

# VEDERE L'INVISIBILE

## Lo sguardo dello scienziato dentro le cose.

Firenze, 18-19 aprile 2024

---

TERZO CLASSIFICATO  
SEZIONE TESINE BIENNIO

### Vedere il piccolo in grande

*Studenti*

Agnagna Ondongo Sally Delice – Bilotta Daniele – Caporizzo Daniele – Pezzoli Julia

Classe 2ES

*Istituto di Istruzione Superiore*

Liceo Casiraghi – Cinisello Balsamo (MI)

*Docente Coordinatore*

Capocelli Laura

*Gli studenti sperimentano che per andare oltre il visibile occorre affinare gli strumenti di osservazione. Dalla lente di ingrandimento, al microscopio da loro costruito sul banco ottico, al microscopio del laboratorio e infine il microscopio SEM presso un centro di ricerca in biotecnologie. Una evidente conoscenza di ottica geometrica si accompagna a una buona consapevolezza delle caratteristiche strutturali del SEM. La relazione, rigorosa nell'esposizione e linguisticamente corretta, mostra apprezzabile senso critico.*

## Relazione dell'insegnante allegata alla tesina dal titolo:

### Vedere il piccolo in grande – SAFTB057

La proposta è stata rivolta a studenti di **una classe II del liceo scientifico** a partire da un lavoro di ottica svolto nelle ore curricolari.

Si è scelto di partire dallo studio delle lenti, trattate in modo molto essenziale nel percorso curricolare mattutino, per poi via via realizzare o utilizzare strumenti con una risoluzione sempre maggiore per comprendere che in fisica è l'oggetto che determina lo strumento da utilizzare per studiarlo. Si è quindi sottolineata l'importanza di adeguare il metodo di osservazione alle dimensioni e alle caratteristiche dell'oggetto osservato.

Tutta la preparazione teorica e l'attività sperimentale si è svolta durante ore extracurricolari. La prima parte del lavoro si è svolta nei laboratori di fisica e di biologia della scuola, mentre l'attività di osservazione con il SEM si è svolta presso i laboratori di analisi della KCS Biotech di Vergiate, con la preziosa collaborazione della dott.ssa Miriam Vergani e dei suoi collaboratori.

Lo sviluppo del percorso realizzato con gli studenti si può dividere in quattro fasi.

**Prima fase** – L'osservazione mediante una lente di ingrandimento e l'osservazione delle prime problematiche

Dopo aver dedicato i primi incontri a rivedere le proprietà delle lenti, affrontate nel percorso curricolare con l'intera classe, gli studenti hanno fatto le prime semplici osservazioni con delle lenti convergenti biconvesse (lenti di ingrandimento). Già dalle prime osservazioni si sono resi conto che gli strumenti hanno dei limiti di utilizzo: hanno infatti osservato le aberrazioni (nel loro caso l'aberrazione cromatica e l'aberrazione sferica) di cui sono andati a ricercare le cause.

**Seconda fase** – La costruzione di un microscopio ottico e le prime osservazioni

Per poter ingrandire maggiormente gli oggetti osservati, gli studenti hanno costruito un prototipo di microscopio ottico utilizzando due lenti convergenti (obiettivo e oculare). Hanno determinato l'ingrandimento ottenuto accoppiando differenti lenti per stabilire la coppia con ingrandimento maggiore da utilizzare per le osservazioni. Si è partiti dall'osservazione di oggetti comuni (biglietti del tram o banconote) per poi cercare di osservare la struttura microscopica di una cipolla. Quest'ultima osservazione non ha portato a risultati soddisfacenti: si riuscivano a osservare, non nitidamente, le cellule delle cipolle solo utilizzando anche lo zoom della camera del cellulare utilizzato per l'osservazione (il nostro "occhio").

**Terza fase** – Utilizzo di un microscopio ottico professionale e il potere risolutivo

Si è passati quindi ad utilizzare i microscopi ottici presenti nel laboratorio di biologia della scuola, che sfruttano sistemi di lenti più complessi per raggiungere ingrandimenti maggiori. Gli studenti hanno potuto quindi osservare le cellule delle cipolle, con le pareti cellulari, i nuclei e le lamelle mediane delle pareti cellulari. Il desiderio di poter continuare a osservare la realtà sempre più piccola ha costretto i ragazzi a chiedersi se con un microscopio ottico sia possibile, realizzando sistemi di lenti sempre più complessi, raggiungere la visione dell'infinitamente piccolo. Il potere risolutivo del microscopio ottico invece determina un limite di utilizzo di tale strumento: tale limite è dovuto alla lunghezza d'onda della luce visibile. Non si possono quindi distinguere due punti con distanza minore di  $0,2\mu\text{m}$ .

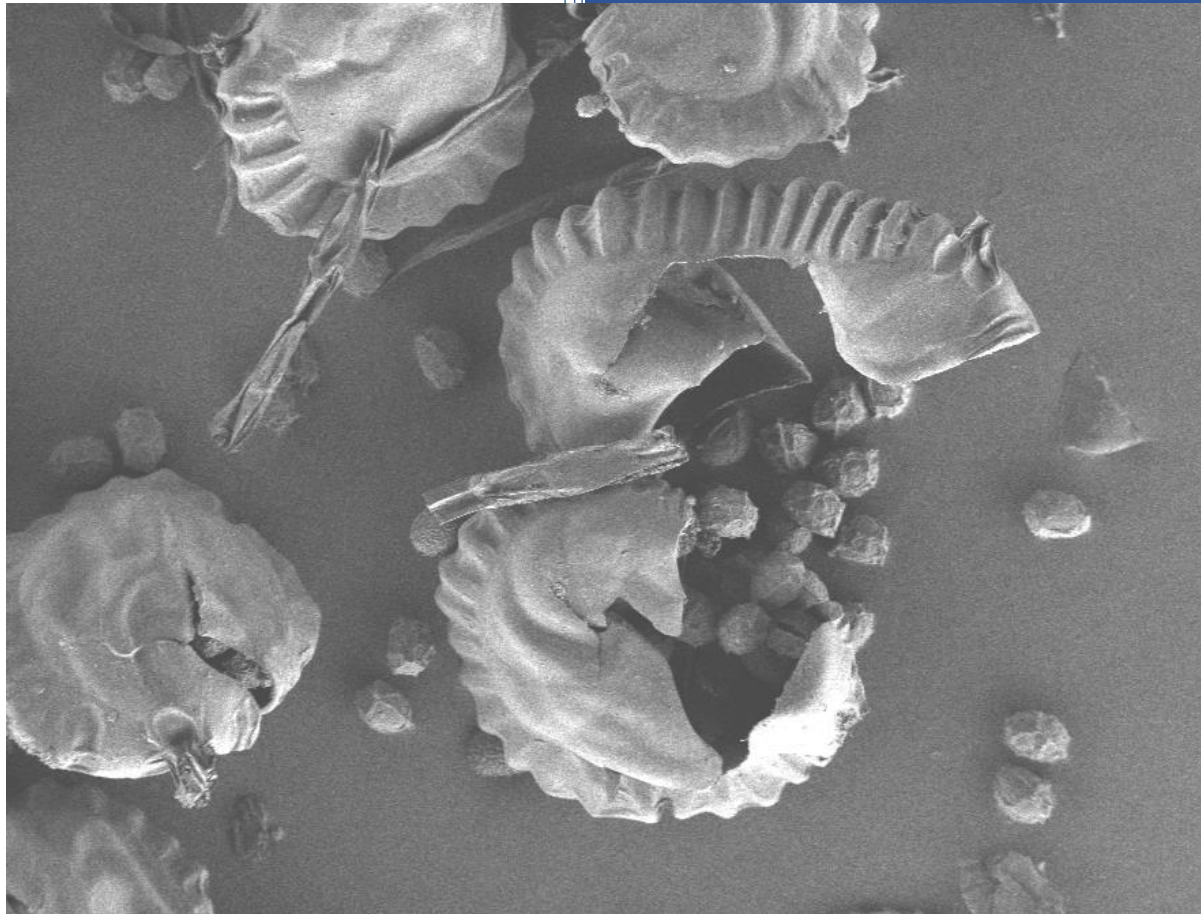
**Quarta fase** - Il SEM

Per poter migliorare il potere risolutivo è necessario cambiare tecnologia: bisogna utilizzare un SEM che sfrutta i fasci di elettroni. Gli studenti hanno quindi proseguito con l'osservazione di campioni biologici (in questo caso funghi e felci) utilizzando i microscopi ottici e il SEM del laboratorio di biologia KCS Biotech di Vergiate. Questa fase ha permesso loro di comprendere che per osservare strutture di dimensioni differenti è necessario cambiare metodo di osservazione (e quindi strumento per l'osservazione). Gli studenti hanno inoltre imparato come strumenti realizzati basandosi su tecnologie differenti (un fascio di luce per il microscopio ottico e un fascio di elettroni per il SEM) non solo permettono di osservare campioni di dimensioni differenti, ma che a parità di dimensioni osservate, permettono di evidenziare caratteristiche differenti dell'oggetto osservato.

Questo lavoro ha permesso, all'inizio dello studio della fisica, di introdurre i ragazzi alla dimensione sperimentale in modo adeguato agli strumenti concettuali e linguistici da essi posseduti, e al tempo stesso di riflettere sul fatto che per poter osservare la realtà microscopica è necessario adeguare lo strumento alle dimensioni dell'oggetto osservato.

# Vedere il piccolo in grande

SAFTB057



Scienzafirenze 2024

## Sommario

Introduzione .....	2
La magia delle lenti.....	2
Lenti convergenti e divergenti.....	2
L'ingrandimento .....	3
Iniziamo ad osservare .....	3
Le aberrazioni .....	4
Vogliamo vedere di più.....	5
Il microscopio ottico .....	5
Costruiamo il nostro microscopio .....	5
Osserviamo le cipolle: qualche lacrima la versiamo.....	6
Aumentiamo l'ingrandimento: le cipolle ci danno soddisfazioni!.....	7
Il microscopio ottico ha un limite: il potere risolutivo .....	8
Vogliamo andare oltre .....	9
Il SEM: come funziona .....	9
La preparazione del campione .....	10
Osserviamo i funghi e le felci.....	10
Conclusioni .....	12
Bibliografia e sitografia.....	12

## Introduzione

Durante il nostro secondo anno di liceo scientifico abbiamo provato a studiare i diversi strumenti di osservazione della realtà microscopica. Siamo quindi partiti dallo studio delle lenti per comprendere il funzionamento di un microscopio ottico, di cui abbiamo costruito un prototipo. Abbiamo quindi fatto delle osservazioni prima di oggetti di uso comune (banconote e biglietti del tram) e poi di campioni biologici sia con il nostro microscopio che con dei microscopi ottici professionali. Abbiamo scoperto il limite di utilizzo di un microscopio ottico studiandone il potere risolutivo. Infine, grazie alla preziosa collaborazione con il laboratorio KCS Biotech di Vergiate, abbiamo potuto utilizzare un microscopio elettronico a scansione (SEM) per l'osservazione di funghi e felci.

## La magia delle lenti

Con il termine lente si indica un dispositivo ottico semplice il cui funzionamento è basato sulla rifrazione. Quando guardiamo un oggetto molto piccolo, assimilabile ad un punto, alcuni raggi di luce presenti nell'ambiente vengono da esso riflessi e vengono raccolti dal nostro occhio, formando sulla nostra retina l'immagine dell'oggetto. Se l'oggetto è esteso basta replicare il processo per ogni punto dell'oggetto. Se tra l'oggetto e l'occhio i raggi passano attraverso una lente allora subiranno delle rifrazioni. Si avrà quindi quella che viene definita visione indiretta di un oggetto: l'occhio vede l'immagine prodotta dalla lente che viene attraversata dai raggi provenienti dall'oggetto.

Quando i raggi di luce provenienti da un punto P dell'oggetto sono raccolti dalla lente e rifratti in modo da passare in un unico punto P', parleremo di formazione di una immagine reale e l'occhio raccoglierà i raggi provenienti dal punto P'; quando invece la lente farà divergere i raggi provenienti dal punto P allora saranno i prolungamenti dei raggi a convergere in P': in questo caso parleremo di immagine virtuale infatti l'occhio raccoglie i raggi divergenti e li percepisce come provenienti dal punto P', da dove però non parte nessun raggio di luce reale.

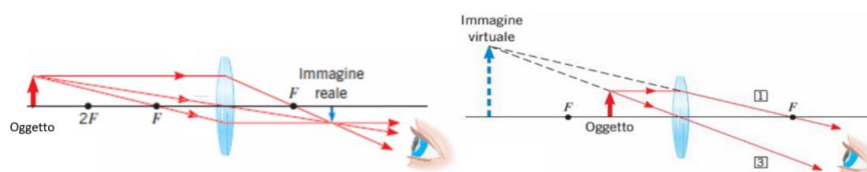


Figura 1 Immagine reale e immagine virtuale

## Lenti convergenti e divergenti

Le lenti che noi abbiamo utilizzato sono lenti sferiche sottili: delle porzioni di materiale trasparente limitate da due superfici che le separano dal mezzo circostante, di cui almeno una a forma di calotta sferica. Sono considerate sottili se i raggi di curvatura delle superfici sferiche sono molto grandi rispetto al diametro della lente e lo spessore della lente deve essere molto piccolo rispetto alla lunghezza dei raggi di curvatura.

Le lenti possono essere divise in lenti convergenti, quando un fascio di raggi che incidono sulla lente parallelamente all'asse viene concentrato in un punto detto fuoco, e divergenti, quando un fascio di raggi dopo aver attraversato la lente si allontana dall'asse divergendo (il fuoco sarà in questo caso il punto in cui convergono i prolungamenti dei raggi).

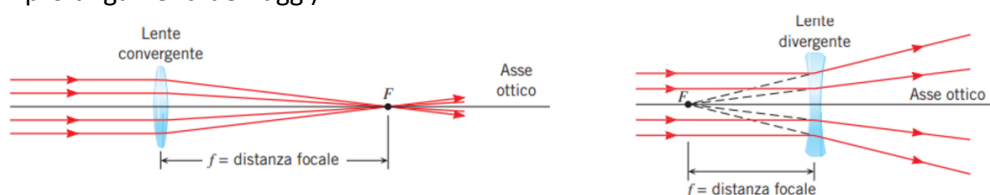


Figura 2 Lenti convergenti e lenti divergenti

Quello che si può osservare è che qualsiasi sia la posizione che assume l'oggetto rispetto alla lente, le immagini che si vengono a formare con le lenti divergenti sono sempre rimpicciolite rispetto all'oggetto reale. Al contrario, con le lenti convergenti possiamo ottenere immagini rimpicciolite, delle stesse dimensioni o ingrandite rispetto all'oggetto (figura 3).

Poiché il nostro scopo era quello di osservare il mondo microscopico, abbiamo utilizzato solo lenti convergenti, in particolare lenti biconvesse.

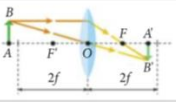
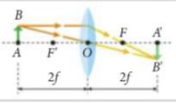
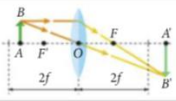
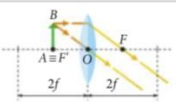
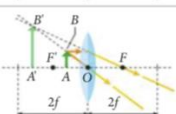
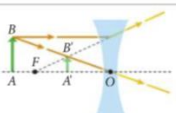
Posizione dell'oggetto	Proprietà dell'immagine	Schema
<b>Lente convergente</b>		
A distanza maggiore del doppio della distanza focale	Reale, capovolta, rimpicciolita	
Al doppio della distanza focale	Reale, capovolta, delle stesse dimensioni	
Tra il doppio della distanza focale e il fuoco	Reale, capovolta, ingrandita	
Nel fuoco	Nessuna immagine	
Tra il fuoco e la lente	Virtuale, diritta, ingrandita	
<b>Lente divergente</b>		
Qualsiasi	Virtuale, diritta, rimpicciolita	

Figura 3 Formazione delle immagini mediante lenti convergenti e divergenti

## L'ingrandimento

Una lente convergente (biconvessa) è quella che comunemente viene chiamata lente di ingrandimento. Quando viene collocata tra l'oggetto che si vuole ingrandire e l'osservatore in modo che la distanza dell'oggetto dalla lente (che chiameremo  $p$ ) sia minore della distanza focale  $f$  (che per le lenti convergenti ha sempre segno positivo) si formerà una immagine virtuale, diritta e ingrandita. L'immagine è tanto più ingrandita quanto più l'oggetto da ingrandire è vicino al fuoco della lente.

L'ingrandimento di una lente è definito dal rapporto tra la dimensione dell'immagine e quella dell'oggetto ed è dato dalla relazione:

$$I = \frac{\text{dimensione immagine}}{\text{dimensione oggetto}} = -\frac{q}{p}$$

dove con  $q$  viene indicata la distanza dell'immagine dalla lente e convenzionalmente ha segno positivo se l'immagine è reale e negativo se l'immagine è virtuale. L'ingrandimento  $I$  assume valore positivo se l'immagine è diritta e negativo se l'immagine è capovolta.

Per determinare l'esatta posizione in cui si viene a formare l'immagine (e quindi determinare  $q$ ) si utilizza la legge dei punti coniugati:

$$\frac{1}{p} + \frac{1}{q} = \frac{1}{f}$$

## Iniziamo ad osservare

Abbiamo iniziato a fare delle osservazioni con le lenti convergenti presenti a scuola: la prima con fuoco 50mm e la seconda con fuoco 100mm. Come "occhio osservatore" abbiamo utilizzato l'obiettivo della fotocamera di un cellulare che abbiamo fissato su un portaoggetti. Abbiamo così osservato le scritte presenti su una banconota. Muovendo l'oggetto lungo il banco ottico abbiamo visto come cambia l'immagine (ingrandita o rimpicciolita, diritta o rovesciata) in base a  $p$ .

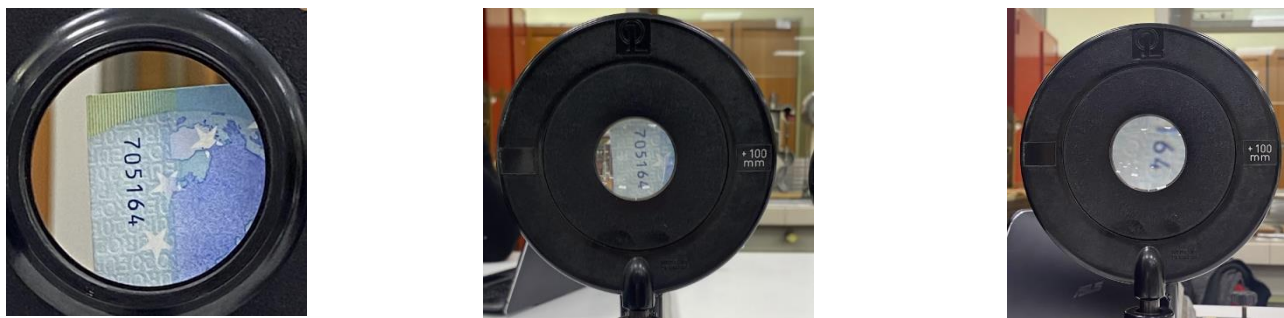


Figura 4 a) banconota osservata senza lente b) e c) banconota osservata con lente con  $f=100\text{mm}$  a  $p$  differenti

Utilizzando la lente con  $f=50\text{mm}$  abbiamo notato che le immagini risultavano deformate ai bordi (figura 5a) e in alcuni casi risultavano alterati anche i colori (figura 5b).

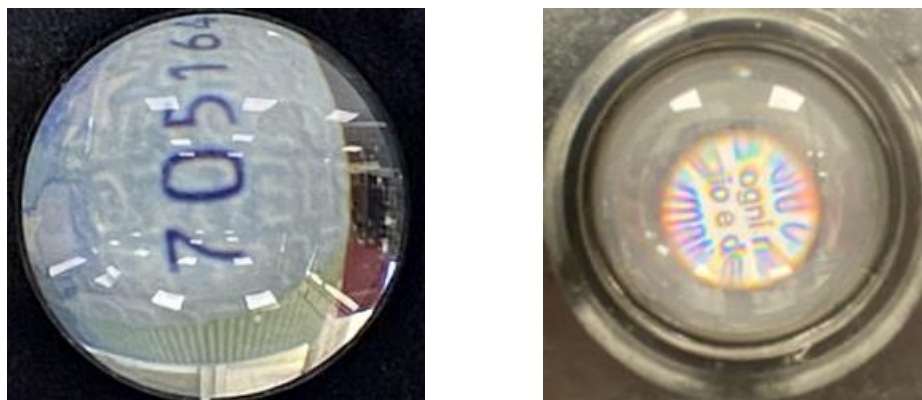


Figura 5 a) deformazione geometrica e b) deformazione cromatica

Siamo andati a cercare le possibili cause di tali deformazioni.

### Le aberrazioni

L'aberrazione dell'immagine di una lente consiste in una deformazione dell'immagine visibile ai margini. Essa dipende da vari fattori e può essere di due tipi: geometrica e cromatica.

L'aberrazione cromatica riguarda i colori: la visione dei colori dell'immagine nelle zone marginali risulta confusa poiché essi sembrano separarsi in più fasci con all'interno i colori più freddi (a partire dal violetto) e all'esterno colori caldi tendenti al rosso. Essa è dovuta al fatto che i raggi di luce bianca sono in realtà costituiti da più raggi di diverso colore, ognuno caratterizzato da una diversa lunghezza d'onda, che vengono rifratti con angoli differenti, convergendo in punti diversi sull'asse ottico. In questo caso quindi la lente si comporta come un prisma.

Tra le aberrazioni geometriche la più comune è l'aberrazione sferica. Questo tipo di aberrazione porta le regioni esterne dell'immagine ad essere notevolmente sfuocate e dipende dal fatto che i raggi marginali subiscono una rifrazione maggiore rispetto ai raggi prossimi all'asse ottico. Invece di avere un unico punto in cui i raggi si focalizzano si crea un cono con diversi punti che non permettono di creare una immagine nitida.

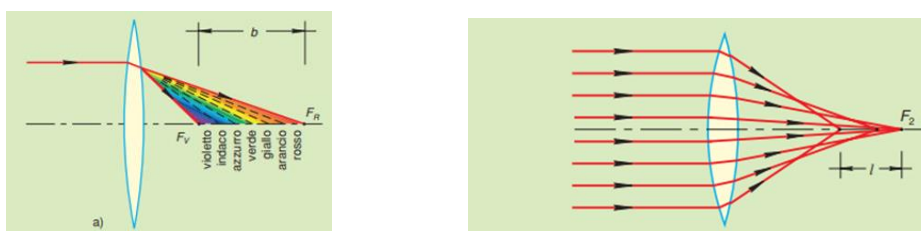


Figura 6 a) aberrazione cromatica e b) aberrazione sferica

Tali deformazioni possono essere corrette mediante una composizione di lenti.

## Vogliamo vedere di più

Con una singola lente l'ingrandimento che si ottiene non è particolarmente elevato. Nel nostro caso, utilizzando una lente con focale di 5cm abbiamo ottenuto un ingrandimento pari a 2,5.

Come possiamo raggiungere un ingrandimento maggiore? Combinando più lenti insieme.

## Il microscopio ottico

Il microscopio ottico è costituito da due lenti (o due sistemi di lenti) convergenti: l'obiettivo, più vicino all'oggetto, e l'oculare, più vicino all'occhio. La prima lente ingrandirà l'oggetto e la seconda ingrandirà l'immagine prodotta dalla prima lente. La prima lente deve quindi creare una immagine reale oltre che ingrandita. Come si desume dalla figura 3, la condizione perché ciò avvenga è che l'oggetto stia tra il doppio della distanza focale e il fuoco della lente dell'obiettivo.

L'obiettivo produce un'immagine  $A_1B_1$  reale, ingrandita e capovolta, che diventerà l'oggetto per l'oculare. Se la posizione dell'oculare è tale da far cadere la prima immagine  $A_1B_1$  tra il fuoco dell'oculare e l'oculare stesso, la nuova immagine  $A_2B_2$  che si verrà a creare sarà una immagine ingrandita, virtuale e diritta rispetto alla prima immagine  $A_1B_1$ . (figura 7)

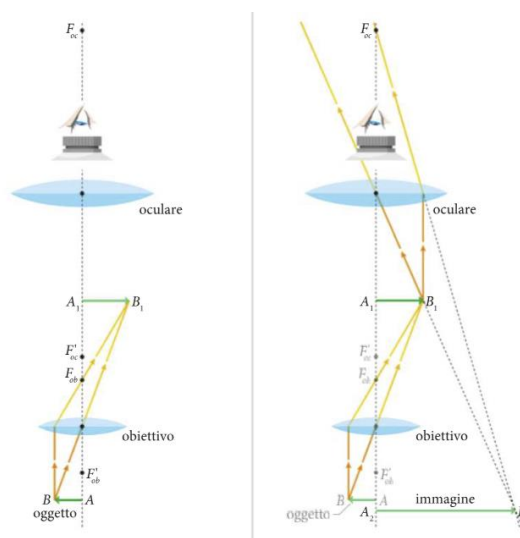


Figura 7 Principio di funzionamento di un microscopio ottico

L'ingrandimento ottenuto con un microscopio ottico è pari al prodotto degli ingrandimenti dell'obiettivo e dell'oculare:

$$I_{tot} = I_{obiettivo} \cdot I_{oculare}$$

## Costruiamo il nostro microscopio

Per realizzare il nostro microscopio abbiamo fissato su un banco ottico le coppie di lenti a nostra disposizione, il portaoggetti su cui fissare l'oggetto da osservare e un portaoggetti per sostenere il cellulare che fungeva da "occhio".

Per ottenere una immagine ingrandita e reale abbiamo dovuto posizionare il portaoggetti ad una distanza  $p_1$  tra il fuoco e il doppio fuoco della prima lente (obiettivo). La posizione dell'immagine  $q_1$  è stata determinata mediante la legge dei punti coniugati per le lenti:

$$q_1 = \frac{f_{obiettivo} \cdot p_1}{p_1 - f_{obiettivo}}$$

Abbiamo quindi posizionato l'oculare a una distanza  $p_2$  dall'immagine prodotta dall'obiettivo minore del fuoco dell'oculare così da ottenere un'immagine ingrandita virtuale ribaltata rispetto all'oggetto iniziale.



Avendo a disposizione 4 lenti convergenti, due con fuoco  $f=5\text{cm}$  e due con fuoco  $f=10\text{cm}$ , abbiamo provato tutte le combinazioni possibili per verificare quale fosse quella con ingrandimento maggiore.

$f_{\text{obiettivo}}$ cm	$f_{\text{oculare}}$ cm	$p_1$ cm	$q_1$ cm	$p_2$ cm	$q_2$ cm	$l_{\text{obiettivo}}$ cm	$l_{\text{oculare}}$ cm	$l_{\text{tot}}$ cm
5,0	10,0	7,0	17,5	5,5	-12,2	-2,5	2,2	-5,5
10,0	10,0	15,0	30,0	5,0	-10,0	-2,0	2,0	-4,0
5,0	5,0	7,0	17,5	2,5	-5,0	-2,5	2,0	-5,0
10,0	5,0	15,0	30,0	3,0	-7,5	-2,0	2,5	-5,0

Il sistema ottico migliore risulta quindi essere il primo, ovvero quello con obiettivo con  $f=5\text{cm}$  e un oculare con  $f=10\text{cm}$ . L'ingrandimento che otteniamo è infatti pari a -5,5, ciò vuol dire che l'immagine finale risulta ingrandita ed è più grande di 5,5 volte rispetto all'oggetto.



Figura 8 Microscopio ottico a) realizzato orizzontalmente b) realizzato verticalmente in analogia ai microscopi ottici reali

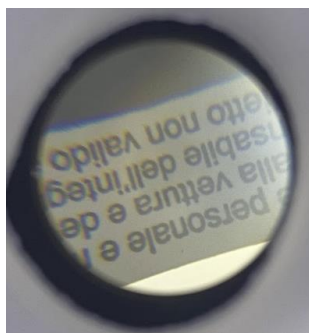


Figura 9 Scritta di un biglietto ATM vista con il nostro microscopio ottico, ingrandimento 5,5

### Osserviamo le cipolle: qualche lacrima la versiamo...

Con l'aiuto di una docente di Scienze Naturali della scuola, abbiamo provato a osservare con il nostro microscopio ottico un sottile strato di cipolla. Abbiamo quindi preparato un campione su vetrino e abbiamo provato ad osservarlo: non si è visto nulla! Abbiamo quindi deciso di colorare con il blu di metilene, adatto alla colorazione delle pareti cellulari, un nuovo campione. Senza sfruttare l'ingrandimento aggiuntivo della telecamera del cellulare si riusciva a vedere solo e unicamente il piccolo campione di cipolla blu. Ingrandendo l'immagine invece si intravedevano le cellule con le pareti cellulari.

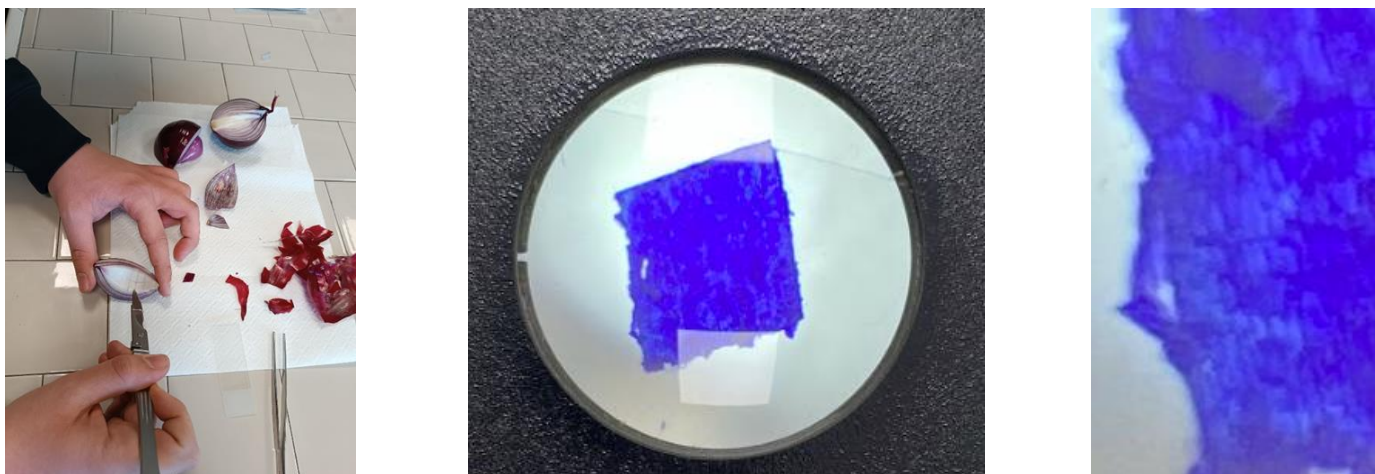


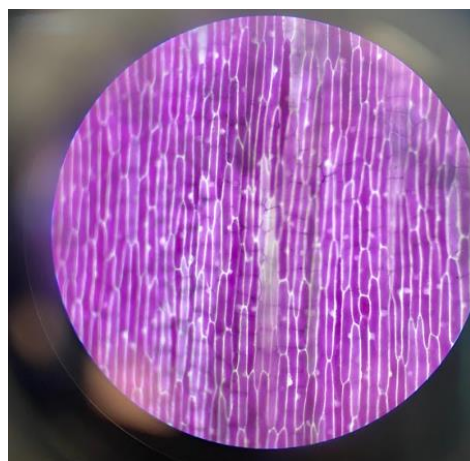
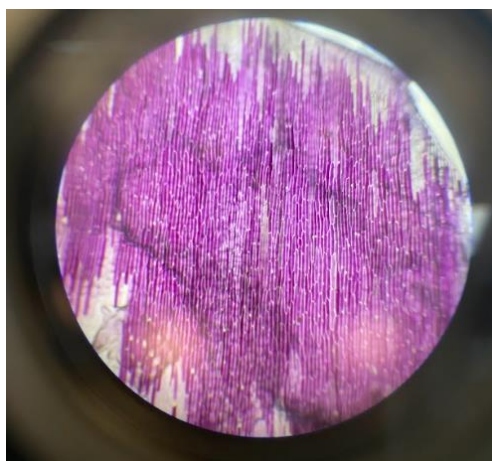
Figura 10 La preparazione di un campione di cipolla, la cipolla al blu di metilene vista con il nostro microscopio ottico e la cipolla ulteriormente ingrandita con lo zoom della telecamera del cellulare: si iniziano a vedere le cellule

### Aumentiamo l'ingrandimento: le cipolle ci danno soddisfazioni!

Desiderosi di osservare le cellule della cipolla abbiamo deciso di utilizzare i microscopi ottici professionali presenti nel laboratorio di Biologia della scuola. Questi ultimi hanno sia l'oculare che l'obiettivo costituiti da sistemi di più lenti convergenti. Al di sotto del portaoggetti inoltre ci sono il condensatore, il diaframma e una lampada: il condensatore ha la funzione di indirizzare la luce della lampada sul preparato, mentre il diaframma è l'elemento che ci permette di regolare l'intensità della luce.

I sistemi di lenti permettono di raggiungere ingrandimenti molto maggiori rispetto al nostro microscopio. In particolare il microscopio che abbiamo utilizzato aveva degli obiettivi con ingrandimenti rispettivamente di 5x, 10x, 40x e 60x, che andavano moltiplicati per l'ingrandimento dell'oculare pari a 10x.

All'aumentare dell'ingrandimento si riescono a osservare le pareti cellulari che permettono di distinguere le cellule, fino ad arrivare ai nuclei, che nella cipolla rossa risaltano maggiormente; al massimo ingrandimento si riesce a osservare anche la lamella mediana, che divide le due pareti cellulari.



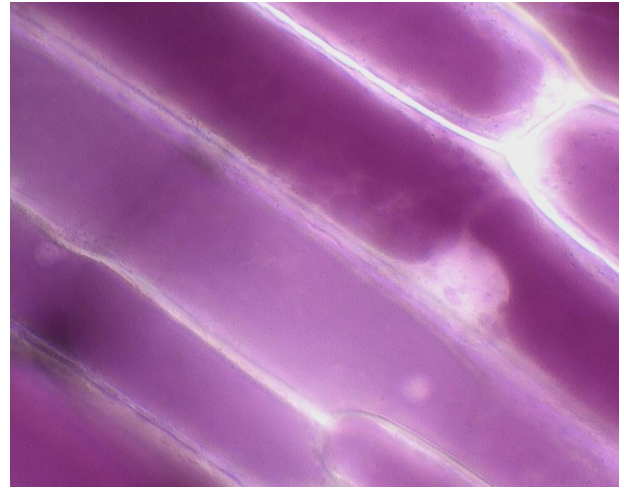
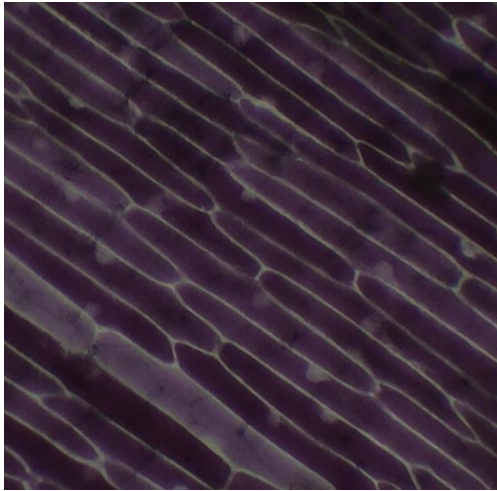


Figura 11 Cipolla rossa osservata al microscopio ottico - ingrandimenti dell'obiettivo: a) 5x si osservano le cellule, b) 10x si evidenziano le pareti cellulari, c) 40x si distinguono i nuclei e d) 60x si osserva anche la lamella mediana che divide due pareti cellulari. Tali ingrandimenti devono essere moltiplicati per l'ingrandimento 10x dell'oculare

### Il microscopio ottico ha un limite: il potere risolutivo

Il potere risolutivo di uno strumento ottico è rappresentato dalla minima distanza tra due punti distinti, al di sotto della quale essi vengono percepiti come un unico punto.

La diffrazione influenza la risoluzione. Considerando una luce monocromatica di lunghezza d'onda  $\lambda$  che passa attraverso una apertura circolare di diametro  $D$ , questa apertura genererà una figura di diffrazione formata da zone luminose alternate a zone scure. La figura di diffrazione ottenuta sarà una figura circolare (figura 12). La prima frangia scura si ha per l'angolo  $\theta$  che soddisfa la condizione  $\sin \theta = 1,22 \frac{\lambda}{D}$ .

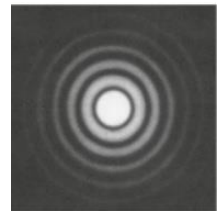
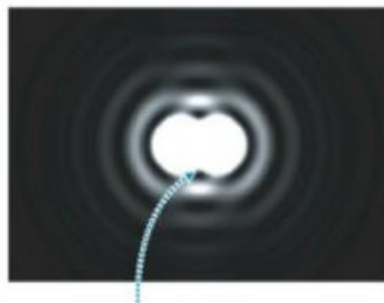


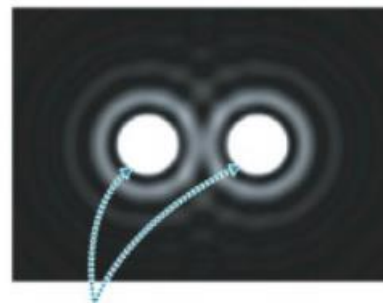
Figura 12 figura di diffrazione da una fenditura circolare

Se due sorgenti di luce vicine subiscono la diffrazione, i cerchi che esse producono possono sovrapporsi, non rendendo possibile la distinzione tra le due sorgenti. La condizione utilizzata per determinare se due sorgenti sono visualizzabili separatamente è data dal criterio di Rayleigh:

“due oggetti possono essere visti come separati solo se la loro separazione angolare è maggiore del seguente valore minimo  $\theta_{min} = 1,22 \frac{\lambda}{D}$ ”



Se la separazione angolare tra due sorgenti non è abbastanza grande, le loro figure di diffrazione si sovrappongono al punto da apparire come un'unica sorgente allungata.



Se la separazione angolare è maggiore, possiamo distinguere separatamente le singole sorgenti.

Figura 13 risoluzione di due sorgenti

Tale separazione angolare corrisponde ad una separazione lineare (il potere risolutivo  $d$ ), per la luce visibile, di  $0,2\mu\text{m}$ . Non si può andare oltre dato che il limite fisico dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata che per la luce visibile va da  $0,4\mu\text{m}$  a  $0,75\mu\text{m}$ .

Se noi facciamo una foto al microscopio ottico, anche se esso è il migliore in commercio, il suo potere risolutivo sarà sempre e comunque di  $0,2\mu\text{m}$ . Ciò vuol dire che la foto che abbiamo fatto la possiamo ingrandire quanto vogliamo, ma se due punti o due linee sono più vicine di  $0,2\mu\text{m}$  continueremo a vederli come un unico punto oppure un'unica linea.

## Vogliamo andare oltre

Dopo aver visto che i microscopi ottici hanno un potere risolutivo legato alla lunghezza d'onda della luce, abbiamo pensato che avremmo potuto fare delle osservazioni di grandezze di dimensioni ancora più ridotte utilizzando un microscopio più potente di un microscopio ottico: il microscopio elettronico a scansione (SEM).

A tale scopo ci siamo recati presso il laboratorio di Biologia della KCS Biotech di Vergiate (Va) dove abbiamo incontrato la dott.ssa Miriam Vergani e i suoi collaboratori, il dott. Lorenzo Rotolo, il dott. Luca Chiodaroli e la dott.ssa Alessia Thartori, con cui abbiamo osservato funghi e felci attraverso il microscopio ottico e il SEM.



## Il SEM: come funziona



Figura 14 Immagine di uno dei SEM presenti nei laboratori della KCS Biotech

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è uno strumento di imaging che utilizza un fascio di elettroni, che hanno una lunghezza d'onda molto inferiore rispetto a quella dei fotoni, per ottenere immagini con risoluzione migliore (anche tridimensionale) rispetto al microscopio ottico. Infatti grazie all'impiego degli elettroni è possibile ottenere un ingrandimento fino a mille volte maggiore rispetto a quello di un microscopio ottico, raggiungendo così la grandezza del nanometro.

Nel SEM il fascio di elettroni scansiona il campione seguendo un determinato pattern. Gli elettroni del fascio vengono generati in cima alla colonna dalla sorgente di elettroni e vengono quindi accelerati ed attratti da un anodo a carica positiva. Per poter effettuare una misurazione con il SEM è necessario che esso agisca nel vuoto, che si ottiene con l'ausilio di una pompa a vuoto, in modo che nessun agente esterno interferisca con il fascio di elettroni. Il vuoto elevato inoltre aumenta la capacità da parte dei detector presenti nel SEM di raccogliere i segnali generati (elettroni retrodiffusi, elettroni secondari e raggi X).

Come per il microscopio ottico, delle lenti sono fondamentali per il controllo del fascio di elettroni. Le lenti impiegate sono elettromagnetiche e consistono in bobine che, quando attraversate da corrente, generano un campo magnetico.

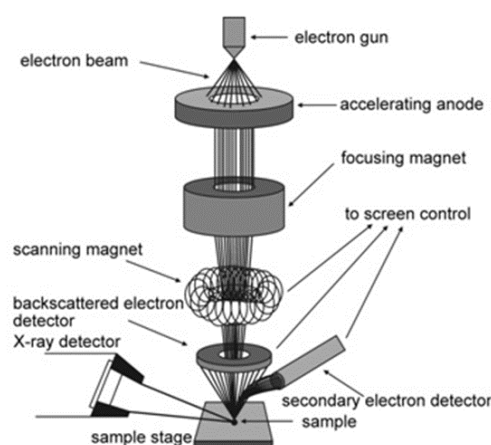


Figura 15 Rappresentazione schematica delle componenti base di un SEM

Dato che gli elettroni sono molto sensibili ai campi magnetici, il loro percorso all'interno della colonna può essere controllato semplicemente modificando la corrente che viene applicata alle singole lenti. Vengono utilizzate due tipologie di lenti: lenti condensatrici, che ordinano il fascio e ne stabilizzano la dimensione; e lenti obiettivo, che hanno la funzione di focalizzare il fascio sul campione.

L'interazione degli elettroni del fascio con il campione generano due tipi di elettroni che i rilevatori hanno il compito di raccogliere per poter ricostruire l'immagine. I rilevatori presentano una forma ad anello e sono posizionati su vari piani della struttura e sono di due tipi, come i due tipi di elettroni che si generano dalla collisione con il campione: rivelatori di elettroni secondari (SE) e di elettroni retrodiffusi (BSE).

Gli elettroni SE provengono da una zona più superficiale del campione e quindi ci permettono di ottenere informazioni relative alla superficie del campione che incidono con una profondità pari a 1-5 nm.

Gli elettroni BSE ci danno informazioni relative a profondità maggiori (10-100 nm) e la penetrazione di questi elettroni sarà minore tanto più grande sarà il numero atomico degli elementi che costituiscono il campione: più è alto il numero atomico, più chiaro appare il materiale nell'immagine.

Le immagini ottenute con il SEM sono caratterizzate da una colorazione di scala di grigi che dipendono dalla lunghezza del tragitto dell'elettrone dal momento in cui incide il campione fino a quando viene rilevato dal detector.

In molti microscopi vengono rivelati anche i raggi X, che vengono generati dall'interazione elettrone-materia e permettono l'analisi elementare del campione. I raggi X, che hanno un'energia specifica, sono l'impronta digitale dei materiali. Rilevando infatti lo spettro di energie dei raggi X che provengono dal campione incognito, è possibile identificare tutti gli elementi (o atomi) ivi contenuti.

Il SEM, a differenza del microscopio ottico, possiede una grande profondità di campo che permette di mettere a fuoco più piani a diverse profondità. Questa caratteristica permette al SEM di sviluppare immagini tridimensionali, inoltre ciò che si ottiene non è l'ingrandimento del campione osservato ma è la sua ricostruzione digitale.

### La preparazione del campione

Prima di osservare il campione al SEM è spesso necessario un processo di preparazione. In generale un campione biologico deve essere trattato per evitare che venga danneggiato e non sia più osservabile. Per prima cosa si procede a disidratare il campione e sostituire l'acqua con la resina, per fissare la sua struttura e non permettere più alcuna mutazione e per evitare il collasso della struttura. Poi i campioni biologici richiedono la metallizzazione, processo che consiste nella copertura del campione con una sottile lamina di un metallo conduttivo (spesso oro per la sua alta conducibilità e per la piccola dimensione dei suoi grani) dello spessore di 0,1 nm. Soprattutto i campioni non conduttivi necessitano di questo processo, altrimenti fungeranno come trappola per gli elettroni e appariranno al microscopio coperti da aree bianche. Per ovviare a questo problema talvolta viene ridotto il vuoto nella camera del SEM, introducendo molecole presenti nell'aria cariche positivamente che interagiscono col fascio primario neutralizzando gli elettroni riducendo però la qualità dell'immagine.

### Osserviamo i funghi e le felci

Abbiamo preparato alcuni vetrini contenenti diverse specie di funghi che abbiamo colorato con blu di metilene o colorante rosso per poterli osservare utilizzando il microscopio ottico.



Figura 16 La preparazione di un vetrino

Abbiamo osservato i funghi utilizzando diversi tipi di ingrandimenti dell'obiettivo, che andavano da 10x e arrivavano fino a 100x. Come per il nostro microscopio scolastico, anche questi ingrandimenti vanno

moltiplicati per l'ingrandimento dell'oculare pari a 10x. Nel caso di ingrandimento pari a 100x è stato necessario inserire tra campione e obiettivo una piccola goccia di uno specifico olio che permetteva di proteggere il campione da possibili urti con l'obiettivo, ma soprattutto modificava l'indice di rifrazione permettendo di ridurre gli effetti di aberrazione. Abbiamo individuato le spore e le ife fungine, identificabili grazie all'ausilio dei coloranti. Le immagini osservate con il microscopio ottico forniscono informazioni circa la superficie del campione e sono bidimensionali infatti permettono di focalizzare un piano alla volta. Il microscopio ottico permette anche una visione interna delle strutture (come ad esempio la visione di un nucleo della cellula) in quanto è possibile differenziare i colori nelle immagini (ad esempio nella cipolla rossa il nucleo risalta perché è bianco come si può vedere nelle immagini 11c e 11d).

Abbiamo poi utilizzato il SEM e con l'aiuto dei tecnici abbiamo ricavato alcune immagini di spore di felce con diversi ingrandimenti. I campioni, a differenza dei funghi, erano stati preparati in precedenza ed erano già stati inseriti nella colonna dove era stato già creato il vuoto.

Le immagini ottenute sono tutte in scala di grigi, permettono una visione tridimensionale del campione di cui si possono chiaramente distinguere dimensione, forma e morfologia (struttura esterna). Non si può però osservare la struttura interna del campione.

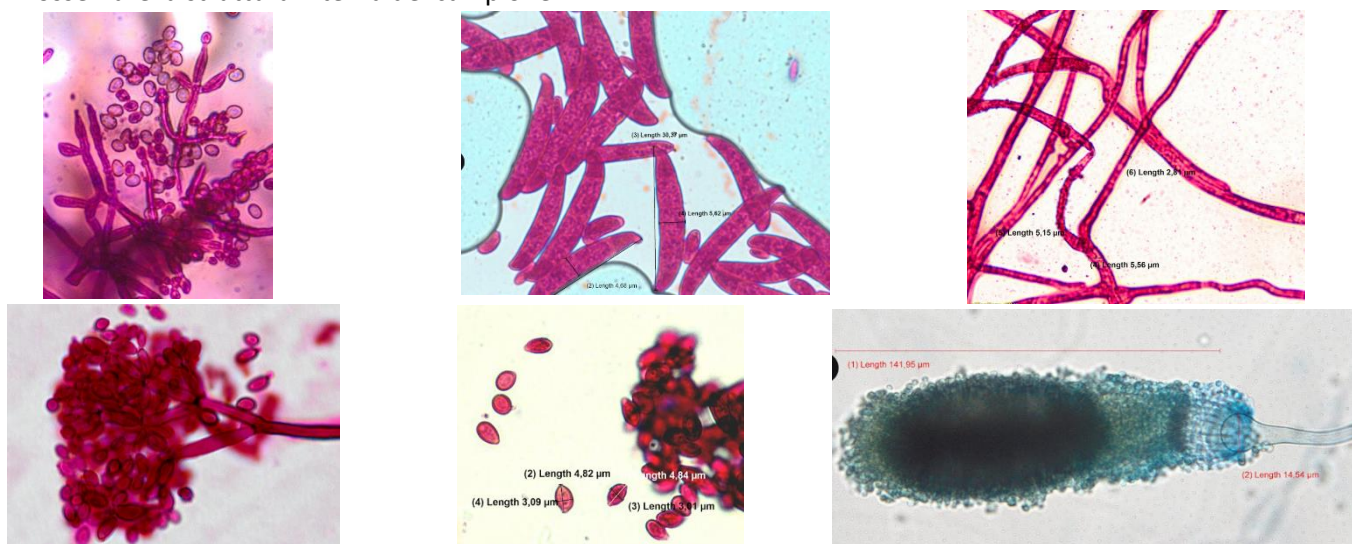


Figura 17 Immagini di spore e ife di funghi, con relative misurazioni, realizzate con microscopio ottico

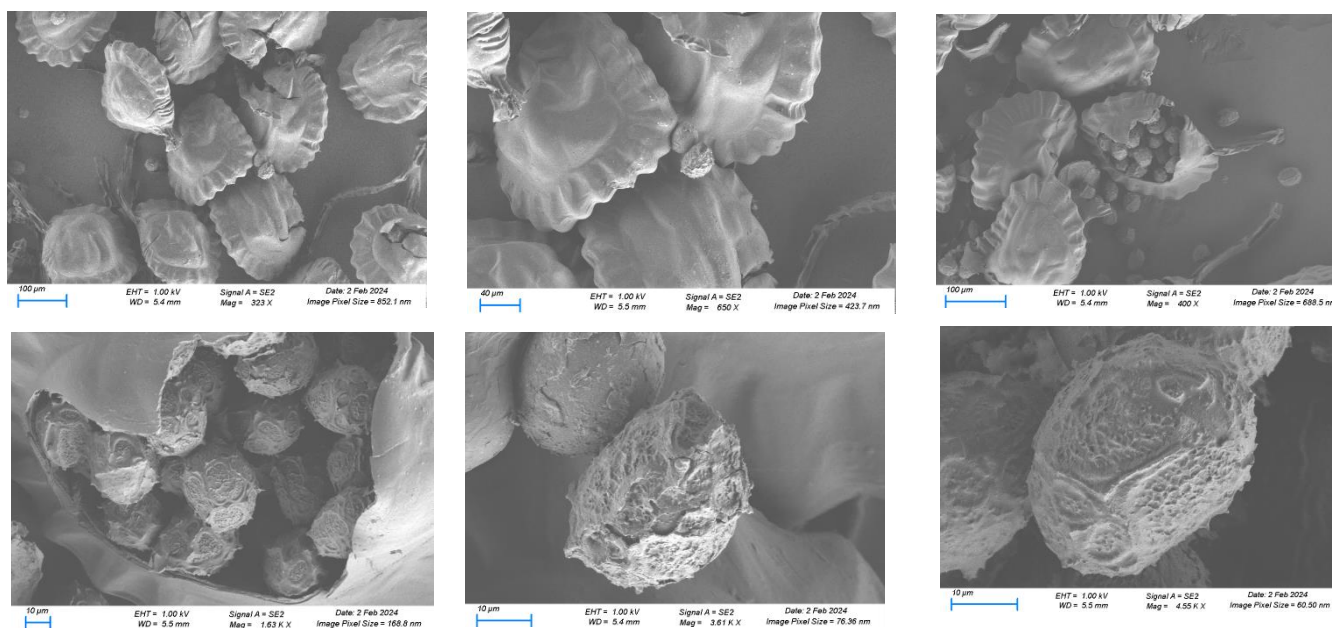


Figura 18 Sporangi e spore di felce osservati con il SEM: le immagini, in scala di grigi, mostrano la forma, le dimensioni e la morfologia dei campioni.

## Conclusioni

Abbiamo osservato come le lenti convergenti permettano di vedere oggetti ingrandendoli. Abbiamo quindi provato a creare un sistema di due lenti convergenti costruendo un prototipo di microscopio ottico con cui abbiamo osservato oggetti di uso comune e provato, senza successo, a osservare campioni biologici. Siamo quindi passati ad utilizzare i microscopi ottici disponibili a scuola e abbiamo osservato dei campioni di cipolla, arrivando a vedere i nuclei e le lamelle mediane delle pareti cellulari. Studiando il significato del potere risolutivo di un microscopio ottico abbiamo compreso che la dipendenza di questo dalla lunghezza d'onda della luce visibile pone un limite di utilizzo di un microscopio ottico: quando due punti sono più vicini di  $0,2\mu\text{m}$  non è più possibile distinguerli indipendentemente dall'ingrandimento utilizzato. Abbiamo visto che cambiando sorgente (passando da fotoni ad elettroni) si può ottenere un potere risolutivo migliore: bisogna quindi adeguare lo strumento alle dimensioni che si vogliono osservare. Ci siamo infine recati presso il laboratorio della KCS Biotech per utilizzare un microscopio ottico con ingrandimento superiore a quelli a disposizione a scuola e il SEM. Abbiamo constatato che cambiando sorgente si ha un potere risolutivo differente, e allo stesso tempo sorgenti diverse permettono di osservare caratteristiche differenti del campione.

## Bibliografia e sitografia

J. S Walker "Il Walker – Corso di fisica" ed Linx Sanoma

<https://www.sintak.it/aberrazioni-ottiche-in-microscopia/>

[https://phet.colorado.ims/html/geometric-optics/latest/geometric-optics\\_all.html?locale=it-edu/s](https://phet.colorado.ims/html/geometric-optics/latest/geometric-optics_all.html?locale=it-edu/s)

<https://www.istitutomedici.edu.it/utenti/studenti/materiale-didattico/dispense-on-line/materiale-prof-giovanni-nalin/botanica/313-il-microscopio-ottico/file>

[https://online.scuola.zanichelli.it/barbonescienzeintegrate/files/2010/04/V02\\_06.pdf](https://online.scuola.zanichelli.it/barbonescienzeintegrate/files/2010/04/V02_06.pdf)

<https://www.microscopiaelettronicaadabanco.it/preparazione-del-campione-come-la-metallizzazione-aiuta-ad-ottenere-immagini-sem>

<https://www.microscopiaelettronicaadabanco.it/come-funziona-il-sem>

Si ringraziano la dott.ssa Miriam Vergani, il dott. Lorenzo Rotolo, il dott. Luca Chiodaroli e la dott.ssa Alessia Thartori di KCS Biotech per la disponibilità, la pazienza e il supporto per le osservazioni con il microscopio ottico e con il SEM.