

Serie B-510

MANUALE D'ISTRUZIONI

Modello
B-510DK

v 1.0 2018



Indice

- 1. Avvertenza**
 - 2. Simboli**
 - 3. Informazioni sulla sicurezza**
 - 4. Utilizzo previsto**
 - 5. Descrizione dello strumento**
 - 6. Disimballaggio**
 - 7. Assemblaggio**
 - 8. Sommario delle procedure di osservazione in campo chiaro**
 - 9. Sommario delle procedure di osservazione in campo scuro**
 - 10. Uso del microscopio**
 - 11. Microscopia in campo scuro**
 - 12. Microfotografia**
 - 13. Manutenzione**
 - 14. Guida alla risoluzione dei problemi**
- Smaltimento**

1. Avvertenza

Questo microscopio è uno strumento scientifico di alta precisione, progettato per durare a lungo con una minima manutenzione; la realizzazione è secondo i migliori standard ottici e meccanici, per poter essere utilizzato quotidianamente. Vi ricordiamo che questo manuale contiene informazioni importanti per la sicurezza e per la manutenzione dello strumento, e deve quindi essere messo a disposizione di coloro che lo utilizzeranno. Decliniamo ogni responsabilità derivante da un utilizzo dello strumento non indicato nel presente manuale.

2. Simboli

La seguente tabella riporta i simboli utilizzati in questo manuale.



PERICOLO

Questo simbolo indica un rischio potenziale ed avverte di procedere con cautela.



SHOCK ELETTRICO

Questo simbolo indica un rischio di shock elettrico.

3. Informazioni sulla sicurezza



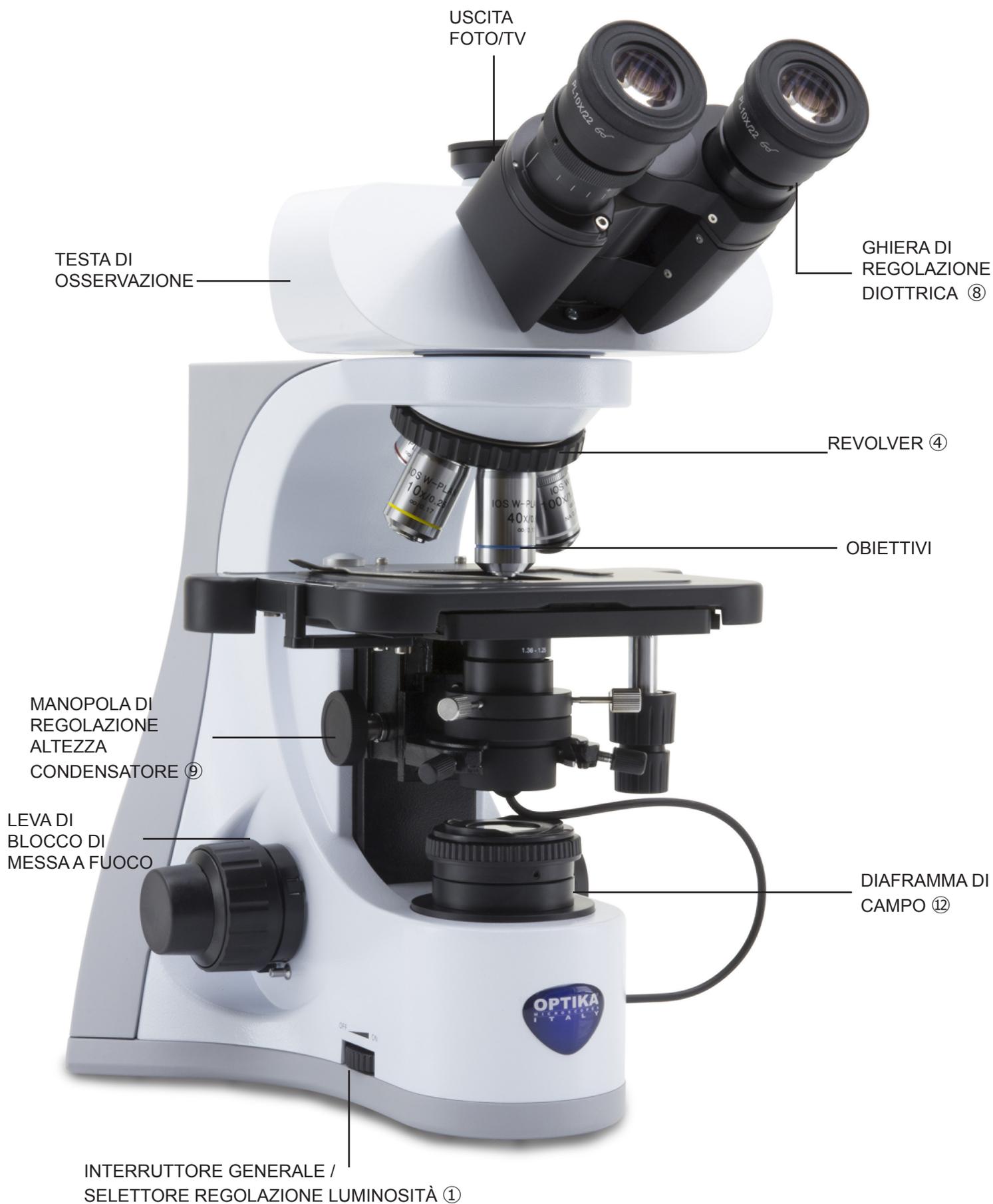
Per evitare shock elettrici

Prima di collegare il cavo di alimentazione alla presa elettrica, assicurarsi che il voltaggio della rete locale coincida con il voltaggio dello strumento e che l'interruttore dell'illuminazione sia nella posizione "OFF". Gli utenti dovranno seguire tutte le norme di sicurezza locali. Lo strumento è certificato CE. In ogni caso, gli utilizzatori sono gli unici responsabili per un utilizzo sicuro dello strumento. Per l'utilizzo in sicurezza dello strumento è importante attenersi alle seguenti istruzioni e leggere il manuale in tutte le sue parti.

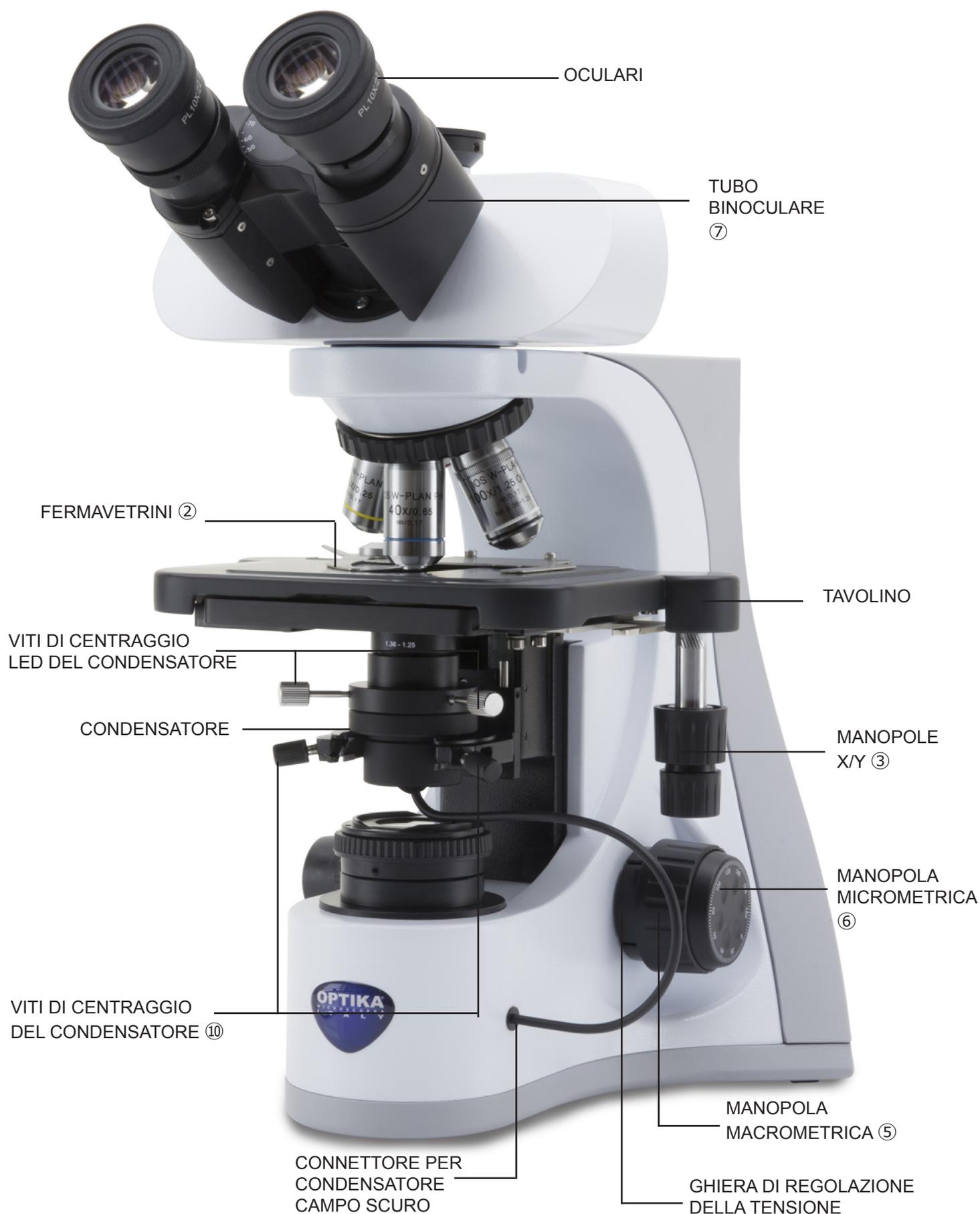
4. Utilizzo previsto

Solo per ricerca. Non è previsto alcun utilizzo di questo strumento per uso diagnostico.

5. Descrizione dello strumento



5. Descrizione dello strumento (lato opposto)



6. Disimballaggio

Il microscopio è riposto in un imballo di polistirolo espanso. Rimuovere il nastro adesivo dal collo ed aprire la parte superiore dell'imballo. Fare attenzione a non far cadere le parti ottiche (obiettivi e oculari) nell'estrarre il microscopio dalla scatola per evitare che vengano danneggiati. Utilizzare entrambe le mani (una intorno allo stativo e una alla base), sfilare il microscopio dal contenitore e appoggiarlo su un piano stabile.



Evitare di toccare le superfici ottiche come lenti, filtri o vetri. Tracce di grasso o altri residui possono ridurre la qualità visiva dell'immagine finale e corrodere la superficie delle ottiche in breve tempo.

7. Assemblaggio

All'apertura della scatola del B-510DK, i componenti del microscopio sono i seguenti:



- ① Stativo del microscopio
- ② Oculari
- ③ Obiettivi
- ④ Testa di osservazione
- ⑤ Olio per immersione
- ⑥ Brugola

- ⑦ Chiave regolazione tensione
- ⑧ Copertina
- ⑨ Alimentatore
- ⑩ Condensatore per campo chiaro
- ⑪ Condensatore per campo scuro
- ⑫ Telescopio di centraggio

Procedura di montaggio

1. Inserire la testata ottica al di sopra dello stativo e stringere la vite di bloccaggio con la brugola in dotazione. (Fig.1)
► **Tenere sempre la testata con una mano durante il serraggio della vite per evitare che la stessa cada.**
2. Inserire gli oculari nei tubi portaoculari della testata ottica. (Fig.2)
3. Avvitare ciascun obiettivo nel foro filettato del revolver, in senso orario in ordine di ingrandimento. (Fig.3)
4. Avvitare ciascun obiettivo nel foro filettato. Inserire lo spinotto dell'alimentatore nel connettore posto sul retro del microscopio (Fig.4)



EVITARE DI SMONTARE LO STRUMENTO

Non disassemblare lo strumento.

Questo comporta l'annullamento della garanzia e potrebbe causare malfunzionamenti.

- Il microscopio viene fornito con due condensatori: uno per campo chiaro ed uno per campo scuro. Selezionare il condensatore adeguato alla metodica di osservazione desiderata.

5. Abbassare il supporto portacondensatore agendo sulla vite di regolazione di altezza ①. (Fig. 5)



6. Allineare la coda di rondine del condensatore al supporto porta condensatore. (Fig. 6)



7. Stringere la vite di serraggio del condensatore ②. (Fig. 7)

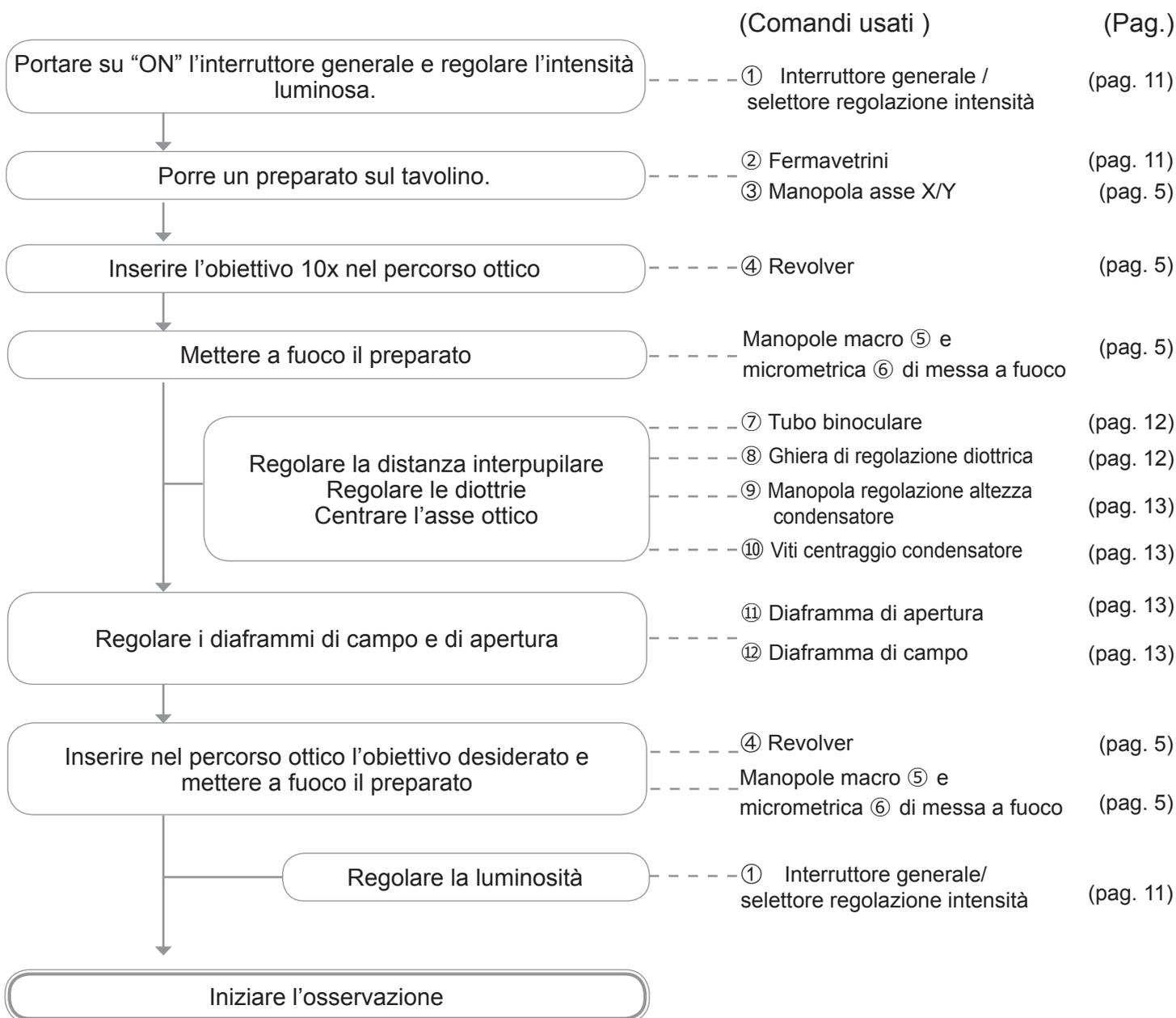


8. (Solo per condensatore per campo scuro) Collegare lo spinotto del condensatore al connettore del microscopio posto sul lato della base. (Fig. 8)

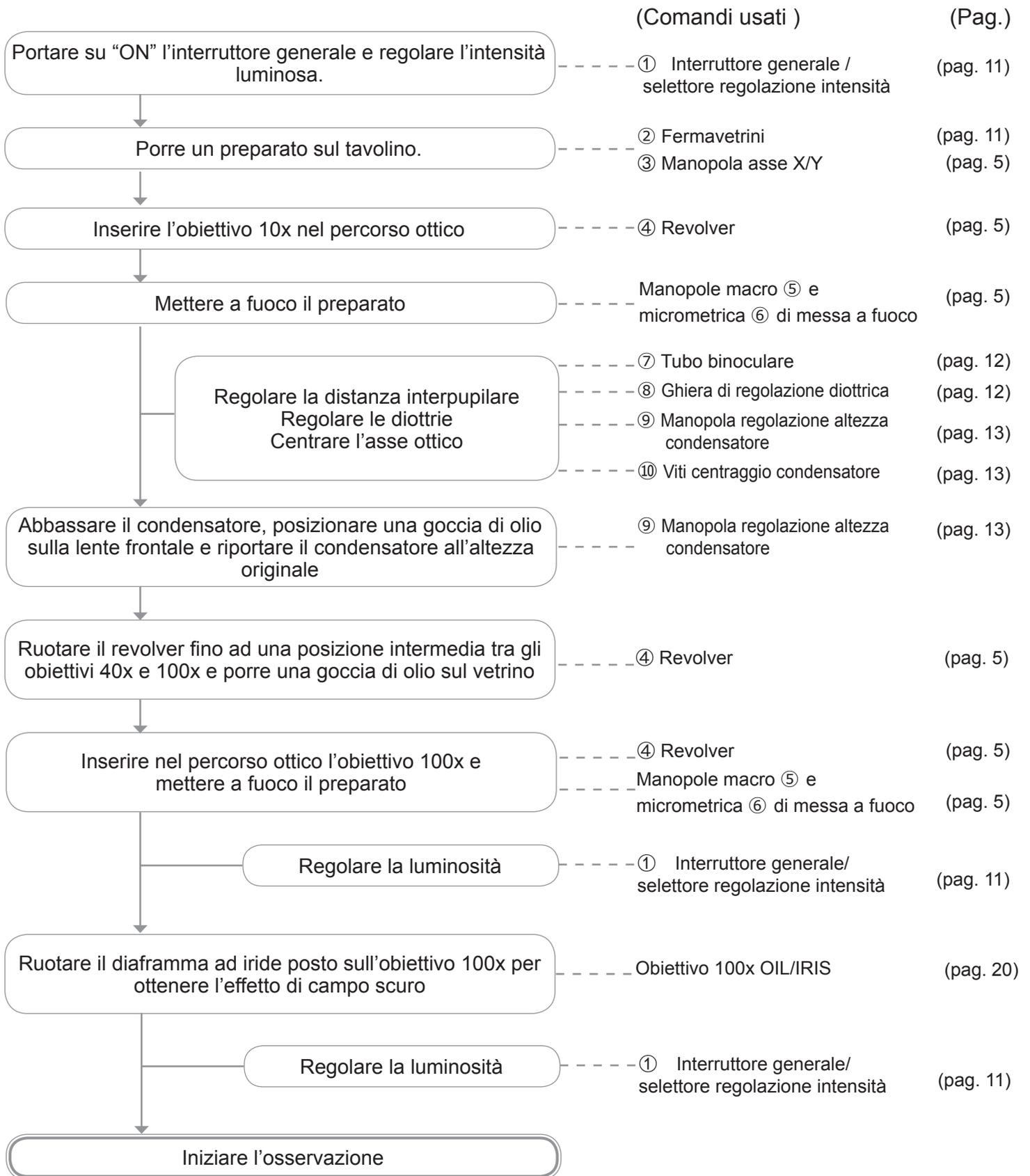
- Quando si collega lo spinotto del condensatore, la luce proveniente dal LED del microscopio si spegne e si accende il LED interno al condensatore.



8. Sommario delle procedure di osservazione in campo chiaro



9. Sommario delle procedure di osservazione in campo scuro



10. Uso del microscopio

1. Regolazione dell'intensità luminosa

Agire sulla rotellina di regolazione dell'intensità luminosa per accendere e spegnere lo strumento e per aumentare o diminuire il voltaggio dell'illuminazione ①. (Fig.5)

2. Regolazione della frizione della manopola macrometrica (Fig. 6)

► Regolare la frizione della manopola utilizzando l'apposita ghiera.

La frizione della manopola macrometrica di messa a fuoco è preregolata in fabbrica. Per modificare la tensione in base alle preferenze personali ruotare la ghiera ② utilizzando la chiavetta in dotazione. La rotazione in senso orario aumenta la frizione. La tensione è troppo bassa se il tavolino scende da solo per gravità o se il fuoco si perde facilmente dopo una regolazione con la manopola micrometrica. In questo caso aumentare la tensione ruotando la ghiera.

3. Leva di blocco di messa a fuoco (Fig. 7)

La leva di blocco svolge una doppia funzione: quella di prevenire il contatto tra obiettivo e preparato e quella di memoria di messa a fuoco. Dopo avere messo a fuoco il campione, ruotare la leva ③ e bloccarla. In questo modo si definisce il punto superiore di messa a fuoco. A questo punto si può abbassare il tavolino con la manopola macrometrica, sostituire il campione e quindi rialzare il tavolino fino al punto superiore: il campione sarà approssimativamente a fuoco e si dovrà effettuare solamente una regolazione fine per ottenere la messa a fuoco ottimale. Il movimento micrometrico non viene influenzato dal blocco di messa a fuoco.

► Per rimuovere il blocco, spostare la leva in senso opposto a quello utilizzato per il blocco.

4. Tavolino (Fig. 8)

Il tavolino accetta vetrini standard 26 x 76 mm, spessore 1,2 mm con coprioggetto 0,17mm.

E' possibile alloggiare due vetrini affiancati sul tavolino.

- Allargare il braccio mobile del fermapreparati ④ e posizionare frontalmente i vetrini sul tavolino.
 - Rilasciare delicatamente il braccio mobile del fermapreparati.
- Un rilascio brusco del fermapreparati potrebbe comportare la caduta di uno o di entrambi i vetrini.



Fig.5



Fig.6



Fig.7



Fig.8

5. Compensazione diottrica (Fig. 9)

1. Osservare e mettere a fuoco il preparato guardando con l'occhio destro attraverso l'oculare destro utilizzando le manopole di messa a fuoco del microscopio.
2. Ora guardare attraverso l'oculare sinistro con l'occhio sinistro. Se l'immagine non è nitida, agire sulla compensazione diottrica utilizzando l'apposito anello ①. (Fig.9)

- ▶ **Il range di compensazione è di ± 5 diottrie. Il numero indicato sulla scala presente sull'anello di compensazione dovrebbe corrispondere alla correzione diottrica dell'operatore**



Fig.9

6. Regolazione della distanza interpupillare (Fig. 10)

Osservando con entrambi gli occhi, sostenere il gruppo di oculari. Ruotare questi lungo l'asse comune fino ad ottenere un unico campo visivo.

- ▶ **La scala graduata sull'indicatore della distanza interpupillare ②, indicata dal puntino “.” sul portaoculare, mostra la distanza interpupillare dell'operatore. (Fig.10)**

Il range della distanza interpupillare è 48-75 mm.

7. Uso dei paraocchi in gomma (Fig.11-12)

- **Uso senza occhiali da vista**
Rialzare i paraocchi ed osservare al microscopio appoggiando gli occhi ai paraocchi, in modo da evitare che la luce esterna arrivi a disturbare l'occhio.
- **Uso con occhiali da vista**
Abbassare i paraocchi in gomma con entrambe le mani. La presenza dei paraocchi abbassati evita di graffiare le lenti degli occhiali



Fig.10



Fig.11



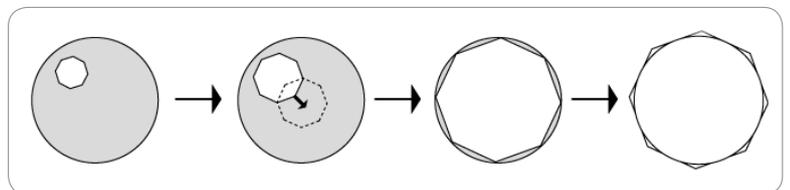
Fig.12

8. Centraggio del condensatore per campo chiaro (Fig.13)

1. Posizionare il campione sul tavolino, inserire l'obiettivo 10x nel percorso ottico e mettere a fuoco.
2. Inserire nel percorso ottico la lente frontale del condensatore swing-out ①.
3. Ruotare la ghiera del diaframma di campo ② nella direzione indicata dalla freccia per chiudere completamente il diaframma.
4. Ruotare la manopola di regolazione dell'altezza del condensatore ③ per mettere a fuoco il bordo del diaframma.
5. Ruotare le due viti di centraggio ④ per portare l'immagine del diaframma nel centro del campo visivo.
6. Aprire gradualmente il diaframma. Il condensatore è centrato quando l'immagine del diaframma è simmetrica al campo visivo.
7. Nell'uso normale, aprire il diaframma fino a che l'immagine circoscrive il campo visivo.



CENTRARE IL CONDENSATORE



Effetti del diaframma di campo

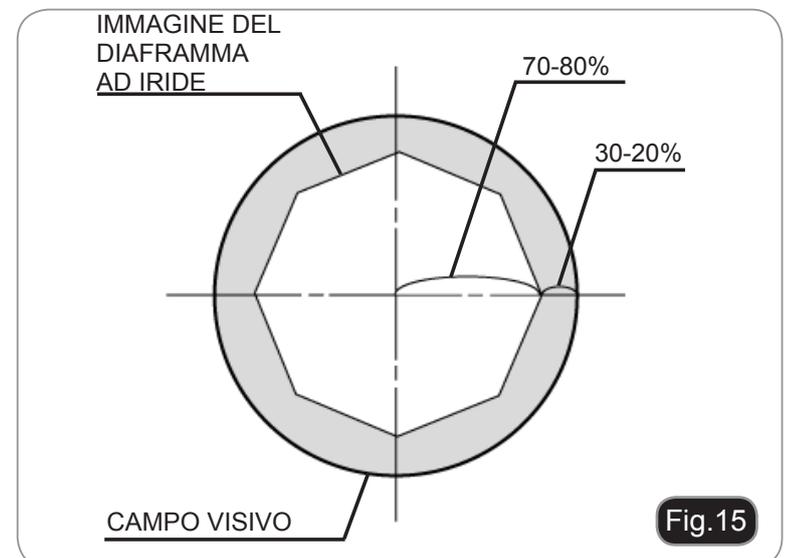
Il diaframma di campo regola l'area illuminata per ottenere un'immagine con elevato contrasto.

Adattare il diaframma di campo in funzione dell'obiettivo in uso fino a che il diaframma ad iride circoscriva il campo visivo per eliminare la luce non necessaria agli oculari.

Diaframma di apertura (Fig. 14)

- Il valore di apertura numerica (A.N.) del diaframma di apertura influenza il contrasto dell'immagine. Aumentando o diminuendo questo valore in funzione dell'apertura numerica dell'obiettivo si variano risoluzione, contrasto e profondità di campo dell'immagine.
- Per campioni con basso contrasto impostare il valore dell'apertura numerica ① (riportato sulla ghiera del condensatore) a circa il 70%-80% dell'A.N. dell'obiettivo. Se necessario, rimuovere un oculare e, guardando nel portaoculare vuoto, regolare la ghiera del condensatore fino ad ottenere un'immagine come quella di fig. 15.

**Es: con obiettivo PLAN 40x / 0,65
regolare la scala a $0,65 \times 0,8 = 0,52$**



11. Microscopia in campo scuro

Il B-510DK è un microscopio per osservazione in campo scuro specifico per l'analisi del sangue con uno speciale condensatore per campo scuro extra efficiente, con A.N. da 1,36 a 1,25 e un obiettivo plan acromatico da 100x con diaframma regolabile.

L'illuminazione a LED X garantisce l'alto livello di intensità della luce tipicamente necessario nelle tecniche darkfield ad alto ingrandimento.

Per utilizzare correttamente questo microscopio, è necessario acquisire familiarità con:

- la tecnica di immersione in olio
- la tecnica di campo scuro.

Nel seguente manuale vengono introdotte le basi di questi metodi (paragrafi 11.1 e 11.2) ed anche una guida passo-passo alla configurazione del B-510DK (paragrafo 11.3).

Vengono forniti anche consigli generali per la microscopia a immersione.

11.1 Principi di microscopia con immersione in olio

La capacità dell'obiettivo del microscopio di catturare i raggi di luce deviati da un campione dipende sia dall'apertura numerica sia dal mezzo attraverso cui la luce viaggia.

L'apertura numerica di un obiettivo è direttamente proporzionale all'indice di rifrazione del mezzo tra il coprioggetto e la lente frontale, e anche al seno di metà dell'apertura angolare dell'obiettivo.

Poiché il seno non può essere maggiore di 90 gradi, l'apertura numerica massima possibile è determinata dall'indice di rifrazione del mezzo di immersione.

La maggior parte degli obiettivi di un microscopio utilizza l'aria come mezzo attraverso il quale i raggi di luce devono passare tra il coprioggetto che protegge il campione e la lente frontale dell'obiettivo. Gli obiettivi di questo tipo vengono definiti obiettivi a secco perché vengono utilizzati senza mezzi intermedi liquidi.

L'aria ha un indice di rifrazione di 1.0003, molto vicino a quello del vuoto e considerevolmente inferiore alla maggior parte dei liquidi, tra cui acqua ($n = 1.33$), glicerina ($n = 1.470$) e comuni oli da immersione al microscopio (media $n = 1.515$).

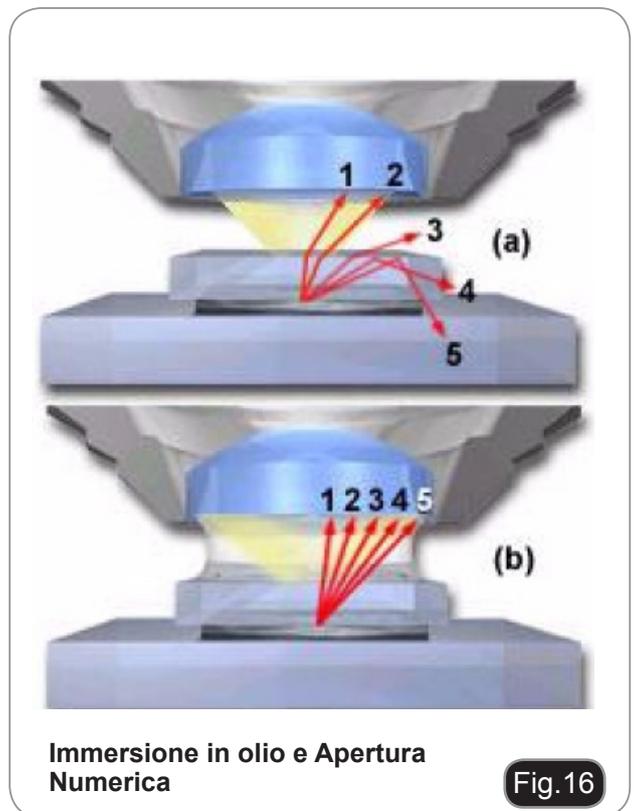
In pratica, l'apertura numerica massima di un sistema di obiettivi a secco è limitata a 0,95 e valori maggiori possono essere raggiunti solo utilizzando l'ottica progettata per il mezzo di immersione.

Il principio dell'immersione in olio è dimostrato nella figura 16 dove i singoli raggi di luce sono tracciati attraverso il campione e passano nell'obiettivo o sono rifratti in altre direzioni. La Figura 16

(a) illustra il caso di un obiettivo secco con cinque raggi (etichettati da 1 a 5) mostrati passando attraverso un campione coperto con un vetrino coprioggetto. Questi raggi sono rifratti nell'interfaccia vetrino-aria e solo i due raggi più vicini all'asse ottico del microscopio (raggi 1 e 2) hanno l'angolo appropriato per entrare nella lente frontale obiettivo. Il terzo raggio viene rifratto con un angolo di circa 30 gradi rispetto al coprioggetto e non entra nell'obiettivo. Gli ultimi due raggi (4 e 5) sono riflessi internamente indietro attraverso il coprioggetto e, insieme al terzo raggio, contribuiscono a riflessi interni di luce su superfici di vetro che tendono a degradare la risoluzione dell'immagine.

Quando l'aria viene sostituita dall'olio con lo stesso indice di rifrazione del vetro, mostrato nella Figura 16 (b), i raggi luminosi passano direttamente attraverso l'interfaccia vetro-olio senza deviazione dovuta alla rifrazione. L'apertura numerica è quindi aumentata dal fattore di n , l'indice di rifrazione del petrolio.

Gli obiettivi da microscopio progettati per l'uso con l'olio per immersione hanno una serie di vantaggi rispetto a quelli utilizzati a secco. Gli obiettivi di immersione sono tipicamente di correzione superiore (fluorite o apocromatica) e possono avere aperture numeriche funzionanti fino a 1,40 quando vengono utilizzati con olio ad immersione avente la dispersione e la viscosità appropriate. Questi obiettivi consentono di aprire il diaframma del condensatore del sotto-stadio in misura maggiore, estendendo così l'illuminazione del campione e sfruttando l'apertura numerica aumentata.

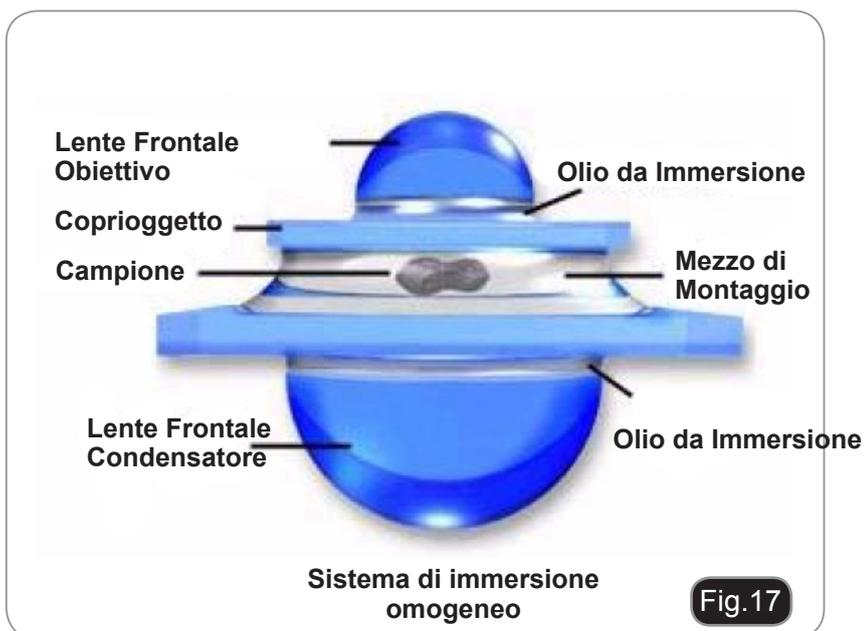


Un fattore che viene comunemente trascurato quando si usano obiettivi ad immersione in olio di apertura numerica aumentata sono le limitazioni poste sul sistema dal condensatore.

In una situazione in cui un obiettivo ad olio di $NA = 1.40$ viene utilizzato per l'immagine di un campione con un condensatore di apertura numerica più piccola (1,0 per esempio), l'apertura numerica inferiore del condensatore sovrascrive quella dell'obiettivo e la NA totale del sistema è limitata a 1.0, l'apertura numerica del condensatore.

I moderni condensatori presentano spesso un alto grado di correzione con valori di apertura numerica compresi tra 1,0 e 1,40. Per utilizzare efficacemente tutti i benefici dell'immersione in olio, l'interfaccia tra la lente frontale del condensatore sotto il tavolino e la parte inferiore del vetrino del microscopio contenente il campione deve essere immersa in olio.

Un sistema ideale è schematicamente visualizzato in Figura 17, dove l'olio di immersione è stato posizionato alle interfacce tra la lente frontale dell'obiettivo e il vetrino del campione e anche tra la lente frontale del condensatore e la parte inferiore del vetrino del campione.



Questo sistema è stato definito un sistema di immersione omogenea ed è la situazione ideale per ottenere la massima apertura numerica e la risoluzione in un microscopio ottico.

In questo caso, l'indice di rifrazione e la dispersione della lente frontale dell'obiettivo, dell'olio di immersione, della lente frontale del condensatore e del mezzo di montaggio sono uguali o molto vicini alla stessa.

In questo sistema ideale, un raggio di luce obliquo può passare attraverso la lente del condensatore e completamente attraverso il vetrino del microscopio, l'olio per immersione e il mezzo di montaggio non soggetti a rifrazione alle interfacce olio-vetro o mezzo di montaggio-vetro.

Quando si utilizzano obiettivi acromatici a immersione in olio ad alto ingrandimento, è talvolta possibile omettere la fase di lubrificazione della lente superiore del condensatore. Questo perché il diaframma di apertura del condensatore deve spesso essere ridotto con obiettivi meno corretti per eliminare gli artefatti e fornire immagini ottimali.

La riduzione della dimensione del diaframma riduce il potenziale aumento dell'apertura numerica (fornito dalla lubrificazione della lente del condensatore), pertanto la perdita di qualità dell'immagine in queste condizioni è generalmente trascurabile. La microscopia in campo scuro è una tecnica di illuminazione specializzata che sfrutta l'illuminazione obliqua per migliorare il contrasto nei campioni che non possono essere osservati bene nelle normali condizioni di illuminazione in campo chiaro.

Tutti noi abbiamo abbastanza familiarità con l'aspetto e la visibilità delle stelle in una notte buia, nonostante le loro enormi distanze dalla terra. Le stelle possono essere viste a causa del netto contrasto tra la loro debole luce e il cielo nero.

11.2 Principi di illuminazione in campo scuro

Questo principio viene applicato nella microscopia campo scuro, un metodo semplice e popolare per rendere chiaramente visibili oggetti non colorati.

Tali oggetti hanno spesso indici di rifrazione molto vicini a quelli dei loro dintorni e sono difficili da immaginare nella microscopia a campo chiaro convenzionale.

Ad esempio, molti piccoli organismi acquatici hanno un indice di rifrazione compreso tra 1,2 e 1,4, il che comporta una differenza ottica trascurabile dal mezzo acquoso circostante. Questi sono candidati ideali per l'illuminazione in campo scuro.

L'illuminazione in campo scuro richiede il blocco della luce centrale che normalmente passa attraverso e attorno (intorno) al campione, consentendo solo ai raggi obliqui di ogni azimuth di "colpire" il campione montato sul vetrino del microscopio. La lente superiore di un semplice condensatore di campo scuro di Abbe è sfericamente concava, consentendo ai raggi di luce che emergono dalla superficie in tutti gli azimuth di formare un cono di luce cavo invertito con un apice centrato nel piano del campione.

Se nessun campione è presente e l'apertura numerica del condensatore è maggiore di quella dell'obiettivo, i raggi obliqui si incrociano e tutti questi raggi non entreranno nell'obiettivo a causa della loro obliquità. Il campo visivo apparirà scuro.

L'insieme condensatore / obiettivo per campo oscuro illustrata nella figura 18 è un sistema ad alta apertura numerica che rappresenta la microscopia in campo scuro nella sua configurazione più sofisticata, che verrà discussa in dettaglio di seguito.

L'obiettivo contiene un diaframma interno ad iride che serve a ridurre l'apertura numerica dell'obiettivo ad un valore inferiore a quello del cono luminoso vuoto capovolto emesso dal condensatore.

Il condensatore cardioide è un progetto per campo scuro riflettente che si basa su specchi interni per proiettare un cono di luce privo di aberrazioni sul piano del campione.

Quando un campione viene posizionato sul vetrino, in particolare un campione non colorato e che non assorbe luce, i raggi obliqui attraversano il campione e sono diffratti, riflessi e / o rifratti da discontinuità ottiche (come la membrana cellulare, il nucleo e gli organuli interni) permettendo a questi deboli raggi di entrare nell'obiettivo.

Il campione può quindi essere visto luminoso su uno sfondo altrimenti nero.

In termini di ottica di Fourier, l'illuminazione del campo scuro rimuove l'ordine zero (luce non ingrandita) dal modello di diffrazione formato sul piano focale posteriore dell'obiettivo.

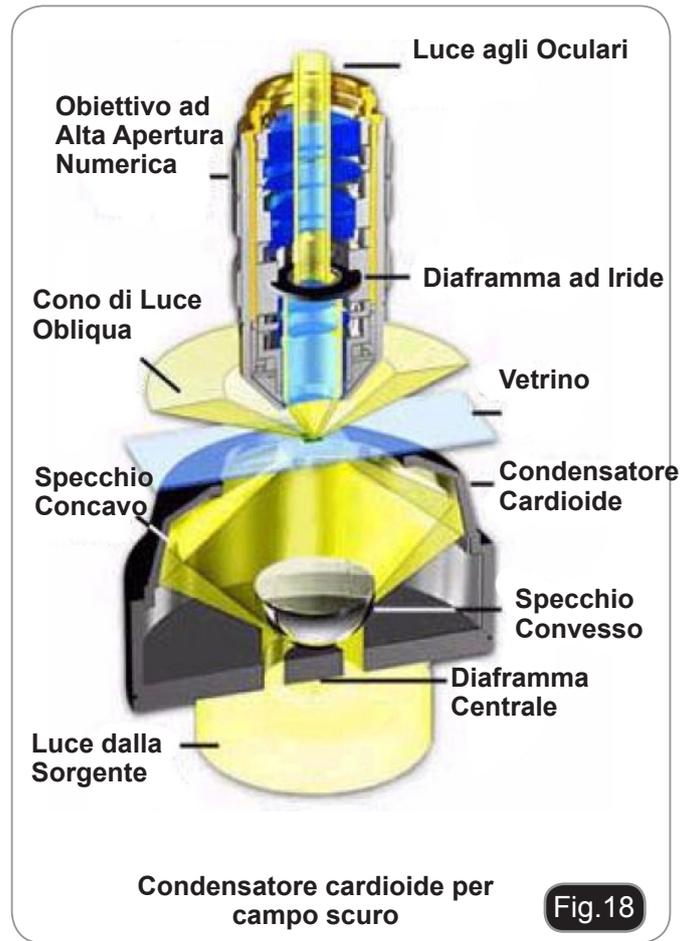
Ciò si traduce in un'immagine formata esclusivamente da intensità di diffrazione di ordine superiore disseminate dal campione.

I candidati ideali per l'illuminazione in campo scuro includono piccoli organismi acquatici viventi, diatomee, piccoli insetti, ossa, fibre, capelli, batteri non colorati, lievito e protozoi.

I campioni non biologici comprendono cristalli minerali e chimici, particelle colloidali, campioni di particelle di polvere e sezioni sottili di polimeri e ceramiche contenenti piccole inclusioni, differenze di porosità o gradienti di indice di rifrazione.

Prestare attenzione quando si preparano i campioni per la microscopia in campo scuro poiché le caratteristiche che si trovano al di sopra e al di sotto del piano di messa a fuoco possono anche disperdere la luce e contribuire al degrado dell'immagine.

Anche lo spessore del campione e lo spessore del vetrino del microscopio sono molto importanti e, in generale, un campione sottile è auspicabile per eliminare la possibilità di artefatti di diffrazione che possono interferire con la formazione dell'immagine.



11.3 Microscopia in campo scuro ad alto ingrandimento

Per lavori più precisi e sfondi più scuri, è possibile scegliere un condensatore progettato appositamente per il campo oscuro, ovvero per trasmettere solo raggi obliqui.

Esistono diverse varietà: condensatori a campo scuro "a secco" con aria tra la parte superiore del condensatore e la parte inferiore del vetrino e condensatori a campo oscuro a immersione che richiedono l'uso di una goccia di olio per immersione (alcuni invece sono progettati per utilizzare l'acqua) che stabilisce il contatto tra la parte superiore del condensatore e la parte inferiore del vetrino del campione.

Il condensatore ad immersione per campo scuro ha superfici interne a specchio e passa raggi di grande obliquità e privo di aberrazione cromatica, producendo i migliori risultati e lo sfondo più nero.

Forse il condensatore di campo oscuro più usato è il paraboloidale, costituito da un pezzo di vetro solido a cui è stata data una forma molto precisa di un paraboloidale. Come discusso sopra, il condensatore per campo scuro a secco è utile per obiettivi con aperture numeriche inferiori a 0,75, mentre i condensatori ad immersione cardioide e paraboloidale (Figura 18) possono essere utilizzati con obiettivi di apertura numerica molto elevata (fino a 1,4).

Gli obiettivi con un'apertura numerica superiore a 1,2 richiedono una riduzione della loro apertura di lavoro poiché la loro apertura numerica massima può superare l'apertura numerica del condensatore, consentendo così alla luce diretta di entrare nell'obiettivo.

Per questo motivo, molti obiettivi con aperture numeriche elevate progettati per l'uso con campo scuro e illuminazione da campo chiaro sono realizzati con un diaframma a iride regolabile incorporato che funge da arresto del diaframma.

Questa riduzione dell'apertura numerica limita anche il potere risolutivo dell'obiettivo e l'intensità della luce nell'immagine. Gli obiettivi specializzati progettati esclusivamente per i lavori in campo scuro sono prodotti con un'apertura numerica massima vicino al limite inferiore dell'apertura numerica del condensatore di campo oscuro.

Non hanno diaframmi interni dell'iride, tuttavia i diametri di montaggio dell'obiettivo sono regolati in modo che almeno una lente interna abbia il diametro ottimale da eseguire come arresto dell'apertura.

Il condensatore cardioide è molto sensibile all'allineamento e deve essere posizionato con cautela per sfruttare il cono d'illuminazione molto nitido, rendendolo il più difficile condensatore di campo oscuro da utilizzare.

Inoltre, il condensatore produce una quantità significativa di abbagliamento, anche dalle particelle di polvere più minute, e la lunghezza focale corta può causare scarsa illuminazione su oggetti che superano pochi micron in termini di dimensioni o spessore.

Quando si scelgono vetrini da microscopio per microscopia di campo scuro ad alto ingrandimento quantitativo, accertarsi di selezionare vetrini fatti con una miscela di vetro esente da impurità fluorescenti.

È necessario prestare particolare attenzione ai dettagli sulla lubrificazione di un condensatore ad apertura numerica elevata sul fondo del vetrino del campione. È molto difficile evitare l'introduzione di minuscole bolle d'aria nell'area tra la lente superiore del condensatore e il fondo del vetrino del microscopio e questa tecnica dovrebbe essere praticata alla perfezione.

Le bolle d'aria causeranno bagliori e distorsioni dell'immagine, con conseguente perdita di contrasto e degradazione generale dell'immagine.

Si verificano inoltre problemi quando si utilizzano vetrini da microscopio troppo spessi o troppo sottili.

Molti condensatori a campo scuro contengono la gamma di spessore della guida utilizzabile incisa direttamente sul supporto del condensatore.

Se il vetrino è troppo spesso, è spesso difficile mettere a fuoco il condensatore senza ricorrere a un olio per immersione a viscosità più elevata. D'altra parte, i vetrini troppo sottili hanno la tendenza a rompere il legame dell'olio tra il condensatore e il vetrino. È una buona idea acquistare vetrini da microscopio di precisione dello spessore corretto per evitare uno dei problemi sopra menzionati.

I condensatori ad apertura numerica elevata, se destinati all'uso secco o con olio, devono essere accuratamente centrati nel percorso ottico del microscopio per ottenere prestazioni ottimali.

Per ottenere ciò, molti condensatori di campo scuro sono costruiti con un piccolo cerchio inciso sulla superficie superiore per facilitare il centraggio del condensatore. La centratura viene eseguita con un obiettivo a basso ingrandimento (10x-20x) mediante l'osservazione del cerchio inciso e utilizzando le viti di centraggio del condensatore per garantire che il cerchio (e il condensatore) siano centrati correttamente nel percorso ottico.

1. Centraggio del condensatore per campo scuro

1. Selezionare un campione per campo scuro e posizionarlo sul tavolino del microscopio tra l'obiettivo e il condensatore, inserire l'obiettivo 10x nel percorso ottico e mettere a fuoco.
 - ▶ **Il condensatore proietterà un punto luminoso sul campione che può essere utilizzato per centrare il percorso ottico.**

2. Utilizzare le viti di centraggio del condensatore per spostare l'anello di luce al centro del campo visivo ①. (Fig. 19)
 - ▶ **Potrebbe essere utile variare l'altezza del condensatore per vedere il punto.**
 - ▶ **Spesso è vantaggioso utilizzare un obiettivo 10x a bassa potenza quando si centrano condensatori per campo scuro ad apertura numerica elevata.**
 - ▶ **Osservando un campione con l'obiettivo 10x mentre si alza e si abbassa lentamente il condensatore, verrà raggiunto un punto in cui un punto luminoso apparirà nel campo visivo come illustrato nella Figura 20 (a). Quando il condensatore è leggermente sollevato o abbassato, comparirà una macchia scura simile a quella mostrata nella Figura 20 (b), se il condensatore è centrato correttamente. Nei casi in cui il condensatore non è allineato e centrato correttamente, un tipico campo visivo potrebbe apparire come quello mostrato nelle Figure 20(c) e (d). Il posizionamento ideale e corretto del condensatore è illustrato nella Figura 20 (a), e il condensatore deve essere regolato fino a quando il campo visivo non appare in questo modo, con le viti di centraggio del condensatore.**

3. Rimuovere il vetrino e mettere una goccia di olio (in dotazione) sulla lente frontale del condensatore. (Fig. 21)
 - ▶ **Assicurarsi che non ci siano bolle d'aria. Le bolle d'aria nell'olio danneggiano la qualità dell'immagine.**



Fig.19

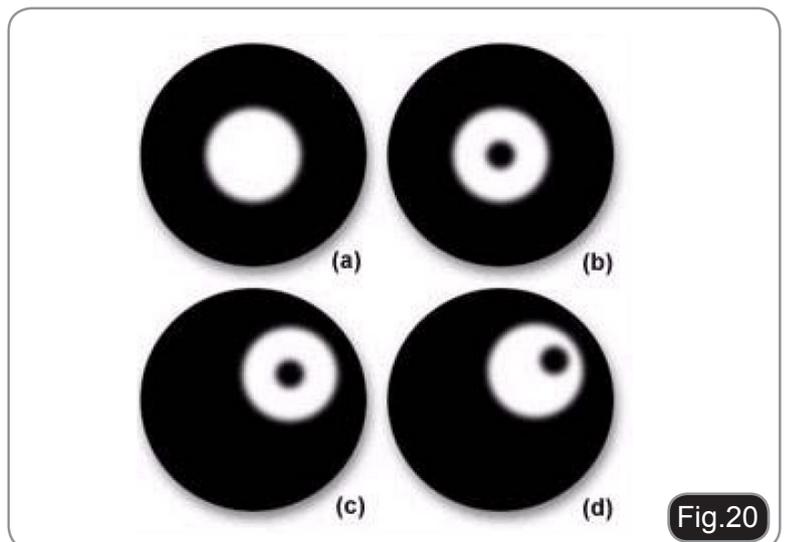


Fig.20



Fig.21

4. Riposizionare il vetrino e alzare il condensatore fino a che l'olio sulla lente frontale del condensatore non sia a contatto con il vetrino.
5. Posizionare l'area da osservare al centro del percorso ottico usando un obiettivo a basso ingrandimento (10x o 40x).
6. Mettere a fuoco il campione.
7. Inserire nel percorso ottico l'obiettivo 100x Oil/Iris. Questo pre-posiziona tutti i componenti del sistema in preparazione per l'aggiunta di olio. Spostare l'obiettivo ad immersione su una posizione adiacente del revolver ed applicare l'olio sul campione. (Fig. 22)



Fig.22

8. In pratica si dovrà averla la situazione in cui il vetrino si trova completamente immerso in olio sia nella parte inferiore (interfaccia condensatore-vetrino) ①, sia nella parte superiore (interfaccia vetrino-obiettivo) ②. (Fig. 23)

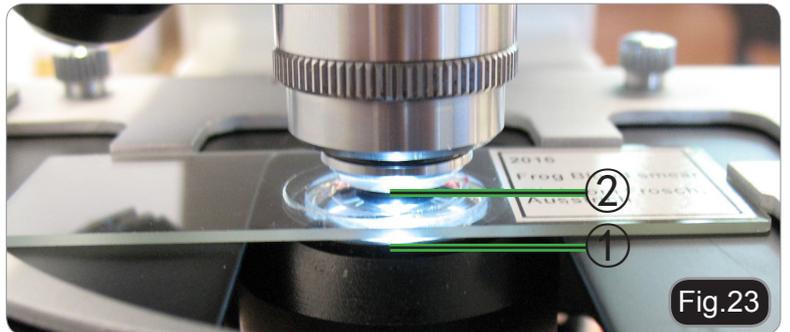


Fig.23

9. Rimuovere un oculare ed inserire il telescopio di centramento nel portaoculare vuoto. (Fig.24)



Fig.24

10. Ruotando la parte superiore del telescopio di centramento mettere a fuoco l'immagine dell'anello luminoso visibile alla periferia del campo visivo. (Fig.25)

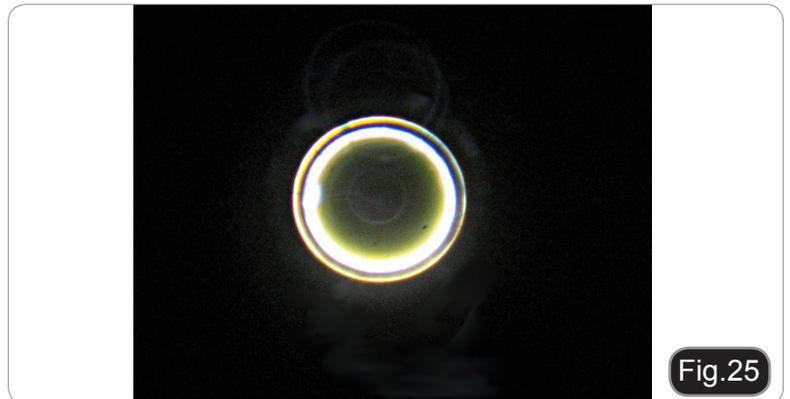


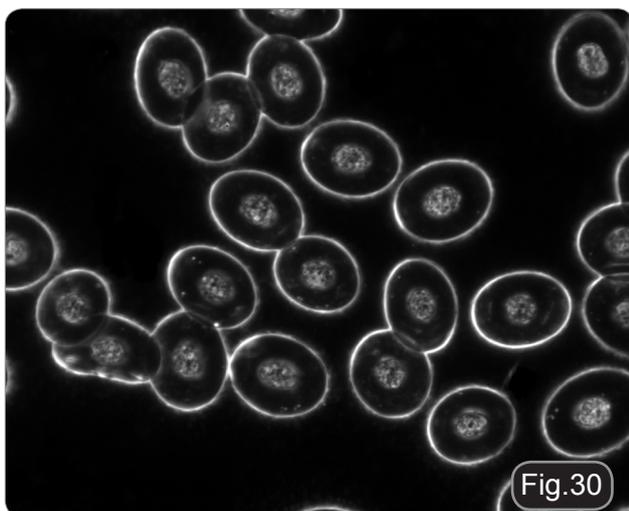
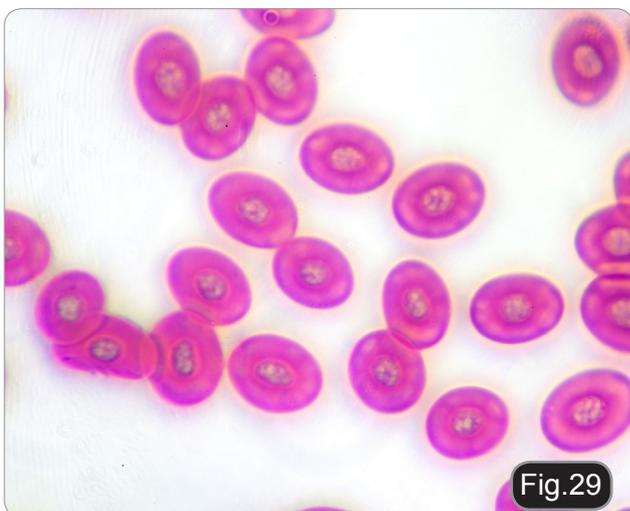
Fig.25

- Se il condensatore non è perfettamente centrato o se il condensatore non è all'altezza esatta (troppo in alto o troppo in basso), l'immagine proiettata sarà come quella di Fig. 26.



Fig.26

11. Ottimizzare il centraggio del condensatore agendo sulla manopola di regolazione di altezza del condensatore e sulle viti di centraggio del condensatore ① e del LED ②. (Fig.27)
12. Dopo avere effettuato il centraggio ottimale del condensatore, rimuovere il telescopio di centramento e riposizionare l'oculare. Ora si può procedere con l'osservazione.
13. L'obiettivo 100x ha un diaframma interno dell'iride progettato per consentire la regolazione dell'apertura numerica. Ruotare il diaframma per chiudere l'iride. (Fig.28)
14. L'effetto che si otterrà passando da un'iride completamente aperta (osservazione simile ad un campo chiaro) ad un'iride completamente chiusa (osservazione in campo scuro) è illustrata nelle figure 29 e 30.



12. Microfotografia

Installazione dell'adattatore passo "C"

1. Allentare la vite di bloccaggio ① sul tubo trinoculare e rimuovere il tappo antipolvere ②. (Fig.31)
2. Avvitare l'adattatore passo C ③ alla telecamera ④ e installare l'attacco rotondo del passo C nel foro vuoto del tubo trinoculare, quindi riavvitare la vite di serraggio ①. (Fig.32)



Fig.31

Uso di fotocamere Reflex

1. Inserire l'adattatore per reflex ① nel tubo di collegamento a microscopio ②.
 2. Avvitare l'anello "T2" ③ (non in dotazione) all'adattatore per reflex
 3. Collegare la fotocamera Reflex ④ all'anello "T2" appena montato (Fig. 33).
- L'anello "T2" non è fornito insieme al microscopio, ma è disponibile in commercio.
 - Per la fotografia di preparati scuri, oscurare gli oculari e il mirino con un panno scuro per limitare la luce diffusa.
 - Per misurare l'ingrandimento della macchina fotografica calcolare:
 $\text{ingrandimento obiettivo} * \text{ingrandimento macchina fotografica} * \text{ingrandimento lente}.$
- **Se si utilizza una macchina SLR, il movimento dello specchio potrebbe far vibrare la macchina. Si consiglia di sollevare lo specchio, di usare tempi di esposizione lunghi e uno scatto remoto.**



Fig.32



Fig.33

13. Manutenzione

Ambiente di lavoro

Si consiglia di utilizzare il microscopio in un ambiente pulito e secco, privo di urti, ad una temperatura fra 0°C e 40°C e con una umidità relativa massima dell'85% (in assenza di condensazione). Si consiglia l'uso di un deumidificatore se necessario.

Prima e dopo l'utilizzo del microscopio



- Tenere il microscopio sempre in posizione verticale quando lo si sposta.
- Assicurarsi inoltre che le parti mobili, ad esempio gli oculari, non cadano.
- Non maneggiare senza precauzioni e non adoperare inutile forza sul microscopio.
- Non cercare di provvedere da soli alla riparazione.
- Dopo l'uso spegnere immediatamente la lampada, coprire il microscopio con l'apposita custodia antipolvere in dotazione e tenerlo in un luogo asciutto e pulito.

Precauzioni per un utilizzo sicuro



- Prima di collegare l'alimentatore alla rete elettrica assicurarsi che il voltaggio locale sia idoneo a quello dell'apparecchio e che l'interruttore della lampada sia posizionato su off.
- Attenersi a tutte le precauzioni di sicurezza della zona in cui ci si trova ad operare.
- L'apparecchio è omologato secondo le norme di sicurezza CE. Gli utenti hanno comunque piena responsabilità nell'utilizzo sicuro del microscopio.

Pulizia delle ottiche

- Qualora le ottiche necessitino di essere pulite, utilizzare prima di tutto aria compressa.
- Se questo non fosse sufficiente usare un panno non sfilacciato, inumidito con acqua e un detergente delicato.
- Come ultima opzione è possibile usare un panno inumidito con una soluzione 3:7 di alcol etilico ed etere.
- Attenzione: l'alcol etilico e l'etanolo sono sostanze altamente infiammabili. Non usarle vicino ad una fonte di calore, a scintille o presso apparecchiature elettriche. Le sostanze devono essere adoperate in un luogo ben ventilato.
- Non strofinare la superficie di nessun componente ottico con le mani. Le impronte digitali possono danneggiare le ottiche.
- Non smontare gli obiettivi o gli oculari per cercare di pulirli.

Per un migliore risultato, utilizzare il kit di pulizia OPTIKA (vedi catalogo).

Se si necessita di spedire il microscopio al produttore per la manutenzione, si prega di utilizzare l'imballo originale.

14. Guida alla risoluzione dei problemi

Consultare le informazioni riportate nella tabella seguente per risolvere eventuali problemi operativi.

PROBLEMA	CAUSA	SOLUZIONE
I. Sezione Ottica:		
L'illuminazione è accesa ma il campo visivo è scuro.	I connettori dell'alimentatore non sono ben collegati	Collegarli
	La luminosità è troppo bassa	Regolarla ad un livello adeguato
I bordi del campo visivo sono vignettati o la luminosità è asimmetrica.	Il revolver non è in posizione corretta	Ruotare il revolver fino al clic stop
	L'olio non è presente o non è in quantità sufficiente sulla lente frontale del condensatore e sul vetrino	Verificare l'adeguata presenza di olio
Nel campo visivo si osservano sporco e polvere.	Sporco e polvere sul campione	Pulire il campione
	Sporco e polvere sull'oculare	Pulire l'oculare
L'immagine (usando il microscopio in campo chiaro) appare sdoppiata.	Il diaframma di apertura è troppo chiuso	Aprire il diaframma di apertura
	Il condensatore non è ben centrato o è ad un'altezza errata	Sistemare il condensatore in accordo al settaggio di Koehler.
La qualità delle immagini è scarsa: L'immagine non è nitida; Il contrasto non è alto; I dettagli non sono nitidi; Il contrasto di fase è basso.	Il revolver non si trova al centro del percorso luminoso	Ruotare il revolver finché non si blocca con un click
	Il diaframma di apertura nel campo visivo è troppo aperto oppure troppo chiuso	Regolare il diaframma di apertura
	Le lenti (condensatore, obiettivi, oculari e vetrino) sono sporche	Pulire accuratamente tutte le componenti ottiche
	Per osservazioni in luce trasmessa, lo spessore del coprioggetto non deve superare gli 0.17mm	Utilizzare un coprioggetto con spessore di 0.17mm
	La messa a fuoco non è omogenea	Il portapreparati non è piano. Spostare il campione fino a trovare la posizione ideale.
	Si sta usando un campione non adatto all'osservazione in campo scuro	usare un campione adeguato
Un lato dell'immagine non è a fuoco	Il revolver non è al centro del percorso luminoso	Ruotare il revolver finché non si arriva al clic stop
	Il preparato non si trova nella posizione corretta (es. inclinato)	Posizionare il preparato orizzontalmente sul piano
	La qualità ottica del vetrino portapreparato è scarsa	Utilizzare un vetrino di migliore qualità

II. Sezione Meccanica:		
La manopola macrometrica è difficile da ruotare	L'anello di regolazione della tensione è troppo stretto	Allentare l'anello di regolazione della tensione
La messa a fuoco è instabile	L'anello di regolazione della tensione è troppo allentato	Stringere l'anello di regolazione della tensione
III. Sezione Elettrica		
Il LED non si accende.	Lo strumento non viene alimentato	Verificare il collegamento del cavo di alimentazione
La luminosità è insufficiente	La luminosità è regolata bassa	Regolare la luminosità
La luce lampeggia	Il cavo di alimentazione non è collegato bene	Verificare il collegamento del cavo
IV. Tubo di osservazione		
Il campo visivo è diverso per ciascun occhio.	La distanza interpupillare non è corretta	Regolare la distanza interpupillare
	La correzione diottrica non è giusta	Regolare la correzione diottrica
	La tecnica di visione non è corretta, e l'operatore sforza la vista	Quando guarda il campione non focalizzi lo sguardo in un unico punto ma guardi l'intero campo visivo a disposizione. Periodicamente distolga lo sguardo e guardi un punto distante, dopodichè torni ad analizzare il campione.
V. Microfotografia e acquisizione video		
Il bordo dell'immagine non è a fuoco	In un certo grado ciò è insito nella natura degli obiettivi acromatici	Per ridurre il problema al minimo, impostare il diaframma di apertura nella posizione migliore
Sull'immagine compaiono delle macchie chiare	Nel microscopio entra della luce diffusa attraverso gli oculari oppure il mirino della macchina fotografica / telecamera	Coprire gli oculari e il mirino con un panno scuro

Smaltimento

Ai sensi dell'articolo 13 del decreto legislativo 25 luglio 2005 n°151. "Attuazione delle direttive 2002/95/CE, 2002/96/CE e 2003/108/CE, relative alla riduzione dell'uso di sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche, nonché allo smaltimento dei rifiuti".



Il simbolo del cassonetto riportato sulla apparecchiatura o sulla sua confezione indica che il prodotto alla fine della propria vita utile deve essere raccolto separatamente degli altri rifiuti. La raccolta differenziata della presente apparecchiatura giunta a fine vita è organizzata e gestita dal produttore.

L'utente che vorrà disfarsi della presente apparecchiatura dovrà quindi contattare il produttore e seguire il sistema che questo ha adottato per consentire la raccolta separata dell'apparecchiatura giunta a fine vita.

L'adeguata raccolta differenziata per l'avvio successivo della apparecchiatura dismessa al riciclaggio, al trattamento e allo smaltimento ambientalmente compatibile contribuisce ad evitare possibili effetti negativi sull'ambiente e sulla salute e favorisce il reimpiego e/o riciclo dei materiali di cui è composta l'apparecchiatura.

Lo smaltimento abusivo del prodotto da parte del detentore comporta l'applicazione delle sanzioni amministrative previste dalla normativa vigente.

B-510 Series

INSTRUCTION MANUAL

Model
B-510DK

v 1.0 2018



Table of Contents

- 1. Warning**
 - 2. Symbols and conventions**
 - 3. Safety Information**
 - 4. Intended use**
 - 5. Overview**
 - 6. Unpacking**
 - 7. Assembling**
 - 8. Summary of brightfield observation procedures**
 - 9. Summary of darkfield observation procedures**
 - 10. Use of the microscope**
 - 11. Darkfield microscopy**
 - 12. Microphotography**
 - 13. Maintenance**
 - 14. Troubleshooting**
- Equipment disposal**

1. Warning

This microscope is a scientific precision instrument designed to last for many years with a minimum of maintenance. It is built to high optical and mechanical standards and to withstand daily use. We remind you that this manual contains important information on safety and maintenance, and that it must therefore be made accessible to the instrument users. We decline any responsibility deriving from incorrect instrument use that does not comply with this manual.

2. Symbols and conventions

The following chart is an illustrated glossary of the symbols that are used in this manual.



CAUTION

This symbol indicates a potential risk and alerts you to proceed with caution.



ELECTRICAL SHOCK

This symbol indicates a risk of electrical shock.

3. Safety Information



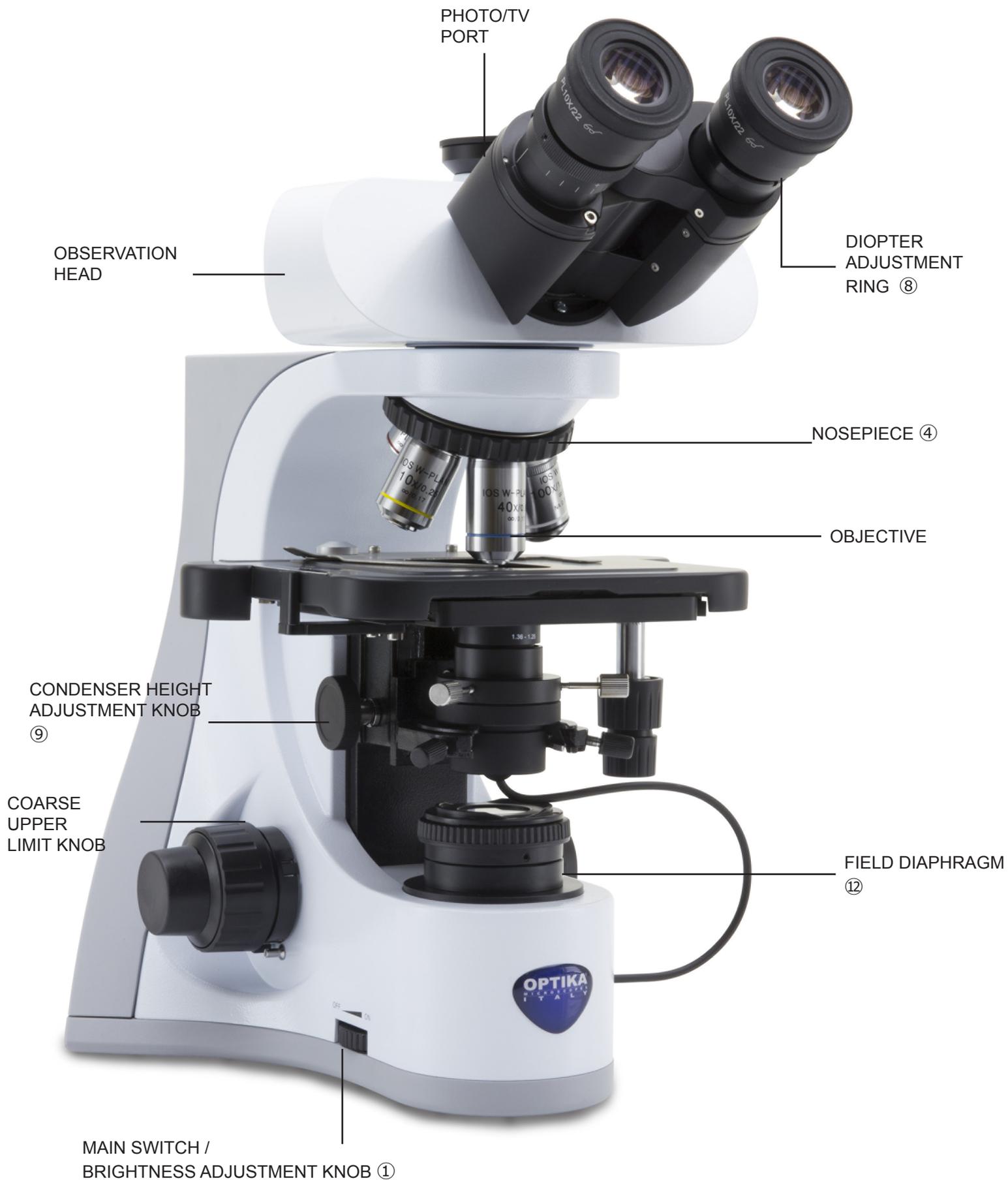
Avoiding Electrical Shock

Before plugging in the power supply, make sure that the supplying voltage of your region matches with the operation voltage of the equipment and that the lamp switch is in off position. Users should observe all safety regulations of the region. The equipment has acquired the CE safety label. However, users have full responsibility to use this equipment safely. Please follow the guidelines below, and read this manual in its entirety to ensure safe operation of the unit.

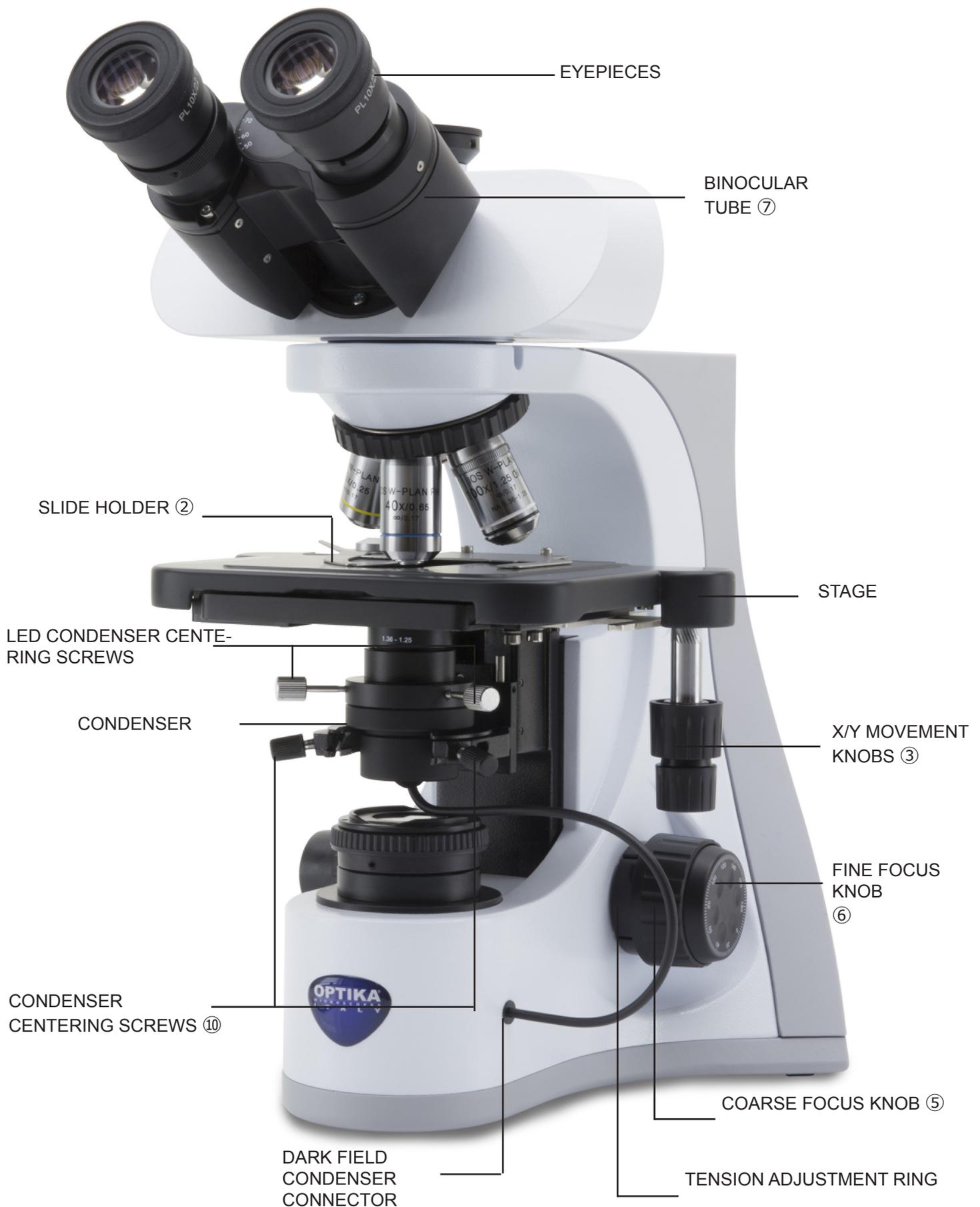
4. Intended use

For research and teaching use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

5. Overview



5. Overview (opposite side)



6. Unpacking (B-510DK)

The microscope is housed in a moulded Styrofoam container. Remove the tape from the edge of the container and lift the top half of the container. Take some care to avoid that the optical items (objectives and eyepieces) fall out and get damaged. Using both hands (one around the arm and one around the base), lift the microscope from the container and put it on a stable desk.



Do not touch with bare hands optical surfaces such as lenses, filters or glasses. Traces of grease or other residuals may deteriorate the final image quality and corrode the optics surface in a short time.

7. Assembling

Once opened the B-510DK box, the microscope parts are the following:



- ① Microscope frame
- ② Eyepieces
- ③ Objectives
- ④ Observation head
- ⑤ Immersion oil
- ⑥ Allen wrench

- ⑦ Tension adjustment tool
- ⑧ Dust cover
- ⑨ Power supply
- ⑩ Bright field condenser
- ⑪ Dark field condenser
- ⑫ centering telescope

Assembling procedure

1. Insert the optical head above the stand and tighten the screw. (Fig.1)
▶ **Hold the head with one hand during the locking in order to avoid that the head falls.**
2. Insert both eyepieces into the tubes of the optical head. (Fig.2)
3. Screw each objective into the thread of the nosepiece, clockwise with increasing magnification. (Fig.3).
4. Insert the power supply jack in the connector placed at the rear side of the microscope. (Fig.4)



Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4



DO NOT DISASSEMBLE THE INSTRUMENT
Do not disassemble the instrument.
This will void the warranty and can cause malfunctions.

- ▶ **The microscope is delivered with two condensers: one for brightfield and one for darkfield. Select the suitable condenser for the observation mode desired.**

5. Lower the condenser holder using the height condenser knob ①. (Fig. 5)



6. Insert the condenser round dovetail with the condenser holder. (Fig. 6)



7. Tight the condenser locking screw ②. (Fig. 7)

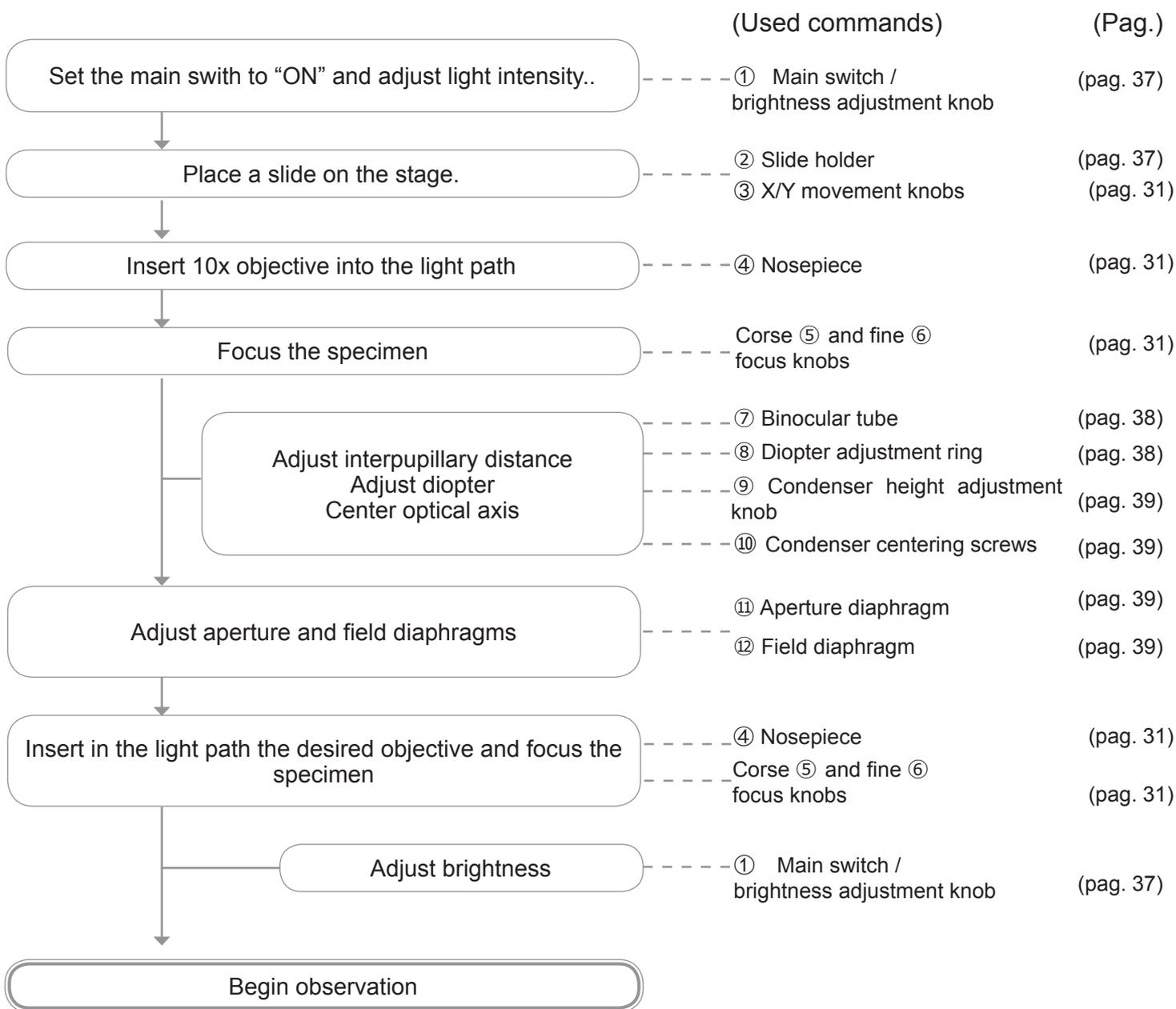


8. (Only for darkfield condenser)
Connect the condenser jack to the connector on the right side of the frame. (Fig. 8)

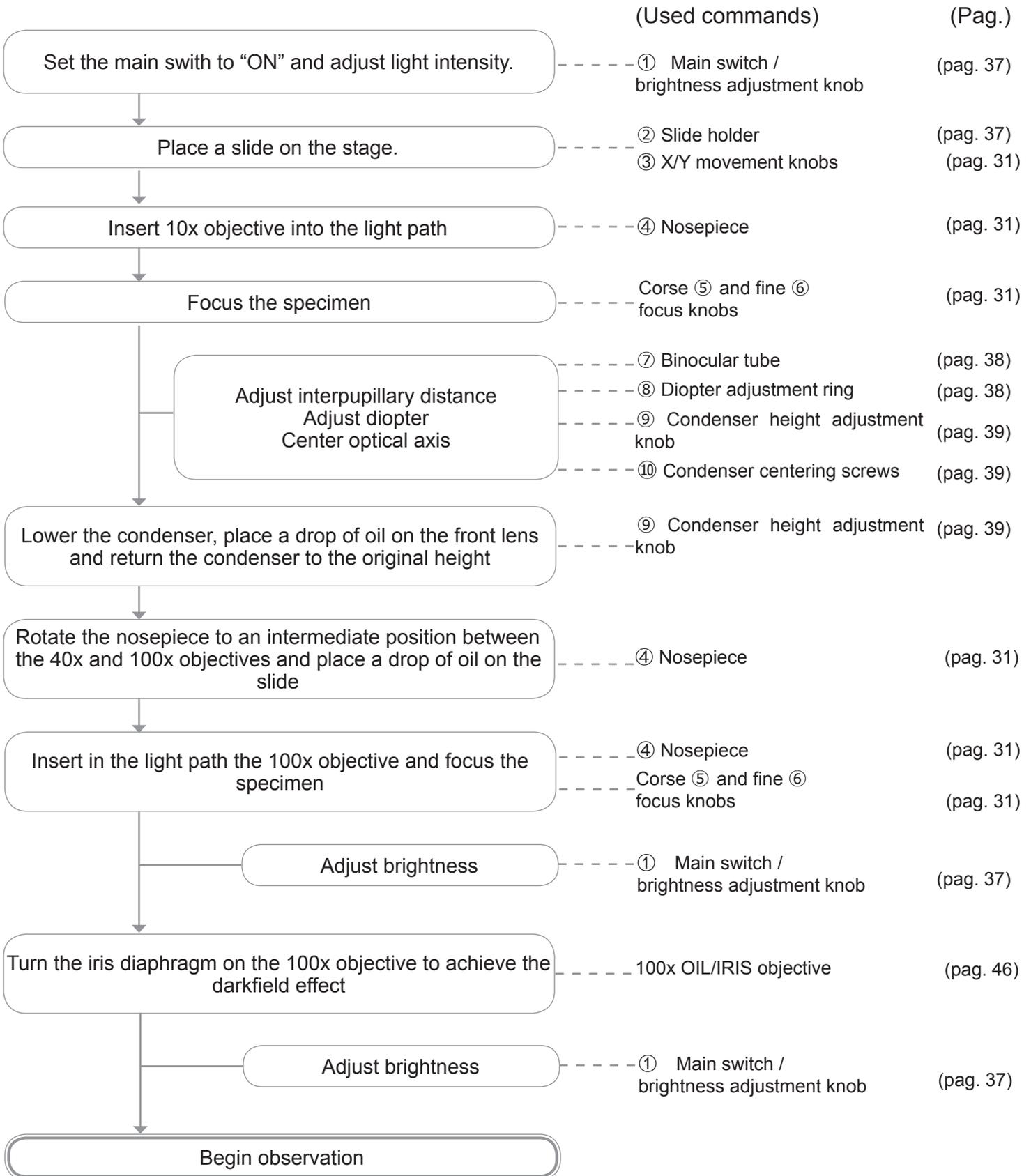
- ▶ **When the condenser plug is connected, the light coming from the microscope LED goes out and the internal condenser LED turns on.**



8. Summary of brightfield observation procedures



9. Summary of darkfield observation procedures



9. Use of the microscope

1. Light intensity adjustment

Operate on the light intensity adjustment knob to turn ON / OFF the microscope and to increase / decrease the illumination voltage ①. (Fig.5)



2. Coarse focus tension adjustment

▶ Adjust the tension using the provided tool.

The coarse knob tension is pre-set in the factory.

To modify the tension according to personal's needs, rotate the ring ② using the provided tool (Fig. 6).

Clockwise rotation increases the tension.

If the tension is too loose, the stage could go lower by itself or the focus easily lost after fine adjustment. In this case, rotate the knob in order to increase the tension.



3. Coarse upper limit knob (Fig. 7)

The upper limit knob has two functions: prevent the contact between slide and objective and acts as "focus memory".

After focussing the specimen, rotate the knob ③ and lock it. In this way the focus upper limit is set. Now one can lower the stage with coarse focus knob, replace the specimen and raise again the stage up to the upper limit: specimen will be in approximate focus and will need a fine adjustment to get the proper focus.

Fine focus movement is not affected by the coarse focus lock.

▶ To unlock, move the knob in the opposite direction to the one used for the lock.



4. Stage (Fig. 8)

Stage accepts standard slides 26 x 76 mm, thickness 1,2 mm with coverside 0,17mm. It is possible to place two slides side by side on the stage.

- Open the spring arm of the slide holder ④ and place frontally the slides on the stage.
- Gently release the spring arm of the slide holder.
- ▶ A sudden release of the the spring arm could cause the falling of the slide.



5. Dioptric adjustment (Fig. 9)

1. Look into the right eyepiece with your right eye only, and focus on the specimen.
2. Look into the left eyepiece with your left eye only. If the image is not sharp, use the dioptric adjustment ring ① to compensate. (Fig.9)

- ▶ **The adjustment range is ± 5 diopter. The number indicated on the adjustment ring graduation should correspond to the operator's dioptric correction.**



Fig.9

6. Adjusting the interpupillary distance (Fig. 10)

Observing with both eyes, hold the two eyepiece prism assemblies. Rotate them around their common axis until the fields of view coincide.

- ▶ **The graduation on the interpupillary distance indicator ②, pointed by the spot “.” on the eyepiece holder, shows the distance between the operator's eyes. (Fig.10)**

The range of the interpupillary distance is 48-75mm.



Fig.10

7. Use of eye shields (Fig.11-12)

- **Use without eyeglasses**
Raise eye shields and observe at the microscope placing eyes to the shields, avoiding external light to disturb the observation.
- **Use with eyeglasses**
Fold rubber eyeshields with both hands. Folded eyeshields avoid scratching the lenses of eyeglasses.



Fig.11



Fig.12

8. Centering the condenser (Fig.13)

1. Place the specimen on the stage, insert 10x objective into the light path and focus.
2. Insert the front lens of the swing-out condenser ①.
3. Rotate the field diaphragm ring ② in the direction showed by the arrow, to fully close the diaphragm.
4. Rotate the condenser height adjustment knob ③ to focus the edges of the diaphragm.
5. Rotate the two centering screws ④ to bring the bright spot in the center of the field of view.
6. Gradually open the diaphragm. The condenser is centered when the diaphragm image is symmetrical to the field of view.
7. In normal use, open the diaphragm until it circoscribes the field of view.

Effects of the field diaphragm

Field diaphragm adjusts the illuminated area to obtain a high contrast image. Set the diaphragm according to the objective in use until it circoscribes the field of view, in order to eliminate unnecessary light to eyepieces.

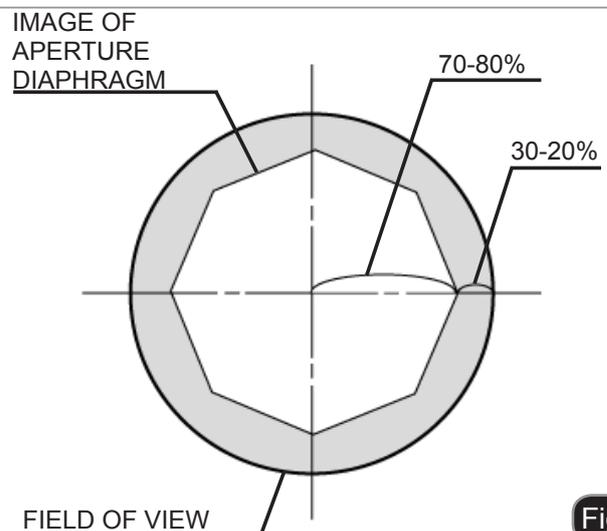
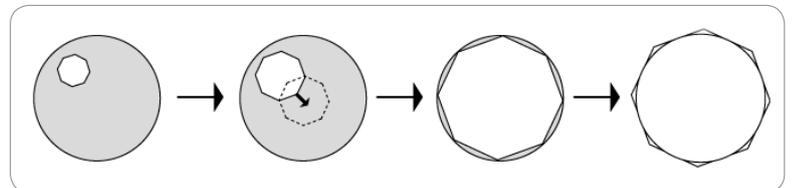
Aperture diaphragm (Fig. 14)

- The Numerical Aperture (N.A.) value of the aperture diaphragm affects the image contrast. Increasing or reducing this value one can vary resolution, contrast and depth of focus of the image.
- With low contrast specimens set the numerical aperture value ① (printed on the condenser ring) to about 70%-80% of the objective's N.A. If necessary, remove on eyepiece and, looking into empty sleeve, adjust the condenser's ring in order to obtain an image like the one in fig. 15.

Example: with objective PLAN 40x / 0,65 set the scale to $0.65 \times 0.8 = 0,52$



CENTERING THE CONDENSER



11. Darkfield microscopy

B-5100DK is a darkfield system specific for blood analysis with a 1.36 - 1.25 N.A. special extra efficient darkfield condenser and a 100X plan-achromatic objective with adjustable iris diaphragm.

The X-LED illumination ensures the high level of light intensity typically needed in high magnification darkfield techniques.

In order to correctly use this microscope, one has to gain some familiarity with:

- a) oil immersion technique
- b) darkfield technique.

In the following manual we present the basics of these methods (chapters 11.1 and 11.2) and then we give a step-by-step guide to configuration of B-5100DK (chapter 11.3).

General tips for immersion microscopy are also given (chapter 5).

11.1 Principles of oil immersion microscopy

The ability of a microscope objective to capture deviated light rays from a specimen is dependent upon both the numerical aperture and the medium through which the light travels.

An objective's numerical aperture is directly proportional to the refractive index of the imaging medium between the coverslip and the front lens, and also to the sin of one-half the angular aperture of the objective.

Because sin cannot be greater than 90 degrees, the maximum possible numerical aperture is determined by the refractive index of the immersion medium.

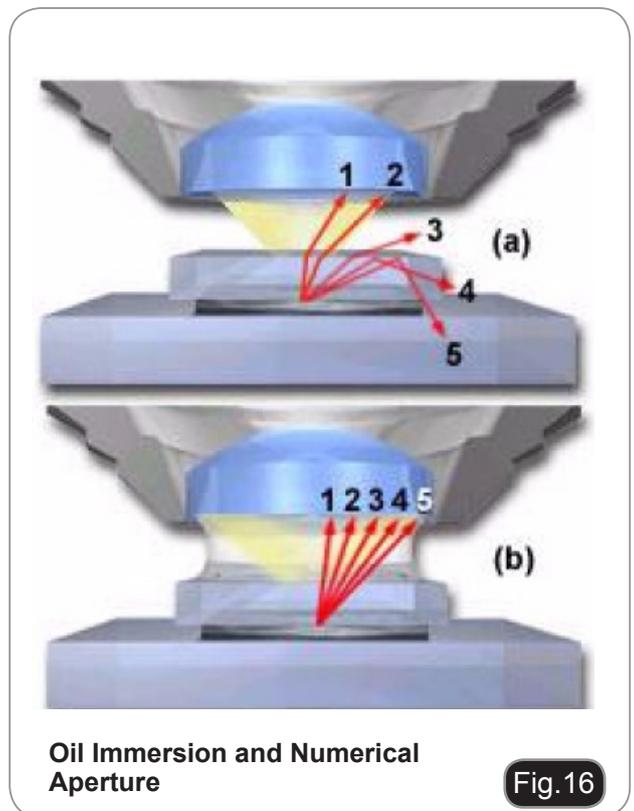
Most microscope objectives use air as the medium through which light rays must pass between the coverslip protecting the sample and front lens of the objective. Objectives of this type are referred to as dry objectives because they are used without liquid imaging media.

Air has a refractive index of 1.0003, very close to that of a vacuum and considerably lower than most liquids, including water ($n = 1.33$), glycerin ($n = 1.470$) and common microscope immersion oils (average $n = 1.515$).

In practice, the maximum numerical aperture of a dry objective system is limited to 0.95, and greater values can only be achieved using optics designed for immersion media.

The principle of oil immersion is demonstrated in Figure 16 where individual light rays are traced through the specimen and either pass into the objective or are refracted in other directions. Figure 16 (a) illustrates the case of a dry objective with five rays (labeled 1 through 5) shown passing through a sample that is covered with a coverslip. These rays are refracted at the coverslip-air interface and only the two rays closest to the optical axis (rays 1 and 2) of the microscope have the appropriate angle to enter the objective front lens. The third ray is refracted at an angle of about 30 degrees to the coverslip and does not enter the objective. The last two rays (4 and 5) are internally reflected back through the coverslip and, along with the third ray, contribute to internal reflections of light at glass surfaces that tend to degrade image resolution. When air is replaced by oil of the same refractive index as glass, shown in Figure 16(b), the light rays now pass straight through the glass-oil interface without deviation due to refraction. The numerical aperture is thus increased by the factor of n , the refractive index of oil.

Microscope objectives designed for use with immersion oil have a number of advantages over those that are used dry. Immersion objectives are typically of higher correction (either fluorite or apochromatic) and can have working numerical apertures up to 1.40 when used with immersion oil having the proper dispersion and viscosity. These objectives allow the substage condenser diaphragm to be opened to a greater degree, thus extending the illumination of the specimen and taking advantage of the increased numerical aperture.



A factor that is commonly overlooked when using oil immersion objectives of increased numerical aperture is limitations placed on the system by the substage condenser.

In a situation where an oil objective of $NA = 1.40$ is being used to image a specimen with a substage condenser of smaller numerical aperture (1.0 for example), the lower numerical aperture of the condenser overrides that of the objective and the total NA of the system is limited to 1.0, the numerical aperture of the condenser.

Modern substage condensers often have a high degree of correction with numerical aperture values ranging between 1.0 and 1.40. In order to effectively utilize all the benefits of oil immersion, the interface between the substage condenser front lens and the underside of the microscope slide containing the specimen should be also be immersed in oil. An ideal system is schematically diagramed in Figure 2, where immersion oil has been placed at the interfaces between the objective front lens and the specimen slide and also between the front lens of the condenser and the underside of the specimen slide.

This system has been termed a Homogeneous Immersion System and it is the ideal situation to achieve maximum numerical aperture and resolution in an optical microscope.

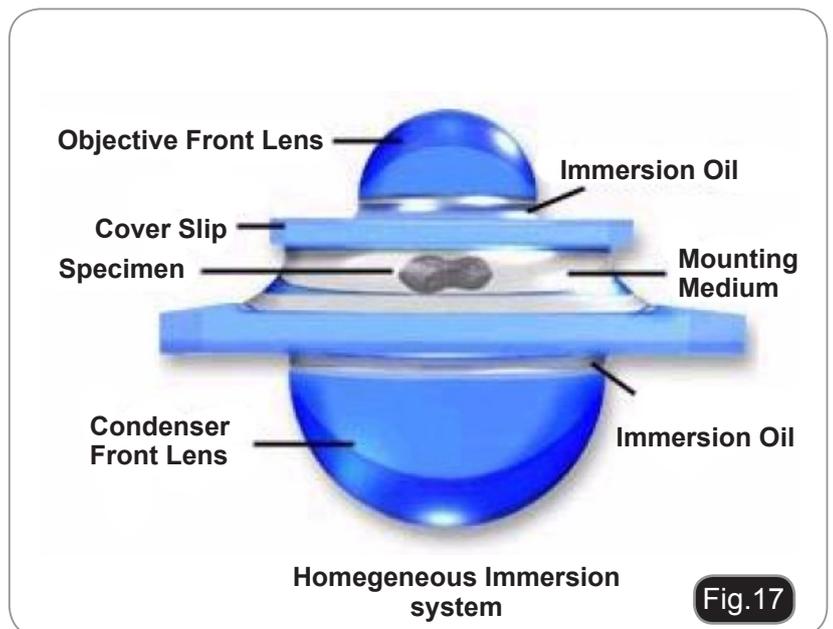
In this case, the refractive index and dispersion of the objective front lens, immersion oil, substage condenser front lens, and the mounting medium are equal or very near equal.

In this ideal system, an oblique light ray can pass through the condenser lens and completely through the microscope slide, immersion oil, and mounting medium undeviated by refraction at oil-glass or mounting medium-glass interfaces.

When using high-power achromat oil immersion objectives, it is sometimes permissible to omit the step of oiling the condenser top lens.

This is because the condenser aperture diaphragm must often be reduced with lesser-corrected objectives to eliminate artifacts and provide optimum imaging.

The reduction in diaphragm size reduces the potential increase in numerical aperture (provided by oiling the condenser lens) so the loss in image quality under these conditions is usually negligible.



11.2 Principles of darkfield illumination

Darkfield microscopy is a specialized illumination technique that capitalizes on oblique illumination to enhance contrast in specimens that are not imaged well under normal brightfield illumination conditions.

All of us are quite familiar with the appearance and visibility of stars on a dark night, this despite their enormous distances from the earth. Stars can be seen because of the stark contrast between their faint light and the black sky.

This principle is applied in darkfield (also called darkground) microscopy, a simple and popular method for making unstained objects clearly visible. Such objects often have refractive indices very close in value to that of their surroundings and are difficult to image in conventional brightfield microscopy. For instance, many small aquatic organisms have a refractive index ranging from 1.2 to 1.4, resulting in a negligible optical difference from the surrounding aqueous medium. These are ideal candidates for darkfield illumination.

Darkfield illumination requires blocking out of the central light which ordinarily passes through and around (surrounding) the specimen, allowing only oblique rays from every azimuth to “strike” the specimen mounted on the microscope slide. The top lens of a simple Abbe darkfield condenser is spherically concave, allowing light rays emerging from the surface in all azimuths to form an inverted hollow cone of light with an apex centered in the specimen plane. If no specimen is present and the numerical aperture of the condenser is greater than that of the objective, the oblique rays cross and all such rays will miss entering the objective because of their obliquity. The field of view will appear dark.

The darkfield condenser/objective pair illustrated in Figure 18 is a high-numerical aperture arrangement that represents darkfield microscopy in its most sophisticated configuration, which will be discussed in detail below. The objective contains an internal iris diaphragm that serves to reduce the numerical aperture of the objective to a value below that of the inverted hollow light cone emitted by the condenser. The cardioid condenser is a reflecting darkfield design that relies on internal mirrors to project an aberration-free cone of light onto the specimen plane.

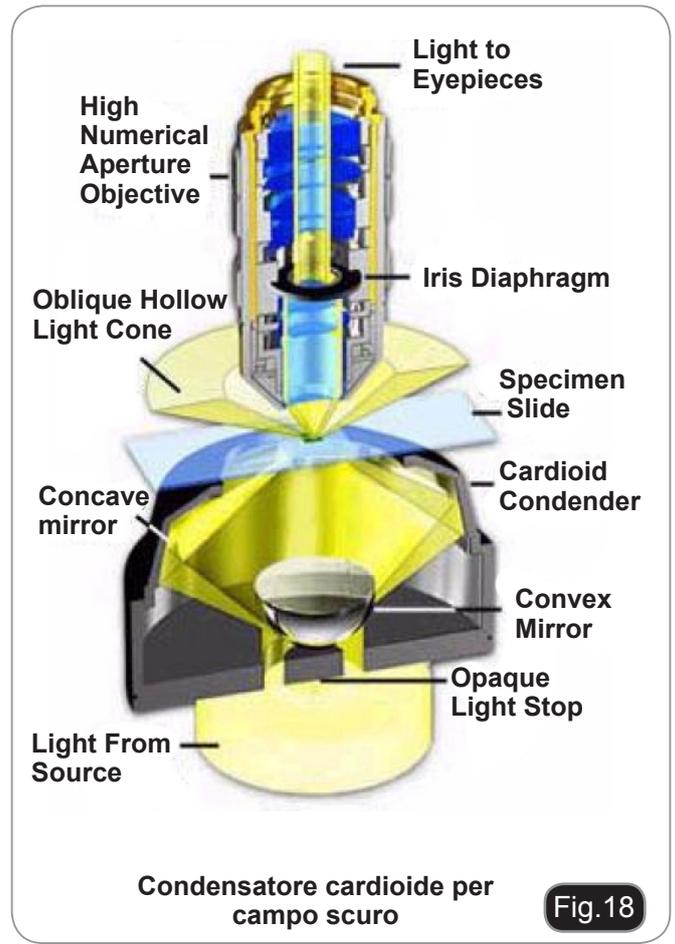
When a specimen is placed on the slide, especially an unstained, non-light absorbing specimen, the oblique rays cross the specimen and are diffracted, reflected, and/or refracted by optical discontinuities (such as the cell membrane, nucleus, and internal organelles) allowing these faint rays to enter the objective. The specimen can then be seen bright on an otherwise black background. In terms of Fourier optics, darkfield illumination removes the zeroth order (unscattered light) from the diffraction pattern formed at the rear focal plane of the objective. This results in an image formed exclusively from higher order diffraction intensities scattered by the specimen.

Ideal candidates for darkfield illumination include minute living aquatic organisms, diatoms, small insects, bone, fibers, hair, unstained bacteria, yeast, and protozoa.

Non-biological specimens include mineral and chemical crystals, colloidal particles, dust-count specimens, and thin sections of polymers and ceramics containing small inclusions, porosity differences, or refractive index gradients.

Care should be taken when preparing specimens for darkfield microscopy because features that lie above and below the plane of focus can also scatter light and contribute to image degradation.

Specimen thickness and microscope slide thickness are also very important and, in general, a thin specimen is desirable to eliminate the possibility of diffraction artifacts that can interfere with image formation.



11.3 High magnification darkfield microscopy

For more precise work and blacker backgrounds, you may choose a condenser designed especially for darkfield, i.e. to transmit only oblique rays. There are several varieties: “dry” darkfield condensers with air between the top of the condenser and the underside of the slide—and immersion darkfield condensers which require the use of a drop of immersion oil (some are designed to use water instead) establishing contact between the top of the condenser and the underside of the specimen slide. The immersion darkfield condenser has internal mirrored surfaces and passes rays of great obliquity and free of chromatic aberration, producing the best results and blackest background.

Perhaps the most widely used darkfield condenser is the paraboloid, consisting of a solid piece of glass ground very accurately into the shape of a paraboloid.

As discussed above, the dry darkfield condenser is useful for objectives with numerical apertures below 0.75, while the paraboloid and cardioid immersion condensers (Figure 18) can be used with objectives of very high numerical aperture (up to 1.4). Objectives with a numerical aperture above 1.2 will require some reduction of their working aperture since their maximum numerical aperture may exceed the numerical aperture of the condenser, thus allowing direct light to enter the objective.

For this reason, many high numerical aperture objectives designed for use with darkfield as well as brightfield illumination are made with a built-in adjustable iris diaphragm that acts as an aperture stop.

This reduction in numerical aperture also limits the resolving power of the objective as well as the intensity of light in the image. Specialized objectives designed exclusively for darkfield work are produced with a maximum numerical aperture close to the lower limit of the numerical aperture of the darkfield condenser. They do not have internal iris diaphragms, however the lens mount diameters are adjusted so at least one internal lens has the optimum diameter to perform as an aperture stop.

The cardioid condenser is very sensitive to alignment and must be carefully positioned to take advantage of the very sharp cone of illumination, making it the most difficult darkfield condenser to use. In addition, the condenser produces a significant amount of glare, even from the most minute dust particles, and the short focal length may result in poor illumination on objects that exceed a few microns in size or thickness. When choosing microscope slides for quantitative high-magnification darkfield microscopy, make certain to select slides made from a glass mixture that is free of fluorescent impurities.

Careful attention should be paid to the details of oiling a high numerical aperture condenser to the bottom of the specimen slide. It is very difficult to avoid introduction of tiny air bubbles into the area between the condenser top lens and the bottom of the microscope slide, and this technique should be practiced to perfection. Air bubbles will cause image flare and distortion, leading to a loss of contrast and overall image degradation.

Problems are also encountered when using microscope slides that are either too thick or too thin. Many darkfield condensers contain the range of usable slide thickness inscribed directly on the condenser mount. If the slide is too thick, it is often difficult to focus the condenser without resorting to a higher viscosity immersion oil. On the other hand, slides that are too thin have a tendency to break the oil bond between the condenser and the slide. It is a good idea to purchase precision microscope slides of the correct thickness to avoid any of the problems mentioned above.

High numerical aperture condensers, whether intended for use dry or with oil, must be accurately centered in the optical path of the microscope to realize optimum performance.

To achieve this, many darkfield condensers are built with a small circle engraved onto the upper surface to aid in centering the condenser. Centering is performed with a low power (10x-20x) objective by imaging the engraved circle and using the condenser centering screws to ensure the circle (and condenser) are correctly centered in the optical path.

1. Centering of darkfield condenser

1. Select a darkfield specimen and place it onto the microscope stage between the objective and the condenser, insert 10x objective in the light path and focus the specimen.

► **The condenser will project a spot of light onto the sample that can be used for centering the optical path..**

2. Use the condenser centering screws to move the ring of light into the center of the field of view ①. (Fig.19)

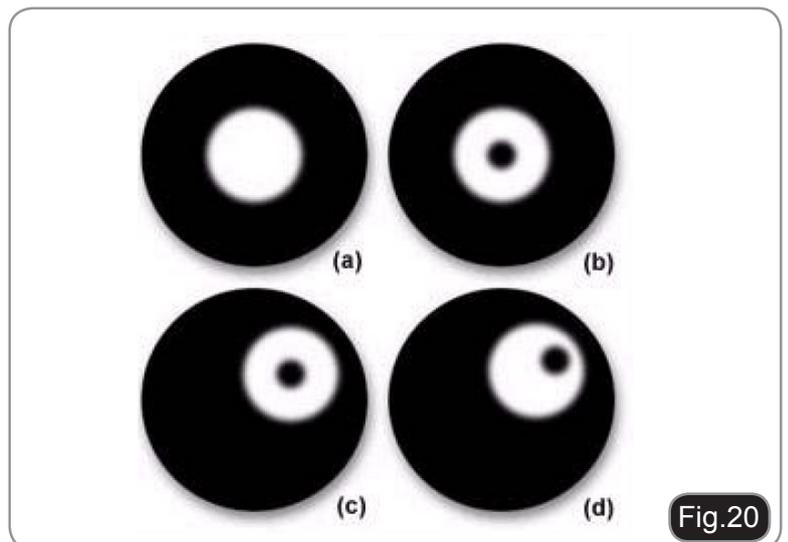
► **It could be useful to vary the height of the condenser in order to view the spot.**

► **It is often advantageous to use a low power 10x objective when centering high numerical aperture darkfield condensers.**

► **When viewing a specimen with the 10x objective while slowly raising and lowering the condenser, a point will be reached where a bright spot will appear in the field of view as illustrated in Fig. 20 (a). As the condenser is slightly raised or lowered, a dark spot similar to the one shown in Fig. 20 (b), if the condenser is properly centered. In cases where the condenser is not properly aligned and centered, a typical field of view might look like that shown in Fig. 20(c) and (d). The ideal and correct positioning of the condenser is illustrated in Fig. 20(a), and the condenser should be adjusted until the field of view appears in this manner, with the condenser centering screws.**

3. Remove the slide and put a drop of oil (provided) on the condenser front lens. (Fig. 21)

► **Make sure there are no air bubbles. Air bubbles in the oil damage the quality of the image.**



4. Reposition the slide and raise the condenser until the oil on the lens of the condenser is in contact with the slide.

5. Move the area to be observed at the center of the optical path using a low magnification objective (10x or 40x).

6. Focus the specimen.

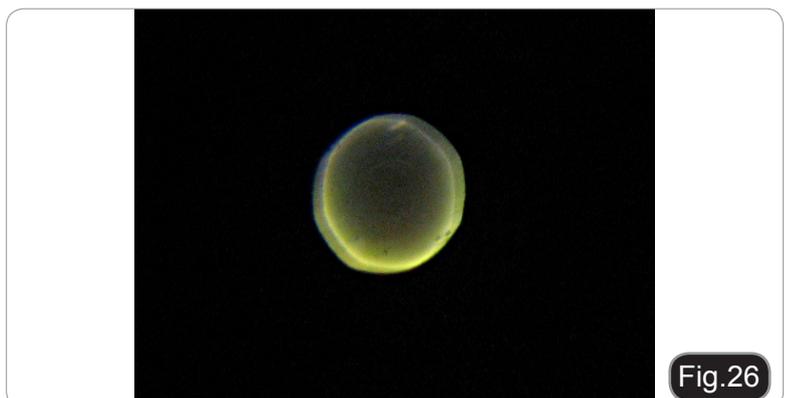
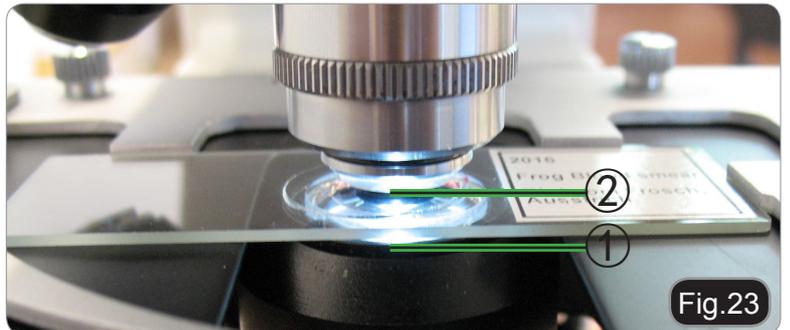
7. Insert in the light path 100X oil/Iris objective. This pre-positions all system components in preparation for adding oil. Move the immersion objective to an adjacent position of the nosepiece and apply the oil to the sample.. (Fig. 22)

8. Actually, the situation must be in which the slide is completely immersed in oil both in the lower part (condenser-glass interface) ①, and in the upper part (glass-lens interface) ②. (Fig. 23)

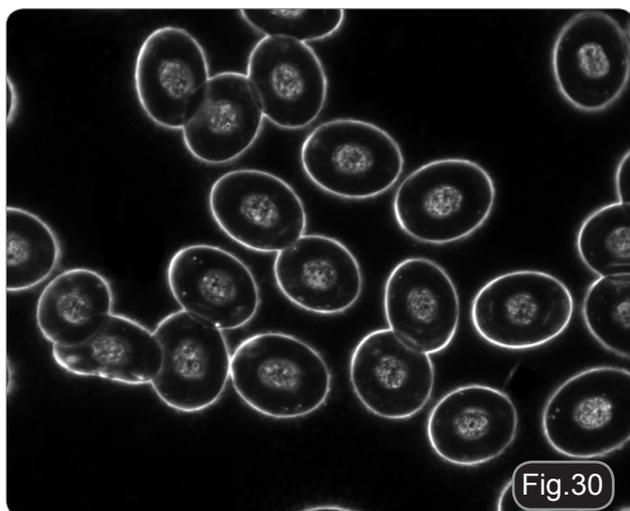
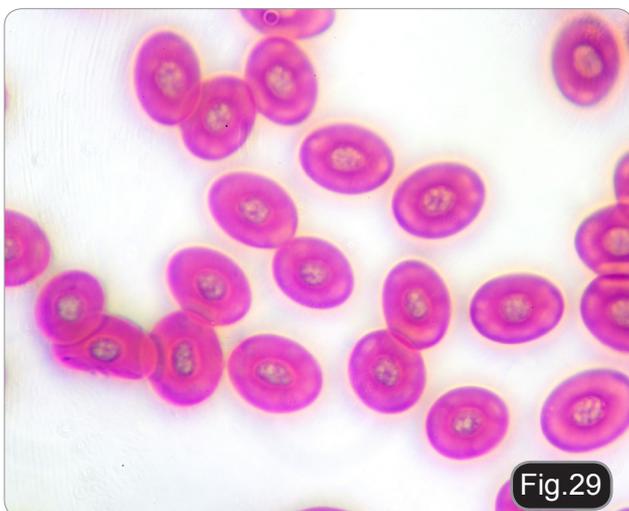
9. Remove one eyepiece and insert the centering telescope in the empty eyepiece sleeve. (Fig.24)

10. Rotating the upper part of the centering telescope focus the image of the light ring visible in the periphery of the field of view. (Fig.25)

► If the condenser is not perfectly centered or if the condenser is not at the exact height (too high or too low), the projected image will be similar to the one in Fig. 26.



11. Fine adjust the condenser centering using the condenser height adjustment knob, on the condenser ① and LED ② centering screws. (Fig.27)
12. After properly setting the condenser, remove the centering telescope and insert again the eyepiece. Now begin the observation.
13. 100x objective has in internal iris diaphragm that allows the adjustment of the numerical aperture. Rotate the diaphragm to close the iris. (Fig.28)
14. The effect one will obtain switching from a fully opened iris (brightfield observation) to a fully closed iris (darkfield observation) is showed in Fig. 29 and 30.



11. Microphotography

Installing the C-mount adapter

1. Loosen the clamping screw ① on the trinocular port and remove the dust cap ②. (Fig.27)
2. Screw the C-mount adapter ③ to the camera ④ and insert the round dovetail of the C-mount into the empty hole of the trinocular port, then tighten the clamping screw ①. (Fig.28)



Use of Reflex camera

1. Insert the Reflex adapter ① into the relay tube to the microscope ②.
 2. Screw the "T2" ring ③ (not provided) to the reflex adapter.
 3. Connect the Reflex camera ④ to the "T2" just installed (Fig. 29).
 - "T2" ring is not provided along with the microscope, but is commercially available.
 - While shooting dark specimens, darken eyepieces and viewfinder with a dark cloth to minimize the diffused light.
 - To calculate the magnification of the camera: objective magnification * camera magnification * lens magnification.
- **If using an SLR camera, mirror movement may cause the camera to vibrate.**
We suggest lifting the mirror, using long exposure times and a remote cord.



17. Maintenance

Microscopy environment

This microscope is recommended to be used in a clean, dry and shock free environment with a temperature of 5°-40°C and a maximum relative humidity of 75 % (non condensing). Use a dehumidifier if needed.

To think about when and after using the microscope



- The microscope should always be kept vertically when moving it and be careful so that no moving parts, such as the eyepieces, fall out.
- Never mishandle or impose unnecessary force on the microscope.
- Never attempt to service the microscope yourself.
- After use, turn off the light immediately, cover the microscope with the included dust-cover, and keep it in a dry and clean place.

Electrical safety precautions



- Before plugging in the power supply, make sure that the supplying voltage of your region matches with the operation voltage of the equipment and that the lamp switch is in off-position.
- Users should observe all safety regulations of the region. The equipment has acquired the CE safety label. However, users do have full responsibility to use this equipment safely.

Cleaning the optics

- If the optical parts need to be cleaned try first to: use compressed air.
- If that is not sufficient: use a soft lint-free piece of cloth with water and a mild detergent.
- And as a final option: use the piece of cloth moistened with a 3:7 mixture of ethanol and ether.
Note: ethanol and ether are highly flammable liquids. Do not use them near a heat source, near sparks or near electric equipment. Use these chemicals in a well ventilated room.
- Remember to never wipe the surface of any optical items with your hands. Fingerprints can damage the optics.
- Do not disassemble objectives or eyepieces in attempt to clean them.

For the best results, use the OPTIKA cleaning kit (see catalogue).

If you need to send the microscope to Optika for maintenance, please use the original packaging.

18. Troubleshooting

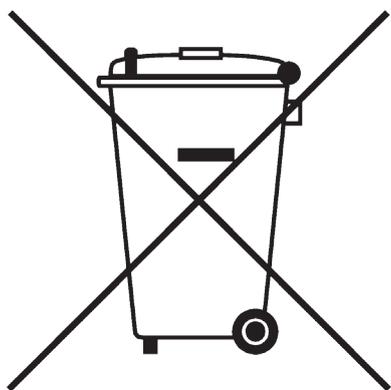
Review the information in the table below to troubleshoot operating problems.

PROBLEM	CAUSE	SOLUTION
I. Optical Section:		
LED operates, but field of view remains dark.	Power supply is unplugged.	Connect
	Brightness is too low	Set brightness to a proper level
Field of view is obscured or not evenly illuminated	Revolving nosepiece is not correctly engaged.	Make sure that the revolving nosepiece clicks properly into place.
	The turret of the phase contrast condenser is in an incorrect position	Move the turret to a click stop
Dirt or dust is visible in the field of view.	Dirt/dust on the specimen	Clean the specimen
	Dirt/dust on the eyepieces	Clean the eyepieces
Image looks double	Aperture iris diaphragm is stopped down too far.	Open aperture iris diaphragm.
	The condenser is not well centered or it is in a wrong height	Set the condenser according to Koehler settings.
Visibility is poor. · Image is not poor. · Contrast is poor. · Details are indistinct. · Image glares	Revolving nosepiece is in an incorrect position	Move the nosepiece to a click stop
	Aperture iris diaphragm is too closed or too open.	Adjust aperture iris diaphragm.
	Dust or dirt on lenses (condenser, objectives, eyepieces and slide)	Clean thoroughly.
	For transmitted light observation, the coverglass thickness must not exceed 0.17mm	Use a coverglass with thickness 0.17mm
	For phase contrast observation, a brightfield objective is used instead a phase contrast one	Use a phase contrast objective
	Phase rings of objective and condenser are not well centered	Operate on centering screws
	Objective in use is not compatible with condenser phase ring	Use a compatible objective
	Focus is not even	Slide holder is not flat. Move the specimen to a flat position.
One side of the image is unfocused	Revolving nosepiece is in an incorrect position	Move the nosepiece to a click stop
	Slide is mounted not in a flat position (tilted)	Place the specimen in a flat position on the stage
	Poor quality of the glass slide	Use a glass slide with higher quality

II. Mechanical Section:		
Coarse focus knob is hard to turn	Tension adjustment ring is too tight	Loosen tension adjustment ring
Focus is unstable	Tension adjustment ring is too loose	Tighten tension adjustment ring
III. Electrical Section		
LED doesn't turn on.	Power supply not connected	Check for proper connection
Brightness is not enough	Brightness setting is too low	Adjust brightness
Light blinks	Power supply not well connected	Check for proper connection
IV. Observation tube		
Field of view of one eye does not match that of the other.	Interpupillary distance is incorrect.	Adjust interpupillary distance.
	Incorrect diopter adjustment.	Adjust diopter.
	Your view is not accustomed to microscope observation.	Upon looking into eyepieces, try looking at overall field before concentrating on specimen range. You may also find it helpful to look up and into distance for a moment before looking back into microscope.
V. Microphotography		
Image edge is unfocused	To a certain extent it is due to achromatic objectives features	To minimize the problem, set the aperture diaphragm in a proper position
Bright spots appear on the image	Stray light entering in the microscope through eyepieces or camera viewfinder	Cover eyepieces and viewfinder with a dark cloth

Equipment disposal

Art.13 Dlsg 25 July 2005 N°151. "According to directives 2002/95/EC, 2002/96/EC and 2003/108/EC relating to the reduction in the use of hazardous substances in electrical and electronic equipment and waste disposal."



The basket symbol on equipment or on its box indicates that the product at the end of its useful life should be collected separately from other waste.

The separate collection of this equipment at the end of its lifetime is organized and managed by the producer. The user will have to contact the manufacturer and follow the rules that he adopted for end-of-life equipment collection.

The collection of the equipment for recycling, treatment and environmentally compatible disposal, helps to prevent possible adverse effects on the environment and health and promotes reuse and/or recycling of materials of the equipment.

Improper disposal of the product involves the application of administrative penalties as provided by the laws in force.

OPTIKA® S.r.l.

Via Rigla, 30 - 24010 Ponteranica (BG) - ITALIA Tel.: +39 035.571.392 - Fax: +39 035.571.435
info@optikamicroscopes.com - www.optikamicroscopes.com

OPTIKA® Spain

spain@optikamicroscopes.com

OPTIKA® USA

usa@optikamicroscopes.com

OPTIKA® China

china@optikamicroscopes.com

OPTIKA® Hungary

hungary@optikamicroscopes.com

OPTIKA® India

india@optikamicroscopes.com
