

# La microscopia elettronica a scansione

**Martina Zibetti**

Liceo scientifico L. Da Vinci Gallarate

Classe 5° A opzione scienze applicate – A.S. 2017-18



*“Non perché più ch’un semplice semblante  
fosse nel vivo lume ch’io mirava,  
che tal è sempre qual s’era davante;*

*ma per la vista che s’avvalorava  
in me guardando, una sola parvenza,  
mutandom’ io, a me si travagliava.”*

*La Divina Commedia. Paradiso - Canto XXXII*



Introduzione.....	5
La mia esperienza di laboratorio.....	5
La microscopia.....	10
I tipi di microscopio.....	12
Microscopi ottici.....	12
Microscopi elettronici .....	13
Microscopi a scansione di sonda.....	14
Immagini a confronto.....	15
Il Microscopio elettronico a scansione .....	17
Utilizzi del SEM.....	21
Il nostro gruppo di lavoro .....	23
Sitografia .....	25



## Introduzione

---

Questo lavoro prende spunto da un'attività svolta nel giugno 2017 presso i laboratori dell'università degli studi dell'Insubria di Varese sotto la supervisione della professoressa Marcella Reguzzoni, ricercatrice del Dipartimento di Morfologia Umana presso la stessa università.

L'esperienza, specificamente indirizzata agli studenti delle scuole superiori, ha avuto una durata di 30 ore ed ha toccato inizialmente alcuni aspetti teorici della microscopia a scansione elettronica (Scanning Electron Microscopy, SEM) guidando poi i partecipanti nell'utilizzo in prima persona un microscopio a scansione a partire dalla preparazione dei campioni biologici fino ad arrivare all'osservazione vera e propria.

## La mia esperienza di laboratorio

---

Durante questa esperienza, svolta assieme ad un gruppo di ragazzi provenienti da diverse scuole superiori della Lombardia, abbiamo studiato e messo in pratica le tecniche per la preparazione di campioni organici, utilizzando sostanze chimiche (fissatori, tamponi, etc) e strumentazione (stereomicroscopio, cappa aspirante, bilancia elettronica di precisione, sputter, etc) per poi osservare i campioni da noi preparati.

Lo scopo dell'esperienza era l'osservazione di campioni biologici e l'individuazione delle strutture anatomiche in essi presenti tramite l'utilizzo di tecniche specifiche e delle nostre conoscenze scolastiche.



La preparazione di campioni biologici per l'osservazione con il microscopio elettronico a scansione è un processo complesso che richiede lunghi tempi di attesa, per cui la nostra esperienza si è svolta su tre giornate consecutive.

In primo luogo abbiamo ispezionato macroscopicamente cuori e fegati di pollo, per poi selezionarne le parti più significative ai fini dell'osservazione servendoci di lamette e pinzette.

Abbiamo quindi immerso i campioni in una soluzione fissante<sup>1</sup> che ha la funzione di preservare e stabilizzare i costituenti dei tessuti. I campioni più voluminosi sono stati immersi direttamente nella soluzione, mentre quelli più sottili sono stati prima ancorati a supporti di polistirolo e poi immersi nel fissatore.

---

<sup>1</sup> 6,5cc di soluzione di paraformaldeide  
5 cc tampone caco dilato 0,4M  
2,5 cc di glutaraldeide 255  
1,5 cc di CaCl<sub>2</sub>  
9,5 cc H<sub>2</sub>O bi distillata  
Portare a 25cc  
PH finale= 7,35

Infine i campioni sono stati lasciati a riposare sotto una cappa aspirante, poiché le esalazioni della soluzione fissante sono tossiche.

Il giorno successivo abbiamo sottoposto i campioni a tre lavaggi di 10 minuti ciascuno, utilizzando una soluzione di tampone cacodilato 0,1M + saccarosio<sup>2</sup>.

Abbiamo poi proceduto alla post fissazione con una soluzione di tetrossido di osmio al 2% lasciando poi riposare sotto la cappa per 1 ora.

Abbiamo nuovamente sottoposto i campioni ad un ciclo di tre lavaggi di tampone cacodilato.

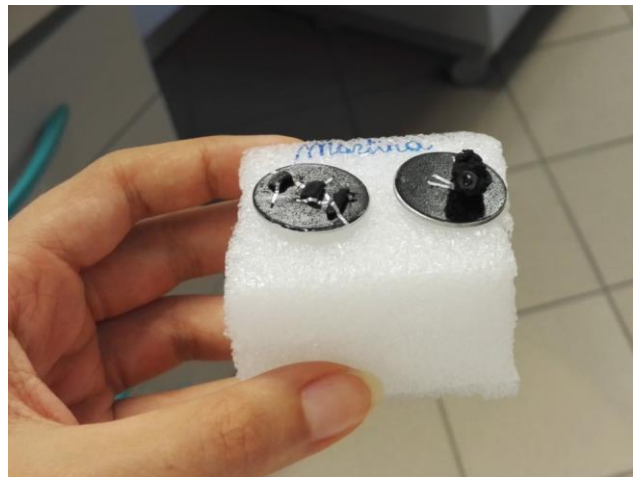
Poiché l'acqua danneggia il microscopio, è necessaria una disidratazione completa, sostituendo l'acqua contenuta nel campione con alcool etilico. Abbiamo dunque immerso i campioni per un tempo compreso tra 15 e 30 minuti, a seconda delle dimensioni, in una serie di soluzioni di alcool etilico a gradazione crescente (scala crescente alcolica 50% 70% 80% 95% 100%) per disidratarli.

Per eliminare gradualmente l'alcool e favorire l'essiccazione completa del campione in modo tale che non si deformasse, abbiamo poi sottoposto i campioni a tre lavaggi successivi della durata di 15 minuti, utilizzando una soluzione di esametil disilazane.

I campioni sono stati in seguito posti ad essiccare su un foglio di carta bibula sotto la cappa aspirante chimica.

Dopo circa 45 minuti abbiamo proceduto alla collocazione dei campioni sugli stub del microscopio, fissandoli con dischetti biadesivi e sottili strisce di Silver Tape (nastro adesivo conduttivo).

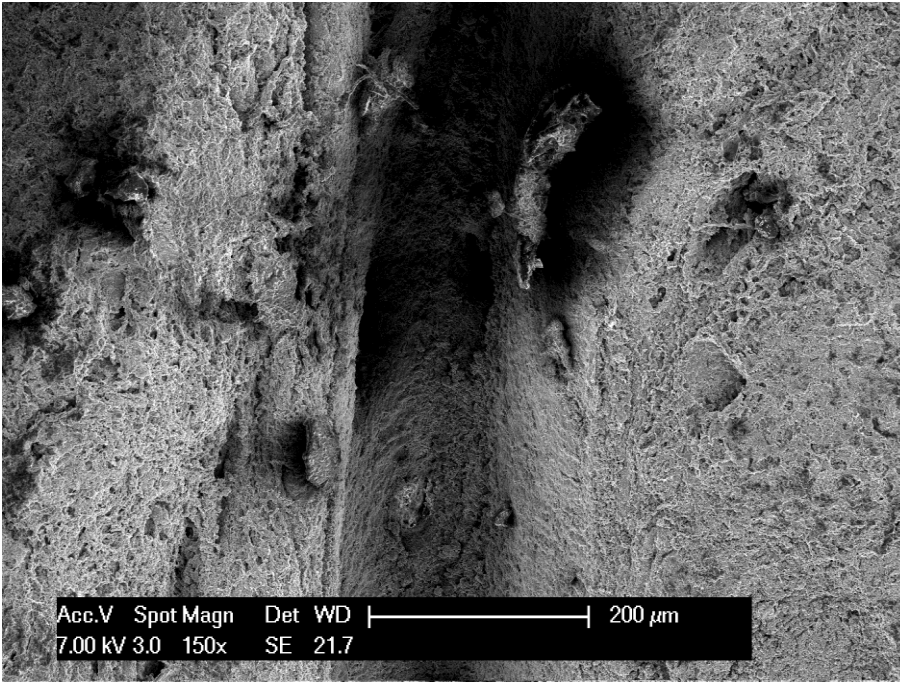
Il terzo giorno abbiamo effettuato l'aurificazione dei campioni attraverso lo sputter, strumento che ricopre i campioni con uno strato d'oro di spessore di 10 Amstrong che rende la superficie dei campioni elettricamente conduttiva. In questo modo i campioni non si caricano elettricamente quando vengono colpiti dal fascio di elettroni del microscopio perché le cariche in eccesso si scaricano a terra attraverso lo stub.



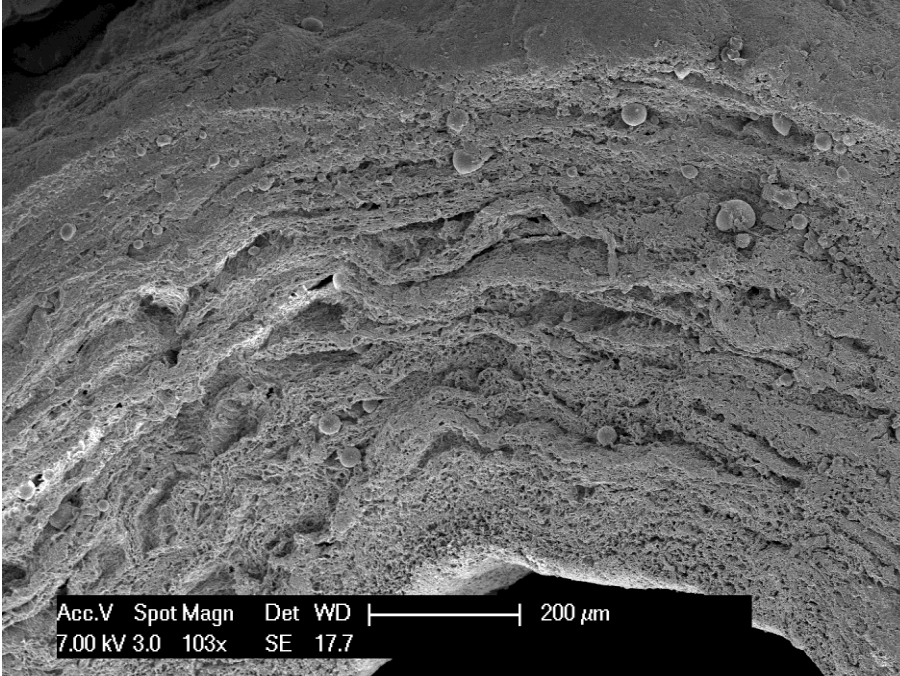
Collocati i campioni nella camera a vuoto del microscopio, abbiamo potuto finalmente osservare le immagini ingrandite dei campioni. Qui di seguito alcune delle riprese più interessanti.

---

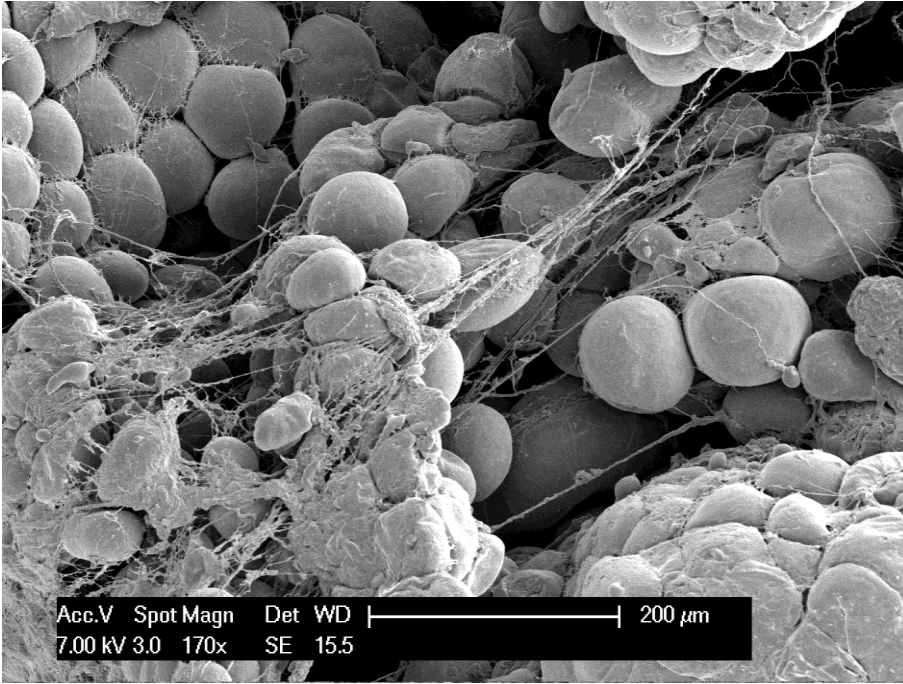
<sup>2</sup> 12,5ml di tampone cacodilato 0,4M  
3ml di CaCl<sub>2</sub>  
1,25g di saccarosio  
tutto in 34cc di H<sub>2</sub>O



Vaso epatico fenestrato (vaso sanguigno capillare che presenta dei pori che permettono scambi rapidi tra capillare e tessuti circostanti).

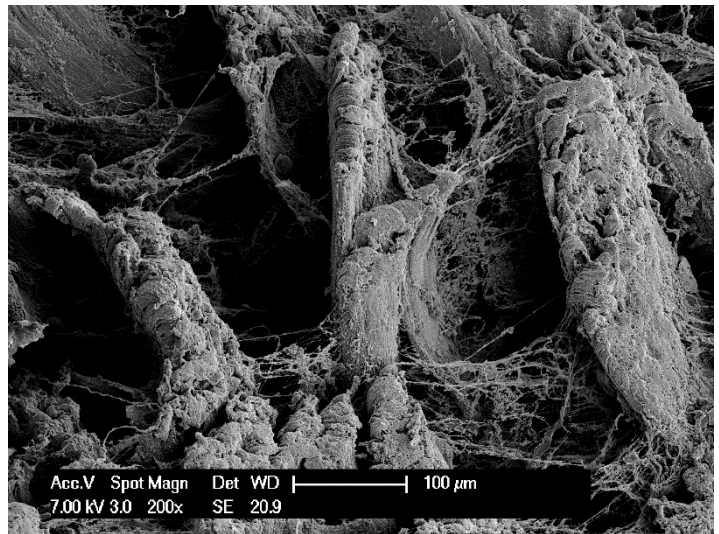


Sezione della parete dell'aorta dove sono visibili le diverse tonache (intima, media ed esterna) con l'abbondante presenza di fibre elastiche.

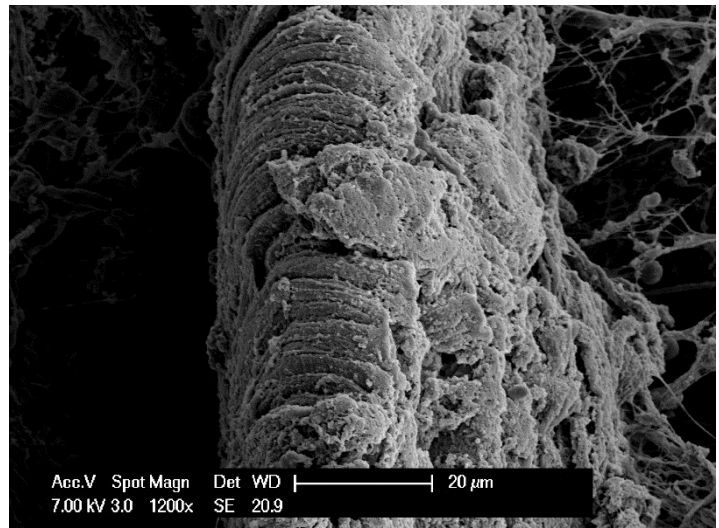


Gruppi di adipociti con rivestimenti di tessuto connettivo in un campione prelevato dal cuore.

Miocardiocita della parete muscolare del ventricolo sinistro.

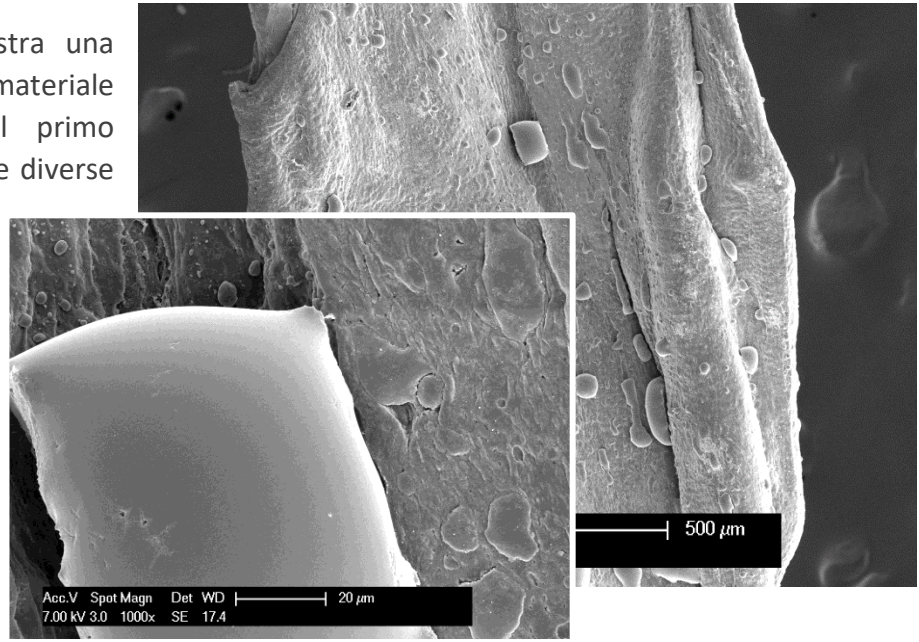


Ingrandimento che evidenzia i sarcomeri del miocardiocita dell'immagine precedente.





La foto qui a fianco mostra una interessante differenza tra materiale organico e inorganico: il primo presenta sulla sua superficie diverse irregolarità, mentre il secondo appare perfettamente liscio. In primo piano si vede infatti un granello di polvere che ha contaminato il campione intendevamo osservare.



Nel corso dei secoli gli studiosi hanno messo a punto strumenti sempre più potenti per osservare l' "infinitamente piccolo".

I romani furono i primi a sperimentare utilizzando il vetro e a studiare come gli oggetti apparissero deformati se osservati attraverso una sezione di questo materiale. Le prime forme di ingrandimento furono proprio lenti di ingrandimento, che furono usate per osservare insetti.

Negli anni '90 del XVI secolo due fabbricanti di occhiali olandesi, **Zacharias Jansen** e suo padre Hans, iniziarono a sperimentare con queste lenti, provando a combinarne diverse contemporaneamente ottenendo ingrandimenti sempre maggiori.

**Anton van Leeuwenhoek** (1632-1723), uno scienziato olandese, fu il primo a realizzare ed utilizzare un vero **microscopio** capace di potente ingrandimento. Grazie ad esso fece molte scoperte biologiche: fu il primo ad osservare e descrivere batteri, lieviti e corpuscoli presenti nel sangue.

Nei successivi 200 anni non furono fatte scoperte significative nel campo della microscopia, ma la qualità delle lenti venne continuamente migliorata. Da ricordare il lavoro di **Ernst Abbe** nella seconda metà dell'Ottocento che, presso i laboratori Carl Zeiss, mise a punto una teoria che permette di legare il potere risolutivo di un microscopio alla lunghezza d'onda utilizzata e all'apertura numerica delle lenti utilizzate (il cosiddetto **principio di Abbe**).

Nel corso del 900 la microscopia ottica è stata spinta ai suoi limiti grazie all'utilizzo di sistemi ottici sempre più sofisticati e lunghezze d'onda sempre più corte (ad esempio nei microscopi a luce ultravioletta).

Un balzo in avanti importante è stato compiuto verso la metà del secolo con l'invenzione della **microscopia elettronica**.

Nel 1931, gli ingegneri elettrici **Ernst Ruska** (1906-1988) e **Max Knoll** (1897-1969), due ricercatori dell'Università Tecnica di Berlino, ottennero la prima immagine elettronica ingrandita di un oggetto. L'ingrandimento era modesto (circa 10 volte), ma il principio venne ripreso negli anni successivi con miglioramenti tecnici sia nello strumento sia nelle tecniche di preparazione dei campioni.

Di notevole successo furono i **microscopi elettronici** che la **RCA** sviluppò a cavallo della seconda guerra mondiale: grazie alla sua tecnologia delle lenti elettromagnetiche, RCA divenne presto il leader nel campo della microscopia elettronica in nord America.

Inizialmente il **microscopio elettronico a trasmissione (TEM)** venne utilizzato per studi nel campo delle scienze della materia e non in biologia o medicina in quanto i campioni dovevano essere esaminati in condizioni di vuoto, completamente disidratati, tagliati in sezioni estremamente sottili e dovevano resistere al forte bombardamento degli elettroni. Nel corso degli anni vennero però individuate tecniche di preparazione adatte anche ai delicati campioni biologici.

Il primo **microscopio elettronico a scansione (SEM)** venne costruito su iniziativa di **Sir Charles Oatley** del Dipartimento di ingegneria della Cambridge University. Il progetto ebbe inizio nel 1948 e **nel 1951** fu messo in funzione il primo strumento di questo tipo; per ottenere immagini di elevata qualità dovettero tuttavia trascorrere ancora alcuni anni (1960).

Negli anni 80 del '900 vennero introdotte altre tecniche di microscopia, ad esempio nella microscopia a scansione di sonda l'oggetto da esaminare viene esplorato da una finissima sonda che ne scansiona la superficie, la struttura tridimensionale dell'oggetto viene poi ricostruita tramite elaborazioni computerizzate.

Appare dunque evidente come nel corso della storia il concetto di "vedere" si sia profondamente modificato: le immagini che oggi si ottengono attraverso i microscopi elettronici sono tutte ricostruzioni ottenute attraverso un computer che soltanto uno specialista è in grado di interpretare. Le fotografie al microscopio elettronico sono una rappresentazione creata dallo sperimentatore: ad esempio l'immagine di una cellula non è realmente una cellula, ma il risultato di un complesso processo sperimentale che mostra alcune specifiche informazioni sulla cellula stessa. D'altra parte un qualunque disegno o rappresentazione di un oggetto è non l'oggetto in sé, ma l'interpretazione di questo da parte di chi lo osserva, in base a ciò che la persona cerca. Il processo di interpretazione può portare a trascurare cose che, per un altro osservatore, sono invece essenziali.

Proprio come nel celebre quadro di Magritte "La Trahison des images" che riporta la scritta "Questa non è una pipa" per indicare che il quadro è solo una rappresentazione dell'oggetto basata sull'interpretazione del pittore e non l'oggetto reale.



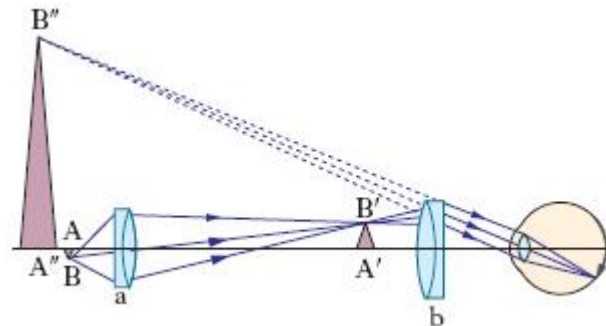
## I tipi di microscopio

### Microscopi ottici

Il funzionamento di un microscopio ottico sfrutta le onde elettromagnetiche, nella maggior parte di casi nello spettro del visibile.

Lo strumento è costituito da 2 sistemi di lenti inserite in un tubo ottico: l'oculare, in cui si guarda, e l'obiettivo, situato vicino al campione da osservare.

L'oggetto AB viene disposto dinanzi all'obiettivo, a una distanza da esso così che l'obiettivo medesimo ne dà un'immagine A'B' reale, ingrandita e capovolta. L'oculare, costituito di solito da un sistema di due lenti, è disposto in modo che A'B' cada tra esso e il suo fuoco F, cioè in posizione tale da dare di A'B' un'immagine A''B'', virtuale, diritta rispetto ad A'B' (quindi capovolta rispetto all'oggetto) e ingrandita; tale immagine è quella vista dall'osservatore attraverso l'oculare.



Il potere di risoluzione, cioè la distanza minima al di sotto della quale non è possibile percepire due punti tra loro distanti, in un microscopio ottico è di  $0,2 \mu\text{m}$  cioè circa 400 volte superiore a quello dell'occhio umano.

Il potere di risoluzione è limitato dalla precisione con cui sono realizzate le lenti, che introducono sempre delle distorsioni geometriche ("aberrazioni"). Un secondo fattore limitante è la cosiddetta "aberrazione cromatica" che deriva dal fatto che la rifrazione agisce in modo diverso su raggi luminosi di diversa lunghezza d'onda. Infatti la *legge di Cartesio-Snell* stabilisce una relazione fra l'angolo di incidenza e l'angolo di rifrazione di un raggio luminoso:

$$n_1 \cdot \sin \alpha_1 = n_2 \cdot \sin \alpha_2$$

Siccome l'indice di rifrazione è funzione della frequenza, i raggi luminosi provenienti da uno stesso oggetto vengono deviati di un angolo diverso generando delle immagini con aloni colorati sui bordi.

In ogni tipo di osservazione è però presente un fattore limitante ineliminabile dovuto alla lunghezza d'onda della sorgente utilizzata per l'osservazione: a causa della diffrazione non è infatti possibile osservare dettagli più piccoli della lunghezza d'onda utilizzata.

Per ridurre al minimo questi limiti sono stati nel tempo ideate varie tecniche come la combinazione di lenti realizzate con diversi materiali che presentano dispersioni cromatiche che si compensano a vicenda (doppietto acromatico).

Per ovviare ai limiti dovuti alla diffrazione si può utilizzare luce con lunghezza d'onda ridotta come la luce ultravioletta (**microscopio a ultravioletti**).

Ci si può spingere anche oltre nella riduzione della lunghezza d'onda utilizzando una sorgente di raggi X per "illuminare" il campione (**microscopio a raggi x**). I raggi X però non subiscono deflessioni

significative quando attraversano la materia (rifrazione) e di conseguenza non si possono facilmente realizzare vere e proprie lenti per focalizzarli o per ottenere immagini ingrandite. La principale tecnica utilizzata per ovviare a questa difficoltà è basata sulla riflessione a incidenza radente dei raggi X da una superficie. Una diversa tecnica usa speciali reticoli di diffrazione circolari ottenuti con tecniche di litografia con fasci di elettroni. L'ingrandimento viene ottenuto in maniera geometrica ponendo la sorgente vicino all'oggetto e il rivelatore invece distante.

## Microscopi elettronici

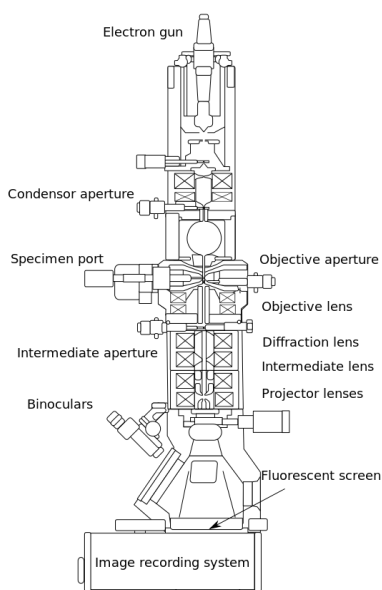
Un aumento sensibile del potere di risoluzione si può ottenere sostituendo le onde elettromagnetiche con un fascio di elettroni. Infatti in base al principio di De Broglie un fascio di elettroni possiede anche caratteristiche ondulatorie con una lunghezza d'onda che è funzione dell'energia degli elettroni stessi in base alla relazione (trascurando per semplicità gli effetti relativistici):

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mE}}$$

La lunghezza d'onda della luce visibile va dai 390 nm ai 700 nm. Dall'equazione di De Broglie si ricava ad esempio che un fascio di elettroni accelerato da una differenza di potenziale di 120 KV ha una lunghezza d'onda di circa  $3,5 \cdot 10^{-3}$  nm.

Tenendo conto di altri fattori diversi dalla lunghezza d'onda che limitano il potere di risoluzione di un microscopio elettronico si arriva ad un potere di risoluzione di 0,2 nm, che è circa 1000 volte migliore rispetto a quello di un microscopio ottico.

I tipi più comuni di microscopio elettronico sono il microscopio elettronico a scansione (di cui parleremo più approfonditamente in seguito) e quello a trasmissione (TEM, **Trasmission Electron Microscope**).



Quest'ultimo si basa su una tecnica per cui un fascio di elettroni è fatto passare attraverso un sottile campione. Dall'interazione tra gli elettroni e il campione si forma un'immagine che è ingrandita e messa a fuoco su dispositivo di visualizzazione come ad esempio una pellicola fotografica, uno schermo fluorescente o un sensore ccd.

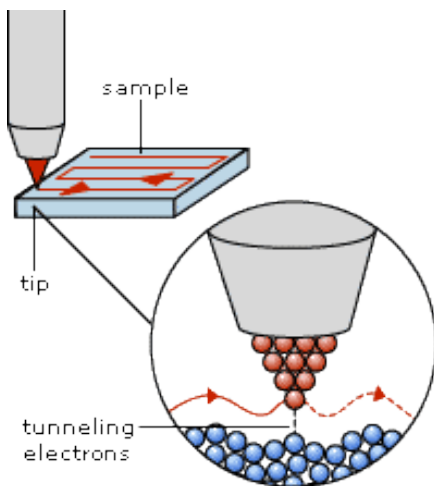
Il fascio di elettroni è generato da un filamento di tungsteno riscaldato e viene direzionato da una serie di campi elettrici e magnetici. Il passaggio attraverso "lenti" magnetiche fa sì che il fascio di elettroni si allarghi e l'immagine finale risulti così notevolmente ingrandita.

L'immagine ottenuta è in bianco e nero, ma può essere colorata digitalmente.

Il primo microscopio TEM fu realizzato da Max Knoll e Ernst Ruska nel 1931 e commercializzato nel 1939. Nel 1986 Ruska vinse Premio Nobel per la fisica per la sua invenzione.

## Microscopi a scansione di sonda

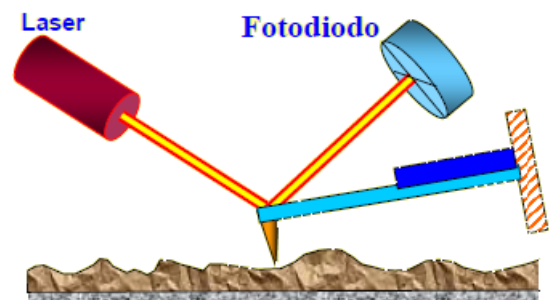
Le tecniche di microscopia a scansione di sonda formano delle immagini grazie ad una vera e propria sonda fisica che segue la superficie del campione eseguendo precisissimi spostamenti. Esistono diversi tipi di microscopi a scansione di sonda, tra cui quello a effetto tunnel e quello a forza atomica.



Il **microscopio a effetto tunnel** (STM, scanning tunneling microscope) restituisce immagini tridimensionali del campione la cui superficie è studiata attraverso uno stilo che la scandaglia mantenendosi ad una distanza fissata. Fra il campione (che deve essere un conduttore di corrente) e lo stilo viene applicata una differenza di potenziale tale da impedire il passaggio di elettroni fra l'uno e l'altro. Campione e stilo sono separati da uno spazio vuoto di dimensioni paragonabili a quelle di un atomo. Su queste brevi distanze si può avere passaggio di elettroni per effetto tunnel anche in presenza della barriera di potenziale che vi si oppone. La punta dello stilo è costituita da un solo atomo e viene mantenuta ad una distanza costante dal campione da un sistema

di retroazione che ne regola la distanza in modo da mantenere costante la corrente di tunnel. La registrazione dei movimenti verticali dello stilo permette di creare un profilo della superficie e a partire da questo, grazie ad elaborazioni digitali, una mappa della superficie.

Similmente il **microscopio a forza atomica** scandaglia la superficie da esaminare con un sottilissimo e leggerissimo stilo che si flette sotto l'effetto delle forze che si esercitano a livello atomico fra la punta dello stilo e l'oggetto da esaminare. Un sistema ottico costituito da un laser ed un sensore permette di rilevare i piccolissimi movimenti dello stilo e di ricostruire un'immagine tridimensionale dell'oggetto.



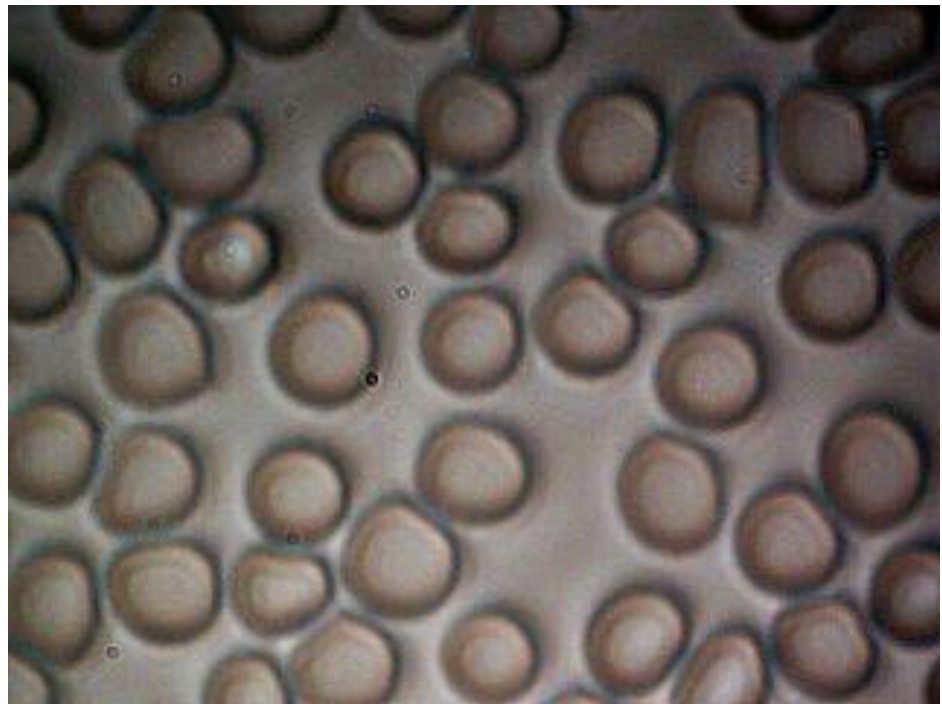
## Immagini a confronto

I diversi tipi di microscopio sono adatti a indagini diverse, non solo per la loro diversa capacità di ingrandimento, ma anche per la diversa visualizzazione che producono (in trasparenza, in sezione, in 3D).

A titolo esemplificativo qui di seguito sono riportate delle immagini di globuli rossi ottenute con diversi microscopi.

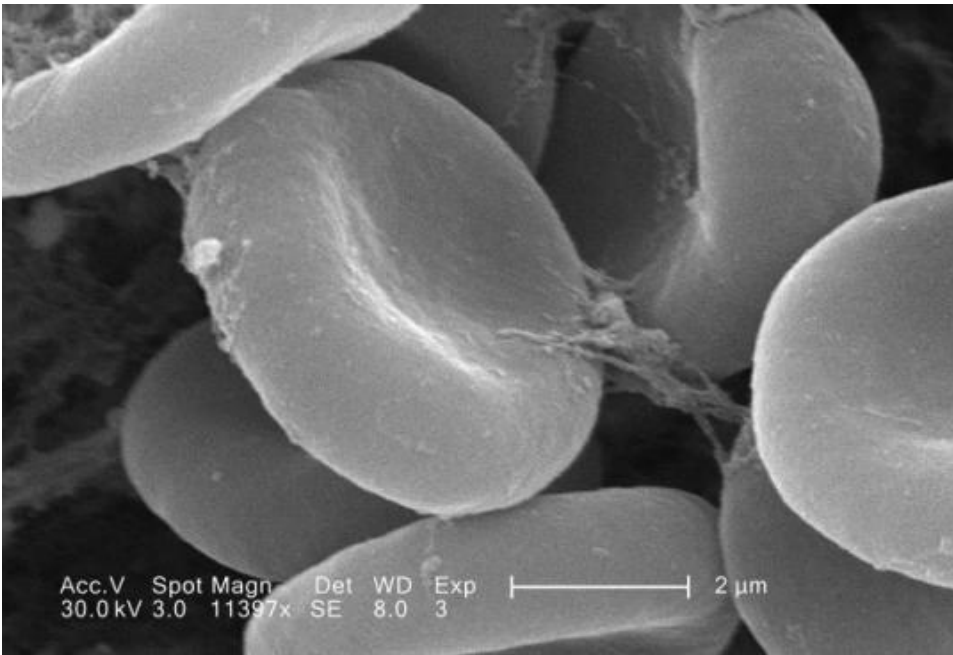
Globuli rossi al  
microscopio ottico

Fonte:  
<https://carnicom institute.org/wp/morgellons-morphology-confirmed>



Sezione di un capillare al microscopio elettronico a trasmissione. La macchia scura al centro del capillare è un globulo rosso.

Fonte:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A\\_red\\_blood\\_cell\\_in\\_a\\_capillary,\\_pancreatic\\_tissue\\_-\\_TEM.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:A_red_blood_cell_in_a_capillary,_pancreatic_tissue_-_TEM.jpg)

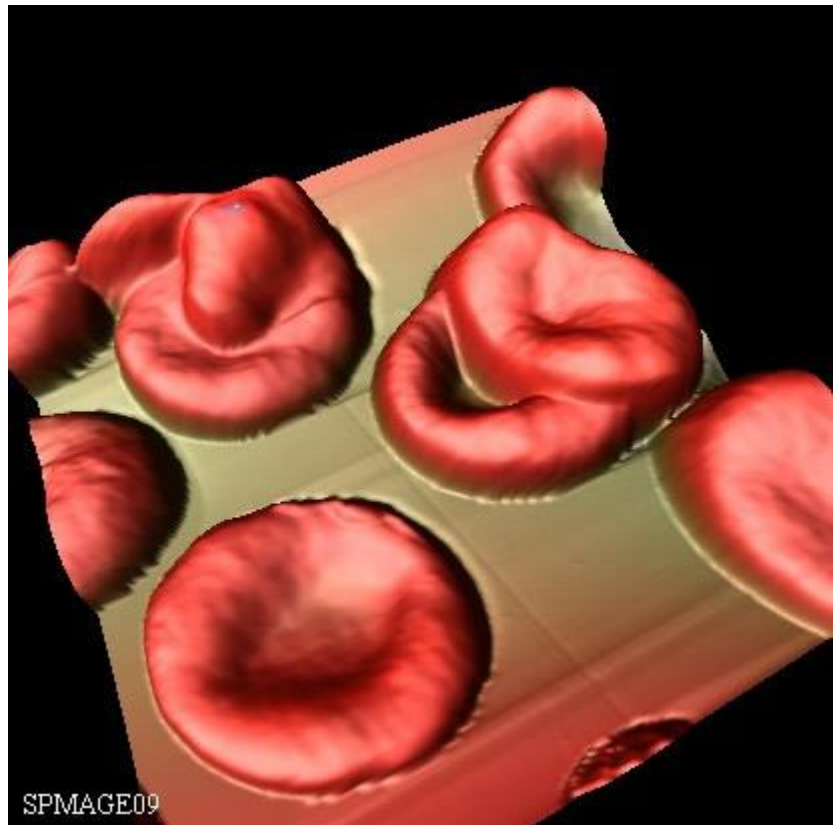


Globuli rossi al  
microscopio  
elettronico a scansione

Fonte:  
[http://www.  
publicdomainfiles  
.com/show\\_file.php?  
id=13518568213253](http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13518568213253)

Globuli rossi ripresi con il  
microscopio a forza atomica

Fonte:  
[https://www.icmm.csic.es/spmage/  
spmageview09.php?id=62](https://www.icmm.csic.es/spmage/spmageview09.php?id=62)





## Il Microscopio elettronico a scansione

Il microscopio elettronico a scansione (Scanning Electron Microscope, SEM) è utilizzato per l'osservazione della superficie dei campioni. Quando il campione è irraggiato con un sottile fascio di elettroni, chiamato "sonda elettronica", la superficie del campione emette degli elettroni secondari. È quindi possibile ricostruire la topografia della superficie del campione effettuando una scansione bidimensionale del campione con la sonda elettronica e misurando il flusso di elettroni secondari generato.



Sono possibili anche altre modalità di osservazione del campione sotto l'effetto della sonda elettronica, come la misurazione degli elettroni retrodiffusi (backscattered electrons) che permette di acquisire informazioni sulle strutture più profonde del campione anche se a risoluzione ridotta.

Il limite di questa tecnica di microscopia è che i campioni devono essere opportunamente trattati per poter essere osservati tramite un SEM.

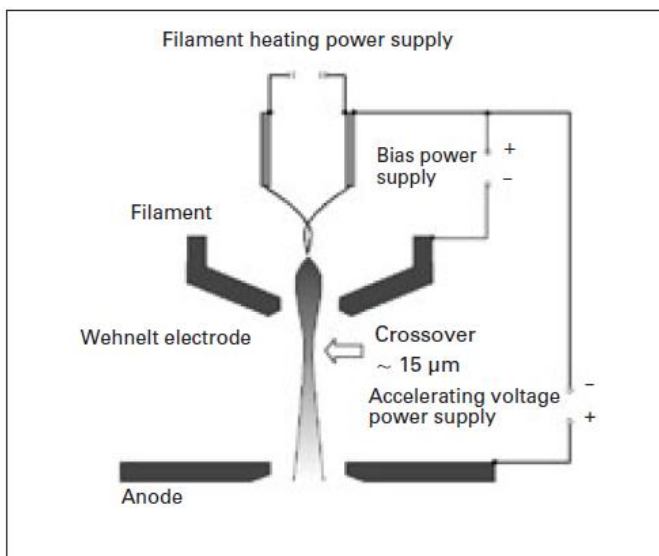
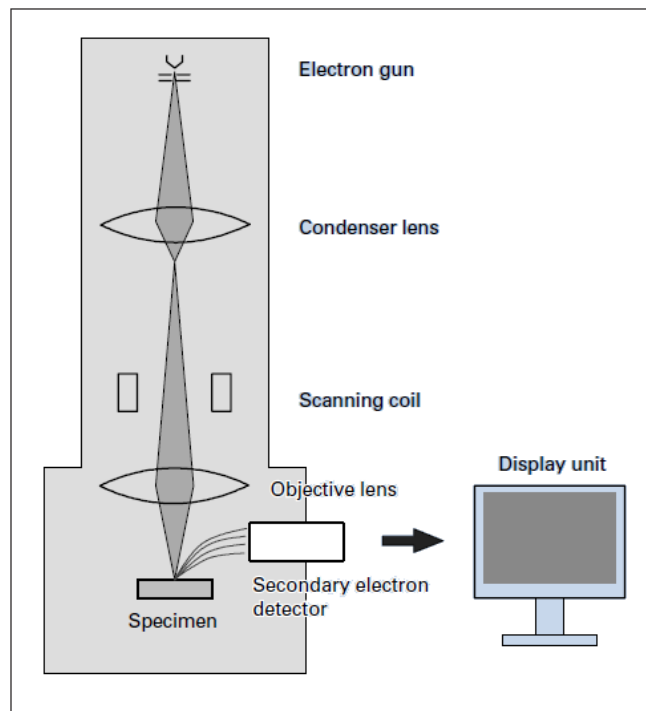
Infatti il campione deve resistere alla condizione di vuoto spinto necessario per la propagazione degli elettroni e deve anche essere in grado di resistere all'irraggiamento da parte della sonda elettronica.

I campioni che non conducono corrente si caricano elettricamente quando vengono colpiti dalla sonda elettronica e ciò genera un degrado dell'immagine ottenibile. Di conseguenza i campioni devono essere elettricamente conduttivi, almeno in superficie, e devono essere messi a terra per prevenire l'accumulo di carica elettrostatica. Gli oggetti metallici non richiedono preparazioni particolari per l'osservazione tramite un SEM, ma quelli non conduttori devono essere ricoperti con un sottile strato di materiale conduttivo (ad esempio oro) che viene depositato sul campione tramite un processo detto "sputtering" (il materiale conduttore viene spruzzato sul campione in condizioni di vuoto) oppure tramite un processo di evaporazione sotto vuoto spinto.

I campioni così preparati vengono fissati al porta-campioni (detto "stub") tramite un adesivo di materiale conduttore per garantire la messa a terra richiesta.

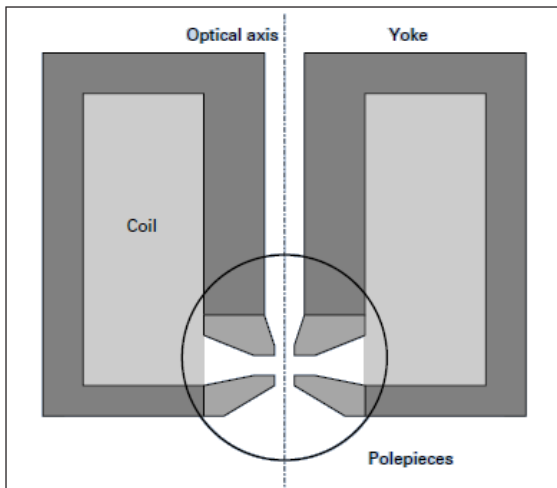
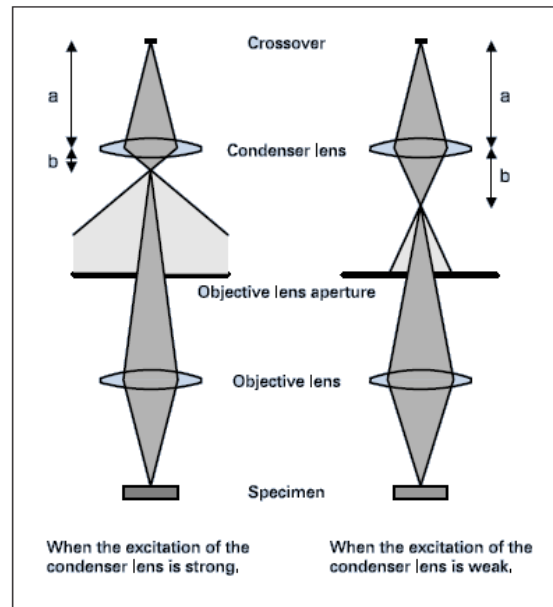
La tecnica SEM è quindi di applicazione particolarmente complessa per l'osservazione di delicati campioni biologici.

Un microscopio elettronico a scansione è schematicamente composto dai seguenti componenti:



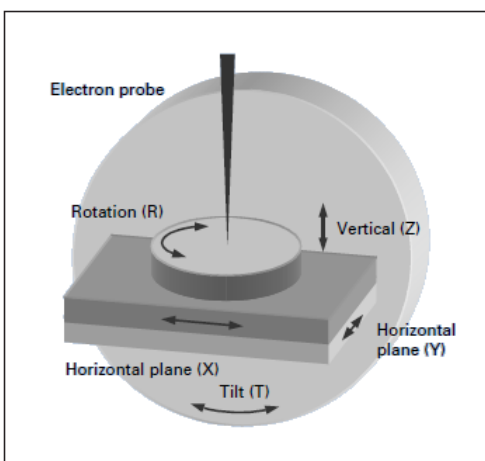
Il **cannone elettronico** produce il fascio di elettroni utilizzato come sonda. La modalità di emissione più comunemente utilizzata è l'effetto termoionico: un sottile filamento di tungsteno viene riscaldato a circa 2800K in modo che emetta elettroni. Tali elettroni vengono attratti verso un anodo caricato positivamente che presenta un foro al centro attraverso il quale fuoriesce un sottile fascio di elettroni.

Le **lenti condensatrici** hanno lo scopo di regolare l'ampiezza del fascio di elettroni. A valle di questa lente viene posta una lastra metallica con un foro che lascia passare solo una parte del raggio. Concentrando il raggio tramite la lente gran parte degli elettroni riuscirà a passare dall'apertura, mentre allargando il raggio gli elettroni verranno diffusi su un'area più ampia e solo una piccola parte di essi riuscirà a passare dal foro. La regolazione delle lenti di condensazione permette in questo modo di regolare l'intensità del fascio di elettroni.



Le **lenti obiettivo** hanno lo scopo di focalizzare il raggio sul campione da esaminare.

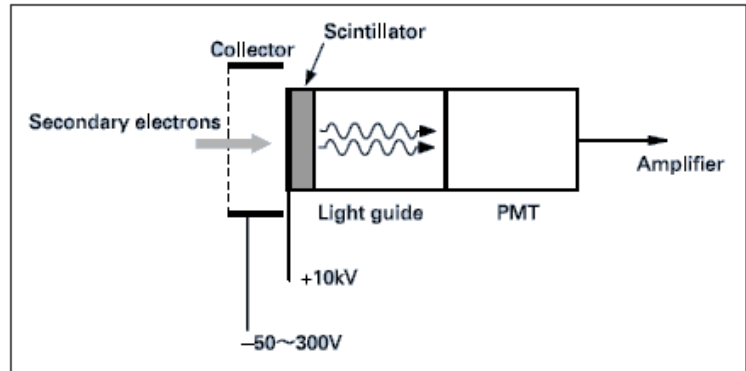
Queste "lenti" non sono però delle normali lenti ottiche, ma sistemi elettromagnetici in grado di deviare il percorso degli elettroni, che sono particelle cariche. Queste lenti sono in sostanza degli elettromagneti alimentati da una corrente continua che genera quindi un campo magnetico costante. Per generare un campo magnetico molto intenso, le bobine dell'elettromagnete sono avvolte in un "giogo" che lascia uscire il flusso magnetico solo da una piccola apertura.



La **camera porta-campione** presenta un supporto a cui viene fissato lo stub con il campione da esaminare. Tale supporto è in grado di muoversi con grande precisione in varie direzioni per selezionare la porzione di campione da inquadrare e regolare la profondità di campo.

### Il rivelatore di elettroni secondari

capta ed amplifica gli elettroni emessi dal campione sotto l'effetto della sonda elettronica. Un collettore caricato positivamente attira gli elettroni secondari che sono poi attratti da uno "scintillatore" posto ad un potenziale elettrico ancora più alto. Questo dispositivo è costituito da un materiale fluorescente che emette fotoni quando viene colpito dagli elettroni. I fotoni sono amplificati da un fotomoltiplicatore e quindi convertiti nuovamente in un segnale elettrico che può essere ulteriormente amplificato.



I fotoni sono amplificati da un fotomoltiplicatore e quindi convertiti nuovamente in un segnale elettrico che può essere ulteriormente amplificato.

L'**unità di visualizzazione** mostra su uno schermo (o permette di memorizzare su un file) l'immagine prodotta dal microscopio. Originariamente questa unità era costituita da un tubo a raggi catodici pilotato direttamente dal segnale in uscita dal rivelatore di elettroni secondari; oggi il segnale viene elaborato digitalmente e la visualizzazione è affidata ad un normale monitor.

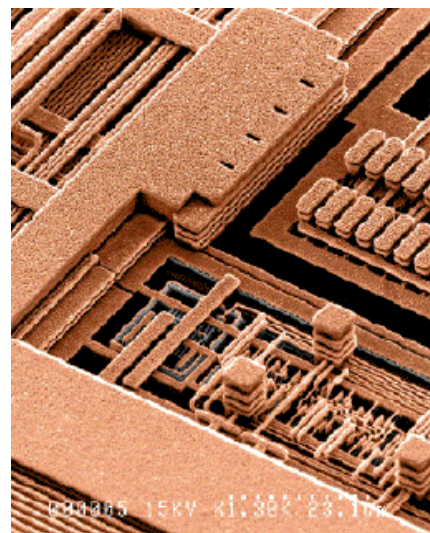
È da notare che l'interno del microscopio deve essere mantenuto sotto vuoto spinto per permettere agli elettroni di muoversi liberamente, quindi fra gli apparati di supporto di ogni microscopio elettronico c'è anche una **pompa a vuoto** che evacua l'aria presente all'interno dello strumento prima di iniziare l'osservazione.

I microscopi a scansione elettronica sono utilizzati in numerose applicazioni industriali, commerciali e di ricerca, dai processi di fabbricazione di materiali e di componenti all'avanguardia alle applicazioni forensi. Le immagini SEM possono infatti fornire informazioni sulla topologia, sulla morfologia o sulla composizione dei campioni esaminati.

I SEM sono utilizzati nella **scienza dei materiali** per la ricerca, il controllo di qualità e l'analisi dei guasti.

In effetti, quasi tutte le più recenti scoperte di scienza dei materiali, dall'industria aerospaziale e chimica all'elettronica e l'utilizzo di energia, sono state rese possibili con l'aiuto di SEM.

I SEM sono largamente impiegati sia nella **prototipazione** che nel **controllo di qualità dei moderni circuiti integrati**. Con scale e materiali sempre più piccoli, le immagini tridimensionali ad alta risoluzione prodotte dal SEM offrono infatti una misurazione rapida e accurata della struttura del semiconduttore in esame ed aiutano ad assicurare che il circuito abbia prestazioni affidabili.



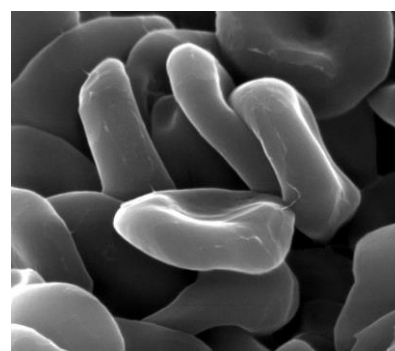
Anche le **indagini forensi** utilizzano i SEM per scoprire prove e analizzare reperti. Fra gli utilizzi più frequenti: analisi dei residui di polvere da sparo, analisi balistica, analisi della grafia e della stampa, esame dell'autenticità delle banconote, analisi di particelle di vernice e fibre, ecc.

Poiché i SEM offrono la possibilità di esaminare un'ampia gamma di materiali ad alto e basso ingrandimento senza sacrificare la profondità di messa a fuoco, il loro uso nelle scienze forensi consente di identificare i materiali e la loro origine e contribuendo a costruire il corpus di evidenze in materia penale e legale.

Ad esempio nel 1993 Charles Smithart fu accusato dell'omicidio di una ragazzina di 11 anni nella città di Glennallen in Alaska.

Gli investigatori sospettavano Smithart in quanto era stato avvistato sulla scena del crimine, ma non avevano prove che lo collegassero direttamente all'omicidio. Usando un SEM, uno scienziato forense ha analizzato frammenti di ferro trovati sulla scena del crimine. Scoprì che avevano una forma globulare che solo la saldatura o la molatura producono. Smithart nel suo negozio aveva un impianto di saldatura, con il quale a volte riparava biciclette per i bambini del posto, che produceva frammenti di ferro di identica struttura.

Nelle **scienze biologiche** i SEM sono utilizzati in campi vastissimi, dato che permettono di studiare oggetti relativamente grandi come gli insetti fino ad arrivare a oggetti di piccolissime dimensioni come i componenti dei tessuti viventi, i batteri e perfino i virus. I SEM sono quindi impiegati nel campo della genetica, nella ricerca su batteri ed agenti patogeni, nello studio di nuove specie animali, etc.



Globuli rossi ingranditi 20.000 volte

(fonte <https://www.nature.com/articles/nnano.2011.55>)

Il SEM ha utilizzi anche nel campo della **geologia** e dell'**archeologia**. Il campionamento geologico utilizzando un microscopio elettronico a scansione può misurare i processi di invecchiamento e la morfologia dei campioni, mentre le immagini ad elettroni retrodiffusi possono essere utilizzate per identificare le differenze di composizione dei campioni. In questo ambito il microscopio a scansione è stato ad esempio utilizzato nella misurazione della qualità del suolo per l'agricoltura e l'allevamento, per la datazione di reperti storici, per l'acquisizione di prove forensi sulla qualità del suolo e la presenza di tossine, etc.



*A sinistra un frammento dei Manoscritti del Mar Morto (immagine di Google Art project); a destra un'immagine al microscopio elettronico a scansione grazie al quale è possibile visualizzare delle fibre (a), la vera e propria superficie della pergamena (b) e dei cristalli di glauberite ( $\text{Na}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$ ), un minerale la cui presenza è probabilmente dovuta a un passato trattamento di restauro. Questi cristalli sono stati ritrovati in entrambi i lati della pergamena e sulla carta giapponese usata come supporto dei frammenti.*

Molteplici sono anche gli utilizzi dei SEM nella **scienza medica**: questi microscopi sono utilizzati per confrontare campioni di sangue e tessuto, per indagare sulle cause di una malattia, per misurare gli effetti dei trattamenti sui pazienti, etc.

Ad esempio il microscopio elettronico realizzato negli anni 40 presso l'RCA Laboratory è stato utilizzato per studiare i meccanismi chimico-fisiologici alla base dell'azione terapeutica della penicillina. Furono proprio gli scienziati dell'RCA che resero note tali risultanze nel corso di una conferenza della Society of American Bacteriologists durante il secondo conflitto mondiale.

Infine, non tutte le applicazioni SEM sono strettamente pratiche: il SEM trova applicazione anche in **campo artistico**. Le immagini prodotte da SEM sono state utilizzate per creare opere d'arte digitali: immagini tridimensionali ad alta risoluzione di vari materiali creano infatti una varietà di paesaggi in cui i soggetti dell'immagine sono in parte alieni e in parte familiari.



Un'immagine a falsi colori di un cristallo di caffeina (fonte: <https://www.smithsonianmag.com/science-nature/science-images-that-border-on-art-50661407/>)

## Il nostro gruppo di lavoro



Il nostro gruppo di lavoro





[http://www.treccani.it/enciclopedia/la-seconda-rivoluzione-scientifica-scienze-biologiche-e-medicina-la-microscopia-da-abbe-al-microscopio-elettronico\\_%28Storia-della-Scienza%29/](http://www.treccani.it/enciclopedia/la-seconda-rivoluzione-scientifica-scienze-biologiche-e-medicina-la-microscopia-da-abbe-al-microscopio-elettronico_%28Storia-della-Scienza%29/)

[https://www.ntmdt-si.com/data/media/files/manuals/fondamenti di microscopia a scansione di sonda.pdf](https://www.ntmdt-si.com/data/media/files/manuals/fondamenti%20di%20microscopia%20a%20scansione%20di%20sonda.pdf)

<http://invitoallanatura.it/2013/storia-verso-il-microscopio-elettronico-e-il-modello-cellula-attuale-parte-2/>

[https://books.google.it/books?id=Ldk\\_BAAQBAJ&pg=PA53&lpg=PA53&dq=scoperte+microscopi+o+elettronico+a+scansione&source=bl&ots=bg2\\_VYDqo-&sig=Hgzb-izcSFYaU3iVIJBmbNt5Uto&hl=it&sa=X&ved=0ahUKEwjvpb3PnZbaAhWE-KQKHW72Adc4ChDoAQg2MAM#v=onepage&q=scoperte%20microscopio%20elettronico%20a%20scansione&f=false](https://books.google.it/books?id=Ldk_BAAQBAJ&pg=PA53&lpg=PA53&dq=scoperte+microscopi+o+elettronico+a+scansione&source=bl&ots=bg2_VYDqo-&sig=Hgzb-izcSFYaU3iVIJBmbNt5Uto&hl=it&sa=X&ved=0ahUKEwjvpb3PnZbaAhWE-KQKHW72Adc4ChDoAQg2MAM#v=onepage&q=scoperte%20microscopio%20elettronico%20a%20scansione&f=false)

<http://www.history-of-the-microscope.org/history-of-the-microscope-who-invented-the-microscope.php>

<http://www.saperescienza.it/biologia/piccoli-indizi-per-grandi-scoperte/943-piccoli-indizi-per-grandi-scoperte>

[www.uniroma2.it/didattica/MetodologieBotaniche/deposito/semtem.ppt](http://www.uniroma2.it/didattica/MetodologieBotaniche/deposito/semtem.ppt)

<http://www.istitutomedici.gov.it/servizi-online/materiali-scaricabili/materiale-didattico/dispense-on-line/materiale-prof-giovanni-nalin/botanica/313-il-microscopio-ottico/file>

<http://www.ailpesaro.com/it/newseventi/news/2016-12-20-scoperta-senza-precedenti-leucemia-acuta-mieloide/>

<https://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope.htm>

[https://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscope/EM\\_HistOverview.htm](https://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscope/EM_HistOverview.htm)

<https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>

[https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem\\_atoz\\_all.pdf](https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf)

<https://www.atascientific.com.au/sem-imaging-applications-practical-uses-scanning-electron-microscopes/>