersione).

## Costituenti del microscopio

Ogni microscopio ha come costituenti fondamentali un **obiettivo ed un oculare**. La distanza tra oculare e oggetto dell'osservazione è invariabile in qualsiasi tipo di microscopio, la messa a fuoco dell'oggetto avviene attraverso spostamento del sistema ottico utilizzato.

# Ingrandimento

L'ingrandimento **G** è dato dalla formula

$$G = \frac{\Delta}{f_2} : \frac{f_1}{f_1 f_2} = \frac{a \Delta}{f_1 f_2}$$

dove **a** è la distanza tra i due fuochi compresi tra l'obiettivo e l'oculare, **f<sub>1</sub>** e **f<sub>2</sub>** le distanze focali dell'obiettivo e dell'oculare. L'ingrandimento cresce se si riducono le distanze focali.

L'ingrandimento dipende anche dalla acutezza visiva del singolo osservatore.

## Potere risolutivo

La visione distinta di oggetti sempre più piccoli non può essere ottenuta solamente aumentando il potere di ingrandimento. La diffrazione pone un limite inferiore alla distanza di separazione tra due punti in posizioni distinte.

Questa distanza minima è data da

$$d_{min} = 1,2\lambda / 2n \sin\alpha$$

dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce che illumina l'oggetto,  $n$  l'indice di rifrazione del mezzo interposto tra oggetto e obiettivo,  $\alpha$  il semiangolo del cono di raggi utili che ha il vertice nel centro dell'obiettivo.

# Microscopio semplice a luce trasmessa

- È costituito da una lente d'ingrandimento munita di sostegno. L'oggetto da osservare viene posto su un altro sostegno, forato, per permetterne l'illuminazione dal basso.

- L'ingrandimento è dato dalla formula

$$I = 25/f$$

25 = distanza della visione distinta, f = distanza focale della lente; le misure sono in centimetri.

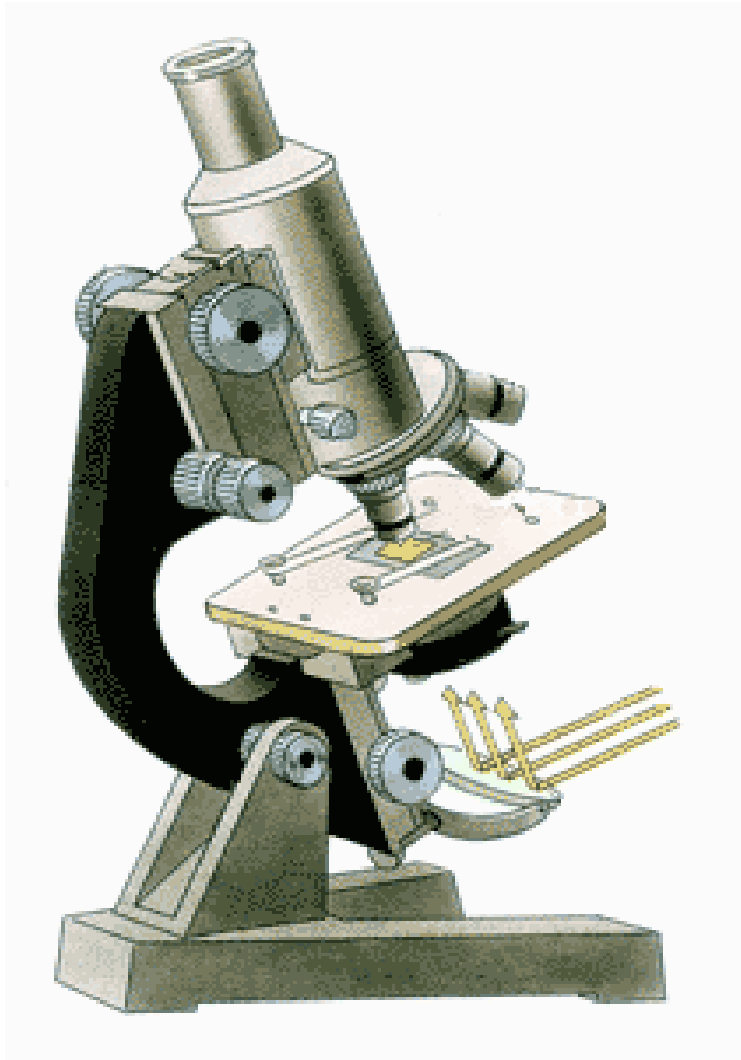
La formula è valida solo per piccole distanze focali.

# Microscopio composto a luce trasmessa

Si compone di:

- **stativo**, il supporto meccanico che comprende anche le viti macrometrica e micrometrica per la messa a fuoco
- **apparato di illuminazione**
- **obiettivo**
- **oculare.**





L'obiettivo fornisce un'immagine reale, capovolta e ingrandita. Se il mezzo interposto tra obiettivo ed oggetto è l'aria si dice *a secco* altrimenti ad *immersione* in un liquido. I liquidi più utilizzati sono l'acqua, l'olio di cedro e la monobromo naftalina.

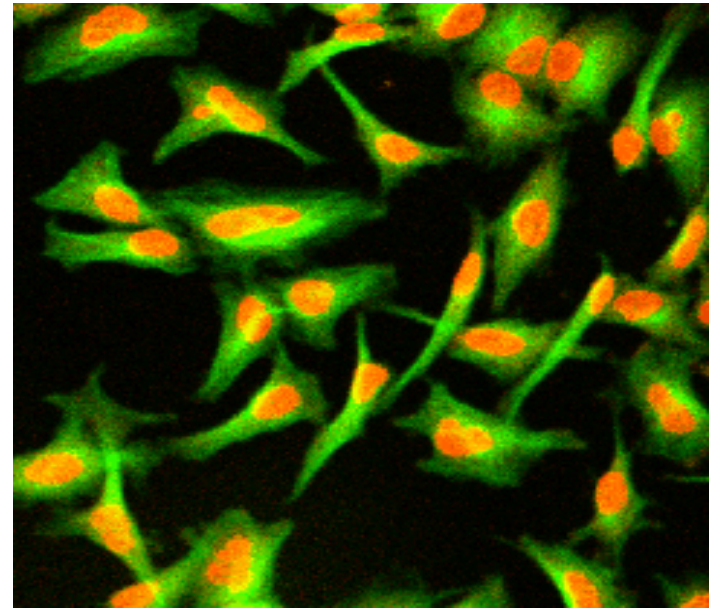
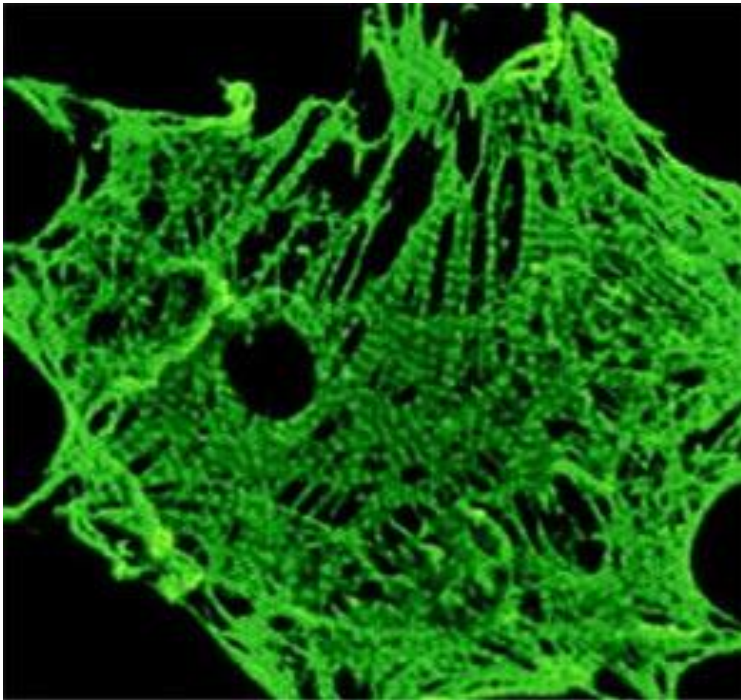
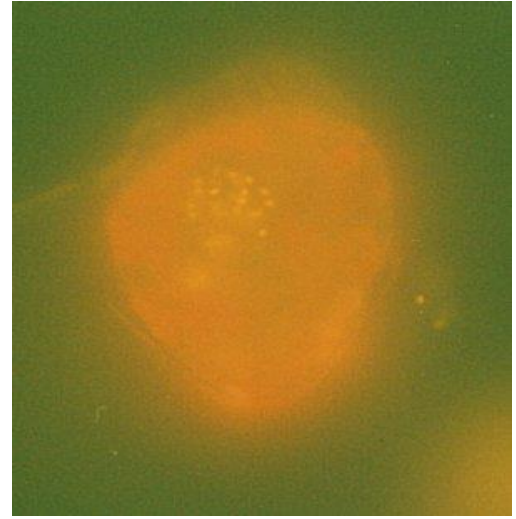
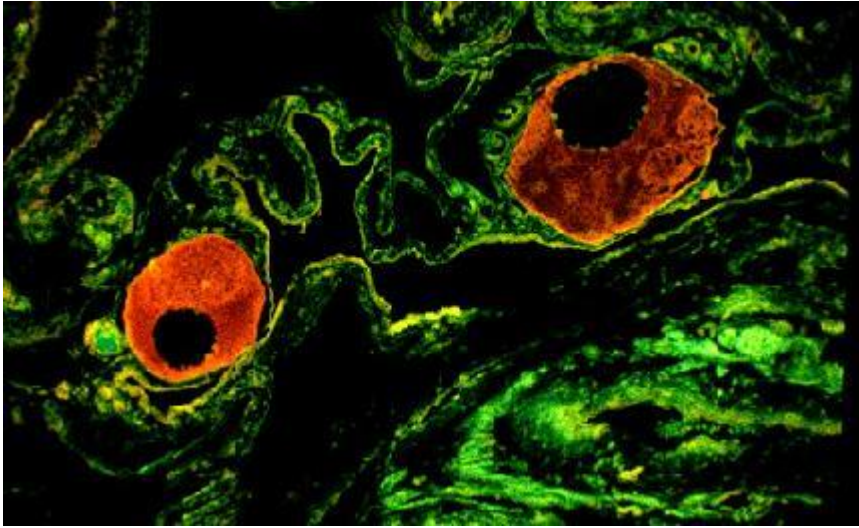
Molto importante è l'illuminazione del soggetto e dalla lunghezza d'onda della luce.

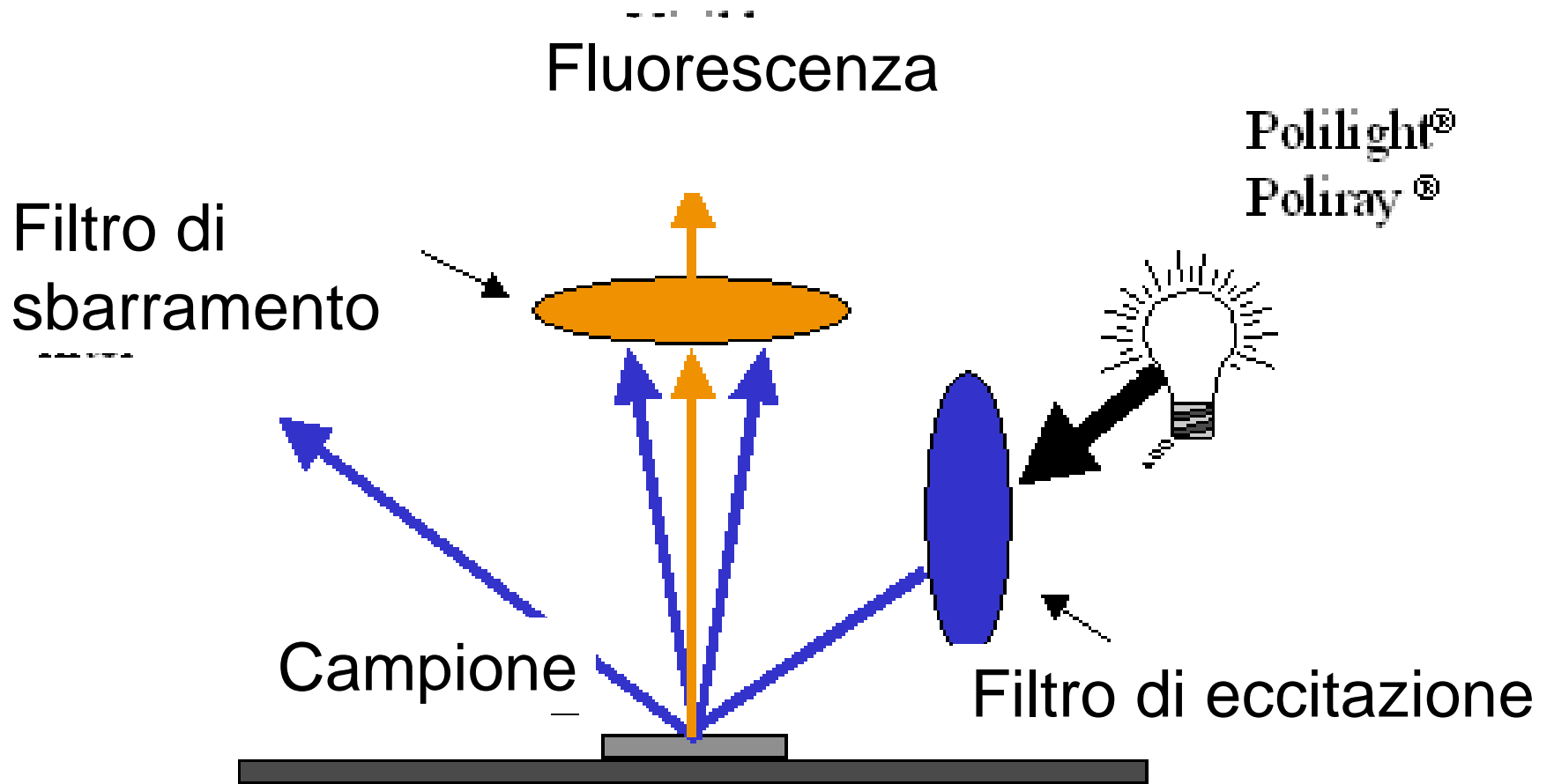
Usando luce bianca normale, con lunghezza d'onda media di  $5.500 \text{ \AA}$  ( $1/10.000.000$  di mm), l'obiettivo può evidenziare oggetti con un diametro di  $2.750 \text{ \AA}$ .

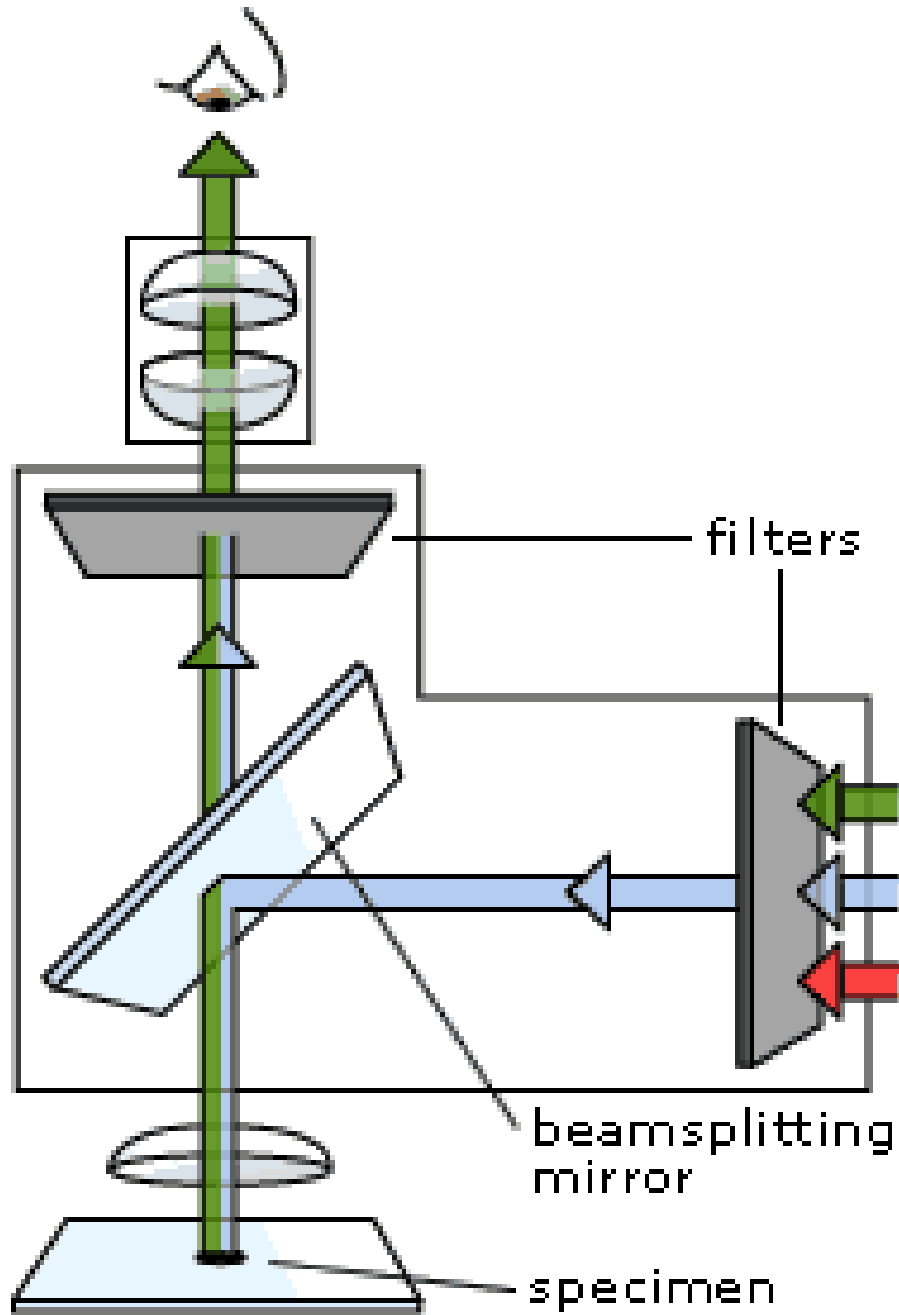
# Microscopio a fluorescenza

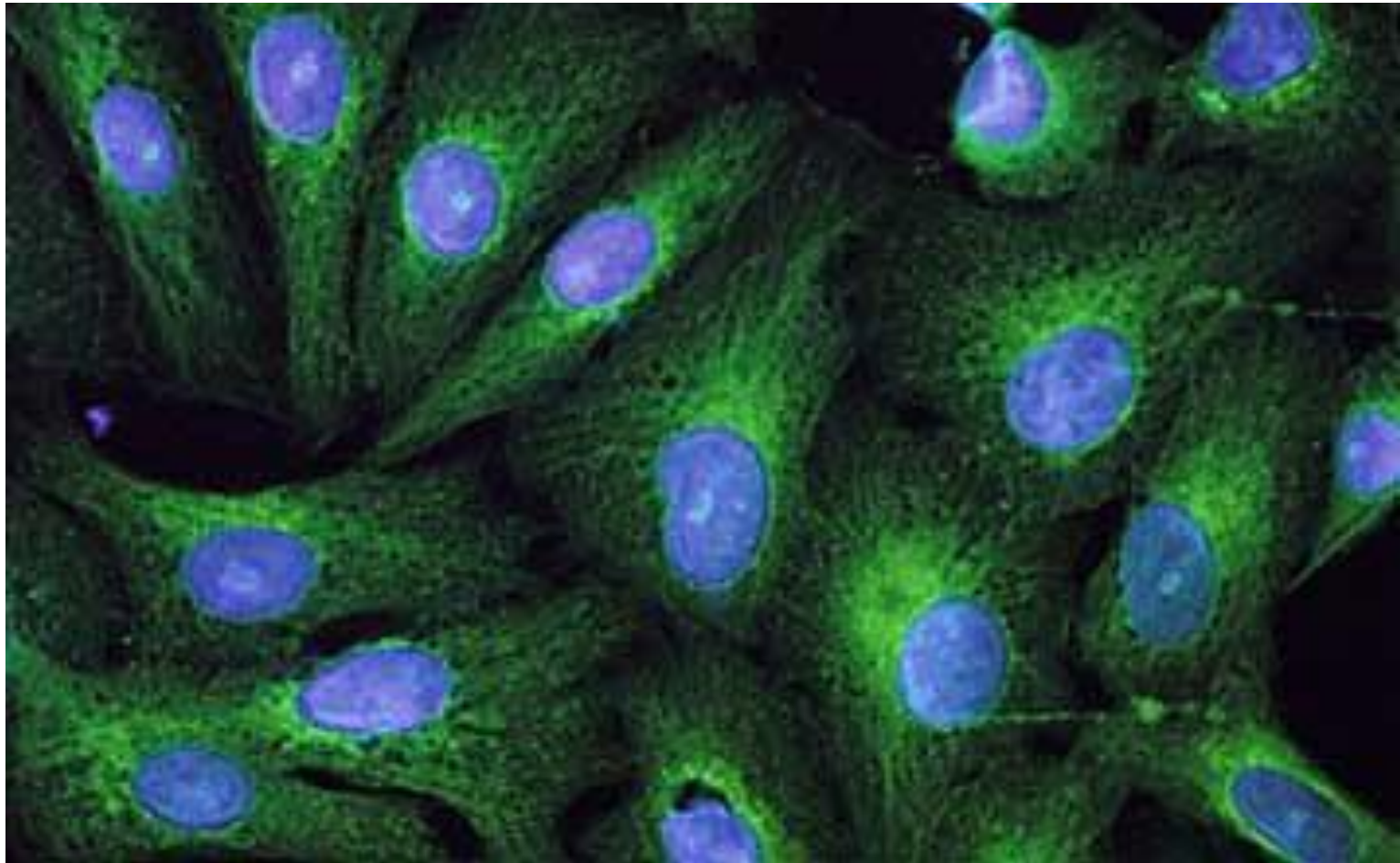
Questo tipo di microscopio utilizza radiazioni ultraviolette, per ottenere, nei preparati in cui ciò è possibile, la fluorescenza.













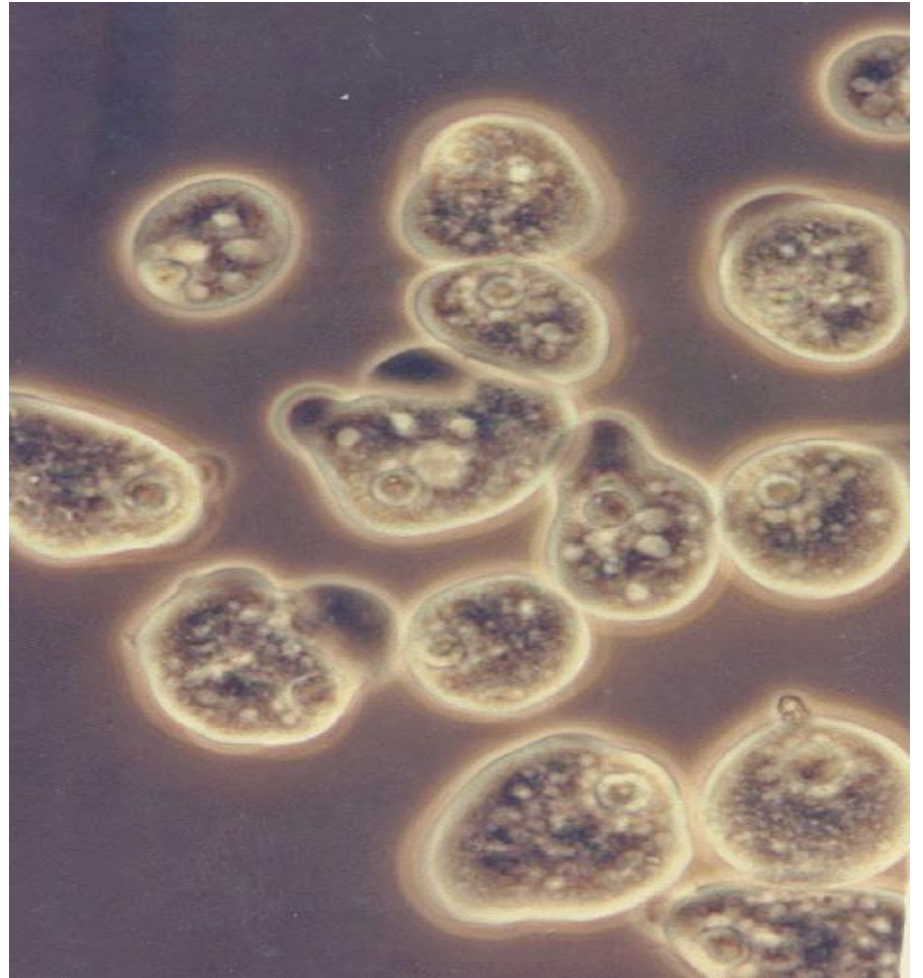
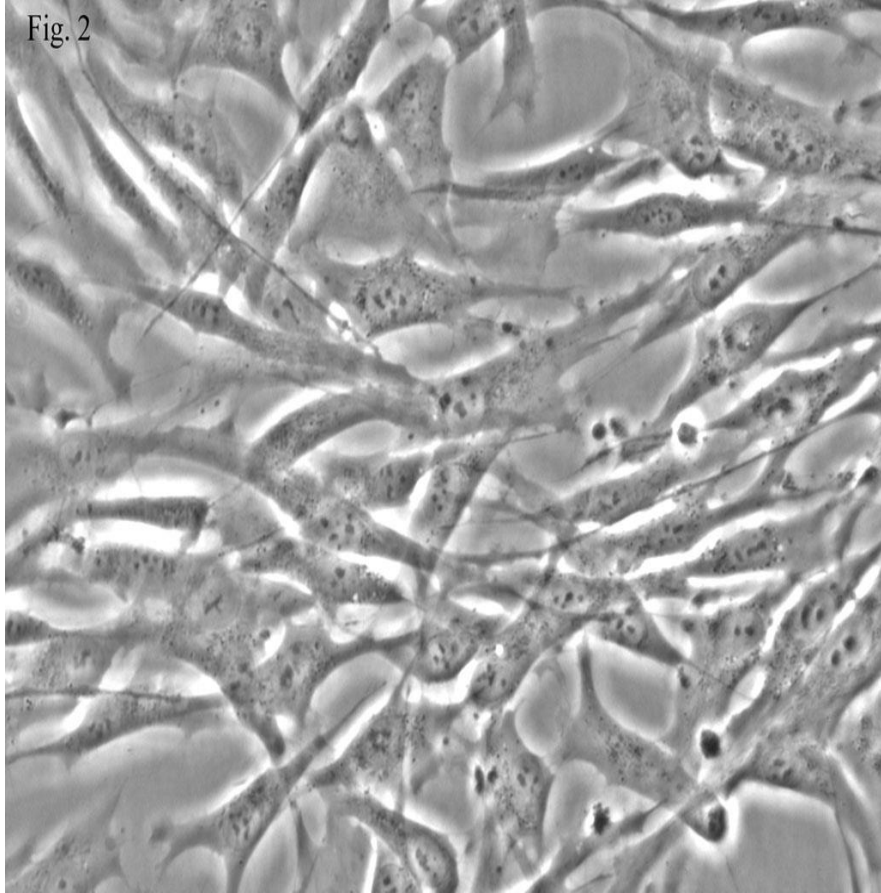
# Microscopio a contrasto di fase

Questo tipo di microscopio sfrutta la differenza di fase in cui i raggi luminosi vengono diversamente ritardati dalle strutture del preparato in esame.

Con questo microscopio, le cellule possono essere osservate senza bisogno di colorazione e quindi le cellule allo stato vivente, senza alcun tipo di alterazione conservativa.

Non permette comunque ingrandimenti maggiori di quelli a luce trasmessa.

Fig. 2



# MICROSCOPIA ELETTRONICA

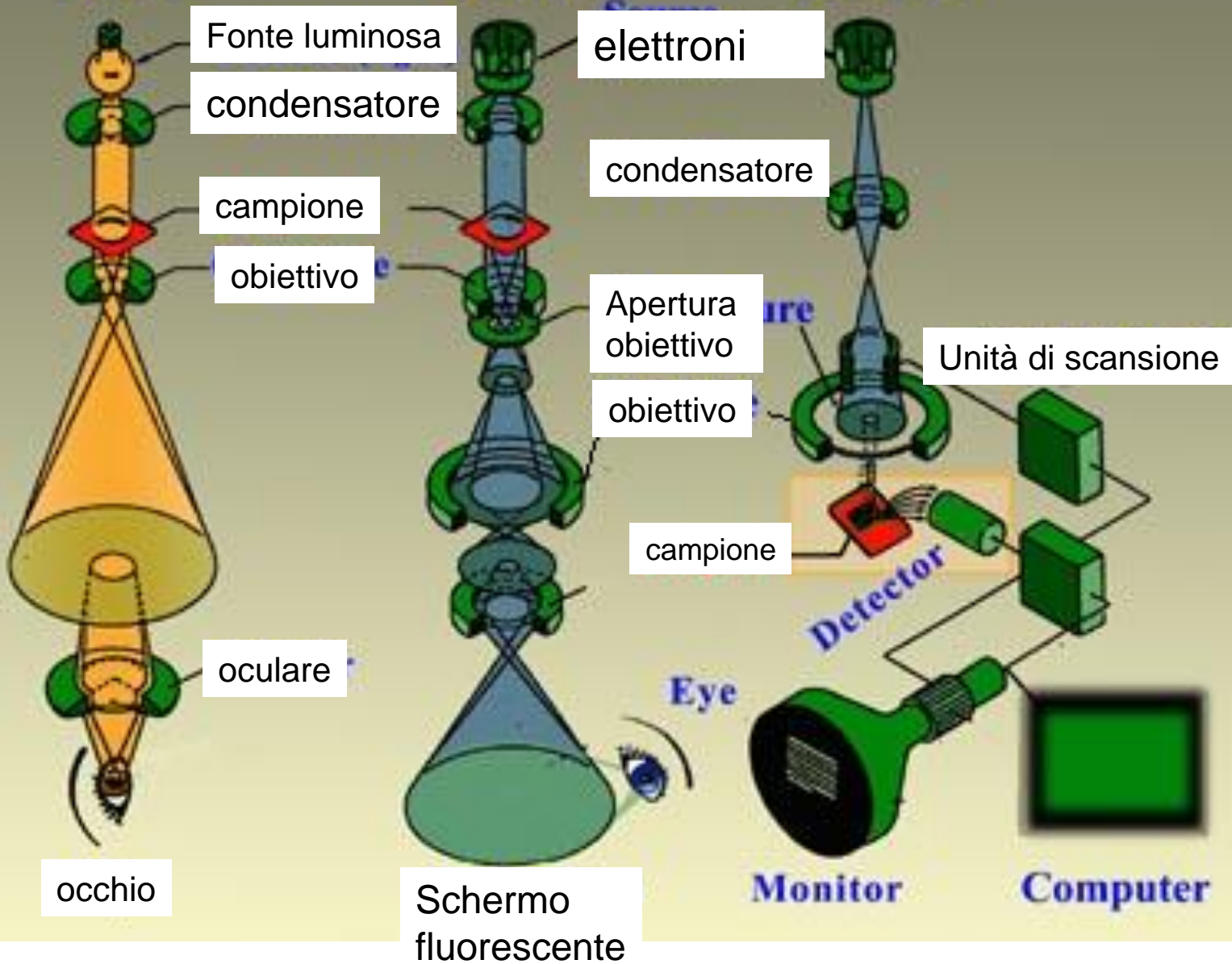
Il limite invalicabile del potere risolutivo del microscopio ottico è legato sostanzialmente alla lunghezza d'onda della luce impiegata.

Il potere risolutivo cresce proporzionalmente al decrescere della lunghezza d'onda della radiazione impiegata, infatti la scoperta che gli **elettroni** hanno una radiazione di bassissima lunghezza d'onda ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri risolutivi assai elevati.

LM

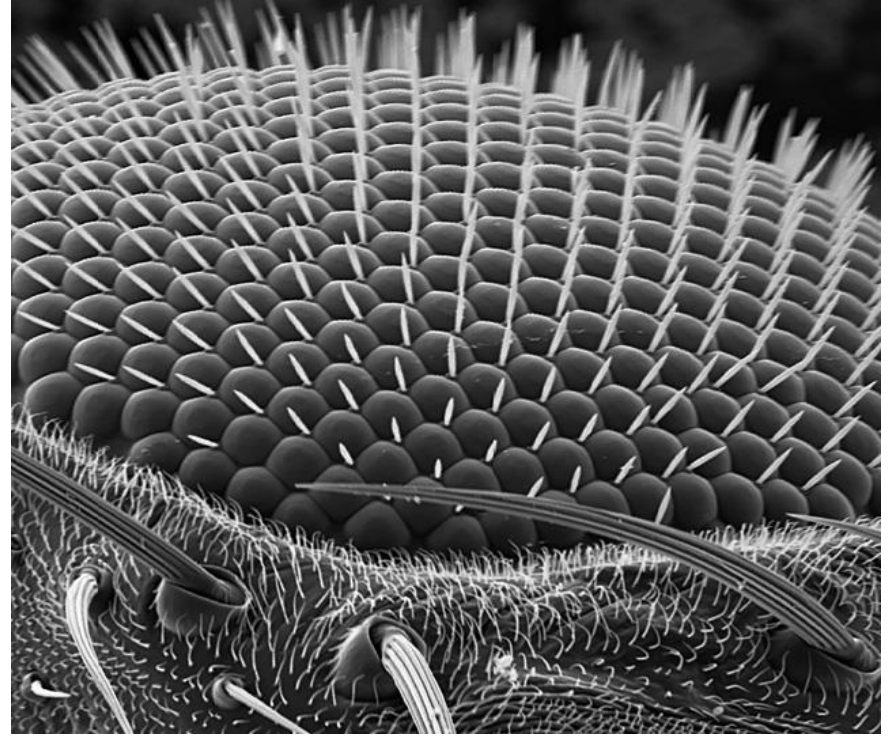
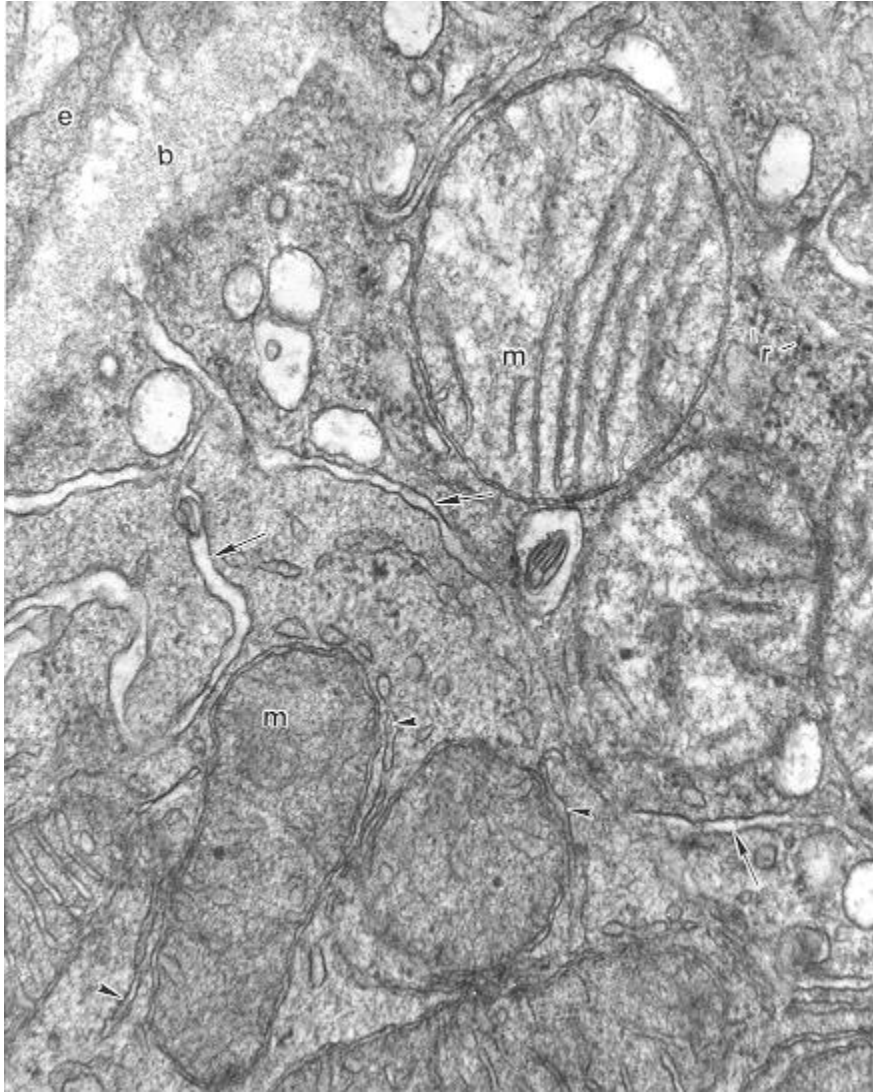
TEM

SEM



In linea di principio un microscopio elettronico opera come un normale microscopio ottico qualora si usasse luce con lunghezza d'onda bassissima.

Poiché però i normali dispositivi ottici non deviano gli elettroni, si ricorre a lenti elettrostatiche o a lenti magnetiche che, agendo sulla carica elettrica degli elettroni, ne provocano la deviazione.



# Il microscopio elettronico è essenzialmente composto

- da una sorgente elettronica di conveniente intensità (generalmente un filamento incandescente che emette elettroni per effetto termoelettronico)

- da un dispositivo che imprime forti accelerazioni al fascio di elettroni emesso, sottoponendoli ad una elevata tensione in un range che va da 20 a 100 mila volt (kV).

Il fascio di elettroni accelerato attraversa un **condensatore** (elettrostatico o magnetico), incide sul campione, viene raccolto su un **obbiettivo** (elettrostatico o magnetico) e passando attraverso una lente proiettore va ad incidere, o su uno schermo fluorescente o su una lastra fotografica formando l'immagine per l'osservazione visiva.

Naturalmente quanto descritto avviene nel vuoto ultra spinto assicurato da un sistema di pompe.



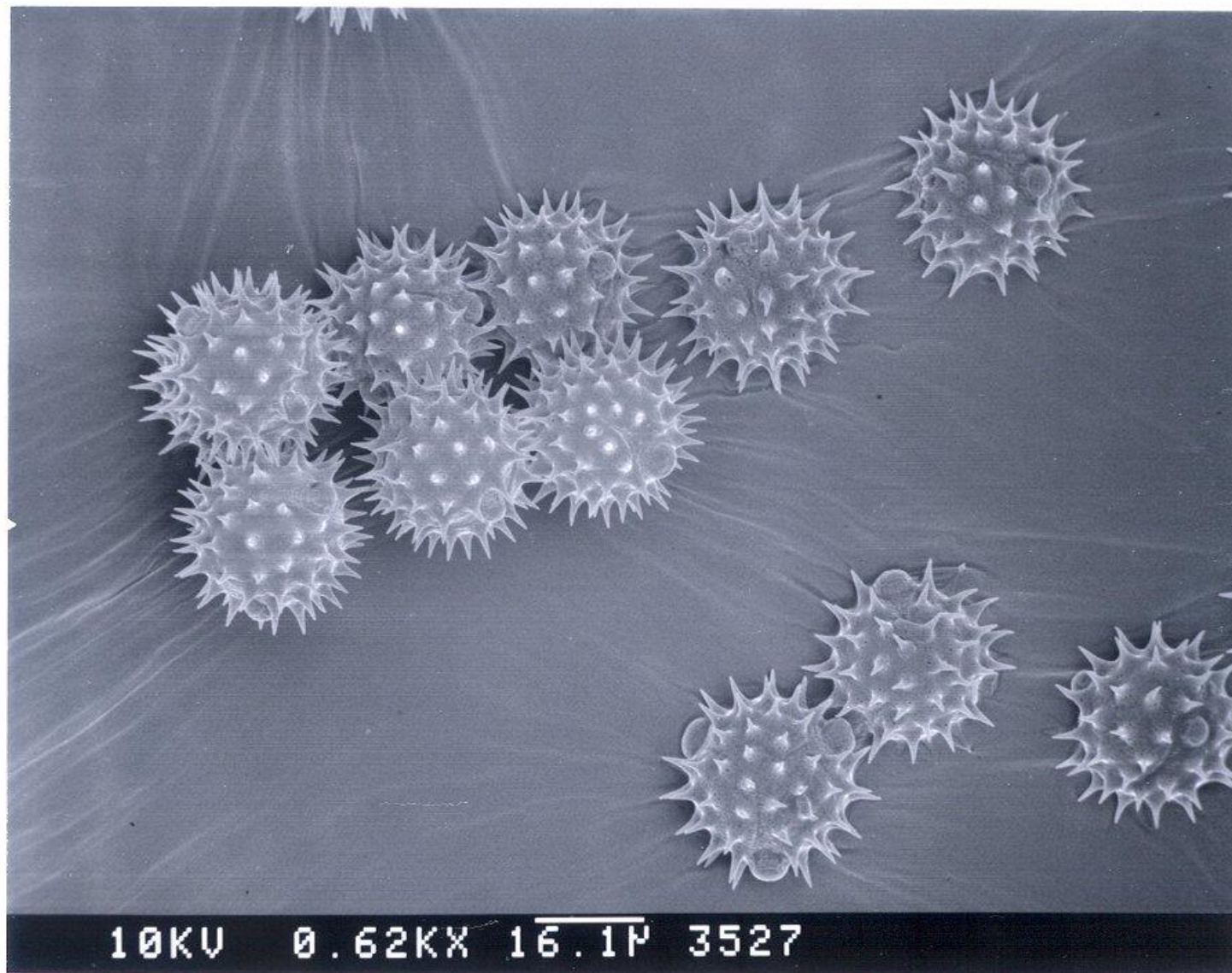
In queste condizioni, la lunghezza d'onda degli elettroni va da 0.1 a 0.005 Å (1 angström =  $10^{-10}$  metri ) in modo da risultare alcune decine di migliaia di volte più piccola della luce visibile.

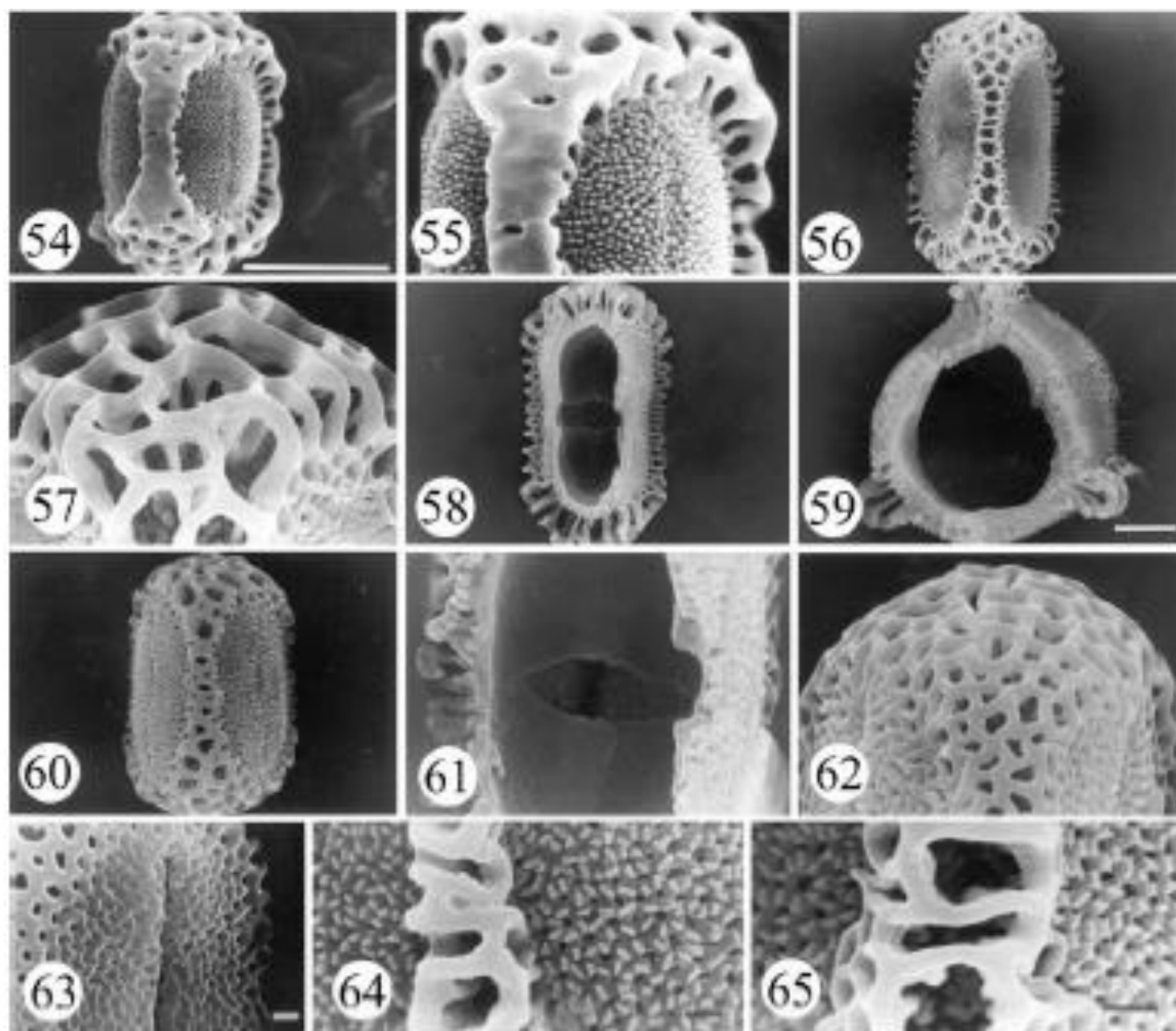
Pur non raggiungendo i limiti teorici, il microscopio elettronico fornisce fino a 150.000 – 200.000 ingrandimenti, con un potere risolutivo dell'ordine del milionesimo di millimetro ( millimicron ).

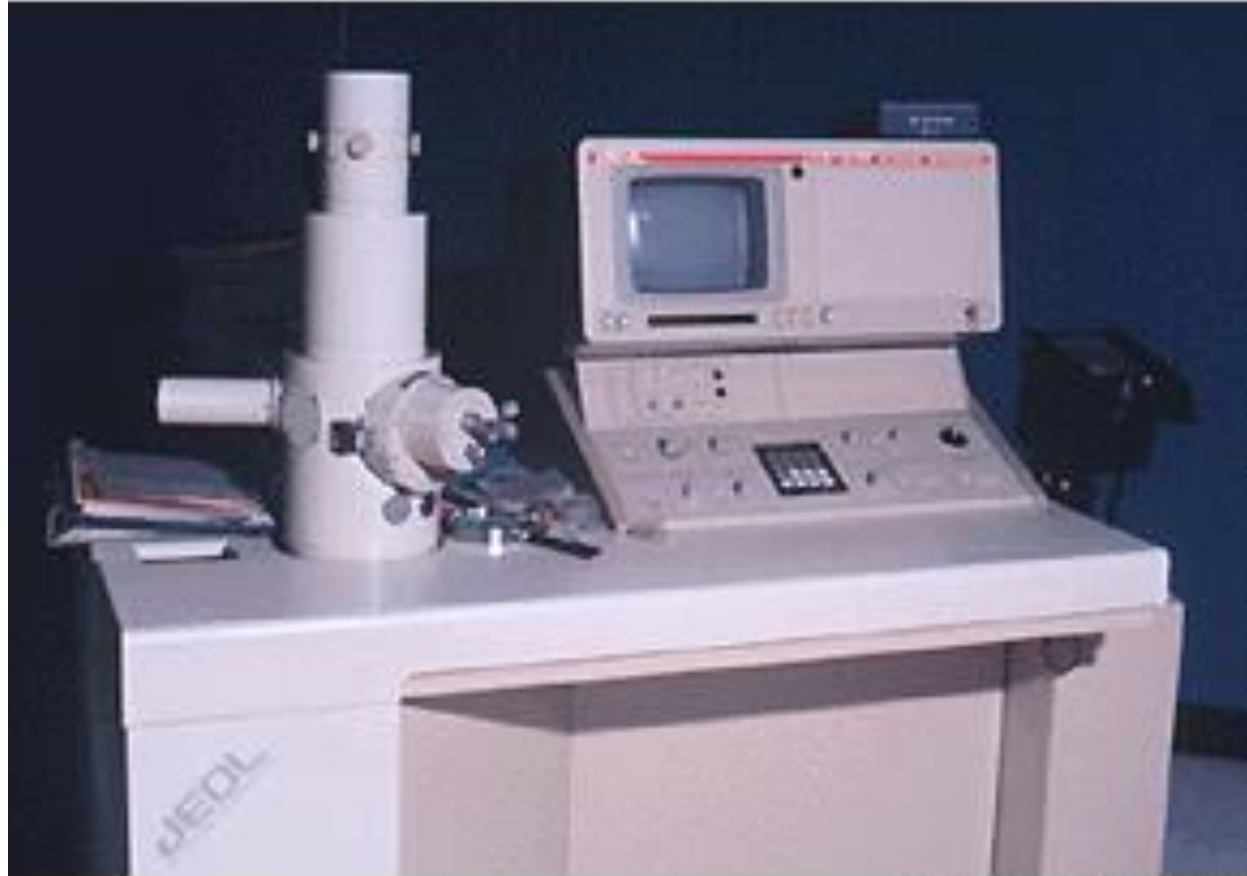
# Il microscopio elettronico a scansione

Il microscopio elettronico a scansione, indicato con la sigla SEM (Scansion Electron Microscope), fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà di superfici e degli strati sottostanti di campioni solitamente solidi, con risoluzione media di 2÷5 nanometri (riferita al segnale “generato” dagli elettroni secondari).

## Pollini di Compositae al microscopio elettronico a scansione





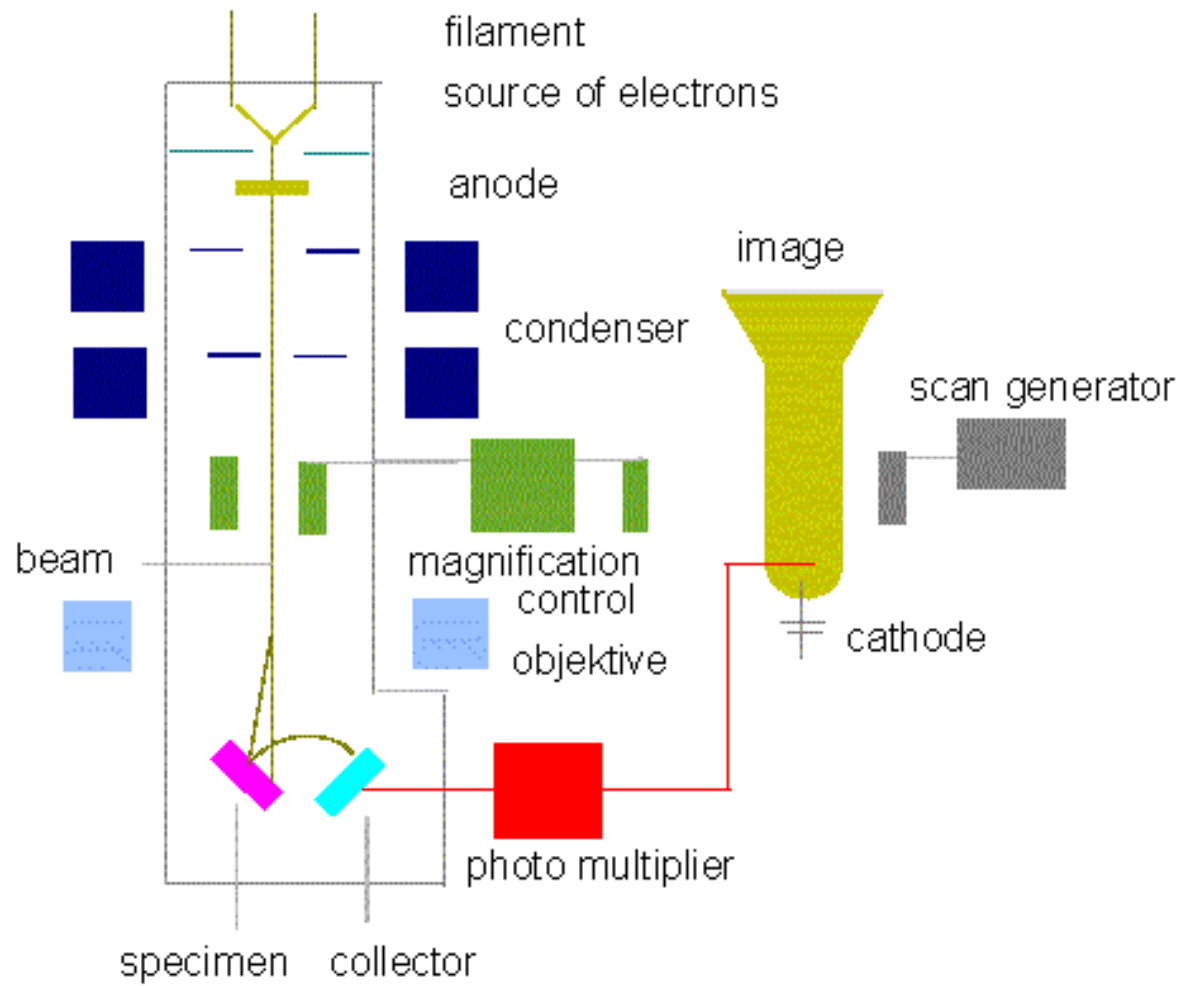


©Eric B. Workman

Funziona in un modo analogo ad un sistema televisivo a circuito chiuso. La superficie del campione viene colpita da un fascio di elettroni, che esplora la superficie per mezzo di una bobina defletttrice, muovendosi come su uno schermo televisivo (il numero di righe per quadro è regolabile, tra 100 e 1.000).

Gli elettroni secondari generati punto per punto dalla superficie vengono raccolti da un elettrodo collettore a 200 V.

L'elettrodo produce un segnale elettrico, che modula il fascio elettronico sullo schermo, percorso in sincronia col fascio primario: sullo schermo si forma così una immagine avente grande profondità di fuoco.





In sostanza una "sonda" molto sottile di elettroni con energia fino a 30 keV viene focalizzata sulla superficie del campione all'interno del microscopio e viene indotta a esercitare una scansione in forma di una successione di linee parallele

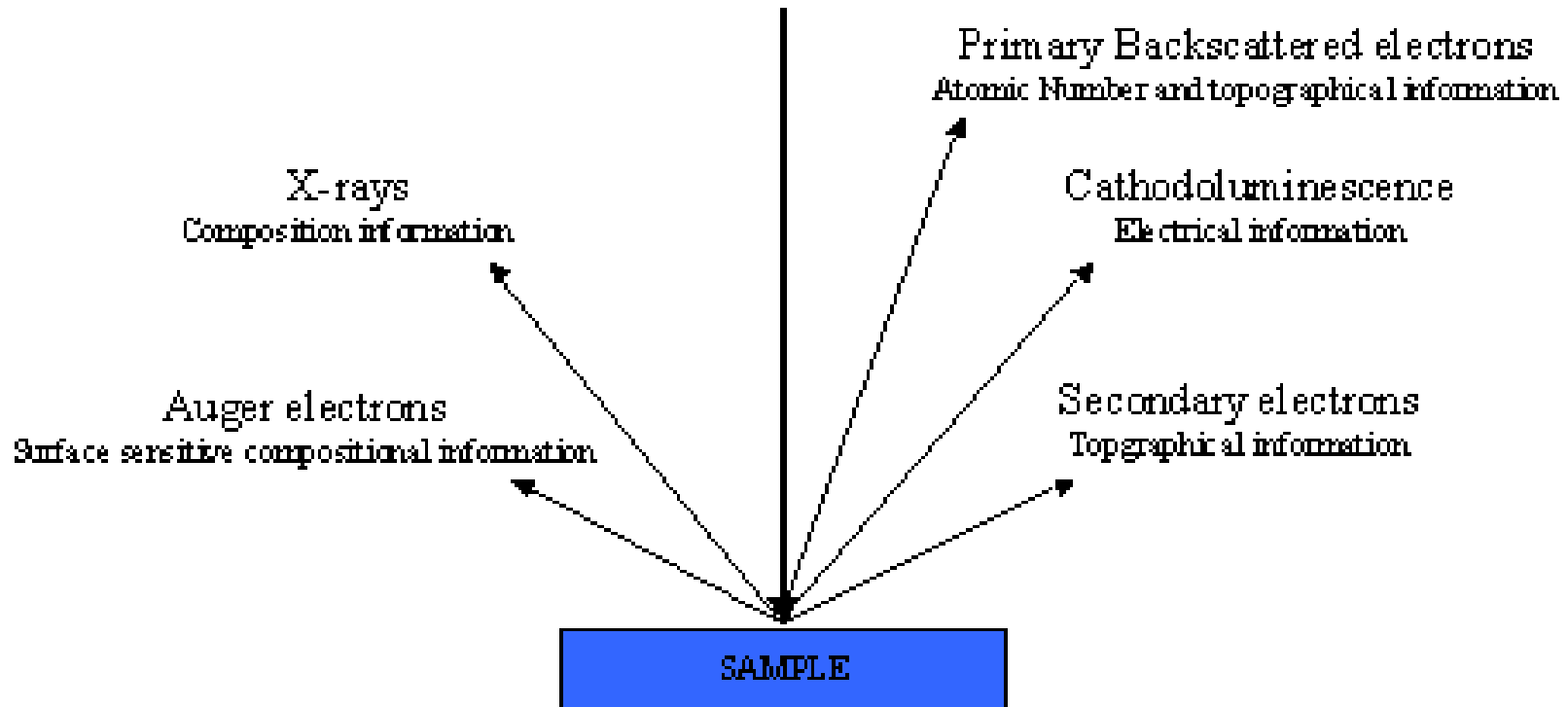
Alcuni fenomeni si verificano sulla superficie sottoposta all'impatto degli elettroni; i più importanti per la microscopia elettronica sono:

- 1) l'emissione di **elettroni secondari** con energie di qualche decina di eV,
- 2) la riemissione o riflessione di elettroni ad alta energia o **retrodiffusi** appartenenti al raggio primario.

Gli elettroni secondari, o segnale SE (Secondary Electron), sono definiti convenzionalmente come gli elettroni uscenti dal campione con energia minore o uguale a 50 eV.

Essi provengono da una profondità di pochi nm (nanometri) e scaturiscono dal fascio primario e dall'interazione degli elettroni retrodiffusi con gli elettroni di valenza (del campione).

Incident Electron Beam



La corrente elettronica emessa è raccolta dai rivelatori e amplificata contemporaneamente alla scansione del fascio elettronico sul campione, le variazioni nella forza del segnale risultante sono usate per variare la brillantezza della traccia del raggio elettronico che fa una scansione su uno schermo fluorescente sincronica con il raggio elettronico sul campione.

L'ingrandimento prodotto dal microscopio elettronico a scansione è il rapporto tra le dimensioni tra l'immagine finale prodotta ed il campo esplorato dal fascio elettronico sul campione.

Normalmente l'ingrandimento può andare da 10 a 200.000x ed il potere risolutivo può spingersi fino a 4nm ( 40 Ångstrom).

Gli **SE** forniscono informazioni sulla topografia delle superfici e sulla presenza e distribuzione di campi magnetici o elettrici; per rilevarli si fa uso di uno scintillatore/fototubo preceduto da uno stadio acceleratore. L'immagine fornita da tali elettroni appare in rilievo, come se l'osservatore fosse allo stesso livello del diaframma interno e guardasse l'oggetto illuminato da un'ipotetica sorgente situata in corrispondenza del **rilevatore**.

Gli **elettroni retrodiffusi**, o segnale BSE (Back-Scattered Electron), sono elettroni di **energia maggiore di 50 eV** che derivano principalmente dalle interazioni (singole a grande angolo o multiple, elastiche e non) del fascio primario con i nuclei degli atomi del campione. Gli BSE forniscono informazioni riguardo al numero atomico medio della zona di provenienza (circa qualche  $\mu\text{m}$ ), alla topografia e alla struttura cristallina del campione.



I prodotti dell'interazione vengono raccolti da opportuni **rivelatori** ed i segnali ottenuti, vengono inviati a modulare l'intensità del fascio del tubo a raggi catodici. Il movimento di scansione della sonda e del pennello elettronico del tubo è controllato unicamente da un **generatore**, che ad ogni posizione della sonda sul preparato ne fa corrispondere una definita del pennello sullo schermo del tubo, la cui luminosità dipende quindi dall'intensità del segnale raccolto.

Il limite alla **risoluzione** (minima distanza alla quale due punti rimangono distinti) del SEM è dovuto alle dimensioni del diametro geometrico della sonda, migliorabile (a parità di intensità di corrente del fascio, che determina il contrasto) mediante l'uso di sorgenti di alta brillantezza e/o grandi angoli di apertura del cono di elettroni convergenti sulla superficie.

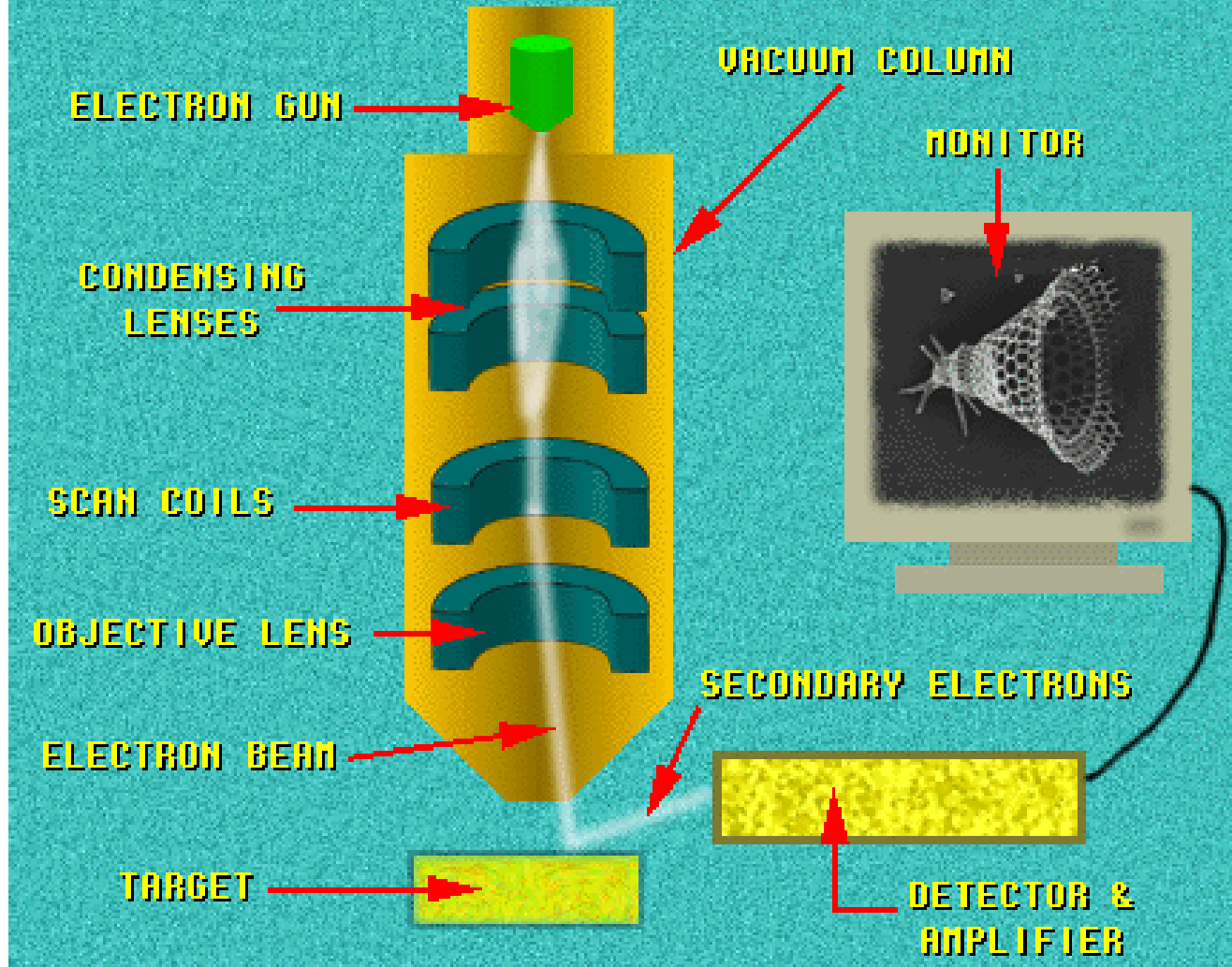
Il sistema ottico dello strumento è costituito da due lenti magnetiche:

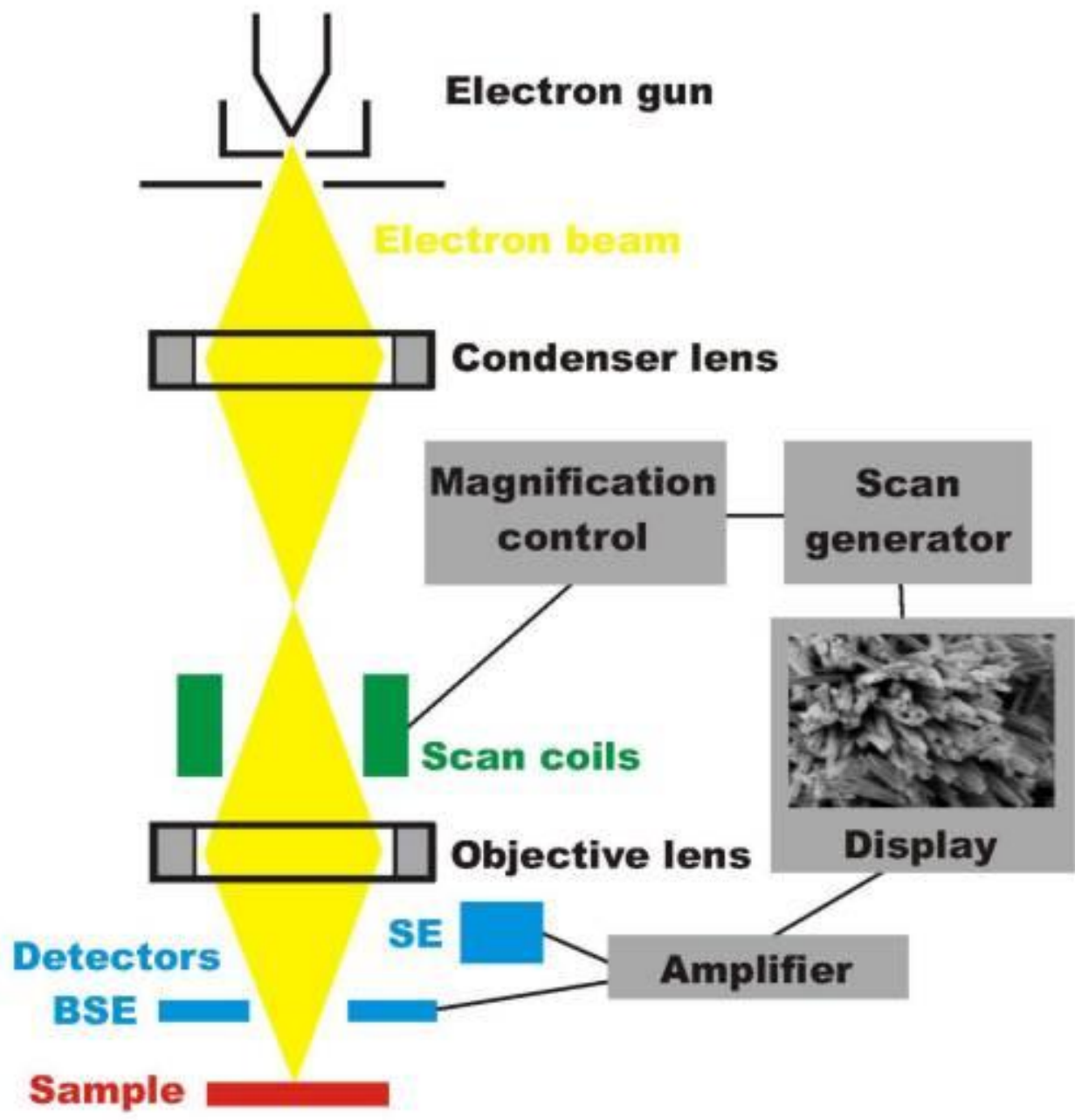
lente condensatrice e lente obiettivo.

Le prime (costituite da una o più lenti) servono per il controllo del fascio elettronico che raggiunge l'obiettivo;

le seconde determinano il fascio di elettroni incidente sulla superficie del campione.

# SCANNING ELECTRON MICROSCOPE





La scansione è eseguita per mezzo di due coppie di **bobine elettromagnetiche** poste internamente alle lenti dell'obiettivo, queste muovono il pennello elettronico sulle coordinate cartesiane X e Y della superficie del campione tramite il segnale elettrico inviatogli.

Tali segnali possono essere sia analogici che digitali; questi ultimi hanno il vantaggio di consentire un migliore movimento ed un eccellente posizionamento del fascio elettronico.

Per i campioni conduttori di elettricità lo studio si presenta più facile, poiché il flusso di elettroni a terra non è ostacolato riducendo al minimo gli inconvenienti dovuti all'accumulo di cariche.

Inoltre essendo dei buoni conduttori di calore, la degradazione termica è minima.

# Allestimento dei preparati

- La prima operazione da effettuare consiste nel **prelievo del campione**.



I campioni che devono essere osservati al SEM per la determinazione della morfologia e della microstruttura devono essere montati e trattati in modo opportuno.

Ad esempio i campioni devono essere anidri, o comunque l'acqua in essi contenuta non deve essere rilasciata nel momento in cui il campione viene portato in vuoto.



# Preparazione dei campione per il SEM

Lavare il campione.

Fissare il campione in 2.5% glutaraldeide in 0.1M PB, pH 7.2 -7.4 oer  
24-48 ore.

Lavare il campione in tampone fosfato 0.1M 4volte X 15 minuti  
risciacquare in acqua distillata 3 X 5 minuti

Disidratare in etanolo

70% etanolo 20 minuti

80% etanolo 20 minuti

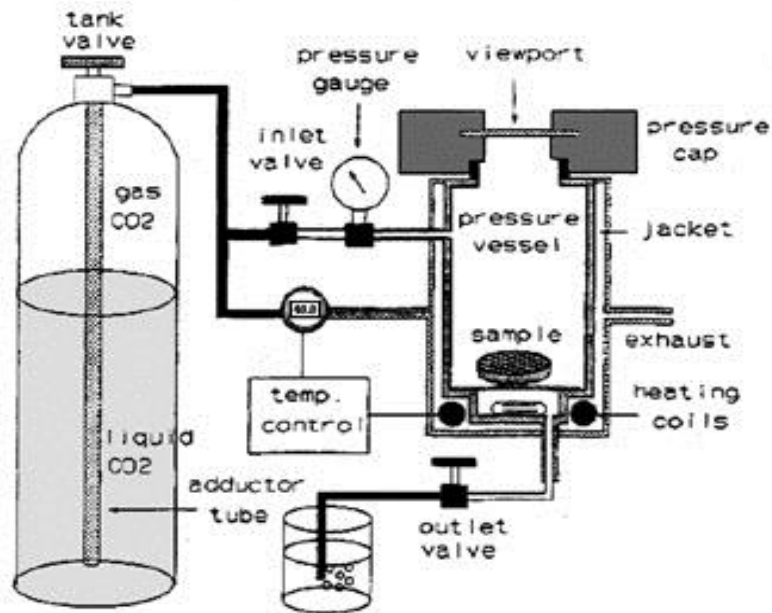
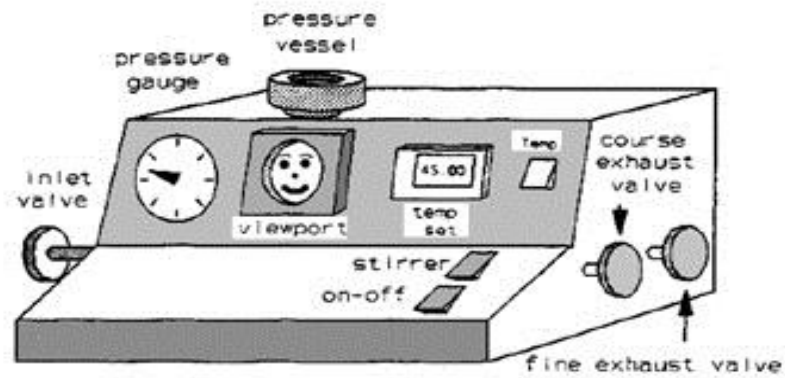
90% “ , 20 minuti

95% “ , 20 minuti

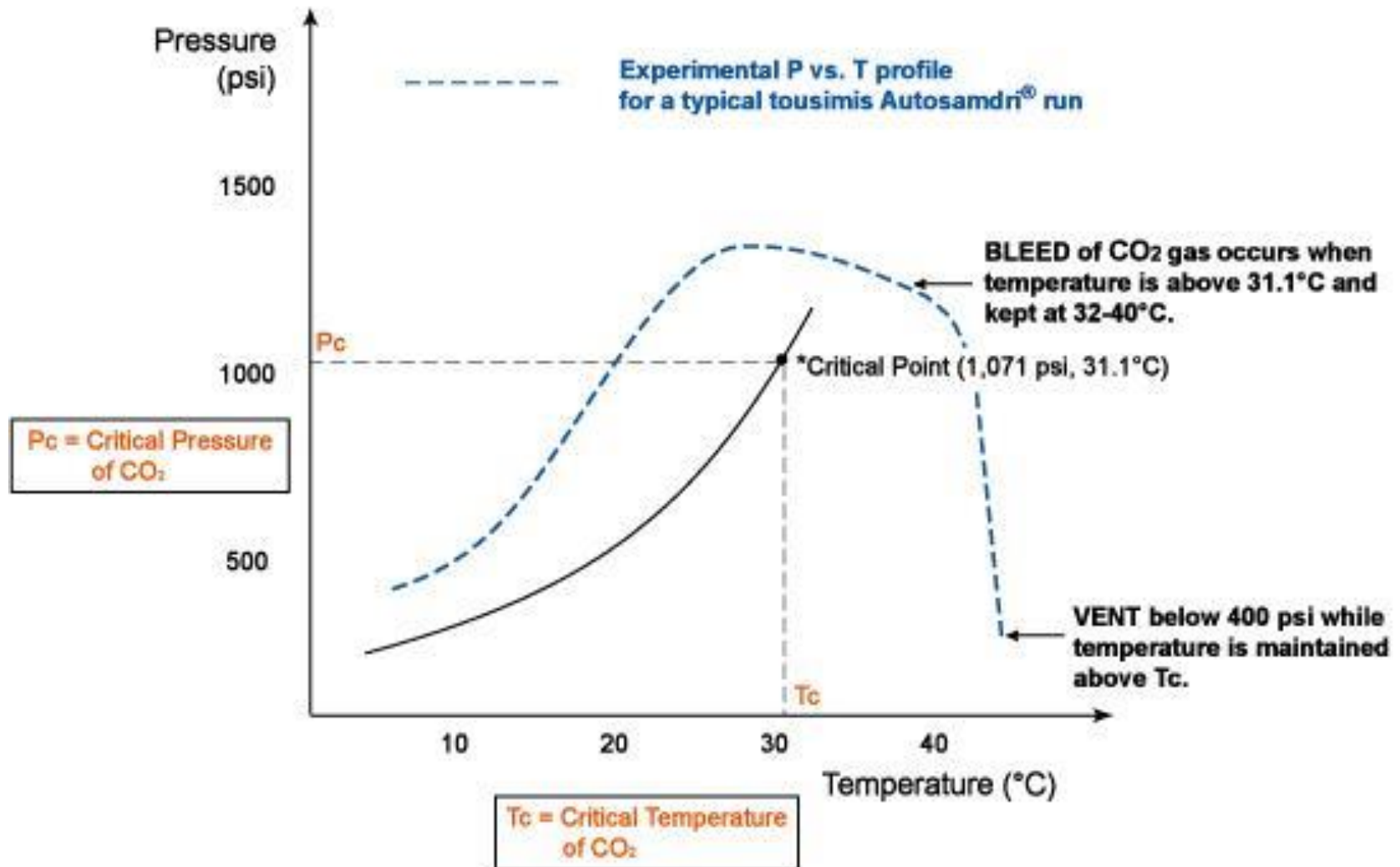
100% “ , 3 X 20 minuti

NOTA : I tempi dipendono dalla dimensione e dalla densità del campione  
I campioni sono pronti per la fase di essiccamento in Critycal point dryer

# Critical-Point Dryer



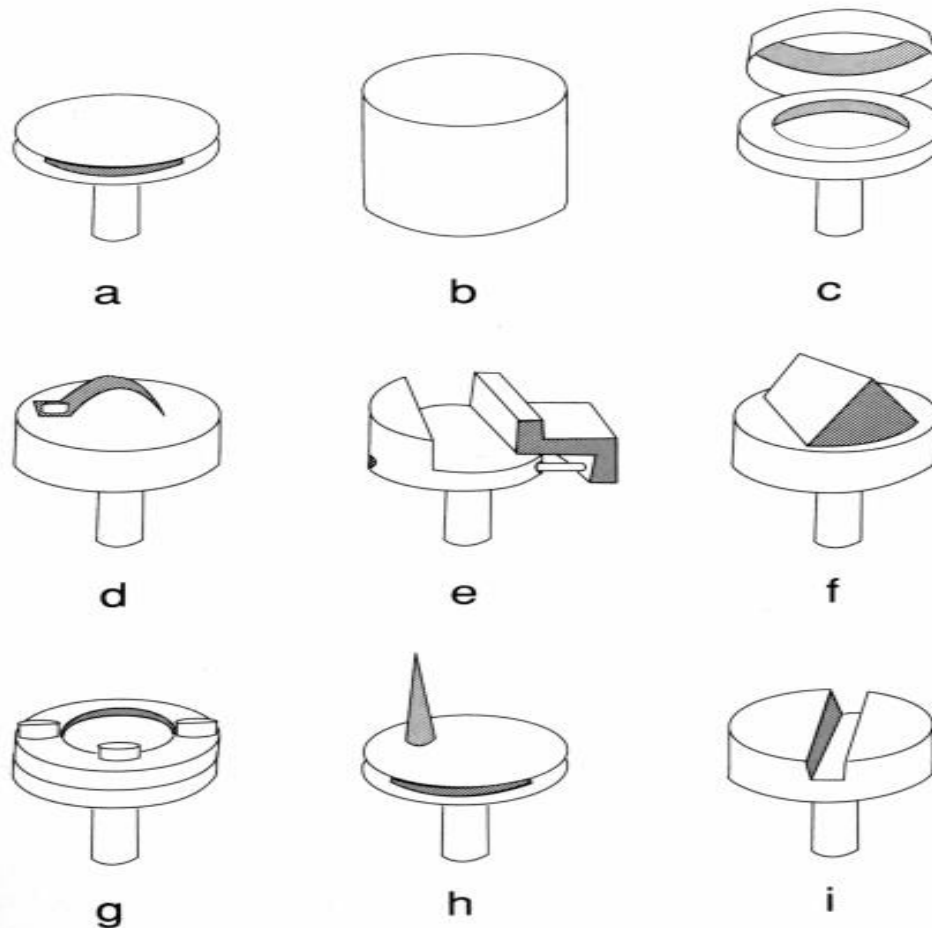
**Figure III. Pressure (P) vs. Temperature (T) Graph For AUTOSAMDRI®**



\* At critical point, the liquid CO<sub>2</sub> transforms into gaseous CO<sub>2</sub> and above critical point isotherm, it is always a gas. Below this point, it can exist as a liquid, gas or both.

I campioni tridimensionali devono generalmente essere incollati su un adeguato supporto, che può essere costituito da un vetrino per microscopio o da una basetta in alluminio già dotata di perno di bloccaggio (**stub**).

Per il fissaggio si adopera uno speciale nastro biadesivo conduttivo, a base di grafite, oppure pasta collante a base di grafite o argento.



**Figure 3-12** Specimen stubs used for mounting biological specimens for viewing in the SEM. The standard types are shown in a and b, while others are modifications to hold or pin down various types of specimens. (Courtesy of Judy Murphy and SEM, Inc. Redrawn with permission.)







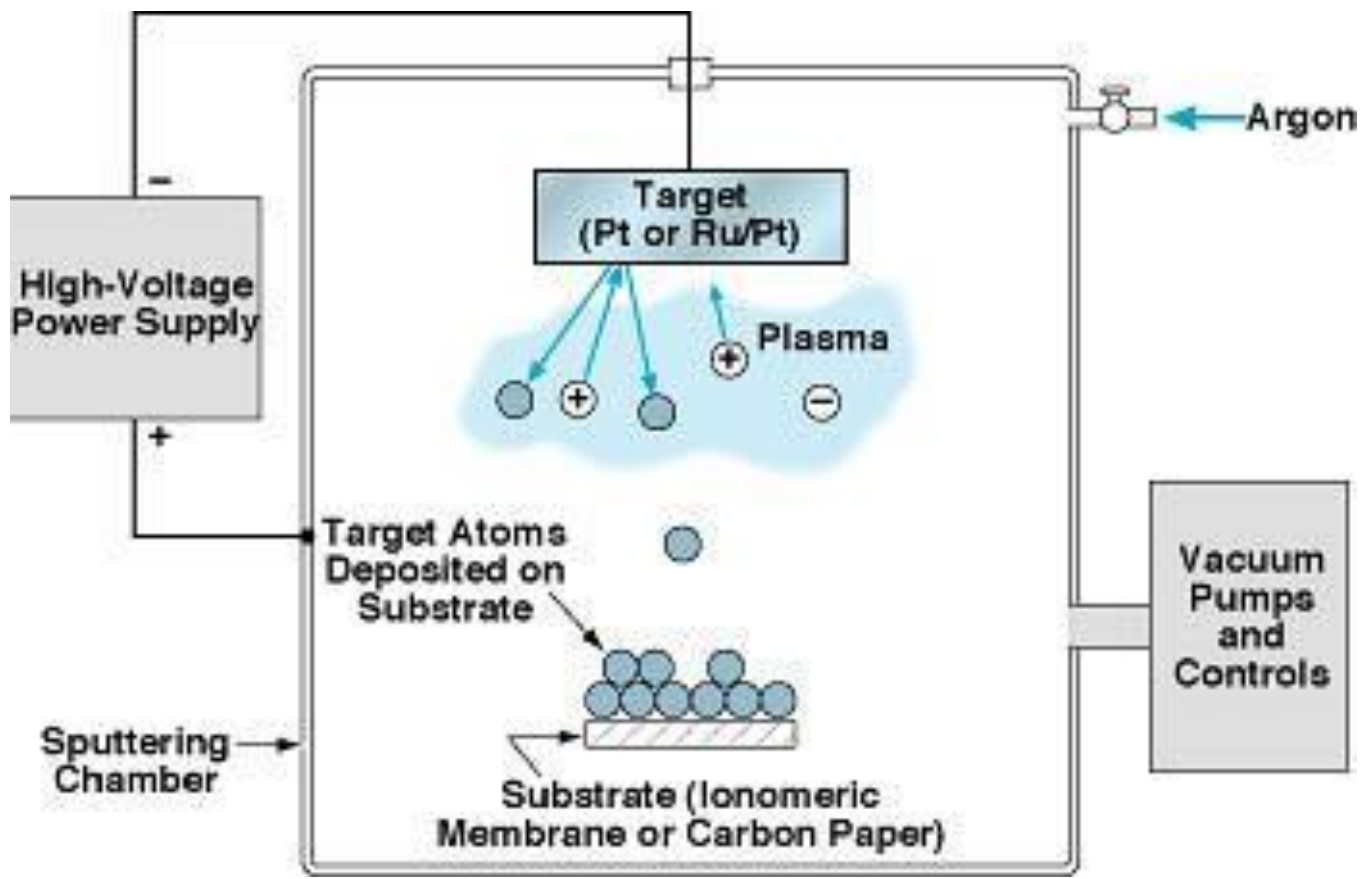
Il campione, qualora non sia conduttivo per propria natura, deve essere reso conduttivo almeno nel suo strato superficiale mediante ricopertura con un sottile strato di oro (**coating** o **metallizzazione**).

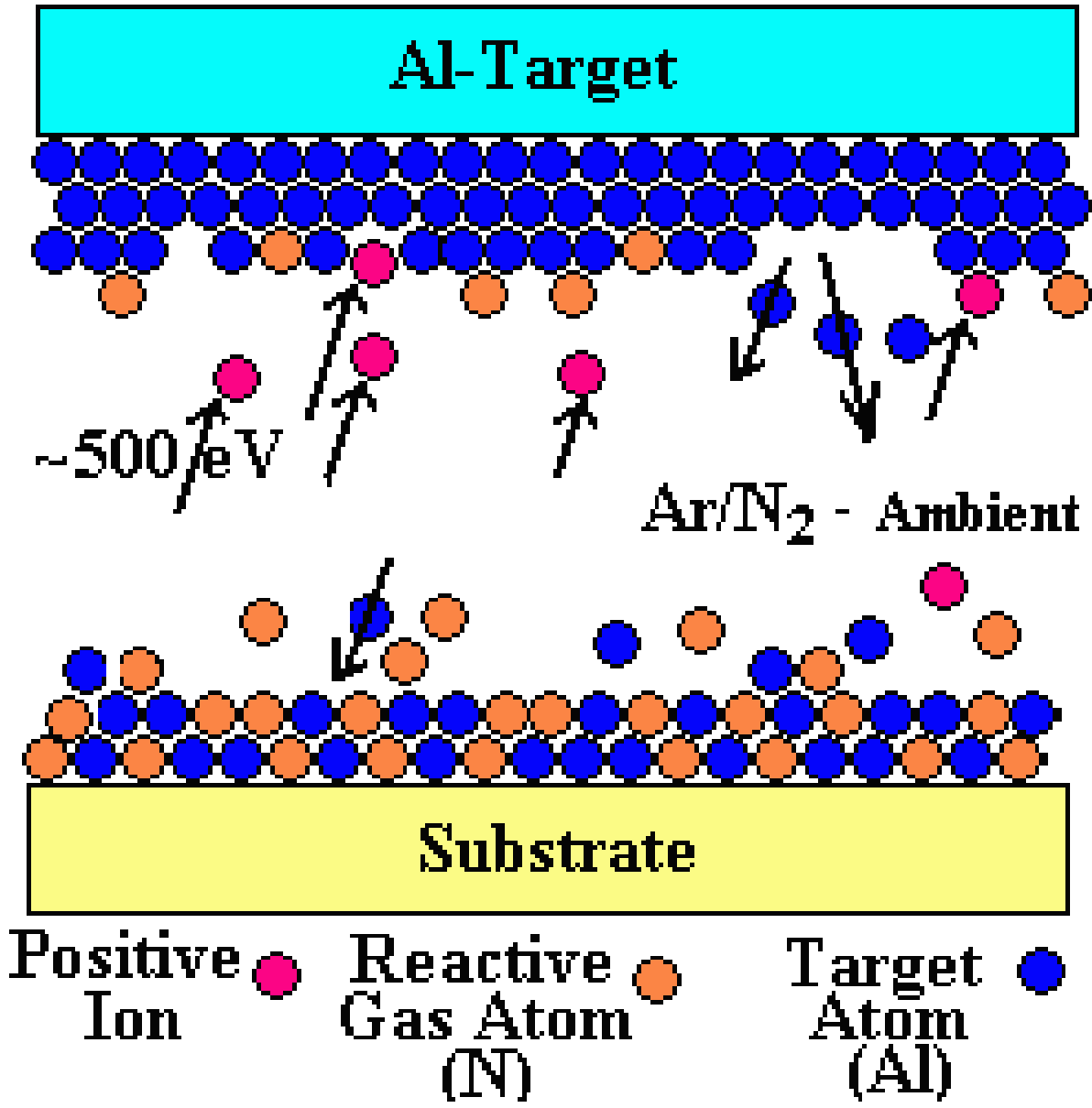
In casi particolari si possono usare altri metalli, oppure il carbonio sotto forma di grafite.

La tecnica più diffusa, per ottenere immagini SEM da campioni non conduttori, consiste nel rivestire la superficie del campione di un sottile film metallico prodotto per *sputtering* o per evaporazione sotto vuoto.

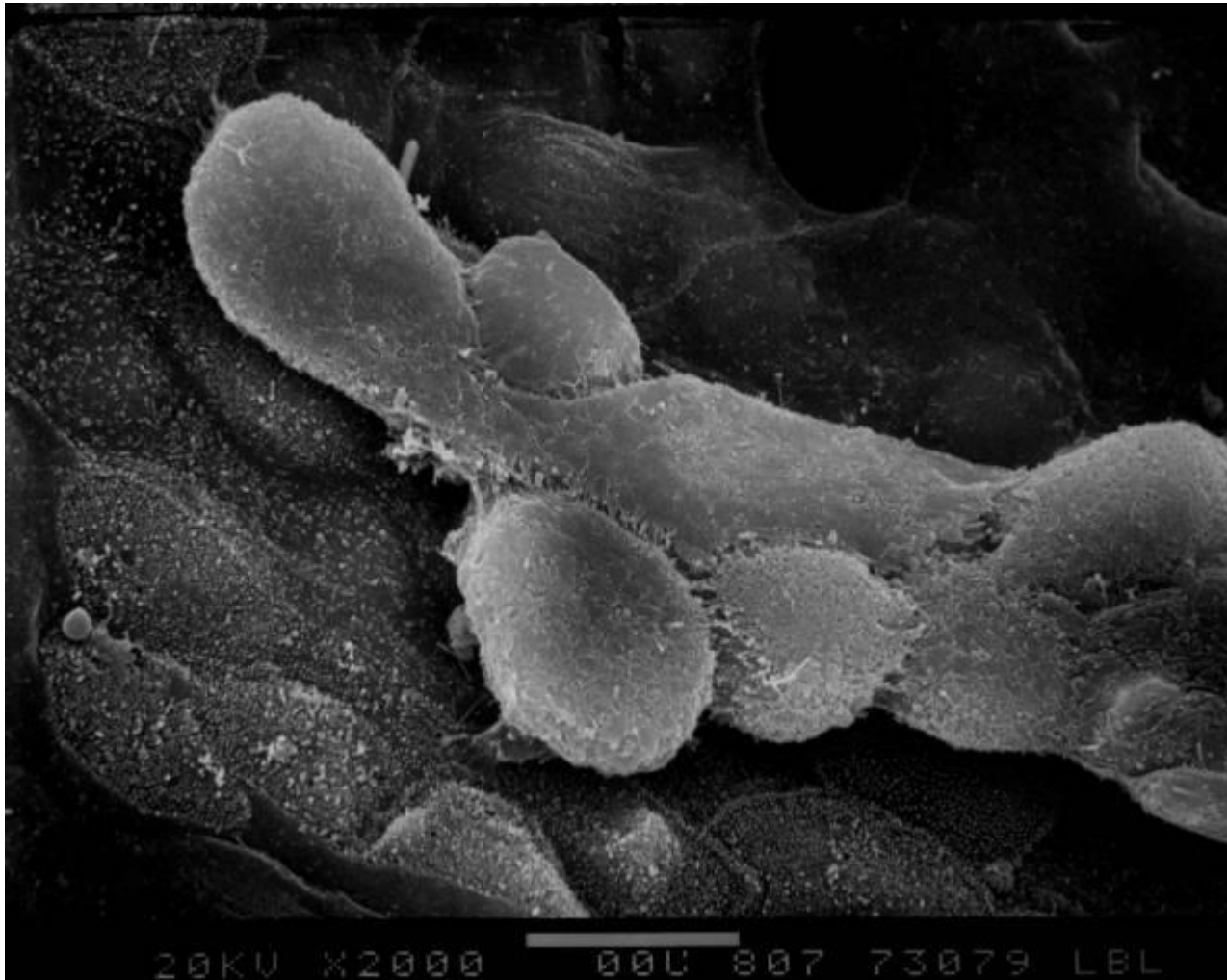
sputter





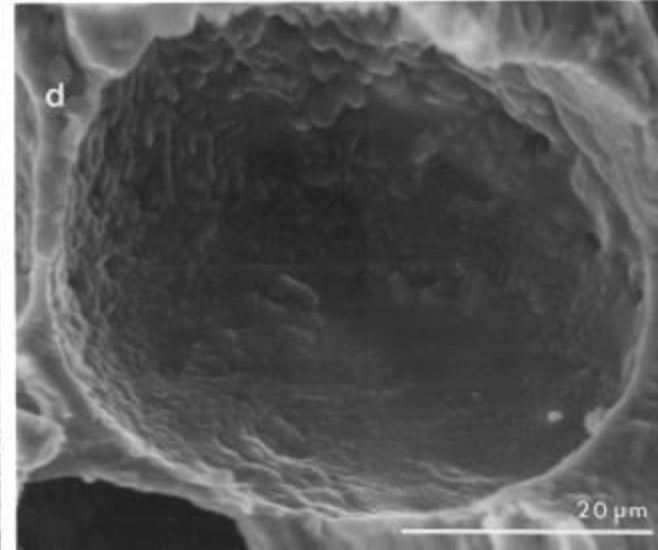
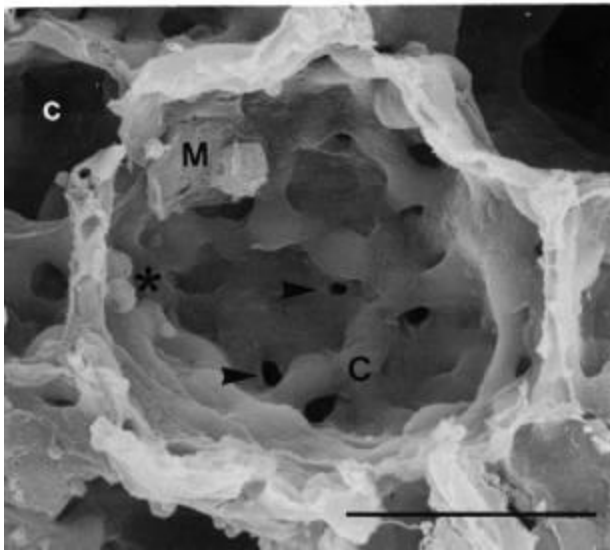
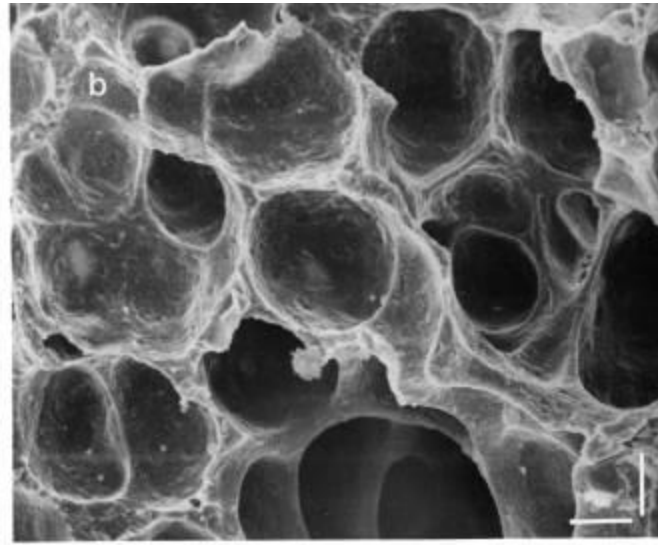
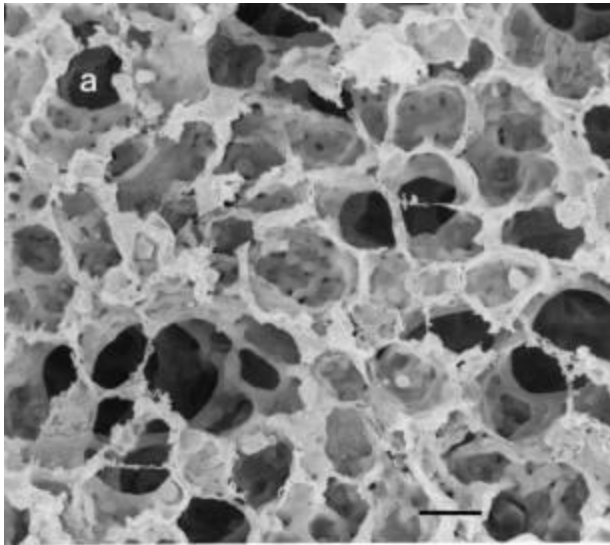


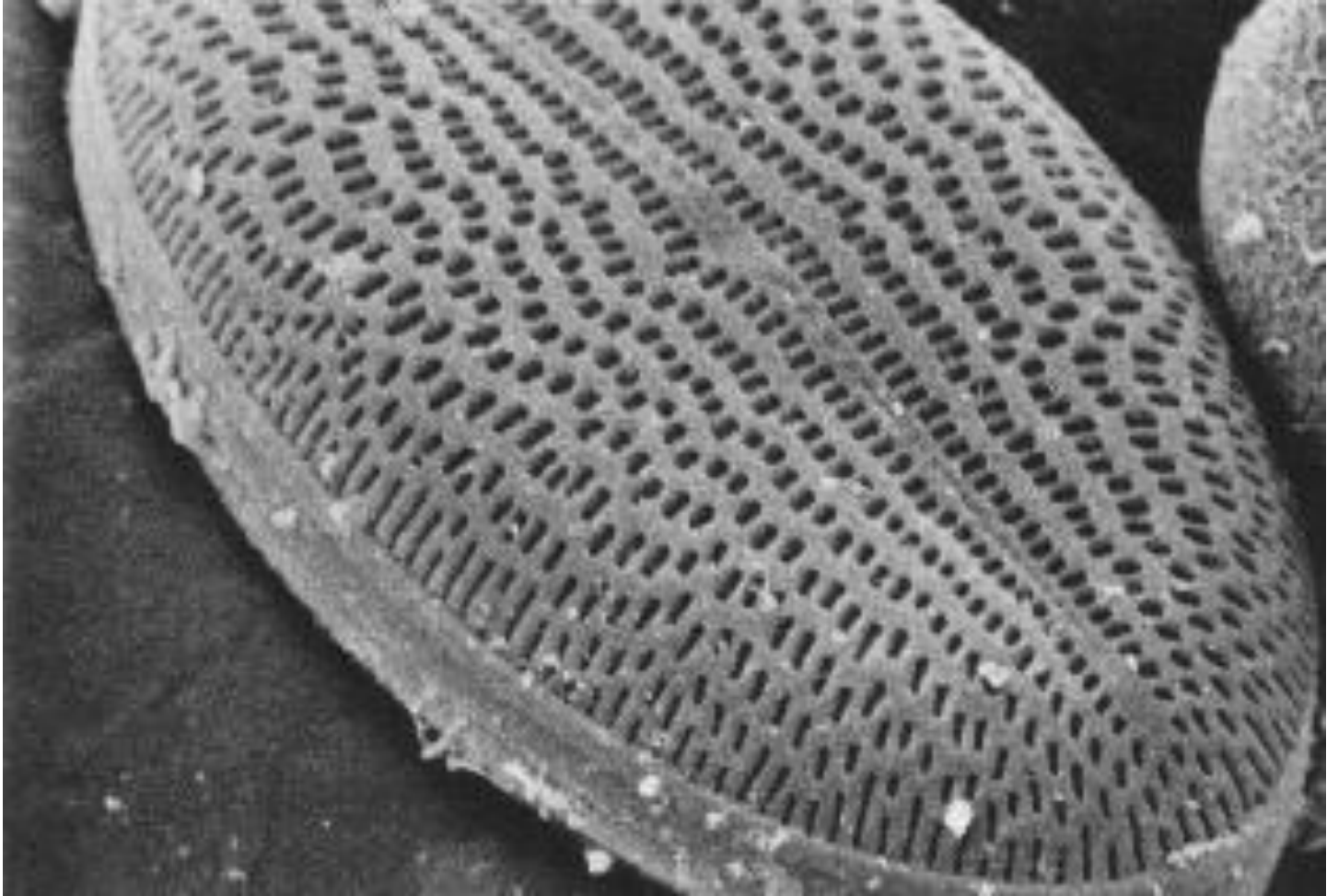
## Bacteria-fighting macrophage cells viewed by SEM

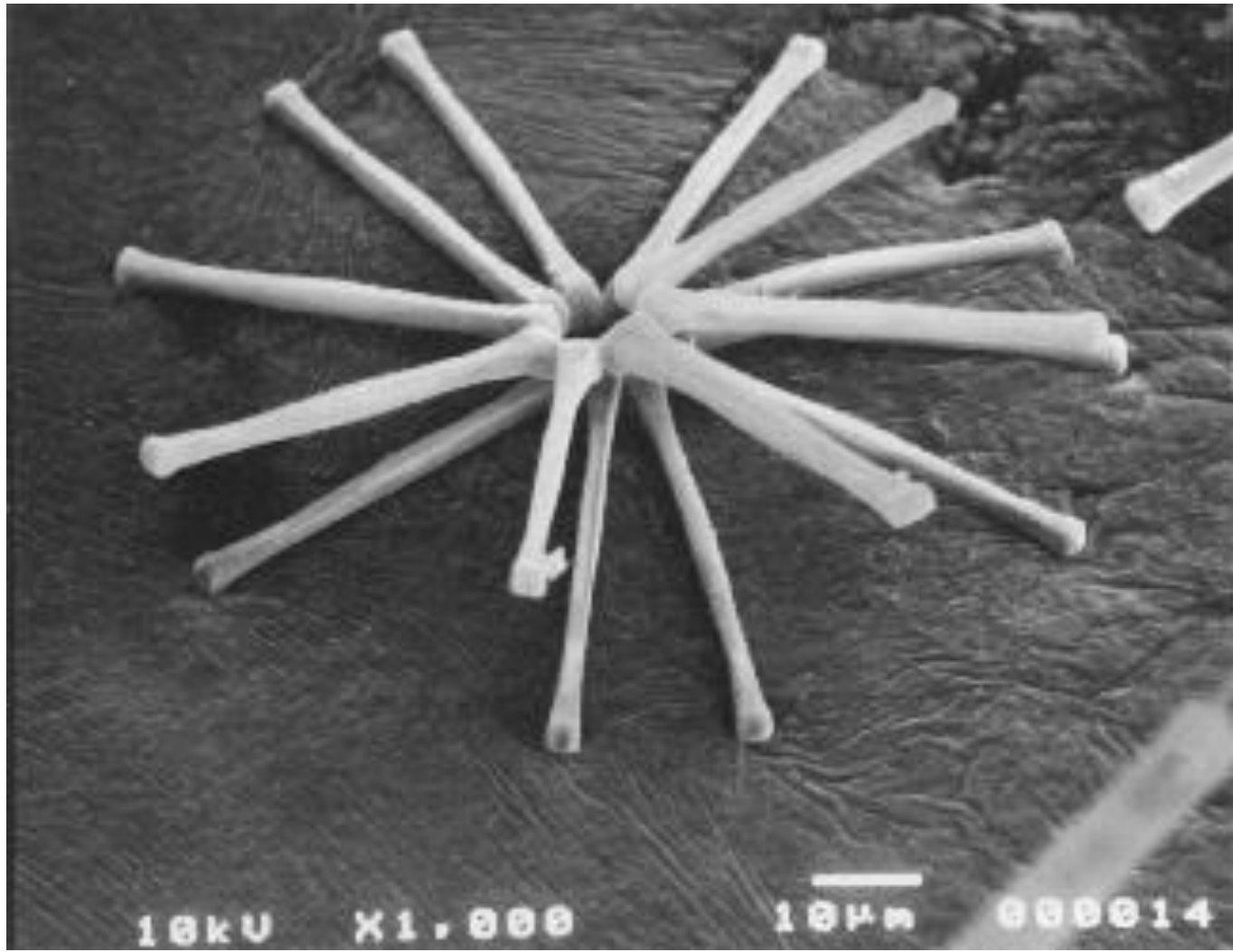




# Alveoli





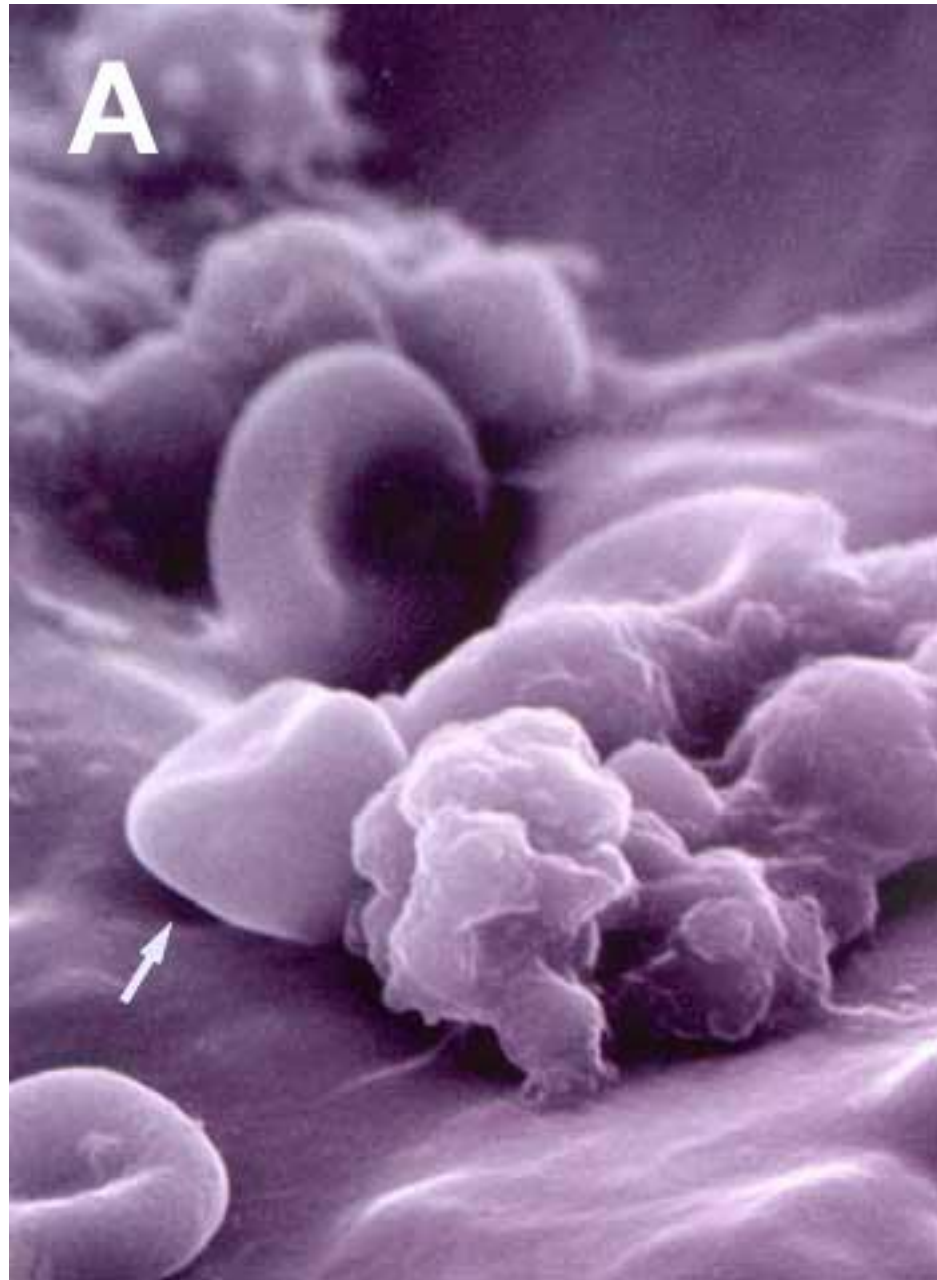


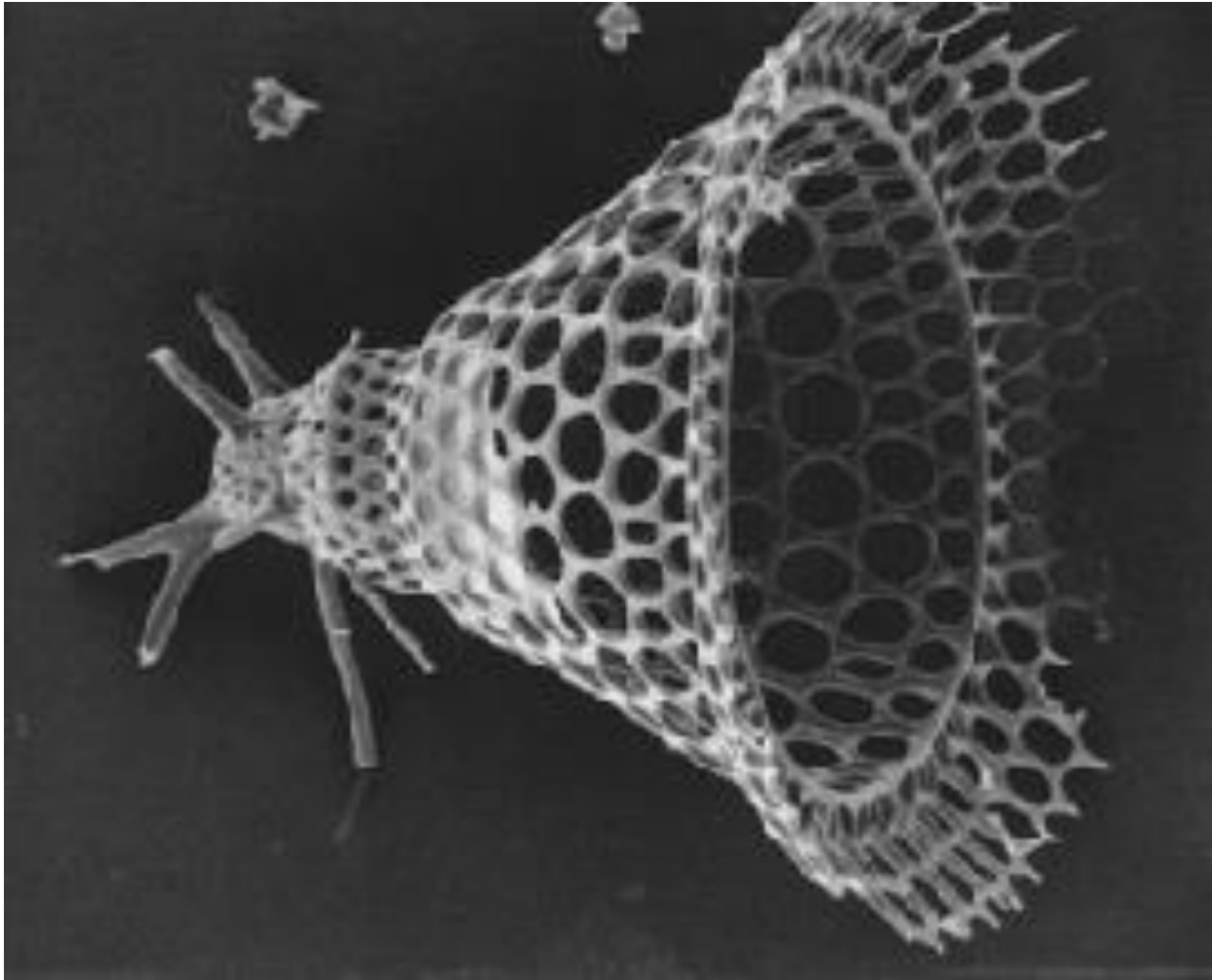
10kV

X1,000

10µm

000014





## Environmental SEM

Mentre un SEM convenzionale richiede un elevato vuoto nella camera l'ESEM può lavorare a pressione ambientale.

La camera è isolata dal resto della colonna (che deve avere sempre un vuoto elevato) da valvole, aperture che controllano la pressione.

L'acqua è il gas che permette la formazione dell'immagine mediante un controllo fine della sua pressione di vapore nella camera.

Quando il fascio primario collide con il campione e dalla sua superficie vengono emessi elettroni secondari, questi collidono con le molecole di acqua che a loro volta funzionano come una cascata amplificatrice poiché la collisione determina un aumento di elettroni. A questo punto gli elettroni positivamente ionizzati vengono attratti dal detector.

I campioni non devono essere fissati e disidratati (possono essere vivi)

## Preparazione campioni SEM convenzionale

Prelievo, fissazione, disidratazione,  
essiccamento (Critical Point Dryer), montaggio,  
Ricopertura, osservazione

## Preparazione campioni SEM ambientale (ESEM)

Nessuna: preparati vivi e idrati

**Ancora bassa risoluzione, costo elevato**