



UNI WERSYTET OPOLSKI
WYDZIAŁ PRZYRODNICZO-TECHNICZNY
Samodzielna Katedra Biosystematyki

Zakład Biologii Roślin

PRACA MAGISTERSKA

Jan Marcinkiewicz

**OBRAZOWANIE OBIEKTÓW BIOLOGICZNYCH W MIKROSKOPII
OPTYCZNEJ ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM PREPARATÓW
ANATOMICZNYCH ROŚLIN NACZYNIOWYCH.**

**IMAGING OF BIOLOGICAL OBJECTS IN OPTICAL MICROSCOPY
WITH PARTICULAR CONSIDERATION OF ANATOMICAL SECTIONS OF
VASCULAR PLANTS.**

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Wiesław Włoch

Opole 2015

Składam serdeczne podziękowania dla mojego promotora, Prof. dr hab. Wiesława Włocha,
za wyrozumiałość i pomoc okazane podczas realizacji tej pracy.

Spis treści:

1. Wstęp.....	3
1.1. Aparaty fotograficzne i dedykowane kamery mikroskopowe.....	3
1.1.1. Rozmiar matrycy.....	3
1.1.2. Kontrola ekspozycji i format RAW.....	4
1.1.3. Praca w terenie.....	4
1.1.4. Lampa błyskowa.....	4
1.2. Połączenie aparatu fotograficznego z mikroskopem.....	5
1.2.1. Aparat z wymiennymi obiektywami.....	7
1.2.2. Aparaty stało-obiektywowe.....	7
1.2.3. Aparaty telefonów komórkowych.....	8
1.3. Istotne części aparatu i mikroskopu, źródła potencjalnych drgań.....	9
1.3.1. Lustro.....	9
1.3.2. Wziernik.....	10
1.3.3. Migawka.....	10
1.3.4. Live view.....	10
1.4. Cel pracy.....	11
1.5. Słowa kluczowe, Key words.....	11
2. Materiały i metody.....	13
2.1. Mikroskopy.....	13
2.2. Aparaty fotograficzne i lampy błyskowe.....	13
2.3. Podłączenie aparatów i lamp do mikroskopów.....	13
2.4. Oprogramowanie.....	14
2.5. Preparaty.....	14
3. Wyniki i dyskusja.....	15
3.1. Pole widzenia.....	15
3.2. Histogram w mikrofotografii.....	17
3.3. Przysłony.....	23
3.3.1. Przysłona polowa.....	23
3.3.2. Przysłona aperturowa kondensora.....	25
3.3.3. Przysłona aperturowa obiektywu.....	27
3.3.4. Wpływ przysłony na wygląd histogramu.....	27
3.4. Dobór czasu.....	29
3.4.1. Czas ekspozycji i drgania.....	29
3.4.2. Ruchy obiektu.....	31
3.4.3. Kompozycje o rozszerzonych rozpiętościach tonalnych.....	32
3.4.4. Wpływ czasu otwarcia migawki na histogram.....	33
3.5. Światłoczułość ISO.....	35
3.6. Balans bieli.....	37
3.7. Format zapisu zdjęcia.....	39
3.8. Lampa błyskowa.....	41
3.9. Procedura wykonywania fotografii.....	44
3.9.1. Fotografia w jasnym polu.....	47
3.9.2. Fotografia w ciemnym polu.....	48
3.9.3. Fotografia w oświetleniu skośnym.....	49
3.9.4. Fotografia w kontraście fazowym.....	50
3.9.5. Fotografia w świetle spolaryzowanym.....	51
3.9.6. Fotografia w kontraście dyferencjalno-interferencyjnym DIC.....	53

3.9.7. Fotografia we fluorescencji.....	55
3.9.8. Fotografia we fluorescencji z KF/DIC.....	56
3.10. Komputerowe wywoływanie fotografii.....	58
3.10.1. Kadrowanie.....	58
3.10.2. Korekcja histogramu.....	59
3.10.3. Odszumianie.....	60
3.10.4. Wyostanie.....	61
3.10.5. Usuwanie aberracji chromatycznej i winety.....	61
3.10.6. Konwersja do formatu TIFF/JPEG i normalizacja fotografii.....	63
3.11. Stereopary.....	64
3.12. Panoramy.....	66
3.13.1. Stosy.....	67
3.13.2. Stosy panoramiczne.....	70
3.13.3. Projekcje 3D.....	71
3.14.1. Nagrywanie filmów.....	74
3.14.2. Tworzenie filmów poklatkowych.....	74
4.1 Podsumowanie.....	75
4.2 Summary.....	76
5. Literatura.....	77

1. WSTĘP.

Obrazowanie mikroskopowe w naukach biologicznych stanowi jeden z podstawowych elementów pracy naukowej z wykorzystaniem mikroskopu optycznego. Fotografie, grafiki i filmy, są prezentowane jako dowód na wystąpienie zjawiska, oraz materiał pomocniczy przy analizie problemów. Jak przedstawiono w [2] (Kenneth R. Spring, Michael W. Davidson, 2012), do celów dokumentacji, wykorzystuje się matryce światłoczułe CCD lub CMOS. Wszystkie znane autorowi metody cyfrowego obrazowania opierają się na wykorzystaniu tych matryc lub urządzeń skanujących i detektorów punktowych w postaci fotopowielaczy, fotodiod i podobnych. W związku z wysokim skomplikowaniem i kosztownością urządzeń skanujących oraz stosunkowo niskimi wymogami rozdzielczości, we wszelkich metodach obrazowania mikroskopowego, wystarczającym sposobem jest wykorzystanie matryc światłoczułych.

1.1. Aparaty fotograficzne i dedykowane kamery mikroskopowe.

Niestety rozwiązania komercyjne, pomimo tej samej zasady działania co aparaty fotograficzne, często nie oferują wymaganej jakości lub są zbyt kosztowne. Możliwe jest przystosowanie konsumenckich aparatów fotograficznych do pracy z mikroskopem, poprzez dosztukowanie tubusu prostego o odpowiedniej długości, lub z wykorzystaniem mieszka i statywu. Efekt tego rozwiązanie przewyższa jakością większość rozwiązań komercyjnych, a jednocześnie jest tani i prosty do osiągnięcia. Sposób ten, obejmuje wymogi wszelkich technik kontrastowania w mikroskopii optycznej, w których zastosowanie znajdują produkty komercyjne, dedykowane dla mikroskopów.

1.1.1. Rozmiar matrycy.

Tendencja do produkcji kamer mikroskopowych o małych rozmiarach matrycy powoduje, że zazwyczaj konieczne jest stosowanie dodatkowej optyki kompensującej, a pole widzenia obejmowane na zdjęciu, jest nieadekwatne. Aparaty fotograficzne produkowane są w rozmiarach pełnej klatki, APS-C lub 4/3. Formaty te gwarantują objęcie użytecznego pola widzenia generowanego przez obiektyw mikroskopu bez konieczności stosowania jakiegokolwiek dodatkowej optyki pośredniej. Należy pamiętać, że jedynym źródłem powiększenia, odpowiadającym za zdolność rozdzielczą jest obiektyw, a każdy kolejny element, może ją jedynie obniżyć, lub zachować na tym samym poziomie. Szumy objawiające się na fotografii w postaci nieadekwatnie

ciemniejszych lub jaśniejszych, losowo rozłożonych pikseli są częstsze na małych matrycach, niż na dużych. Jest to związane z podwyższoną temperaturą matrycy, a łatwiej nagrzewają się te mniejsze, o dużej liczbie pikseli.

1.1.2. Kontrola ekspozycji i format RAW.

Częsty brak formatu RAW oraz manualnej kontroli nad kadrem w dedykowanych kamerach mikroskopowych, są efektem uproszczenia funkcjonowania tych urządzeń. Format RAW jest w nich usuwany tuż po przetworzeniu informacji z matrycy na format zdjęcia TIFF/JPEG a oprogramowanie zostało pozbawione możliwości manualnej ingerencji użytkownika dla obniżenia kosztów produkcji lub dalszego uproszczenia funkcjonowania urządzenia. Aparaty fotograficzne pozwalają zarówno na wybór metod uproszczonych oraz bardziej zaawansowanych.

1.1.3. Praca w terenie.

Aparaty fotograficzne nie wymagają żadnego dodatkowego przetwornika w postaci komputera lub dekodera, ani nawet monitora, ze względu na coraz bardziej popularną funkcję „Live view”. W związku z tym możliwe jest ich użycie na mikroskopach terenowych, z późniejszą analizą fotografii w laboratorium. Jeśli aparat jest wyposażony w urządzenie WI-FI, możliwe jest podłączenie z tabletem lub telefonem systemu android. Takie urządzenie będzie stanowić dodatkowy wyświetlacz "Live view" oraz kontroler parametrów ekspozycji, zastępując wężyk spustowy lub komputer.

1.1.4. Lampa błyskowa.

W przeciwieństwie do kamer mikroskopowych, aparaty fotograficzne mają możliwość podłączenia zewnętrznej lampy błyskowej. W technikach kontrastowania, w których wymagana jest duża ilość światła, a nie jest możliwe dalsze zwiększenie mocy lampy mikroskopowej lub światłoczułości ISO, korzystne jest zastosowanie lampy błyskowej. W krótkim czasie wytwarza ona silny strumień światła o korzystnym spektrum. Zazwyczaj stosowane są palniki ksenonowe, których emisja obejmuje światło ultrafioletowe, widzialne oraz podczerwone, przy zachowaniu zimnej, białej barwy wypadkowej, oraz płaskim wykresie spektralnym. Jednak w przypadku stosowania lampy w technikach fluorescencyjnych lub fotografii w UV/IR może być niezbędne usunięcie filtra absorpcyjnego na lampie. Użycie lamp diodowych nie jest w mikroskopii uzasadnione, ze względu na tryb ich pracy oraz kompozycję spektrum.

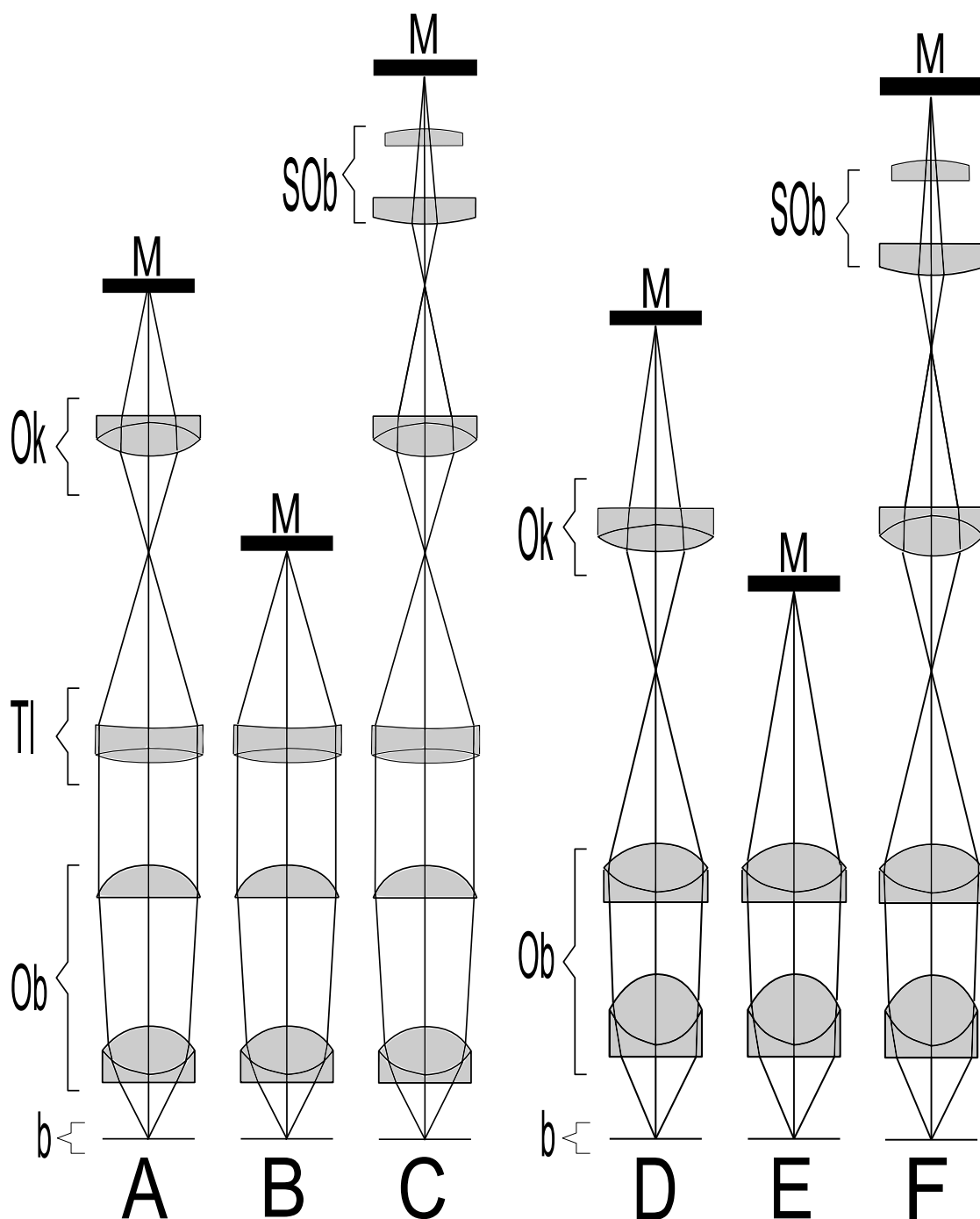
1.2. Połączenie aparatu fotograficznego z mikroskopem.

Aparat fotograficzny może być podłączony do trzeciego toru nasadki trzytorowej, do jednego z torów binokularu, a w przypadku konstrukcji korygowanych na skończoną długość tubusu, także w miejsce nasadki okularowej. Możliwe metody podłączenia aparatu do mikroskopu obrazuje rycina 1.

Mikroskopy systemu na nieskończoną długość tubusu, posiadają pełną korekcję aberracji optycznych w obiektywie i soczewce tubusowej. Dlatego okulary w tych modelach mają za zadanie jedynie powiększenie obrazu i umożliwienie jego rejestracji poprzez oko obserwatora. Gdy pożądané jest dodatkowe powiększenie, możliwe jest zastosowanie okularu projekcyjnego, tal jak obrazuje schemat „A”. W przeciwnym wypadku, wystarczy połączyć aparat tuż za soczewką tubusową „B”. W pierwszym przypadku w lepszym stopniu wykorzystana jest rozdzielczość matrycy, jednak rozdzielczość optyczna pozostaje jednakowa. Ze względu na bardzo duże rozdzielczości matryc aparatów fotograficznych nie ma celu stosowanie okularów projekcyjnych, ponieważ zwykle wycięcie interesującego fragmentu zdjęcia przyniesie identyczny efekt pod względem zdolności rozdzielczej. Jednak jeśli użyty aparat fotograficzny nie posiada możliwości odpięcia obiektywu głównego, niezbędne będzie zastosowanie okularu projekcyjnego „C”.

Mikroskopy systemu na skończoną długość tubusu wymagają dedykowanej optyki projekcyjnej, która koryguje aberracje obiektywów mikroskopowych. W tym wypadku okular, poza standardową funkcją, dodatkowo wprowadza wady odwzorowania obrazu ze znakiem przeciwnym względem wad obiektywu „D”. Wady te wzajemnie się niwelują. Wyjątkiem są obiektywy firmy Nikon z serii CF oraz CFN, w których po raz pierwszy cała korekcja wad odwzorowania, odbywa się w obiektywie „E”. Jeśli jednak użyty aparat nie ma możliwości odpięcia obiektywu głównego, niezbędne jest zastosowanie okularu projekcyjnego „F”.

Połączenie aparatu z mikroskopem stereoskopowym odbywa się identycznie jak z mikroskopem korygowanym na nieskończoność – dla konstrukcji produkowanych po 1990 roku, lub z mikroskopem korygowanym na skończoną długość tubusu – dla mikroskopów produkowanych przed 1990 rokiem. Aparat może być podłączony do jednego z tubusów okularowych lub do portu fotograficznego, jeśli mikroskop stereoskopowy jest w takowy wyposażony.



Rycina 1. Sposoby przystosowania mikroskopu do projekcji lub fotografii

A, B, C - mikroskop korygowany na nieskończoną długość tubusu,

D, E, F - mikroskop korygowany na skończoną długość tubusu.

A, D - z projekcją okularową; B, E - z projekcją bezpośrednią;

C, F - z projekcją poprzez układ optyczny aparatu fotograficznego

b - płaszczyzna przedmiotowa, Ob - obiektyw mikroskopu, Tl - soczewka tubusowa, Ok - okular, SOB - wbudowany obiektyw aparatu fotograficznego, M - płaszczyzna obrazowa (matówka, ekran, matryca)

Źródło: opracowanie własne, na podstawie [4] (M. Pluta, 1982).

1.2.1. Aparat z wymiennymi obiektywami.

Każdy aparat fotograficzny z odłączanym obiektywem nadaje się do adaptacji w celach mikrofotografii, jednak pewne cechy decydują o stopniu łatwości adaptacji oraz jakości odwzorowania.

Ważne jest, aby możliwe było wykonanie fotografii bez podłączonego obiektywu. Większość nowych produktów umożliwia ze swojego menu wybranie takiej opcji, jednak w przypadku gdy nie jest to możliwe, należy pomiędzy adapter a aparat wprowadzić chip naśladujący sygnały elektroniczne dedykowanego obiektywu. Chip taki znajduje się zazwyczaj na adapterze pomiędzy bagnetem aparatu a gwintem standardowym m42. Dodatkową zaletą tego rozwiązania jest możliwość manipulowanie parametrami dotychczas zablokowanymi (np: przysłona aperturowa). Takowy chip wprowadzając do aparatu fałszywe informacje na temat warunków ekspozycji, może posłużyć do np: do zmiany obrazu symulacji ekspozycji wyświetlanego przez aparat względem ekspozycji.

Aparat tego typu łączy się do mikroskopu z wykorzystaniem kilku elementów: adaptera m42-bagnet aparatu, tubusu prostego zakończonego gwintami m42 z obu stron, adaptera m42-szyna nasadki mikroskopowej. Ewentualnie, do tubusu prostego można dodatkowo wprowadzić okular projekcyjny.

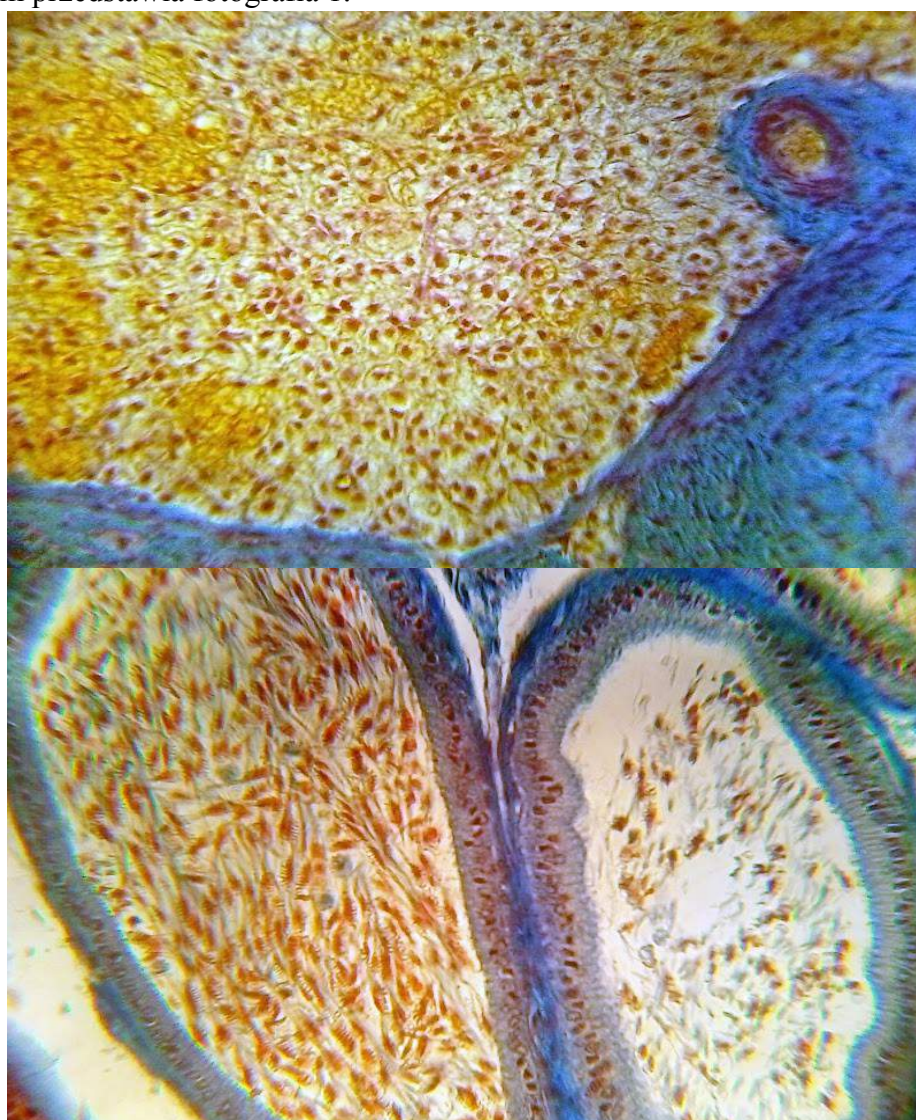
1.2.2. Aparaty stało-obiektywowe.

Aparaty fotograficzne tego typu nadają się do adaptacji w celach mikrofotografii, jednak wyłącznie do dokumentacji poprzez okular projekcyjny. Ze względu na cechy obiektywu głównego mogą wymagać specjalistycznego okularu projekcyjnego, którego koszt wykonania przerasta cenę zakupu nowego aparatu o zmiennych obiektywach. Dlatego też na uznanie zasługują jedynie egzemplarze będące w stanie współpracować ze standardowymi okularami. Trudno jest określić bez próby, czy dany model nadaje się do wykonywania zdjęć w wysokiej jakości. Na ogół, z mikroskopem lepiej współpracują aparaty z obiektywem typu superzoom o możliwie małej soczewce zewnętrznej. Wśród okularów, najlepiej sprawują się szerokopolewe, dostosowane do pracy z okularami korekcyjnymi.

Możliwości montażu takiego typu aparatu są bardzo ograniczone. Uniwersalnym rozwiązaniem będzie montaż na trójnogu z mieszkim fotograficznym lub wykonanie adaptera pomiędzy gwintem gniazda na filtry obiektywu oraz okulem.

1.2.3. Aparaty telefonów komórkowych.

Aparaty tego typu zaliczane są do aparatów stało-obiektywowych i metoda ich podłączenia do mikroskopu jest identyczna. Z reguły na to, że posiadają migawkę elektroniczną i zautomatyzowane tryby pracy, nie oferują jednak równie wysokiej jakości i możliwości manipulacji zdjęciami jak wspomniane powyżej, jednak posiadają wyższą tolerancję na drgania i możliwe jest wykonywanie fotografii aparatem z ręki, poprzez przyłożenie obiektywy aparatu do okulara projekcyjnego. Jest to bardzo szybkie i proste rozwiązanie, które może być zadowalające dla obiektów, które nie wymagają wysokiej rozdzielczości optycznej. Przykładowe zdjęcia wykonane takim sposobem przedstawia fotografia 1.



Fot 1. Fotografie wykonane aparatem fotograficznym telefonu komórkowego. U góry: barwiony preparat ciała żółtego. U dołu: barwiony przekrój przez przewód najądrza. Obiektyw 40x/0.65, Źródło: Opracowanie własne.

1.3. Istotne części aparatu i mikroskopu, źródła potencjalnych drgań.

Wszelki ruch mikroskopu lub aparatu w trakcie naświetlania matrycy, będzie powodował rozmycie uzyskanej ekspozycji, czyli utratę zdolności rozdzielczej oraz zmianę rozmiarów obiektów na fotografii. Nabierają one znaczenia wraz ze wzrostem powiększenia układu mikroskop-aparat. Takie drgania (ruch) mogą być wprowadzone z zewnątrz np: przez przemieszczanie się osób postronnych w bliskiej okolicy mikroskopu, poprzez dotykanie stolika, śrub mikrometrycznych lub innych elementów mikroskopu lub stołu na którym jest ustawiony. Należy unikać powyższych czynności tuż przed wykonaniem ekspozycji. Jeśli środowisko zewnętrzne wprowadza znaczną ilość drgań, można je wyeliminować dzięki zastosowaniu stołu optycznego, antywibracyjnego.

Częstą przyczyną drgań jest również ręczne wciskanie spustu migawki aparatu. Można uniknąć tego problemu poprzez zastosowanie wężyka spustowego lub czasomierza, oraz poprzez kontrolę zdalną. Najnowsze modele aparatów fotograficznych umożliwiają połączenie z pomocą kabla USB lub HDMI oraz bezprzewodowo z pomocą WI-FI. Dzięki tym metodom, możliwa jest kontrola aparatu z pomocą telefonu z systemem android lub tabletu, lub z poziomu komputera.

Drgania mogą być również generowane przez zmotoryzowane elementy mikroskopu takie jak: stół w osiach x, y, z, miska rewolwerowa, kondensor, wieża z kostkami do światła odbitego. Ruchów spowodowanych samą pracą mikroskopu można najskuteczniej uniknąć poprzez wprowadzenie krótkiej przerwy pomiędzy ekspozycją a czynnością wykonaną przez mikroskop. Zazwyczaj jest to uwzględnione przez oprogramowanie sterujące pracą mikroskopu i aparatu, jednak może być to parametr korygowany przez użytkownika.

1.3.1. Lustro.

Dedykowane kamery mikroskopowe są pozbawione lustra, którego brak, jest ich zaletą. W przypadku zastosowanie lustrzanki, niezbędne jest zablokowanie lustra przed wykonaniem ekspozycji, co zapobiegnie wprowadzeniu przez nie drgań. Jeśli aparat nie posiada takiej funkcji, niezbędne jest jego elastyczne połączenie z mikroskopem, z użyciem mieszka. W przypadku aparatów, tak zwanych bezlusterkowców, lustro zostało usunięte, przy zachowaniu pozostałych cech lustrzanki. Równocześnie ze względu na usunięcie komory lustra i części komponentów jej towarzyszących, aparaty te są

zazwyczaj mniejsze i tańsze, przez co ich wybór w celach adaptacji do mikroskopu, jest korzystniejszy.

1.3.2. Wziernik.

Wziernik stanowi pomocne narzędzie w przypadku gdy aparat nie jest połączony z komputerem lub dla precyzyjnego nastawiania ostrości i kontroli parametrów ekspozycji. W przypadku lustrzanek można spotkać się ze wzmiernikami optycznymi i wzmiernikami elektronicznymi. W przypadku aparatów stało-obiektywowych i bezlusterkowców, są to wzmierniki elektroniczne.

Zaletą wzmiernika optycznego, jest jego większa rozdzielczość, jednak utrudniona jest kontrola parametrów ekspozycji, którą trzeba zweryfikować z obrazem "live view". Rozdzielczość wzmierników elektronicznych jest ograniczona liczbą pikseli i czasem może być niewystarczająca dla oceny wszystkich detali, jednak wyświetlany obraz jest rzeczywistym odwzorowaniem parametrów ekspozycji. Dodatkowo we wzmiernikach elektronicznych mogą być wyświetlane elementy pomocnicze, takie jak "zebry" – półprzeźroczyste pasy oznaczające niedoświetlone i prześwietlone elementy fotografii, lub obszary znajdujące się w obrębie głębi ostrości.

1.3.3. Migawka.

Kolejnym potencjalnym źródłem drgań jest migawka. Ruch migawki generuje drgania, które mogą powodować rozmycie detali na fotografii. Dedykowane kamery mikroskopowe są wyposażone w elektroniczną migawkę, dzięki czemu są całkowicie wolne od drgań. Jednak rozwiązanie to nie jest dobre ze względu na kompromis względem jakości obrazu i szybkości pracy który wynika z natury pracy migawki elektronicznej.

Rozwiązanie problemu stanowi technologia hybrydowej migawki, stosowana w większości nowoczesnych aparatów fotograficznych zwana: elektroniczną kurtyną pierwszej migawki EFSC (z *ang. electronic first shutter curtain*). Zazwyczaj jest ona dostępna jako opcja nazywana trybem cichego fotografowania, lub jest włączona domyślnie. W celach mikrofotografii, opcja ta powinna być zawsze włączona.

1.3.4. Live view.

Tryb live view umożliwia wyświetlanie przez aparat podglądu ekspozycji. Może pracować w dwóch trybach. Pierwszy z nich stanowi symulacja ekspozycji, gdzie aparat wyświetla kadr zgodnie z parametrami ekspozycji. Jest używany w celu dobrania

odpowiedniego czasu otwarcia migawki, światłoczułości, i przysłony. Drugi sposób polega na wyświetleniu ekspozycji przez aparat, w najlepszy możliwy sposób, ignorując wprowadzone parametry ekspozycji. Jest on używany w celu prezentacji preparatu na żywo, dla większego grona odbiorców na wyświetlaczu aparatu lub urządzeniu do niego podłączonego np.: telewizorze ,lub komputerze.

1.4. CEL PRACY

Celem pracy jest próba przedstawienia metod obrazowania mikroskopowego w naukach biologicznych przy wykorzystaniu konsumenckich aparatów fotograficznych opartych na matrycach światłoczułych CCD lub CMOS, oraz ich zalet nad rozwiązaniami komercyjnymi, jakie stanowią cyfrowe kamery mikroskopowe, również opartych na tych samych przetwornikach. Dla osiągnięcia celu użyto preparaty biologiczne w postaci: roślinnych preparatów anatomicznych jako serie przekrojów poprzecznych przez kambium, preparaty przeżyciowy fito i zoo planktonu, warstwy kambium ściągane żyłką z zielonych części drzew, liście drzew, wypreparowane stawonogi, grzyby strzępkowe, szlify cienkie z minerałów występujących w skamieniałościach oraz skamieniałości.

1.5. SŁOWA KLUCZOWE Obrazowanie, mikroskopia, mikrofotografia, preparaty anatomiczne roślin naczyniowych.

1.6. KEY WORDS: Imaging, microscopy, photomicrography, anatomical slides of vascular plants.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. Mikroskopy.

Fotografie wykonano na mikroskopach:

- Nikon Microphot SA z episkopowym oświetlaczem fluorescencyjnym i jasnego pola, diaskopowym kontrastem DIC, kontrastem fazowym, jasnym i ciemnym polem oraz polaryzacją. Obiektywy PZO 5x/0.15 i 10x/0.24 i nikon CFN PlanFluor 20x/0.5 i 40x/0.75. Uniwersalny kondensor achromatyczno-aplantyczny 1.4
- Olympus BX40 z jasnym polem, obiektyw UplanSapo 100x/1.40, kondensor Abbego 1.2;
- Delta Optical Genetic Pro Trino z jasnym polem, obiektywy 4x/0.10 10x/0.25, 40x/0.65, kondensor abbego 1.2
- Mikroskop stereoskopowy PZO MST 130 z nasadką do wykonywania stereopar.

2.2. Aparaty fotograficzne i lampy błyskowe.

Wszystkie przedstawione zdjęcia zostały wykonane z użyciem jednego z poniższych aparatów i lamp błyskowych:

- Lustrzanka Canon EOS 1100D
- Bezlusterkowy (z ang. *mirrorless*) Sony ILCE A6000
- Wbudowany aparat fotograficzny telefonu Kazam Trooper X4.5
- Lampa błyskowa Porst MDC 400-2

2.3. Podłączenie aparatów i lamp do mikroskopów.

Aparaty fotograficzne Canon EOS 1100D i Sony ILCE A6000 zostały połączone z mikroskopami Microphot SA, BX40, MST130 z wykorzystaniem dosztukowanego tubusu prostego z metodą projekcji bezpośredniej. Aparat wbudowany telefonu Kazam Trooper X4.5 został wykorzystany na mikroskopie Genetic Pro Trino poprzez umieszczenie go na statywie nad okulem z metodą projekcji okularowej poprzez układ optyczny aparatu. Lampa błyskowa została połączona z układem optycznym mikroskopu Microphot SA, poprzez umieszczenie jej za zmodyfikowanym oświetlaczem halogenowym.

2.4. Oprogramowanie.

Komputerowa obróbka fotografii odbyła się z wykorzystaniem poniższych programów:

- Capture One 8 - do wywoływania fotografii RAW.
- Photoshop CS6 - do składania zdjęć panoramicznych, tworzenia filmu "Time lapse".
- IageJ - do tworzenia stosów, i analizy histogramów.
- FIJI – z wtyczką Volume Viewer do tworzenia i podglądu brył 3D.
- Zerene Stacker - do tworzenia stosów na jednej fotografii.

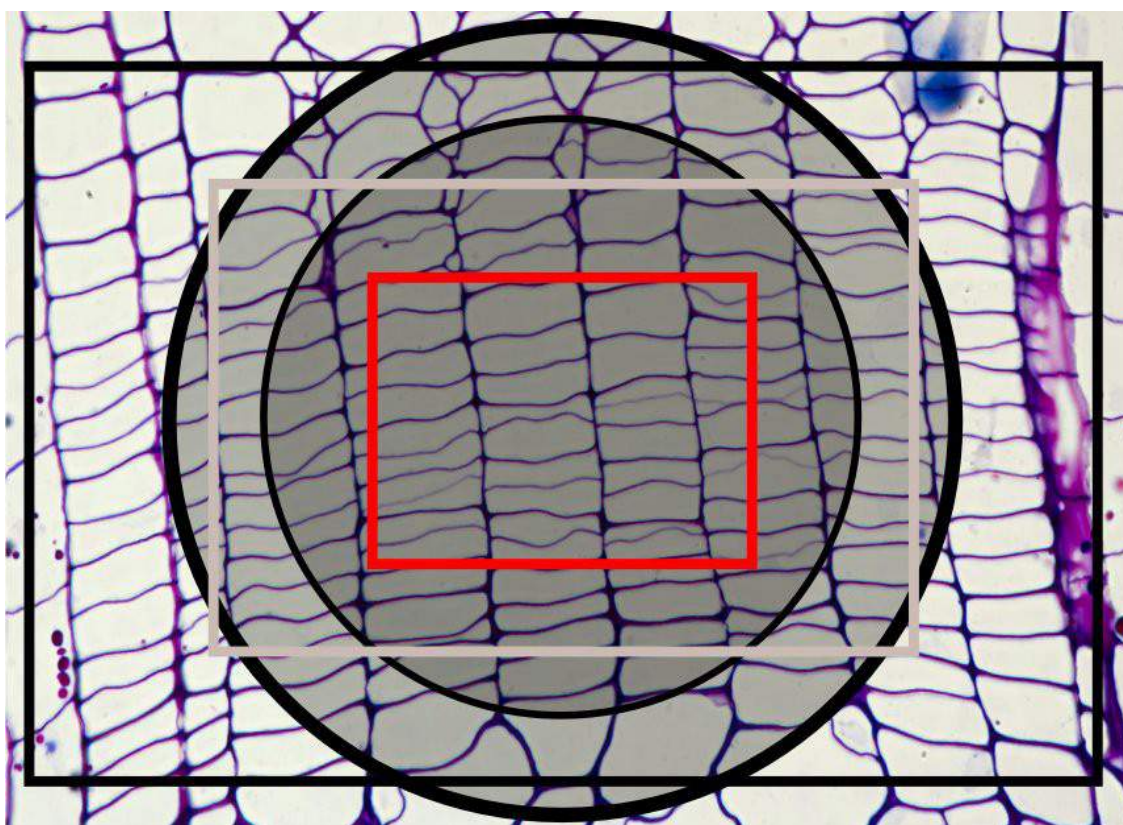
2.5. Preparaty.

W pracy wykorzystano preparaty anatomiczne roślin naczyniowych, udostępnione i wykonane przez pracowników Zakładu Biologii Roślin. Próby fito i zoo planktonu pobrano z jeziora Turawskiego z wykorzystaniem siatki planktonowej o średnicy oczek stu mikrometrów. Szlify cienkie i skamieniałości zostały udostępnione przez pracowników Zakładu Paleobiologii . Owady oraz elementy roślin pochodzą ze zbiorów własnych autora. Grzyby mikroskopowe zostały udostępnione przez pracowników Zakładu Biotechnologii.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1 Pole widzenia.

Okulary projekcyjne są dostosowane do pracy z średnim formatem oraz aparatami pełnoklatkowymi, które są stosunkowo kosztowne. Popularne aparaty konsumenckie posiadają matryce w rozmiarze APS-C lub podobnym. Dla mikrofotografii, zasadnicza różnica która wynika z rozmiaru matrycy, to pole widzenia. Schemat obrazujący pole tworzone przez obiektywy oraz okulary projekcyjne względem matrycy przedstawia poniższa rycina 2.



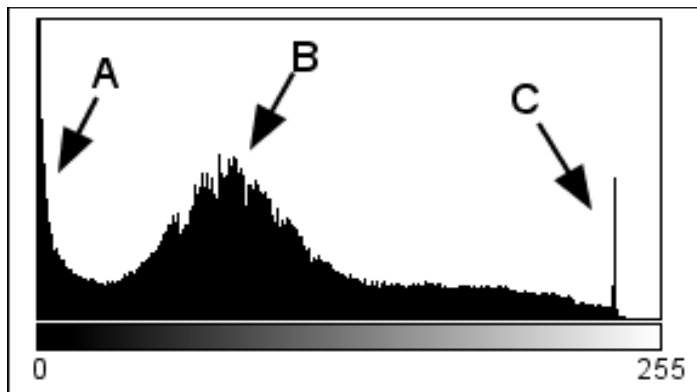
Rycina 2. Fotografia przekroju poprzecznego przez kambium, barwionego, w jasnym polu. Szerokim okręgiem zaznaczono optycznie skorygowaną powierzchnię preparatu odwzorowaną przez obiektyw o FN 26.5. Okręgiem wąskim zaznaczono optycznie skorygowaną powierzchnię odwzorowaną przez obiektyw o FN 20. Czarny prostokąt oznacza powierzchnię preparatu jaką może zarejestrować matryca pełnoklatkowa 36x24mm. Prostokąt szary oznacza powierzchnię preparatu jaką może zarejestrować matryca w formacie APS-C 23,6x15,7mm. Prostokąt czerwony obejmuje powierzchnię, jaką może zarejestrować matryca 1" stosowana w wysokiej klasie kamerach mikroskopowych 12,8x9,6mm. Źródło: Opracowanie własne.

Jak wynika z powyższego schematu, pożądane jest zastosowanie projekcji bezpośredniej w większości przypadków. W związku z tym, dla systemów o skończonej długości tubusu, może być korzystnym zrezygnowanie z korekcji, jakie wprowadza okular, a dzięki temu zachowane będzie duże pole zarejestrowane na fotografii.

Dodatkowo widać, że najkorzystniejszym rozmiarem matrycy, jest format APS-C, której powierzchnia jest mniejsza o około 1,5x od pełnej klatki. Rzeczywiste pole powierzchni zbierane przez obiektyw jest zawsze większe od podanej przez producenta obiektywu wartości liczby polowej FN, jednak obraz w tych partiach może być pozbawiony korekcji optycznych.

3.2 Histogram w mikrofotografii.

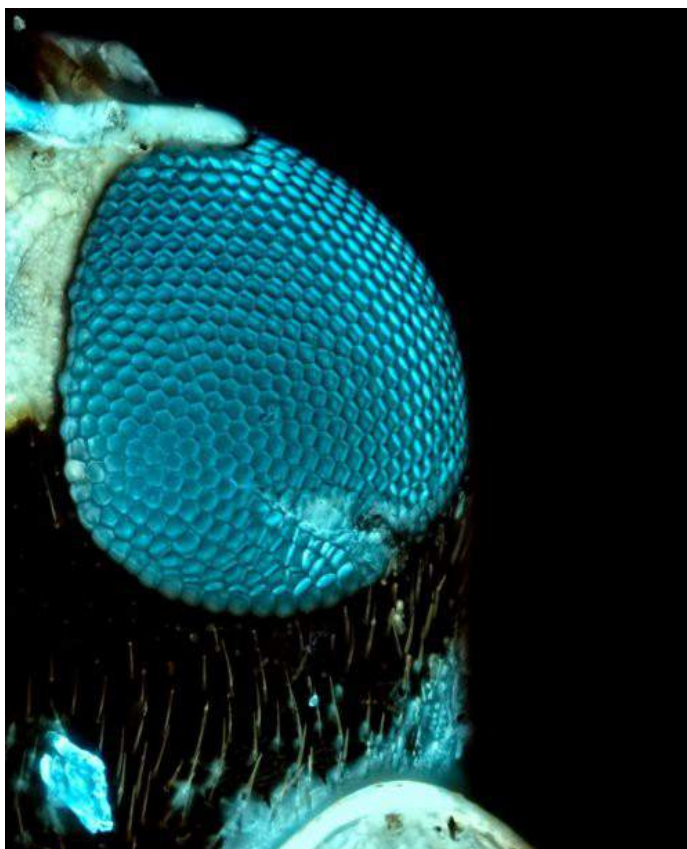
Histogram jest wykresem przedstawiającym na osi rzędnych ilość pikseli, a na osi odciętych ich jasność w skali od 0 do 255. Zazwyczaj występuje w formie linearnej. Histogram w formie linearnej, na podstawie fotografii 1, przedstawia rycina 3.



Ryc 3. Histogram skali szarości wygenerowany przez program ImageJ na podstawie fotografii 2.

A – Pik w rejonie odcieni ciemnych, stanowiący piksele tworzące tło, B – piksele odpowiadające za obraz obiektu, C – pik w rejonie odcieni jasnych odpowiadający za prześwietlony fragment.

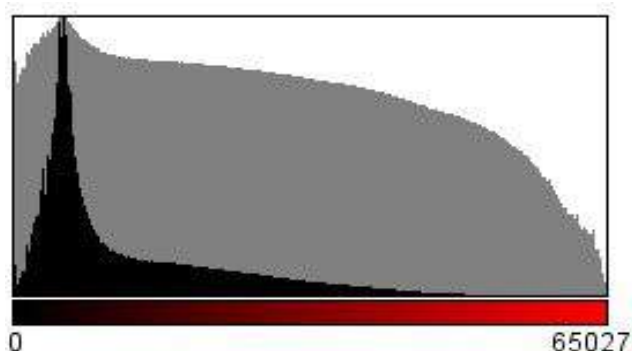
Źródło: Opracowanie własne.



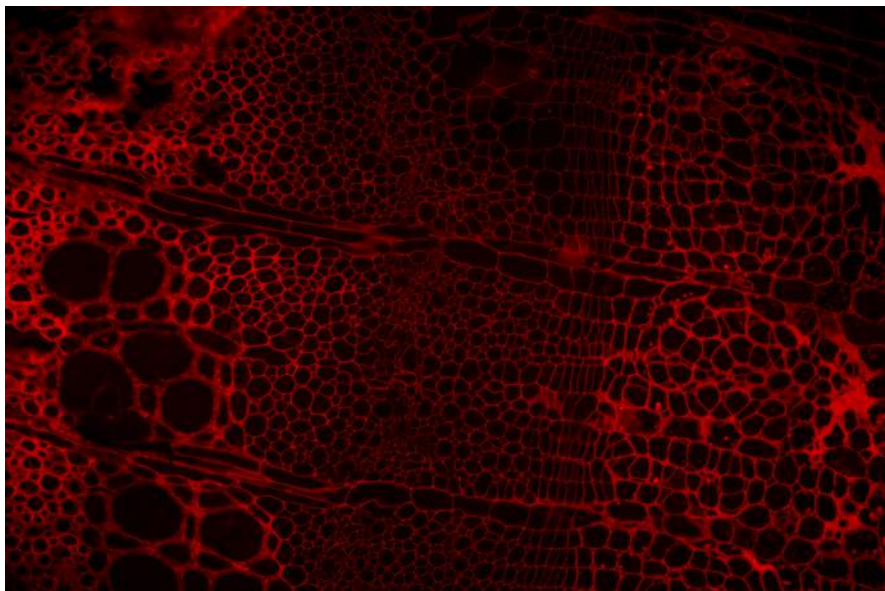
Fot 2. Z góry: Fotografia *Coccinella septempunctata* we fluorescencji UV. Lampa HBO 100W. Obiektyw achromatyczny PZO 5x/0,15, Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1 sek. Stos 20 zdjęć.

Źródło: Opracowanie własne.

Często korzystny, szczególnie w mikrofotografii jest histogram logarytmiczny. W sytuacji, gdy dominuje jeden lub kilka pików odpowiadających za tło i duże obiekty, daje on lepszy pogląd na detale pomiędzy pikami, co często ma miejsce w przypadku dokumentacji mikroskopowej. Do analizy mogą służyć histogramy poszczególnych barw składowych RGB lub histogram wypadkowy skali szarości. Histogramy składowe RGB i histogram sumaryczny, w formie linearnej i logarytmicznej, na podstawie fotografii 2, przedstawia rycina 4.



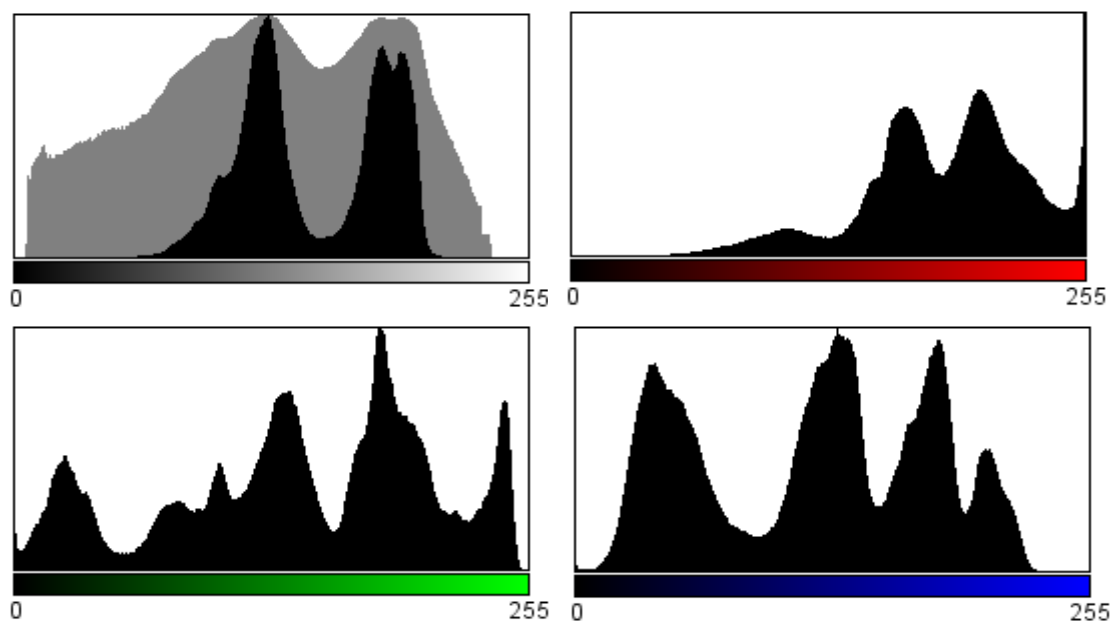
Ryc 4. Histogram wypadkowy w rozszerzonej skali szarości, na podstawie fotografii 3, wygenerowane przez program ImageJ. Kolorem szarym zaznaczono histogram logarytmiczny, ułatwiający dostrzeżenie pikseli przenoszących informacje o znacząco mniejszej liczebności niż piksele tła.
Źródło: Opracowanie własne.



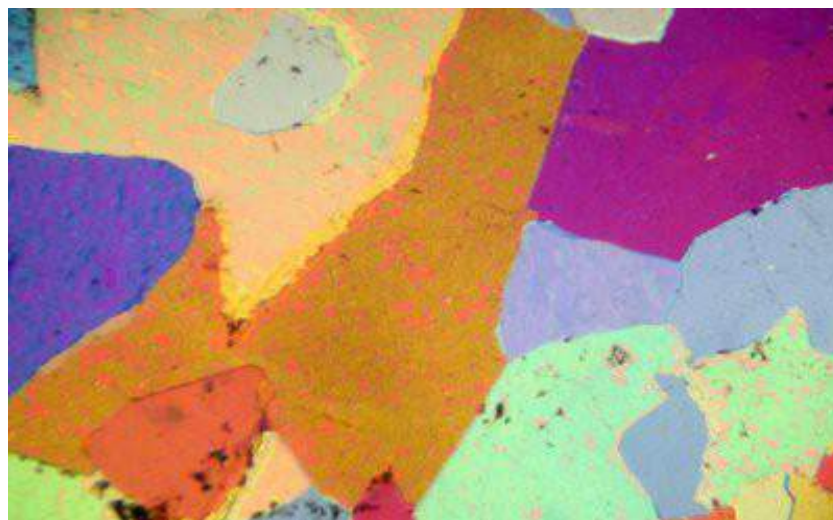
Fot 3. Fotografia przekroju poprzecznego przez kambium we fluorescencji zielonej, wzbudzony lampą HBO 100W. Obiektyw Nikon CFN PlanFluor 20x/0,50, Sonya6000: RAW, ISO200, przysłona otwarta, czas 1 sekunda.

Źródło: Opracowanie własne.

Z reguły dobre zdjęcie posiada charakterystyczny, rozciągnięty w całej skali szarości, histogram z rozkładem zbliżonym do normalnego lub nieregularnym. Sprawdza się to w mikroskopii w świetle odbitym, oraz w typowej mikroskopii polaryzacyjnej, gdzie obiekt stanowi o jego wyglądzie, ponieważ wypełnia kadr i cechuje się dużą rozpiętością tonalną. Typowe histogramy takiego rodzaju oraz przypadków, gdy obiekt jest zróżnicowany i dominuje nad tłem, przedstawia rycina 5.

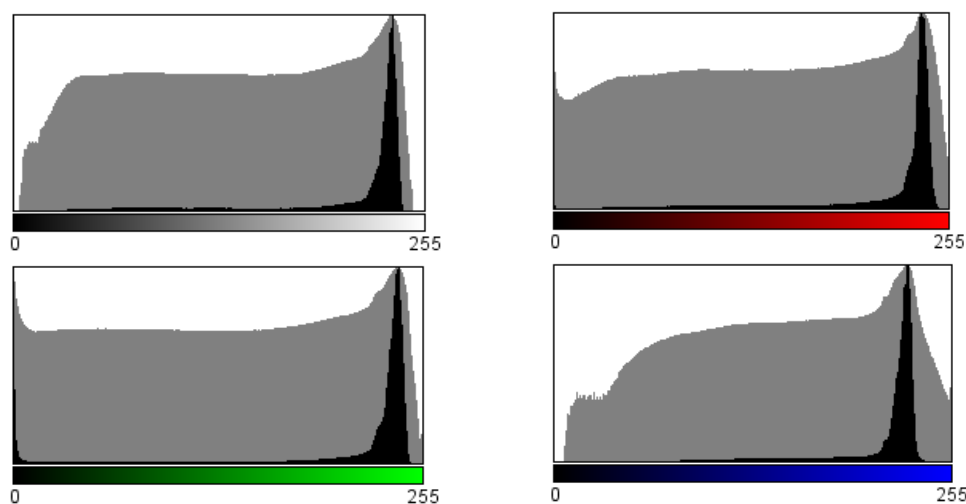


Ryc 5. Histogram wypadkowy (górną lewą) skali szarości i histogramy składowe RGB, na podstawie fotografii 4, wygenerowane przez program ImageJ. Kolorem szarym zaznaczono histogram logarytmiczny. Histogramy w formie zbliżonej do rozkładu normalnego lub nieregularnego. Źródło: Opracowanie własne.

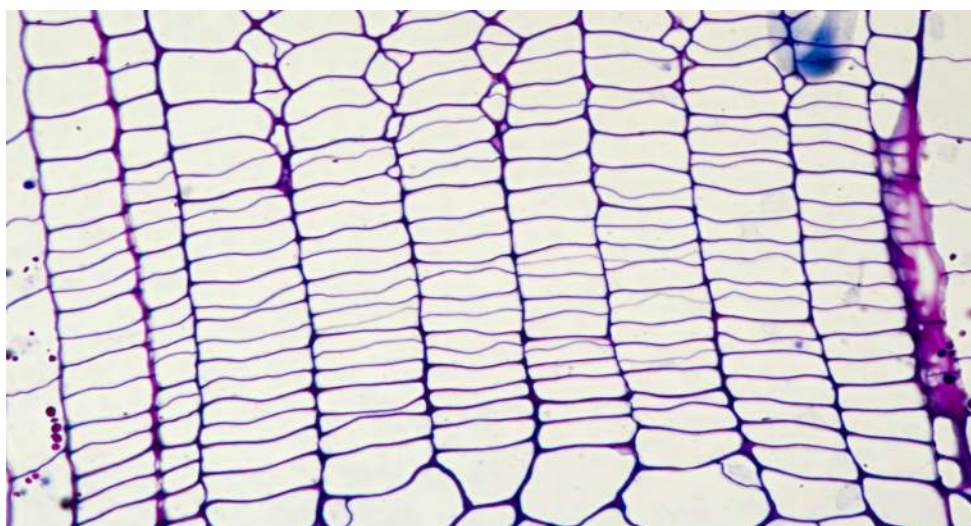


Fot 4. Fotografia kalcytu, szlif cienki na szkiełku podstawowym w polaryzacji wraz z falówką. Obiektów achromatyczny PZO 5x/0,15, Canon 1100D: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/60. Źródło: Opracowanie własne.

W przypadku mikroskopii w świetle przechodzącym, znaczną część histogramu stanowi tło, a histogram przybiera formę zbliżoną do rozkładu wykładniczego. Fotograf stara się zachować jak najwięcej detali, również w tle, np.: chmury na niebie w ujęciu pejzażowym. Jednak w mikroskopii, dąży się jednak do maksymalnego ujednolicenia tła a jego niejednorodność i zabrudzenia powodują niepotrzebne rozciąganie histogramu, zabierając miejsce na skali szarości, które mogłyby zająć detale fotografowanego obiektu. Prawidłowo rozciągnięty histogram z pikiem tła przedstawia rycina 6, na podstawie fotografii 4.

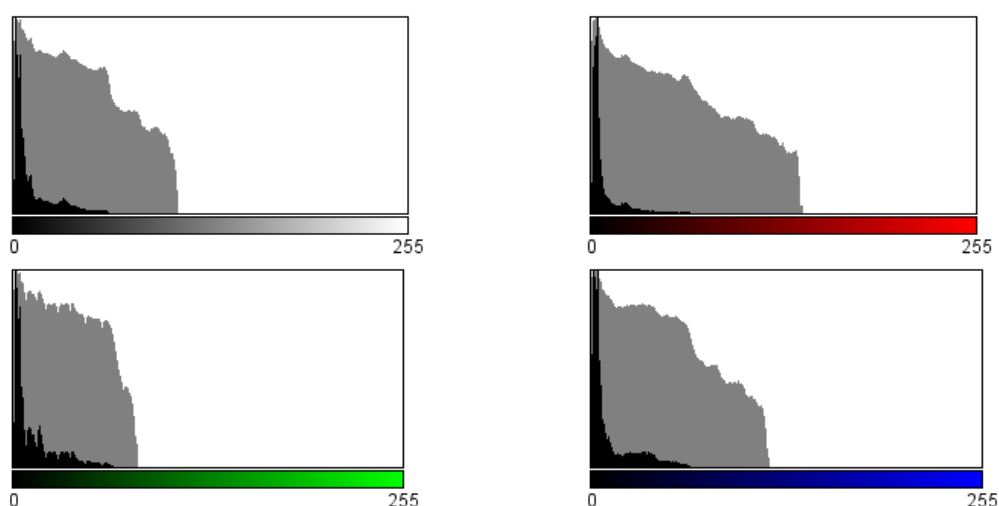


Ryc 6. Histogram wypadkowy (górną lewą) skali szarości i histogramy składowe RGB, na podstawie fotografii 5, wygenerowane przez program ImageJ. Kolorem szarym zaznaczono histogram logarytmiczny. Piek odpowiadający za jasne tło znajduje się z prawej strony skali. Źródło: Opracowanie własne.



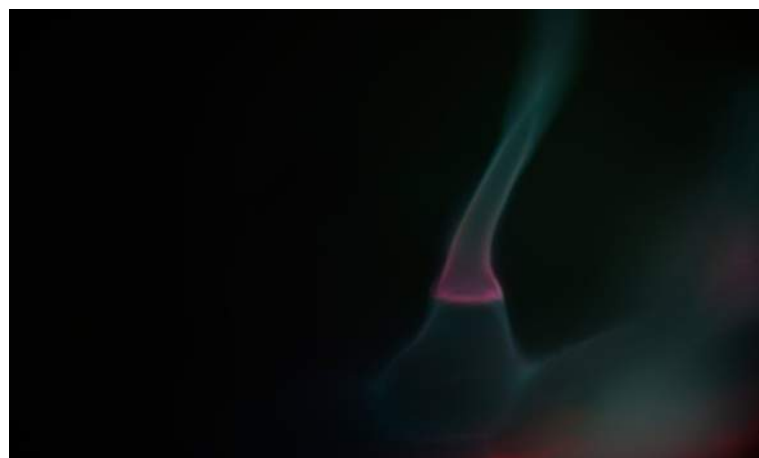
Fot 5. Fotografia przekroju poprzecznego przez kambium, barwionego, w jasnym polu. Obiektyw Olympus UPlanSApo 100x/1.40, Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona 1/3, czas 1/800. Źródło: Opracowanie własne.

Powyższe histogramy mikrofotografii w typowym jasnym polu charakteryzują się tłem stanowiącym wyraźny pik z jasnej strony, a detale są równomiernie rozłożone od strony jasnej, do strony ciemnej. Ten typ histogramów jest charakterystyczny dla jasnego pola, kontrastu fazowego pozytywnego i kontrastu dyferencjalno-różniczkowego. Histogram typowy dla technik takich jak ciemne pole, kontrast fazowy negatywny i fluorescencja jest odbiciem lustrzanym wspomnianych powyżej i są przedstawione na rycinie 7, stworzonej na podstawie fotografii 5.



Ryc 7. Histogram wypadkowy (górną lewą) skali szarości i histogramy składowe RGB, na podstawie fotografii 6, wygenerowane przez program ImageJ. Kolorem szarym zaznaczono histogram logarytmiczny.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 6. Fotografia włoska na liście *Zebrina pendula*, preparat przyżyciowy we fluorescencji UV wzbudzony lampą HBO 100W. Obiektyw Nikon CFN PlanFluor 40x/0,75, Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1 sekunda.

Źródło: Opracowanie własne.

Jeśli tło jest nierównomierne, to w procesie wywoływania lub podczas korygowania ekspozycji, dąży się do przesunięcia histogramu w stronę tła jak ma to miejsce na fotografii 6 i histogramach na rycinie 7, w tym wypadku rozjaśnienia i szumy zostały wyeliminowane poprzez skrócenie czasu ekspozycji do 1 sekundy. W efekcie tło jest jednorodnie ciemne a obiekt dobrze wyeksponowany, pomimo tego że histogram nie jest całkowicie rozciągnięty.

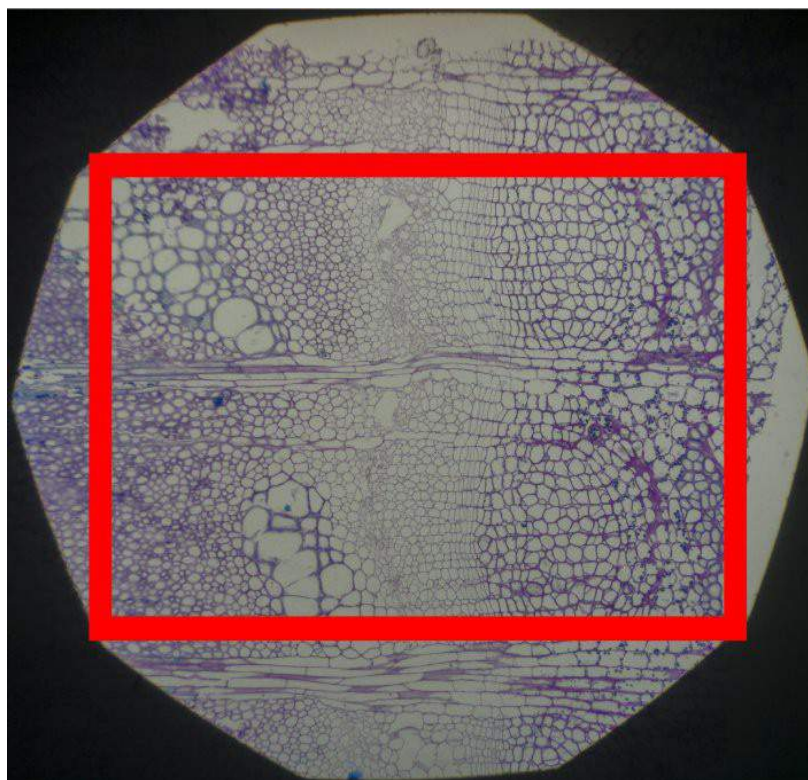
Wszystkie histogramy zostały wykonane z pomocą programu ImageJ (Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, 2012). Bazując na nich oraz fotografiach, można stwierdzić, że histogram jest dobrym narzędziem pomocniczym do kontroli warunków ekspozycji oraz podczas wywoływania fotografii. Umiejętność odczytywania informacji w nim zawartych umożliwi maksymalne wykorzystanie rozpiętości tonalnej i uchwycenie największej możliwej liczby detali. Histogram w mikrofotografii przyjmuje nieco inną formę niż w fotografii tradycyjnej, i nieco inaczej powinno się do niego podchodzić. Różnice te powodują, że automatyka aparatu fotograficznego nie zawsze potrafi optymalnie dobrać parametry ekspozycji i trzeba okresowo kontrolować wygląd histogramu i fotografii w przypadku gdy jest ona wykorzystywana. Należy również pamiętać, że aby uzyskać zdjęcie zdadne do publikacji elektronicznej lub wydruku, należy je przekonwertować z formatu RAW, do ogólnie przyjętych formatów jak TIFF lub JPEG, co wpływa na wygląd histogramu. Konwersja ta następuje automatycznie w oprogramowaniu aparatu, lub ręcznie z poziomu komputera. Czynność tę można porównać to wywoływania filmu analogowego, jednak powinno się dążyć do tego, aby fotografia wymagała jak najmniej obróbki. Skutkiem jest to, że histogram rzeczywisty będzie się w pewnym stopniu różnił od tego podawanego przez aparat w momencie ekspozycji, który jest właściwy jedynie dla formatu RAW. Z tego powodu, podczas wykonywania fotografii, powinno się zostawić nieco miejsca z obu stron histogramu.

3.3 Przysłony

Mikroskop, podobnie jak i klasyczny obiektyw fotograficzny, posiada szereg przysłon służących do regulowania światła wpadającego do jego układu optycznego. Obiektyw fotograficzny z reguły zawiera jeden kompleks listków, stanowiący regulację apertury numerycznej. Podstawowy mikroskop posiada przynajmniej jedną, a zazwyczaj dwie, lub trzy przysłony: polową, aperturową kondensora i aperturową obiektywu. Prawidłowa kalibracja przysłon jest priorytetem dla fotografii wysokiej jakości.

3.3.1 Przysłona polowa

Przysłona polowa znajdująca się w układzie kolektora służy do precyzyjnej regulacji pola, które zostanie podświetlone przez lampę mikroskopową. Jej zadaniem jest eliminacja światła rozproszonego spoza obiektu zainteresowania fotografa. Światło to objawia się na fotografii w postaci artefaktów oraz zamglenia obniżającego kontrast i rozdzielczość. Pierwszym krokiem przed wykonaniem zdjęcia powinno być zawsze przymknięcie przysłony pola tak, aby jej krawędź znajdowała się tuż poza obrębem kadru lub w jego wnętrzu.

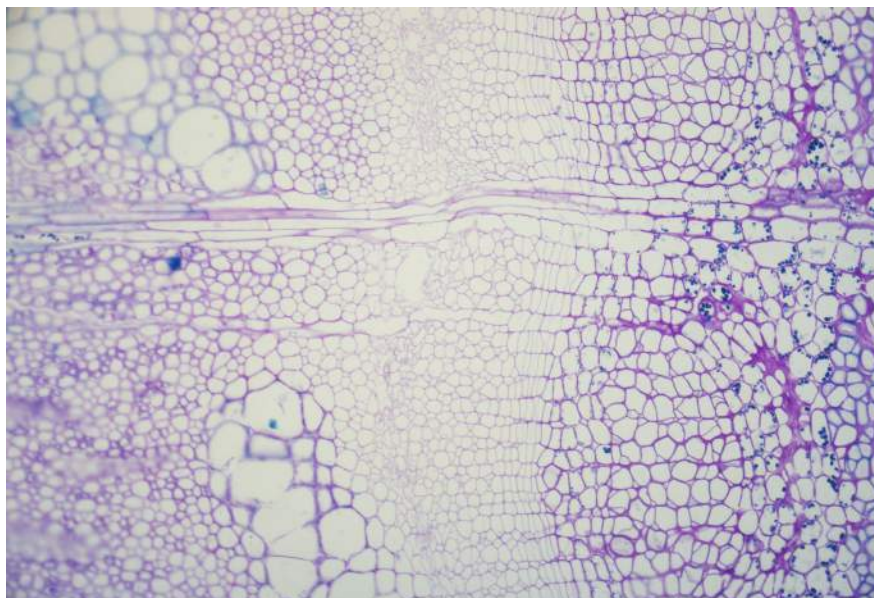


Ryc 8. Prawidłowa pozycja kadru względem przysłony polowej, naniesiona na fotografię barwnego przekroju przez kambium. Narożniki fotografii powinny znajdować się na granicy przysłony polowej.
Źródło: Opracowanie własne.

Niektóre, proste mikroskopy są pozbawione przysłony pola. Fotografie wykonane na takim sprzęcie będą nieco ustępowały jakością względem tych wykonanych na mikroskopie z oświetlaczem Koehlera. Należy zwrócić uwagę na to, że zazwyczaj pole widzenia okularów oraz pole rejestrowane przez aparat fotograficzny nie pokrywają się. Zalecane jest skorygowanie rozmiaru przysłony polowej wobec aparatu fotograficznego. Różnice w jakości fotografii wykonanych z oświetleniem Köhlera i z oświetleniem krytycznym przedstawiają fotografie 7 i 8.



Fot 7. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w jasnym polu. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 20x/0.50. Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona 1/3, czas 1/80. Oświetlenie Köhlera.
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 8. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w jasnym polu. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 20x/0.50. Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/250. Oświetlenie krytyczne.
Źródło: Opracowanie własne.

3.3.2 Przysłona aperturowa kondensora

Przysłona apertury kondensora znajduje się w żrenicy wyjściowej kondensora mikroskopu. Jej zadaniem jest nadawanie zdjęciu głębi ostrości, przy okazji zwiększając kontrast. Skutkiem ubocznym jest jednak zmniejszenie ilości światła trafiającego na matrycę, oraz spadek zdolności rozdzielczej. Wartość przysłony powinna być dobrana doświadczalnie. Zazwyczaj optymalna wartość to $1/3$ - $2/3$ NA obiektywu. Wpływ przysłony na zdolność rozdzielczą obrazuje fotografia 9.



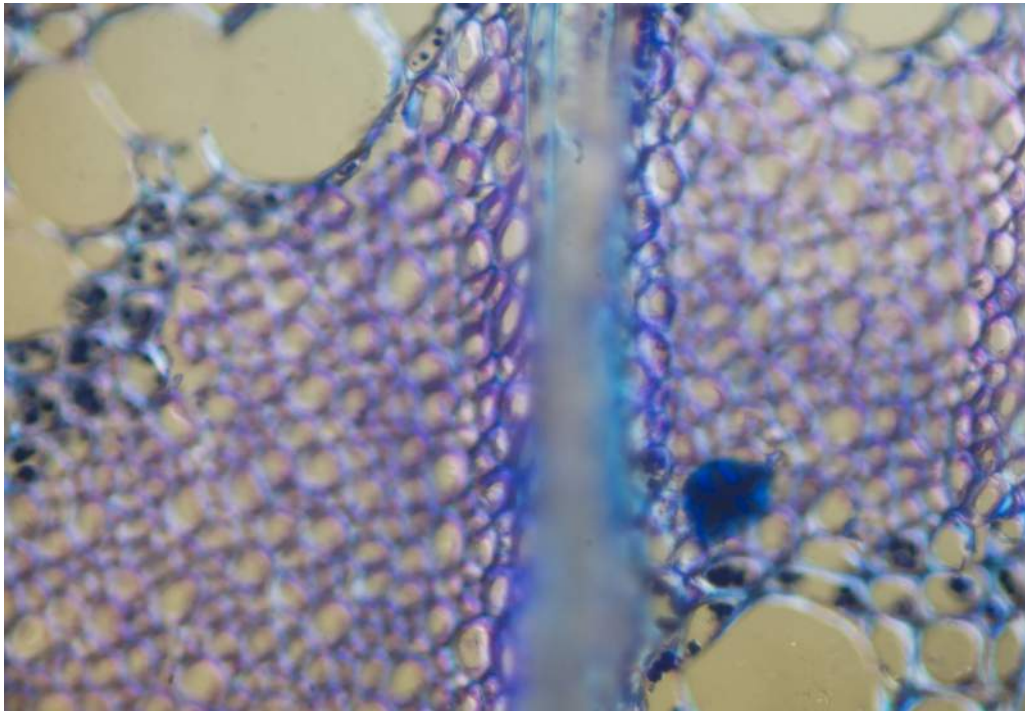
Fot 9. Fotografia okrzemek w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sonya6000: RAW, ISO100, czas 1 sekunda dla lewej fotografii, 3 sekundy dla prawej.

Fotografia po lewej stronie została wykonana z przysłoną otwartą do Na 0.50, prążki na środkowej okrzemce są wyraźnie widoczne na całej długości.

Fotografia po prawej stronie została wykonana z przysłoną przymkniętą do Na 0,12, prążki na środkowej okrzemce są ledwo, lub wcale niedostrzegalne.

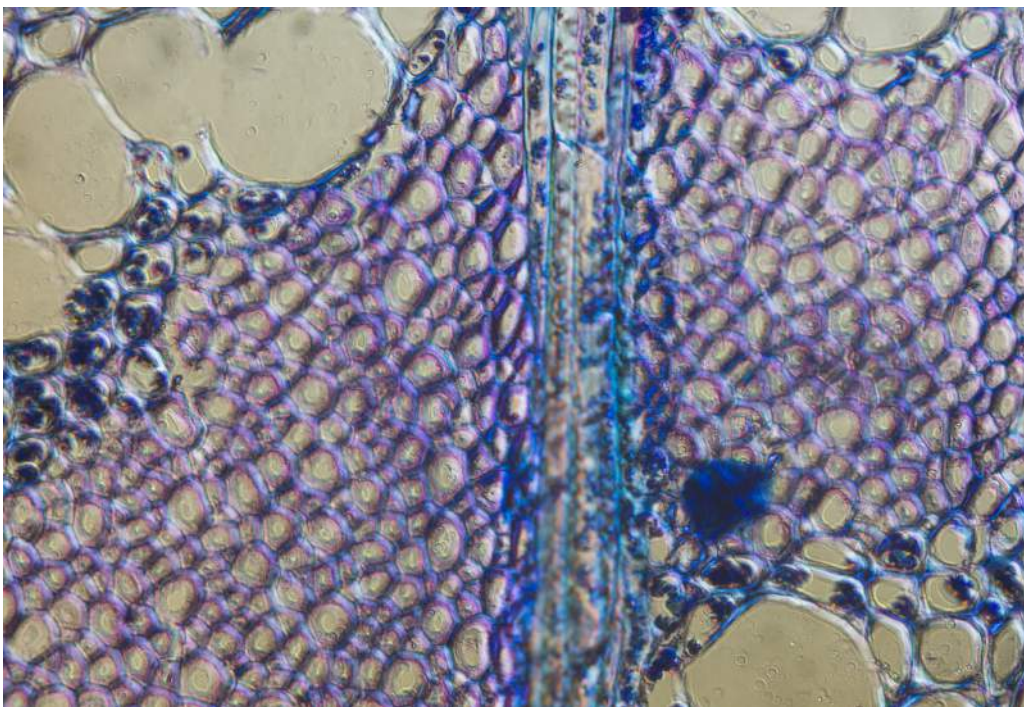
Źródło: Opracowanie własne.

Wpływ przysłony na głębię ostrości przedstawia fotografia 10 i 11.



Fot 10. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/15. W głębi ostrości znajduje się jedynie wąski fragment preparatu.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 11. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/5. W głębi ostrości znajduje się cały fragment preparatu ujęty w kadrze.

Źródło: Opracowanie własne.

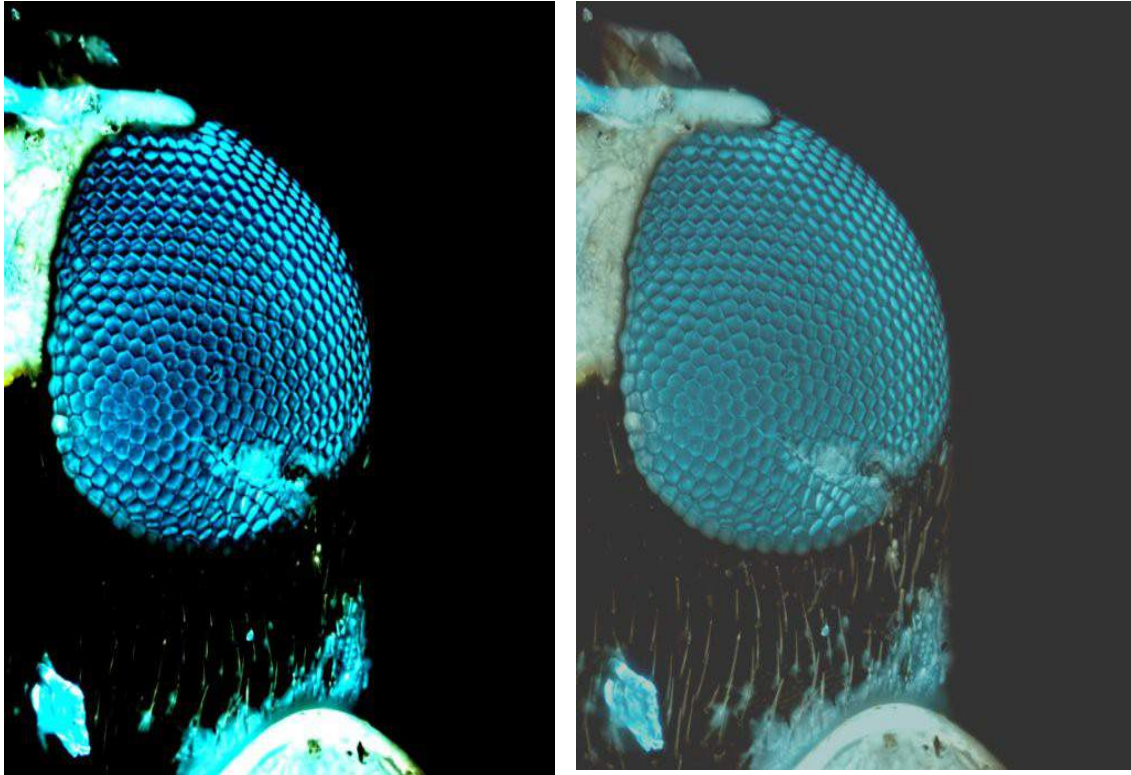
Możliwe jest zwiększenie głębi ostrości bez utraty zdolności rozdzielczej poprzez składanie fotografii z różnych płaszczyzn ostrości, w tym wypadku przysłona powinna być przymknięta do wartości NA obiektywu. Ze względu na to, że preparat działa na przysłonę pola i kondensorową, nieco podobnie jak matówka. Ich praca może być nieco odmienna od teoretycznych obliczeń. Temat zwiększania głębi ostrości bez utraty zdolności rozdzielczej jest omówiony w rozdziale 3.13.1 Stosy.

3.3.3. Przysłona aperturowa obiektywu.

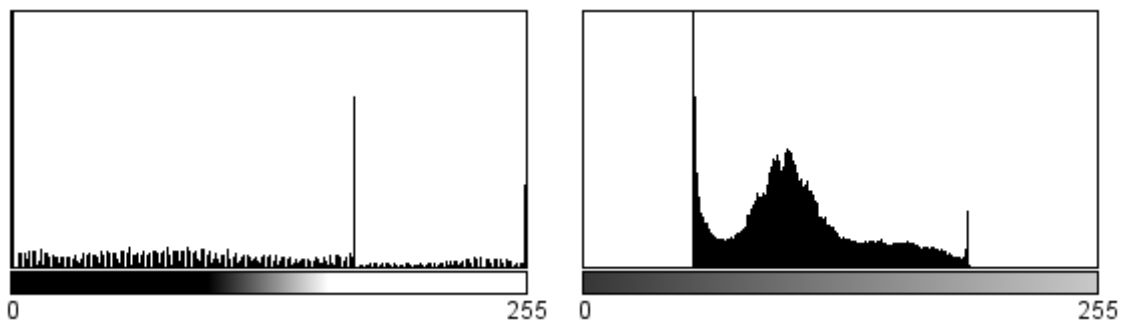
Przysłona apertury obiektywu spełnia identyczną funkcję jak przysłona kondensora, jednak jej praca nie jest zaburzona przez naturę preparatu. Ze względu na kosztowność oraz trudność we wstawieniu przysłony do obiektywu, jest ona rzadko spotykana. Zazwyczaj występuje w obiektywach o małych powiększeniach i silnych obiektywach immersyjnych, przeznaczonych do pracy w ciemnym polu. Przysłona obiektywowa powinna być ustawiona na wartość niższą niż $Na\ 0.95$ dla pracy w ciemnym polu, lub całkowicie rozwarta dla pracy w jasnym polu. Jeśli preparat w znaczącym stopniu zaburza pracę przysłony kondensorowej, powinno się ją ustawić podobnie jak przysłonę kondensorową.

3.3.4. Wpływ przysłony na wygląd histogramu.

Przymykanie przysłon aperturowych powoduje przesunięcie histogramu w stronę ciemną oraz jego rozciąganie co obrazuje rycina 9 wykonana na podstawie fotografii 12.



Fot 12. Fotografie *Coccinella septempunctata* we fluorescencji UV wzbudzonej lampą HBO 100W. Obiektyw achromatyczny PZO 5x/0,15, Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta. Stack 20 zdjęć. Po lewej: zdjęcie przekontrastowane. Po prawej: zdjęcie z niedostatecznym kontrastem. Źródło: Opracowanie własne.



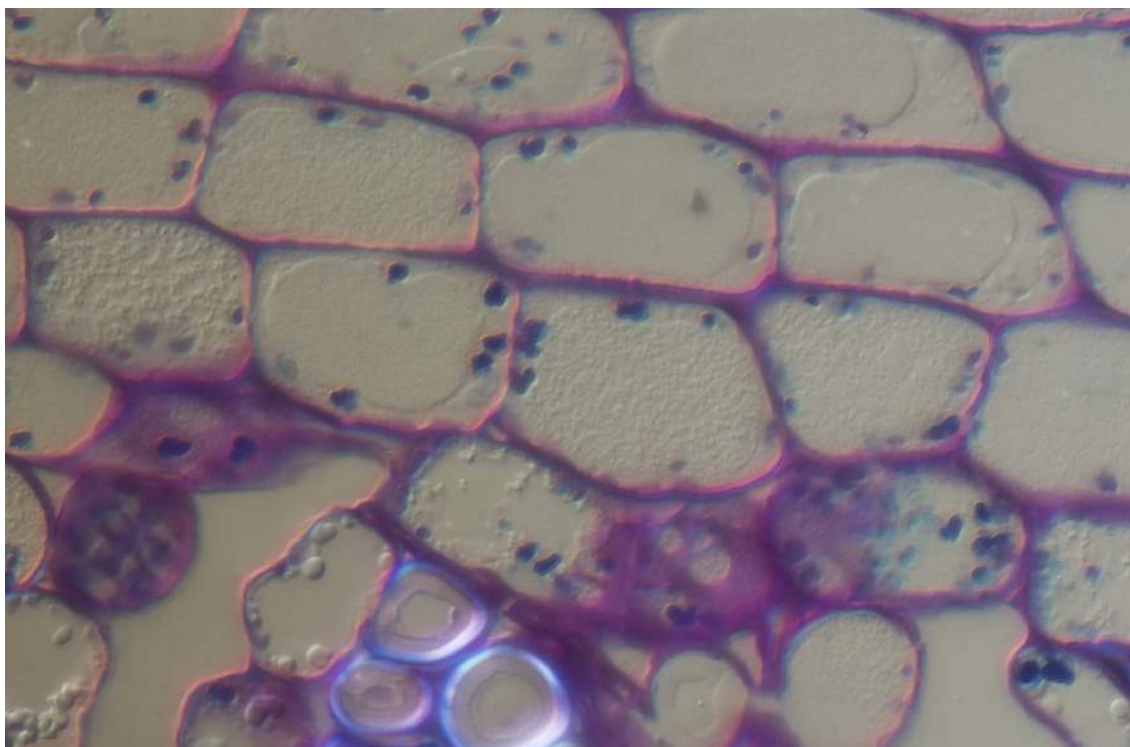
Ryc 9. Histogramy skali szarości fotografii 12. Wygenerowane przez program ImageJ. Po lewej: histogram zbyt rozciągnięty, piksele odpowiadające za tło oraz obiekt pokrywają się. Po prawej: histogram zbyt wąski, różnica pomiędzy pikselami odpowiadające za obiekt i tło jest zbyt niska, w efekcie czego fotografia wygląda na zamgloną. Źródło: Opracowanie własne.

3.4. Dobór czasu.

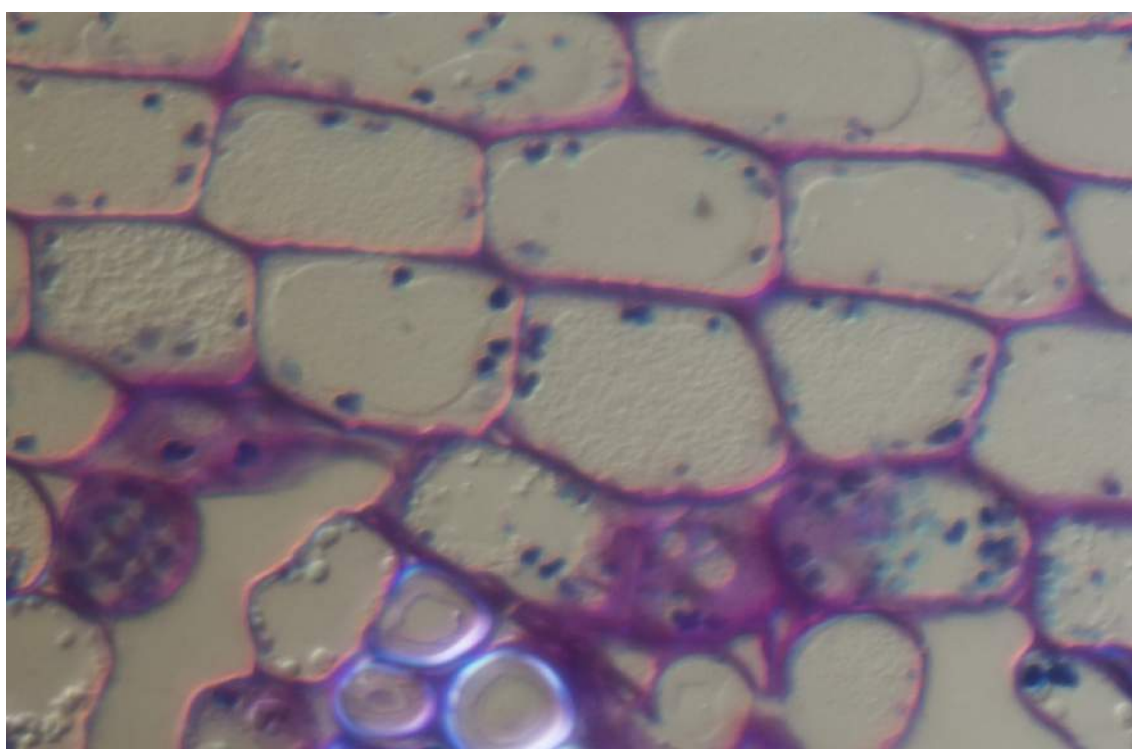
Fotografia, jest efektem naświetlania elementu światłoczułego, w czasie wystarczającym do prawidłowego zarejestrowania obrazu. Czas ten musi być na tyle długi, aby wszelkie informacje zostały ujęte na zdjęciu, ale na tyle krótki, aby ruch obiektu nie spowodował wielokrotnego naświetlenia na jednym ujęciu.

3.4.1 Czas ekspozycji i drgania.

W przypadku preparatów utrwalonych, pomimo braku ruchu preparatu, nie jest możliwe bezkrytyczne wydłużanie ekspozycji. Wszelkie drgania generowane w okolicy mikroskopu, a nawet przenoszone z daleka mogą powodować rozmycie detali na fotografii. Ze względu na ekstremalne powiększenia, nieistotne w klasycznej fotografii źródła drgań takie jak ruchy powietrza mogą szkodliwie wpłynąć na jakość fotografii. Również praca migawki oraz lustra aparatu może być ich źródłem. Pomocna jest możliwość blokady lustra aparatu, które w mikroskopii jest właściwie zbędne, stąd przewaga aparatów bezlusterkowych nad lustrzankami. Kolejnym istotnym udogodnieniem jest funkcja elektronicznej kurtyny migawki, która eliminuje kolejne źródło potencjalnych drgań. Jeśli aparat jest pozbawiony powyższych funkcji, zamiast sztywnego połączenia, może być konieczne zainstalowanie go na statywie z połączeniem elastycznym z pomocą mieszka. Szczególnie podatne na drgania czasy ekspozycji, to zakres pomiędzy 1 sekundą a 1/30 sekundy. W przypadku pracy z tymi czasami zalecane jest aby mikroskop znajdował się na powierzchni absorbującej drgania, okna i klimatyzatory były zamknięte, a ruch w pomieszczeniu został ograniczony. W przypadku gdy czas naświetlania jest dłuższy niż sekunda, lub krótszy niż 1/30 sekundy, zazwyczaj światło przenoszące szkodliwe drgania nie jest wystarczająco silne aby stać się elementem ekspozycji. Zaleca się pracę z minimalną światłoczułością i maksymalną mocą lampy mikroskopowej i optymalnym dla nich czasem ekspozycji. W przypadku gdy występuje rozmycie spowodowane drganiami, zalecane jest skorygowanie czasu ekspozycji kosztem ISO. Praca w jasnym polu i oświetleniu skośnym nie wymaga dużej mocy źródła światła. Problemy z drganiami mogą wystąpić w technikach takich jak kontrast Nomarskiego, polaryzacja, ciemne pole, kontrast fazowy, które wymagają dużej mocy lampy mikroskopowej. Wpływ drgań na zdjęcie przedstawiają fotografie 13 i 14.



Fot 13. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Canon EOS 1100D: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/10, EFSC włączony. Źródło: Opracowanie własne.



Fot 14. Fotografia barwionego przekroju przez kambium w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Canon EOS 1100D: RAW, ISO100, przysłona otwarta, czas 1/10, EFSC wyłączony. Źródło: Opracowanie własne.

3.4.2. Ruchy obiektu.

W przypadku preparatów przeżyciowych, dąży się do maksymalnego wydłużenia czasu ekspozycji, przy zachowaniu efektu „zatrzymania” obiektów ruchliwych. Należy pracować z maksymalną mocą lampy mikroskopowej, która nie spowoduje zbyt szybkiego wysychania preparatu oraz śmierci organizmów. Pomocne są filtry pochłaniające promieniowanie podczerwone przed kondensorem, które pochłaniają szkodliwe ciepło. Po ustawieniu wartości przysłony, czas ekspozycji jest wartością priorytetową. Należy go dobrać tak, aby ruch obiektu nie powodował rozmycia detali na fotografii. Ze względu na to, że pracuje się z czasami w granicach 1/30 do 1/2000 sekundy, normalnym jest stosowanie wysokich światłoczułości ISO lub lampy błyskowej. Znaczenie prawidłowego doboru ISO i czasu otwarcia migawki przedstawia fotografia 15.



Fot 15. Fotografie *Cyclops sp.* w kontraście DIC. Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: RAW, przysłona 1/2 Na.,

Po lewej: ISO 100, czas otwarcia migawki 1/4 sekundy – ekspozycja zbyt długa.
Po prawej: ISO 3200, czas otwarcia migawki 1/400 – ekspozycja optymalna.

Źródło: Opracowanie własne.

3.4.3. Kompozycje o rozszerzonych rozpiętościach tonalnych.

Prawidłowy dobór czasu, ze względu na niejednorodność fotografowanych obiektów, może być czasem niemożliwy. Dla jednej kompozycji przy optymalnej rozpiętości czasu ekspozycji, niektóre elementy mogą być niedoświetlone, podczas gdy inne będą prześwietlone. Wtedy wyjściem z sytuacji jest kompozycja kilku fotografii o różnych parametrach ekspozycji. W takiej sytuacji zazwyczaj stosownym jest wykonanie dwóch ekspozycji. Pierwsza, ciemna, dla której elementy jasne są dobrze naświetlone a większość kadru jest niedoświetlona. Druga, jasna, dla której elementy ciemne są dobrze naświetlone, a większość kadru jest prześwietlona. Następnie te trzy zdjęcia są komputerowo składane w jedno zdjęcie o wszystkich elementach naświetlonych prawidłowo. Zdjęcia składowe przedstawia fotografia 16. Zdjęcie wynikowe przedstawia fotografia 17.

Jest to postępowanie podobne do fotografii w trybie HDR i może być wykonane automatycznie w niektórych modelach aparatów fotograficznych.



Fot 16. Fotografie preparatu liścia *Sambucus racemosa* w jasnym polu. Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: RAW, przysłona otwarta, ISO100.

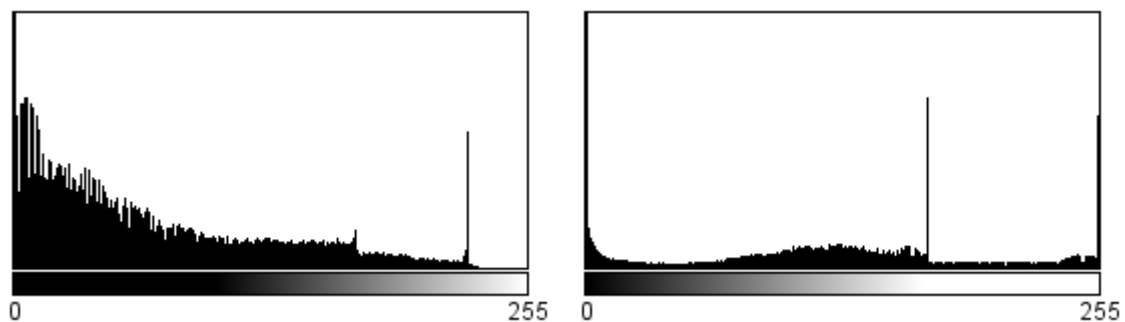
Po lewej zdjęcie niedoświetlone z dobrą ekspozycją żyłek o czasie ekspozycji 1/2000. Po prawej zdjęcie dobrze naświetlone, z prześwietlonymi żyłkami o czasie ekspozycji 1/500. Źródło: Opracowanie własne.



Fot 17. Fotografia składowa z fotografii 14 o dobrze naświetlonych żyłkach i reszcie kadru.
Źródło: Opracowanie własne.

3.4.4. Wpływ czasu otwarcia migawki na histogram.

Wpływ zmiany czasu na histogram obrazuje rycina 10 na podstawie fotografii 18.

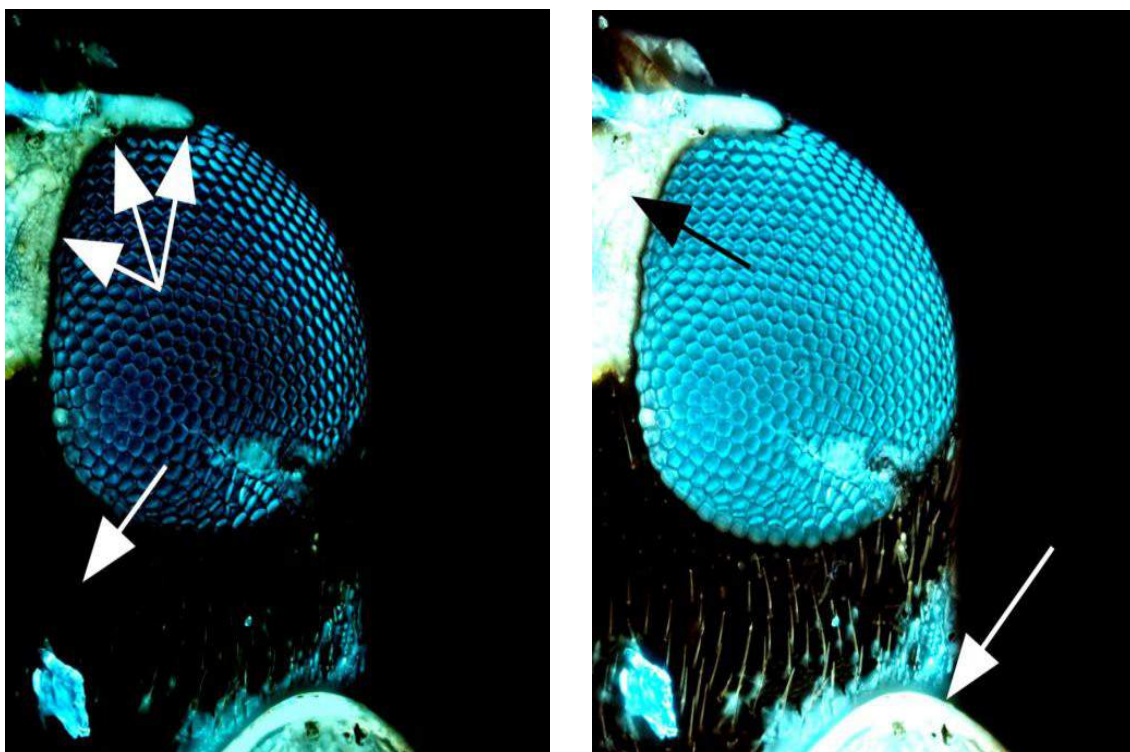


Ryc 10. Histogramy skali szarości fotografii 18. Wygenerowane przez program ImageJ.

Po lewej: piksele odpowiadające za tło oraz obiekt pokrywają się.

Po prawej: piksele odpowiadające za obiekt zbyt przesunięte w stronę jasną.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 18. Fotografie *Coccinella septempunctata* we fluorescencji UV wzbudzonej lampą HBO 100W. Obiektyw achromatyczny PZO 5x/0,15, Sonya6000: RAW, ISO100, przysłona otwarta. Stack 20 zdjęć. Po lewej: zdjęcie niedoświetlone o czasie ekspozycji 1/10, strzałkami zaznaczono obszary z utratą informacji. Po prawej: zdjęcie prześwietlone o czasie 1 sekundy, strzałkami zaznaczono obszary z utratą informacji.

Źródło: Opracowanie własne.

3.5. Światłoczułość ISO.

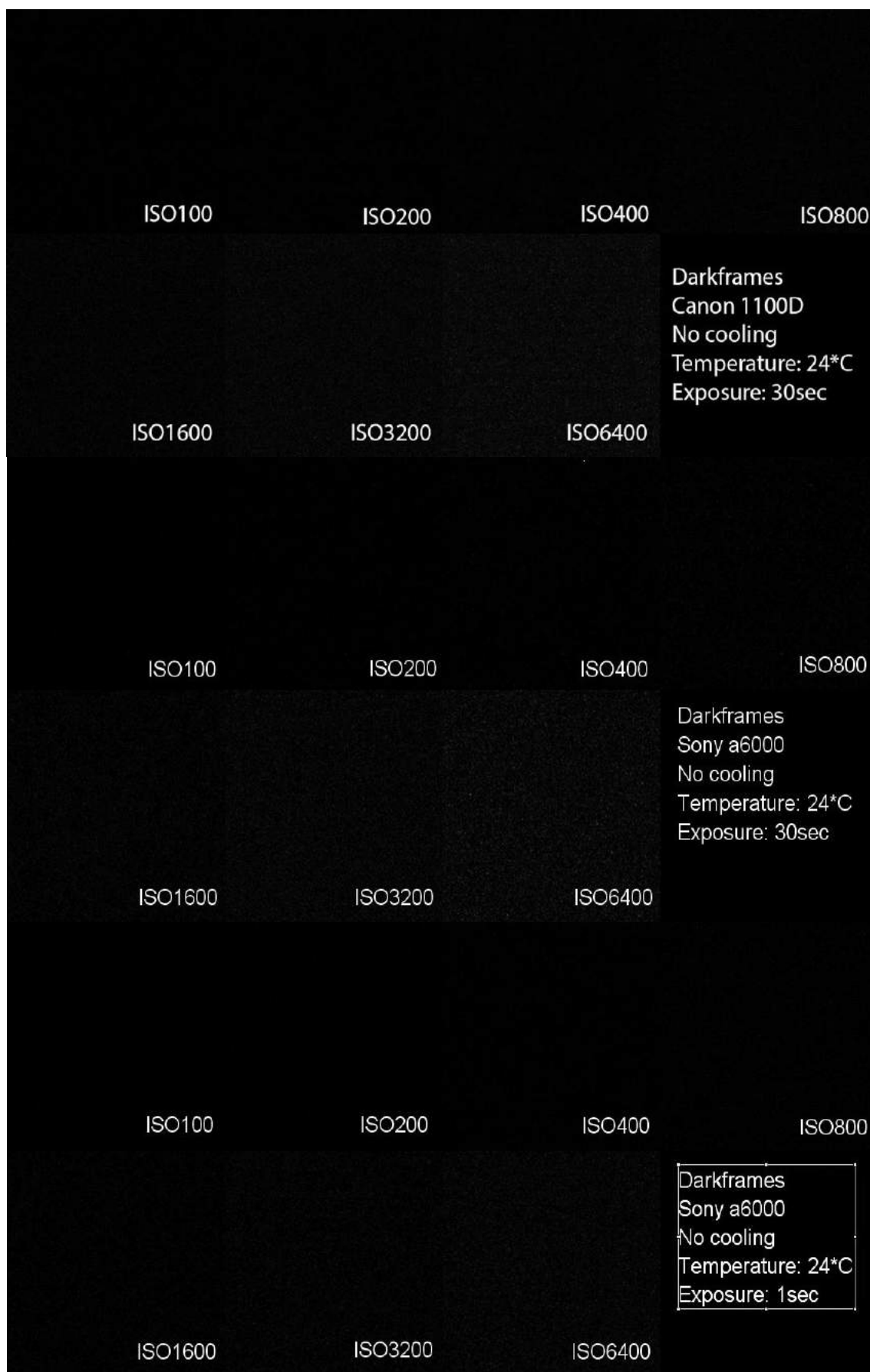
Światłoczułość natywna matrycy, jest to wartość, która gwarantuje najwyższą jakość fotografii przy minimalnym wpływie szumów. W związku z tym, że zazwyczaj jest to wartość minimalna, powinno się dążyć do maksymalnego ograniczenia ISO. Wraz z podnoszeniem światłoczułości, histogram przesuwają się w stronę jasną o jedną wartość ekspozycji na dwie zmiany ISO. Równocześnie rośnie poziom szumów, obniżających rozdzielczość. Szumy te jednak zależą nie tylko od ISO, ale rosną również wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji oraz zwiększaniem światłoczułości. Jest cechą konkretnego modelu aparatu, jak dobrze radzi sobie z pracą przy wyższych światłoczułościach i powinno się eksperymentalnie dobrać odpowiednie czasu i czułości dla danego aparatu przy technikach fluorescencyjnych. Przy fotografiach preparatów utrwalonych normalnym jest praca z czasami ekspozycji rzędu 1/30-1/400 sekundy, co umożliwia pracę z minimalnym ISO dla jasnego pola i oświetlenia skośnego z każdym oświetlaczem. W przypadku pozostałych technik, z reguły możliwe jest podniesienie ISO do poziomu 1600 bez znaczącego wpływu szumów na rozdzielczość.

Zwiększanie wartości ISO powoduje przesunięcie histogramu w stronę jasną, podobnie jak poprzez wydłużanie czasu ekspozycji.

Obecność szumów na fotografii, w zależności od światłoczułości ISO obrazuje rycina 11.

Ryc 11. (strona 36) Porównanie szumów generowanych przez lustrzanki Canon EOS 1100D (góra) i bezlusterkowca Sony a6000 na kadrach czarnych (środek) . Porównanie szumów dla tych samych wartości ISO i różnych czasów otwarcia migawki generowanych przez bezlusterkowca Sony a6000. Czas 30 sekund (środek) oraz czas 1 sekunda (dół).

Źródło: Opracowanie własne.

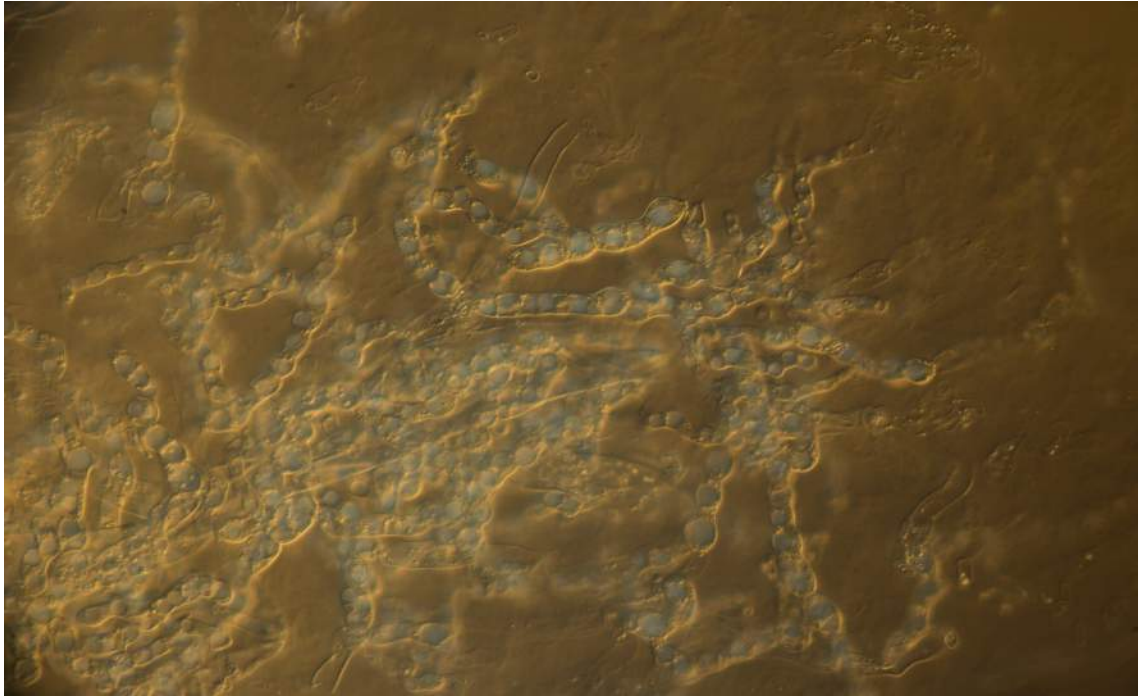


3.6. Balans bieli.

Prawidłowy balans bieli zwany też balansem szarości lub kolorów, oznacza rzeczywiste odwzorowanie kolorów na fotografii.. W dobie fotografii analogowej, balans bieli fotografii był zachowany dzięki odpowiednim doborze filmu i światła, oraz zestawem barwnych filtrów optycznych. Dzisiejsze aparaty cyfrowe, mają możliwość automatycznej lub ręcznej korekcji temperatury barwowej. Zazwyczaj tryb automatyczny spisuje się poprawnie i nie ma potrzeby go korygować, jednak przy wykonywaniu wielu fotografii np: elementów do kompozycji panoramicznych lub do stosów głębi ostrości, może się zdarzyć, że będą się one różnić między sobą. Również, gdy preparat znacznie dominuje nad tłem i występuje w rzadko spotykanych w naturze kolorach, jak barwione preparaty histologiczne, automatyczny balans bieli może być niepoprawny. We wszystkich technikach poza fluorescencyjną, dobrym zwyczajem jest fotografia z maksymalną mocą oświetlacza, w związku z tym zalecane jest ręczne ustawienie balansu bieli aparatu dla mikroskopu i jego okresowa korekcja. Konieczność poprawy parametrów wynika ze zmiany temperatury barwowej wraz z wiekiem lampy, jednak zmiana ta jest subtelna i nie wymaga częstych korekt.

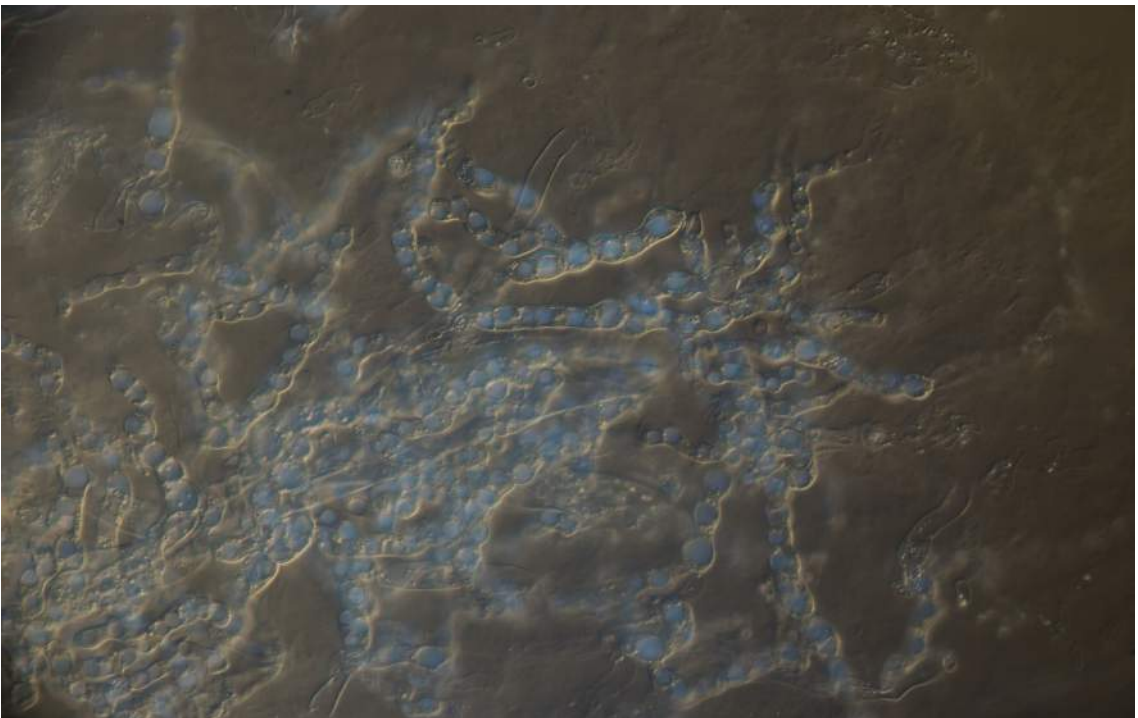
Dzięki cyfrowej korekcji balansu bieli, filtry barwne nie znajdują już w fotografii dużego zastosowania. Są przydatne przy zastosowaniu oświetlaczów halogenowych i żarowych, gdy te pracują na niskich napięciach. W tej sytuacji temperatura barwowa jest bardzo niska, a tło może być brunatno-żółte. Sytuacja taka ma miejsce przy optycznym łączeniu technik mikroskopowych światła przechodzącego z fluorescencją.

Połączenie kontrastu DIC z fluorescencją bez użycia filtra balansującego obrazuje fotografia 19, natomiast z użyciem takiego filtra, fotografia 20.



Fot 19. Fotografia strzępek grzyba *Rhizoctonia sp.* W kontraście DIC. Jądra komórkowe barwione DAPI we fluorescencji UV wzbudzonej lampą HBO 100W. Nie zastosowano filtra balansującego. Sony a6000: ISO400, czas otwarcia migawki 5 sekund.

Źródło: Opracowanie własne.

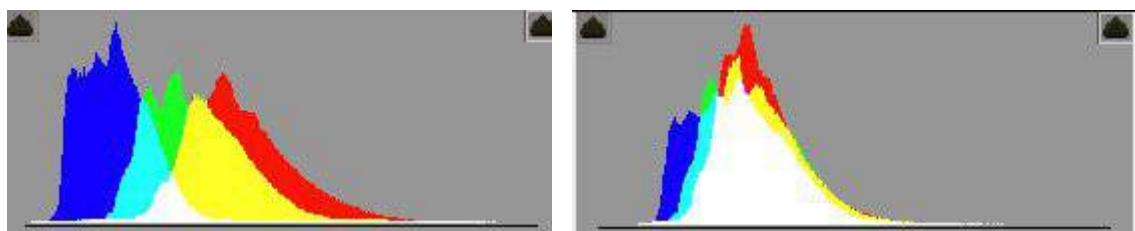


Fot 20. Fotografia strzępek grzyba *Rhizoctonia sp.* W kontraście DIC. Jądra komórkowe barwione DAPI we fluorescencji UV wzbudzonej lampą HBO 100W. Zastosowano filtr balansujący Nikon NCB11. Sony a6000: ISO400, czas otwarcia migawki 5 sekund.

Źródło: Opracowanie własne.

Korekcja balansu bieli może zostać łatwo przeprowadzona z poziomu komputera, szczególnie w formacie RAW, jednak w celu uniknięcia dodatkowej pracy, dobrze jest wykorzystać możliwość jego korekcji w aparacie.

Korekcja balansu bieli powoduje subtelne, ale nieregularne zmiany poszczególnych kanałów barwnych histogramu. Różnice w histogramie wynikająca z doprowadzenia fotografii 19 do balansu jak na fotografii 20, obrazuje rycina 12.



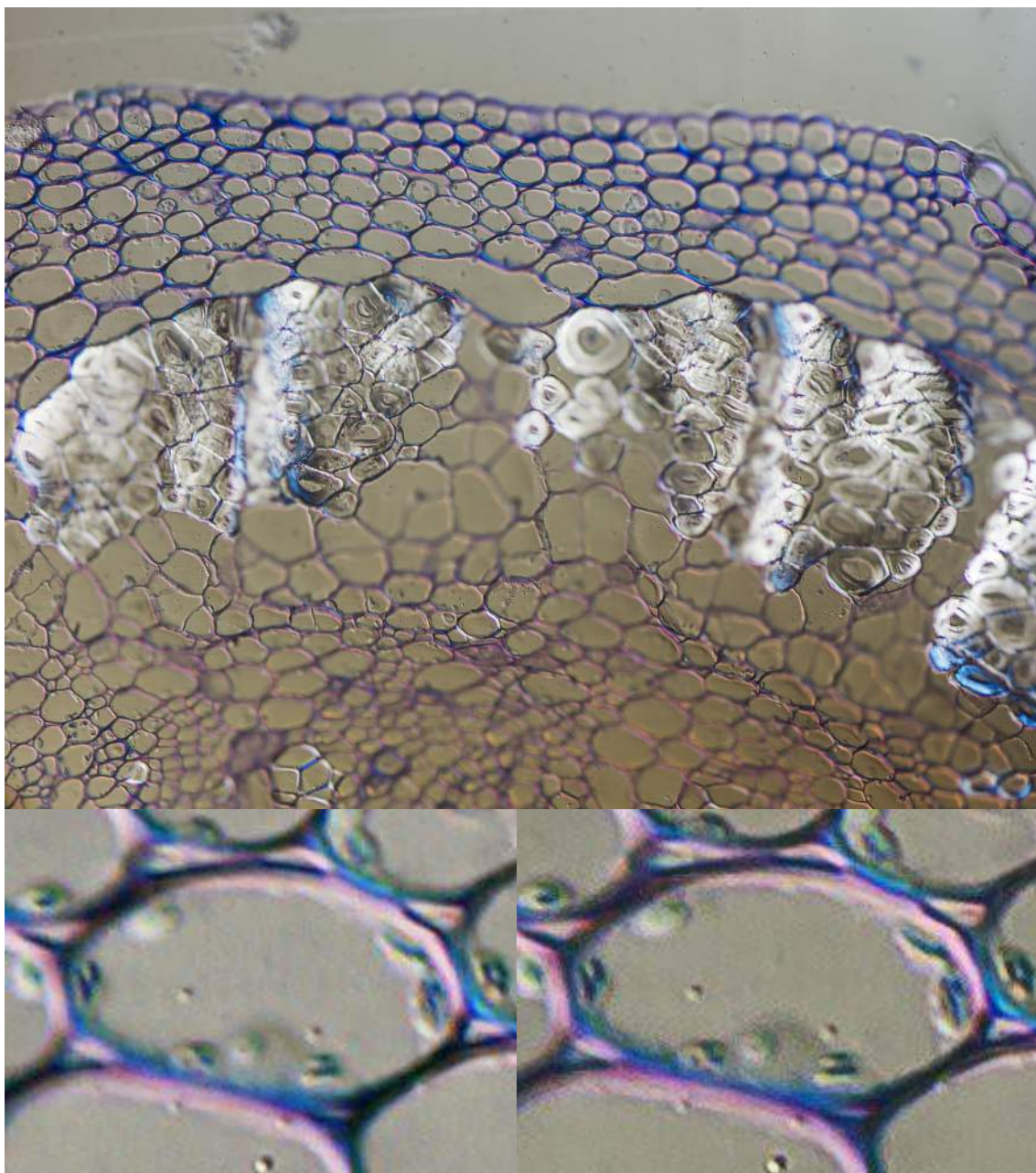
Ryc 11. Kompozytowe histogramy RGB. Po lewej: histogram fotografii 19. Po prawej: jej histogram, po doprowadzeniu jej do balansu bieli jak na fotografii 20

Źródło: Opracowanie własne.

3.7 Format zapisu zdjęcia.

Matryca aparatu, stanowi płaszczyznę o współrzędnych pikseli "X, Y". Na każdy piksel składają się z cztery punkty: czerwony, niebieski oraz dwa zielone, każdy rejestrujące natężenie padającego światła. W momencie wykonania zdjęcia informacje o pikselach są zapisywane w formacie RAW, który jest formatem bezstratnym, jeśli chodzi o informacje uchwycone przez mikroskop i aparat. Aby jednak zdjęcie mogło być opublikowane lub wydrukowane należy je przekonwertować do jednego z dwóch popularnych formatów: TIFF lub JPEG. Czynność ta może odbyć się z poziomu oprogramowania aparatu, lub poprzez wywoływanie komputerowe. Jeśli priorytetem jest jakość, należy pozostać przy formacie RAW, jednak jeśli istotne jest szybkie i łatwe opublikowanie zdjęcia, korzystniejszy jest format TIFF. Jeśli aparat nie posiada możliwości generowania zdjęć w formacie TIFF, lub niezbędny jest mały rozmiar fotografii, należy wybrać format JPEG. Zazwyczaj możliwe jest wykonywanie zdjęć z równoczesnym zapisem RAW + TIFF/JPEG.

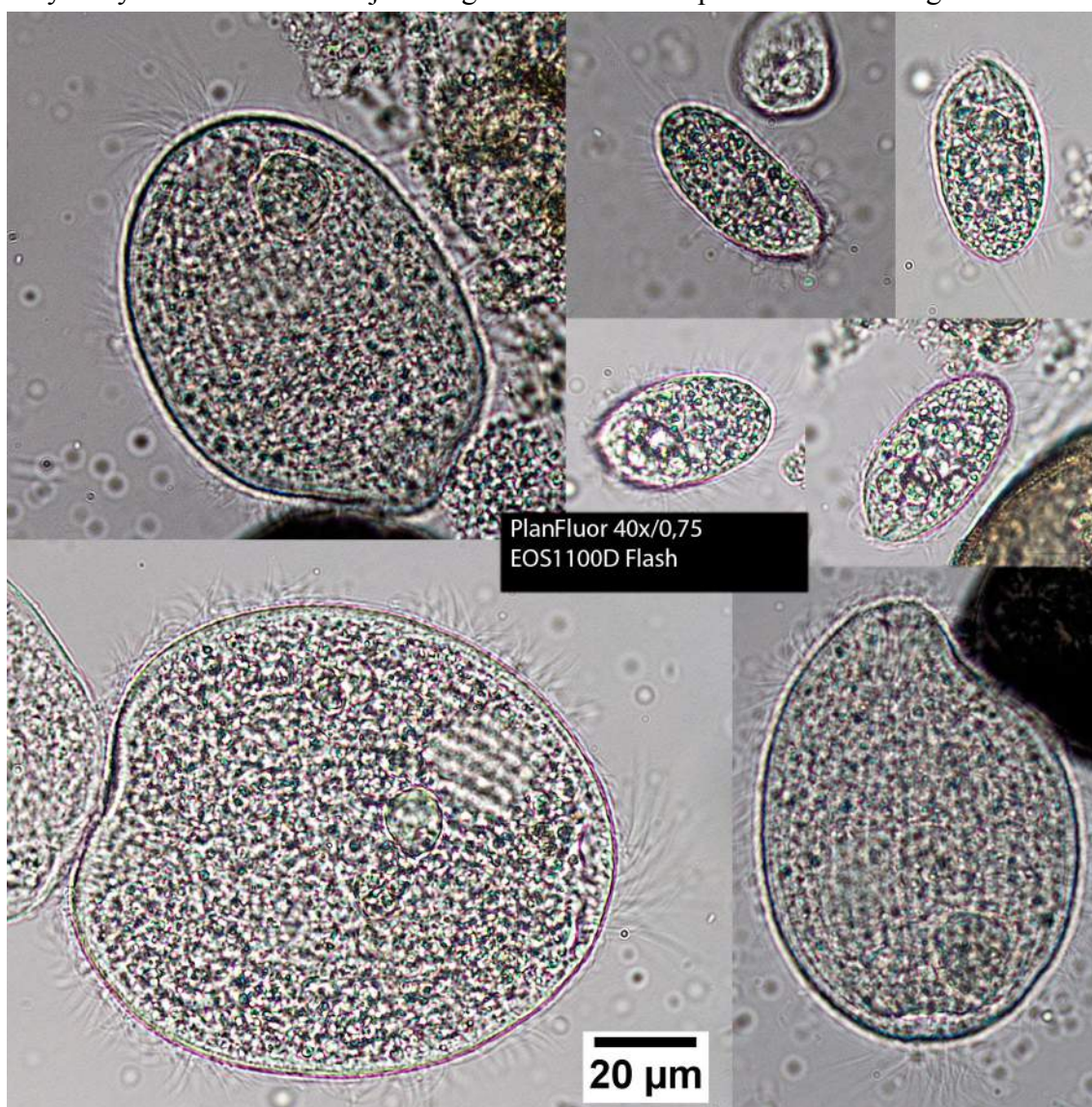
Różnicę w zdjęciach RAW konwertowanych do formatu TIFF oraz zdjęciach JPEG przedstawia fotografia 21.

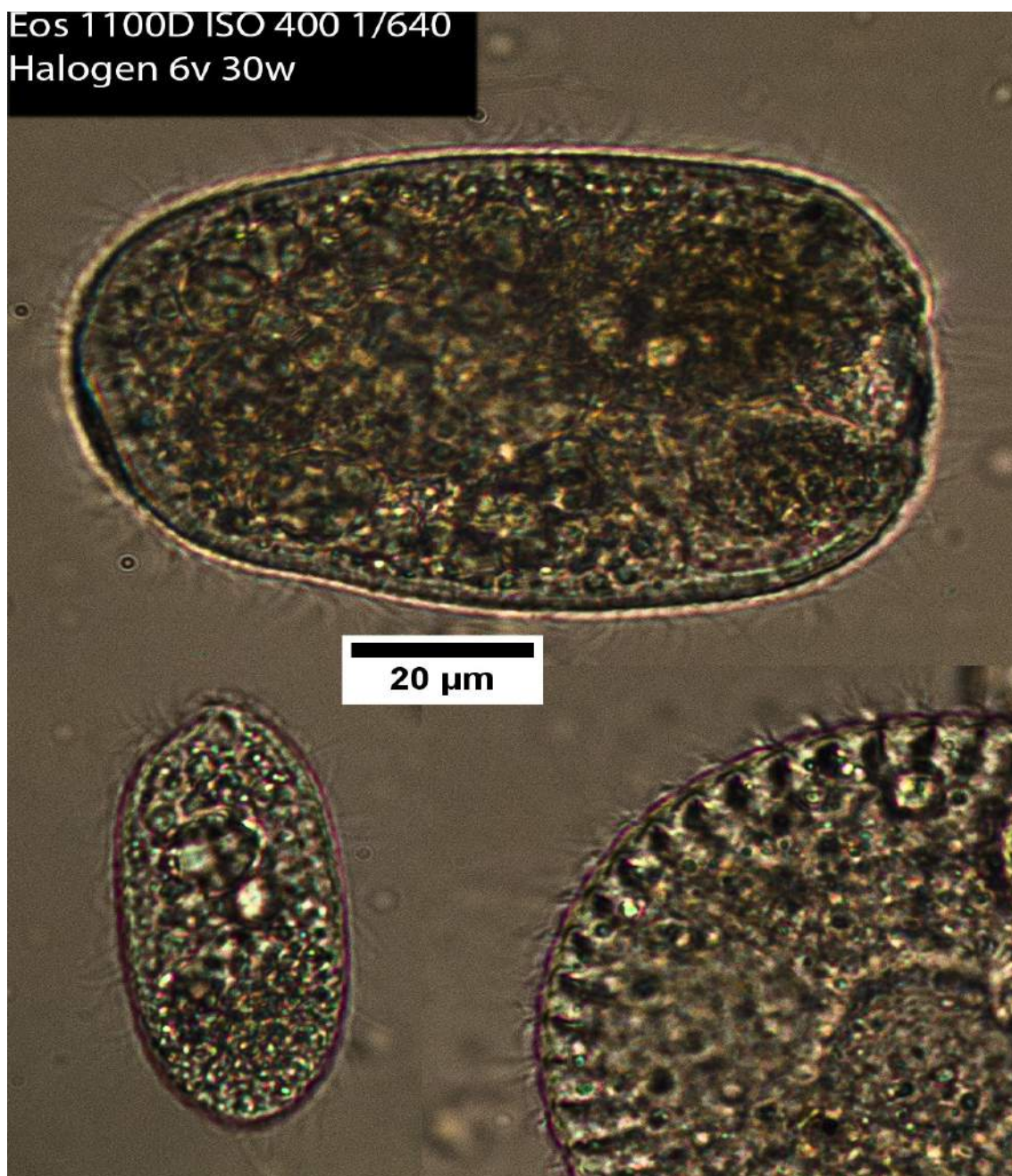


Fot 21. Góra: Fotografia barwionego przekroju anatomicznego rośliny naczyniowej w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sony a6000: ISO100, przysłona 2/3 Na, czas 1/8 sekundy. Dół lewo: wykadrowany fragment JPEG, zdjęcie automatycznie odszumione, o niższej rozpiętości tonalnej i nieostrych detalach. Dół prawo: wykadrowany fragment TIFF skonwertowanego z RAW, zdjęcie odszumione manualnie, o pełnej rozpiętości tonalnej oferowanej przez matrycę aparatu, o ostrych detalach.
Źródło: Opracowanie własne.

3.8. Lampa błyskowa.

W metodach nadawania kontrastu o dużych wymaganiach względem mocy oświetlacza oraz przy fotografii ruchliwych obiektów, ze względu na charakter pracy, użycie lampy błyskowej jest pożądane. Niektóre reakcje fizjologiczne wymagają bardzo krótkich czasów ekspozycji, np.: ruch rzęsek pierwotniaków, który dla uchwycenia ich ostro na zdjęciu, wymaga czasu ekspozycji rzędu $1/500 - 1/1000$. W takim wypadku, szumy tła będące efektem podwyższonej czułości ISO są na tyle znaczne że degradacja obrazu utrudnia interpretację. Korzystne jest użycie lampy błyskowej, która oferuje ekspozycję o czasie rzędu $1/8000 - 1/14000$ sekundy z zachowaniem niskiej światłoczułości. Przykładowe fotografie z wykorzystaniem lampy błyskowej przedstawia fotografia 22. Zdjęcia tego samego obiektu, ale z wykorzystaniem konwencjonalnego oświetlacza przedstawia fotografia 23.





Fot 23. Fotografie orzęsków w jasnym polu. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Canon EOS 1100D. Uwidocznienie rzęsek umożliwiło użycie czasu ekspozycji 1/640 sekundy. Przysłona domknięta do 2/3 Na. Lampa Halogenowa 30W z maksymalną mocą. W tych warunkach poziom szumów i warunki ekspozycji wymusiły użycie światłoczułości ISO 400, balans bieli auto. Fotografia nie była korygowana komputerowo.

Źródło: Opracowanie własne.

Fot 22. (strona 41) Fotografie orzęsków w jasnym polu. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Canon EOS 1100D. Przysłona domknięta do 2/3 Na. Lampa błyskowa, ISO 100, balans bieli auto. Fotografia nie była korygowana komputerowo.

Źródło: Opracowanie własne.

Aparat fotograficzny, korzystając z lampy błyskowej nie będzie używał funkcji EFSC, jednak ze względu na bardzo krótką ekspozycję, drgania spowodowane przez pracę migawki nie będą wpływały na ostrość zdjęcia. Również inne źródła wstrząsów zostaną zmarginalizowane, dlatego stosowanie lampy jest zawsze korzystne. Problematiczna może być praca automatyki aparatu. Dobrym rozwiązaniem jest manualne komponowanie ekspozycji, które wraz z praktyką przyjdzie łatwo, jednak jeśli z pewnych względów niezbędne będzie skorzystanie z programu, aparat będzie musiał posiadać funkcję pomiaru TTL (z ang. *Through the lens* – poprzez obiektyw), w przeciwnym wypadku stosowanie automatyki będzie nieuzasadnione.

Czas synchronizacji lampy błyskowej z migawką nie jest bardzo znaczącym parametrem, jednak im krótszy jest maksymalny czas, tym więcej możliwości oferuje użyta konfiguracja. W tym miejscu należy jednak zwrócić uwagę, że lampy z funkcją HSS (z ang. *high speed synchronization* – synchronizacja z migawką wysokiej szybkości) są w tym wypadku bezużyteczne ponieważ całkowicie zmienia się ich tryb pracy i bardziej przypomina on latarkę niż lampę błyskową. Zamiast jednego silnego impulsu, lampa emituje bardzo wiele słabych, z których jedynie niektóre będą trwałe w czasie ekspozycji. O ile w przypadku klasycznej fotografii może mieć to zalety, to w wypadku mikrofotografii efekt będzie identyczny jak z użyciem zwykłego oświetlacza mikroskopowego, podobnie wygląda to w wypadku lamp diodowych. Stąd też użyteczny czas synchronizacji będzie wynosił pomiędzy 1/80 a 1/500 sekundy przy czym rzeczywista ekspozycja nadal wyniesie jedynie 1/8000 - 1/14000 sekundy.

Autorowi nie są znane produkowane współcześnie, mikroskopowe lampy błyskowe. Możliwe jest dostosowanie lampy błyskowej do pracy z mikroskopem w serwisie lub samodzielnie. Najprostszym sposobem jest ułożenie lampy na porcie świetlnym mikroskopu. Nie wymaga to żadnych modyfikacji, jednak uniemożliwi obserwację preparatu co utrudni prawidłową kompozycję i fotografię obiektów ruchliwych. Dodatkowo, nie będzie możliwe prawidłowe oświetlenie według Koehlera, ponieważ pominięta zostaje przysłona polowa. Jednakże wciąż możliwe jest ustawienie oświetlenia krytycznego wg Abbego choć w tym przypadku mogą pojawić się aberracje związane z przesunięciem kondensora poza jego prawidłową odległość roboczą, dlatego nie jest zalecane korygowanie jego pozycji wobec lampy błyskowej.

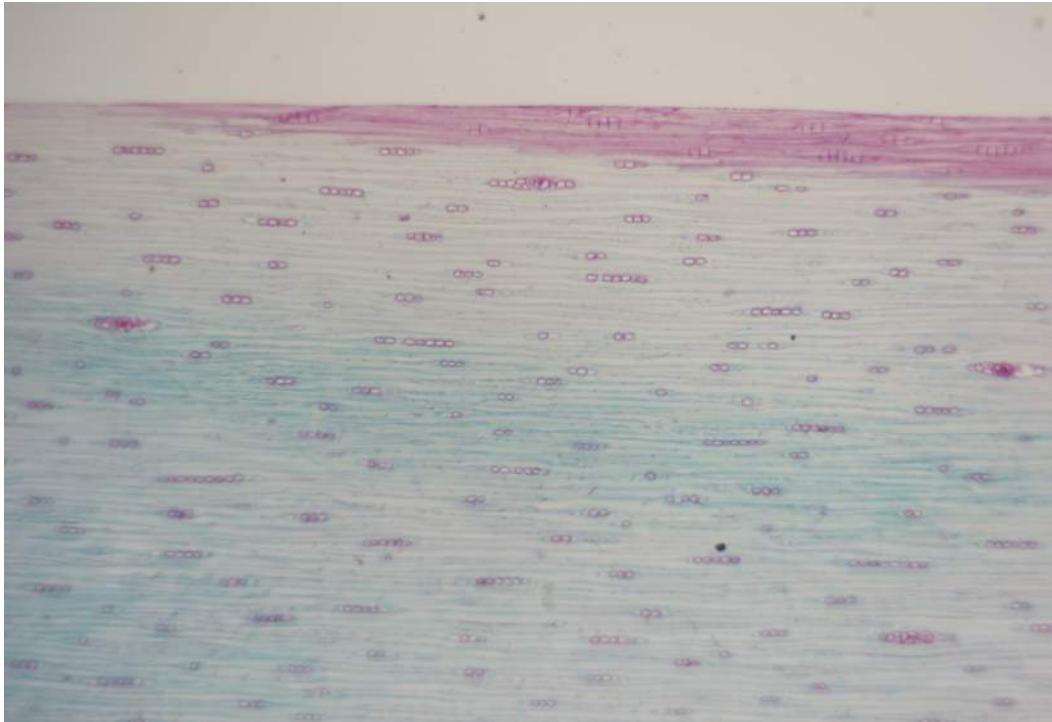
Kolejnym prostym sposobem jest użycie elementu światło dzielącego poprzez

umieszczenie go na porcie świetlnym w ten sposób, aby częściowo przepuszczał światło oświetlacza mikroskopowego a częściowo światło ustawionej z boku lampy błyskowej. Dzięki temu możliwa jest stała obserwacja i prawidłowe ustawienie oświetlenia Koehlera (pod warunkiem, że do lampy zostanie dołączona przysłona polowa). Najlepszym elementem będzie tutaj kostka światłodziela 20%/80% ustawiona tak, aby wprowadzała do kondensora 20% światła z oświetlacza, a 80% z lampy błyskowej. W przypadku braku takowego elementu możliwe jest zastosowanie szkiełka nakrywkowego ustawionego pod kątem 45 stopni wobec portu oświetlacza mikroskopowego oraz lampy błyskowej. Wadą takiego rozwiązania jest podatność konstrukcji na drgania, niska trwałość konstrukcji oraz utrata części mocy lampy.

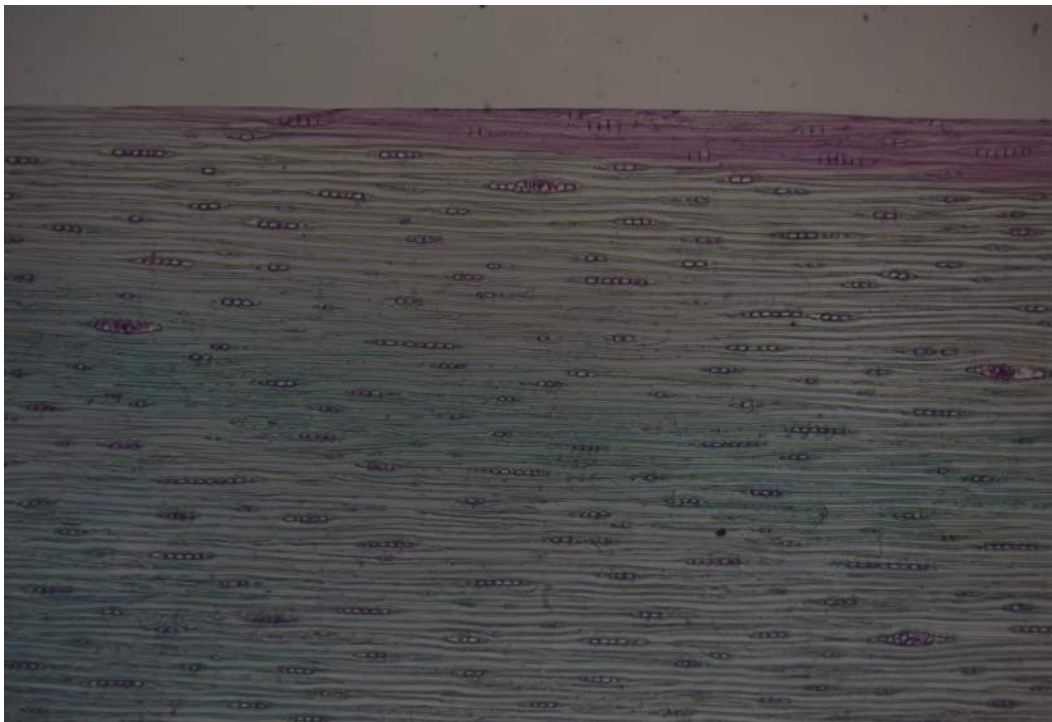
Kolejnym sposobem, wymagającym już modyfikacji jest umieszczenie lampy tuż za właściwym oświetlaczem mikroskopowym lub w miejscu lustra kolektora. Wadą tego rozwiązania jest utrata części mocy lampy wbudowanej oraz ewentualna konieczność trwałej modyfikacji. Rozwiązanie to jest możliwe jedynie w konstrukcjach, w których radiator oraz klatka oświetlacza znajduje się poza podstawą mikroskopu. Najlepszym sposobem adaptacji, jest przeniesienie palnika ksenonowego tuż za lub tuż przed żarnik oświetlacza mikroskopowego. Rozwiązanie to zapewni prawidłowe ustawienie oświetlenia według Koehlera, przy maksymalnym wykorzystaniu mocy lampy, jednak może wymagać trudnych przeróbek tubusu kolektora oraz oprawy oświetlacza.

3.9. Procedura wykonywania fotografii.

O jakości fotografii decyduje prawidłowy balans omówionych parametrów (przysłona, czas otwarcia migawki, światłoczułość ISO i balans bieli). Moc oświetlacza powinna być ustawiona na maksimum, a podział światła w nasadce okularowej dobrany tak, aby jak najwięcej trafiało do aparatu. Pierwszym krokiem jest ustawienie oświetlenia w mikroskopie. Jeśli konstrukcja posiada przysłonę polową, należy ustawić oświetlenie według Köhlera, jeżeli brak jest przysłony polowej, powinno się ustawić oświetlenie krytyczne. Następnie regulując przysłonę apertury, wybrać taką jej wartość, aby uzyskać pożądaną głębię ostrości i kontrast. Zdjęcie wykonane przed ustawieniem przysłon przedstawia fotografia 24. Zdjęcie z prawidłowo dobranymi przysłonami przedstawia fotografia 25.

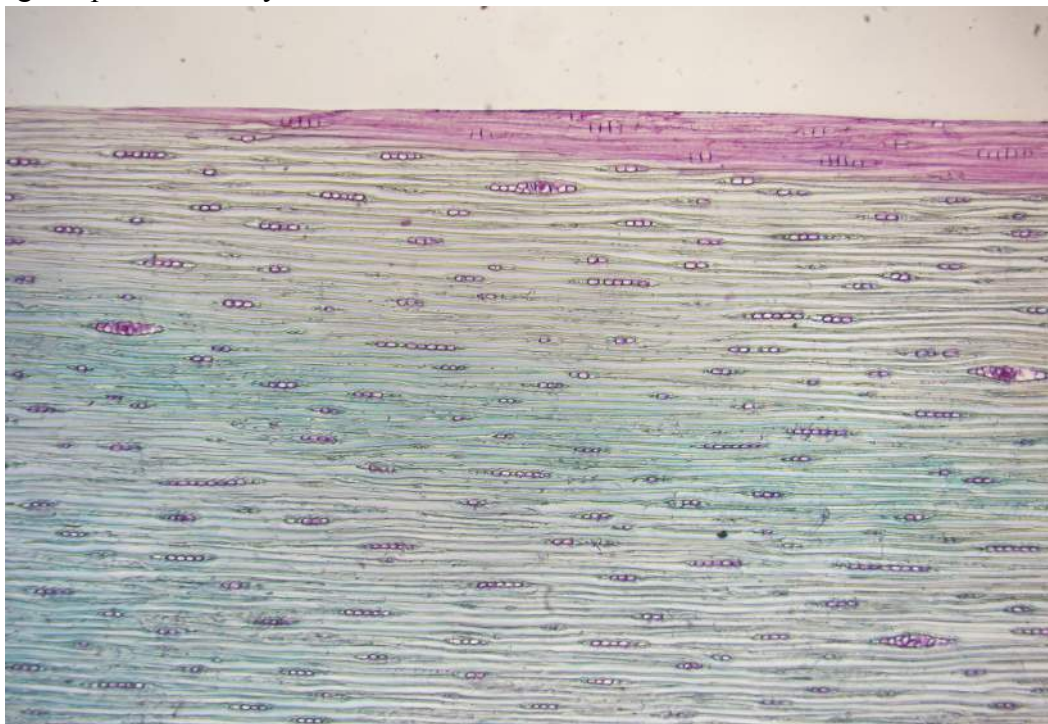


Fot 24. Fotografia barwionego przekroju poprzecznego przez drewno *Pinus Silvestris* . Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: przysłony szeroko otwarte, ISO 400, czas 1/800.
Źródło: Opracowanie własne.



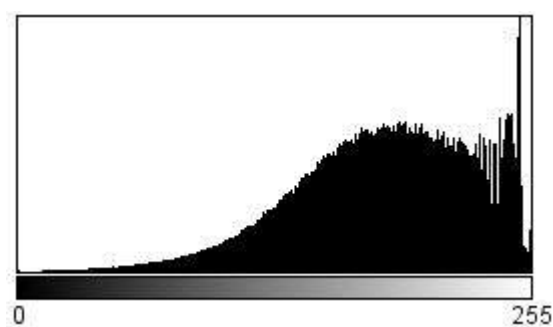
Fot 25. Fotografia barwionego przekroju poprzecznego przez drewno *Pinus Silvestris*. Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: przysłona połowa przymknięta do kadru, przysłona aperturowa do 1/3 Na, ISO 400, czas 1/800.
Źródło: Opracowanie własne.

Jeżeli obiekt jest statyczny, należy ustawić światłoczułość ISO na minimalną wartość a czas otwarcia migawki ustalić dla optymalnego histogramu. Jeśli obiekt jest ruchliwy, powinno się dobrać czas ekspozycji taki, aby ruch obiektu nie powodował rozmycia na zdjęciu, a następnie światłoczułość na taką wartość aby histogram był optymalny. Zdjęcie o dobrze dobranych parametrach przedstawia fotografia 26, jej histogram przedstawia rycina 12.



Fot 26. Fotografia barwionego przekroju poprzecznego przez drewno *Pinus Silvestris*. Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: przysłona połowa przymknięta do kadru, przysłona aperturowa do 1/3 Na, ISO 100, czas 1/125.

Źródło: Opracowanie własne.



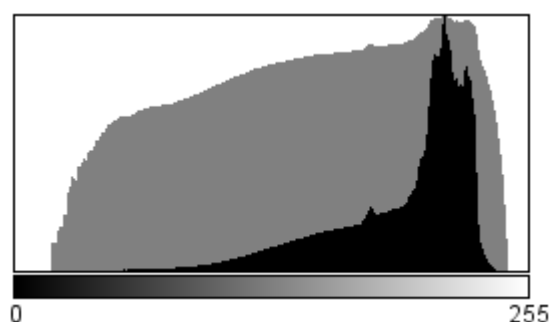
Ryc 12. Histogram fotografii 26. Prawidłowy kształt z rozkładem zbliżonym do wykładniczego.

Źródło: Opracowanie własne.

Jeżeli z pewnych przyczyn manualne ustawienie tych parametrów nie jest możliwe, można skorzystać z programów oferowanych przez aparat fotograficzny. Aby ich działanie było możliwe, aparat musi posiadać pomiar światła w systemie TTL (through the lens - z ang. poprzez obiektyw). Efekt będzie zależny od oprogramowania aparatu. Użyteczne w mikrofotografii tryby to: automatyczny i priorytet czasu (inaczej nazywany jako priorytet migawki „S”). Tryb automatyczny wszelkie decyzje pozostawia oprogramowaniu aparatu fotograficznego. Tryb priorytetu migawki automatycznie dobiera balans bieli i światłoczułość ISO względem ręcznie wybranego czasu ekspozycji. Tryby automatyczne przyspieszają czas wykonania fotografii, jednak pewne parametry ekspozycji mogą być źle dobrane a w przypadku panoram i stosów, zdjęcia mogą znacząco różnić się między sobą, dlatego zalecane jest korzystanie z trybu manualnego

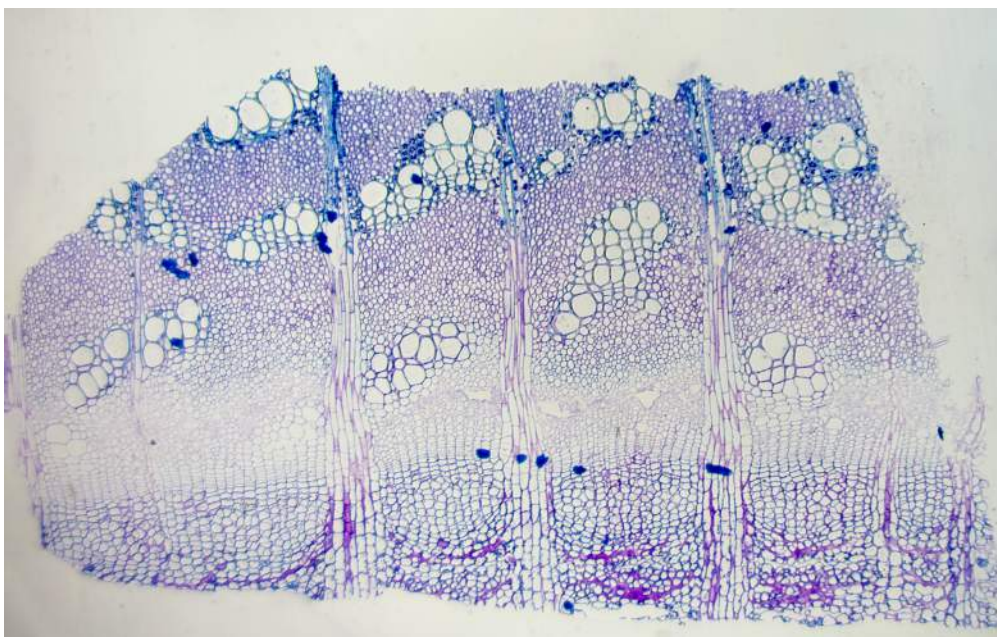
3.9.1 Fotografia w jasnym polu

Technika dla fotografii preparatów utrwalonych, barwionych, lub o naturalnym kontraście, jak na zdjęciu 27. Ze względu na jasne tło, histogram powinien posiadać charakterystyczny pik na granicy jasnej strony, tak jak na rycinie 13. Przysłona aperturowa powinna służyć jedynie dla regulacji głębi ostrości, światłoczułość ISO powinna być ustawiona na minimalnej wartości. Należy zwrócić szczególną uwagę, czy balans bieli jest poprawny. Ze względu na dużą wydajność świetlną, czas migawki dobrany tak, aby uzyskać optymalny histogram.



Ryc 13. Histogram fotografii 27. Wyraźny pik tła z jasnej strony z dobrze rozciągniętą częścią odpowiedzialną za szczegóły obiektu.

Źródło: Opracowanie własne.

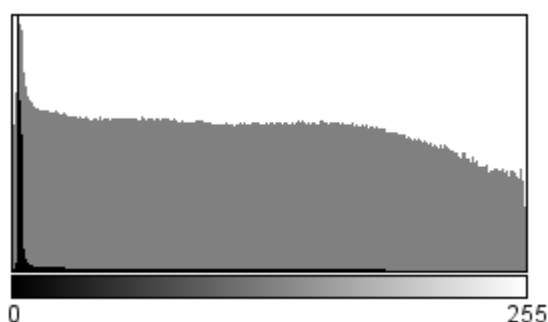


Fot 27. Fotografia barwionego przekroju poprzecznego przez kambium. Obiektyw PZO 5x/0.15. Sony a6000: przysłona 1/3 Na, ISO 100, czas 1/200.

Źródło: Opracowanie własne.

3.9.2. Fotografia w ciemnym polu

Technika dla fotografii preparatów przeżyciowych, barwionych lub niebarwionych, jak na zdjęciu 28. Histogram o pikie na granicy ciemnej strony z detalami obiektu silnie oddalonymi po stronie jasnej, jak na rycinie 14. Przysłona nie odgrywa roli, jednak technika nadaje się do tworzenia stosów. W przypadku ruchliwych obiektów, priorytetem jest czas naświetlania kosztem ISO.



Ryc 14. Histogram fotografii 28. Wyraźny pik tła z ciemnej strony z dobrze rozciągniętą częścią odpowiedzialną za szczegóły obiektu.

Źródło: Opracowanie własne.



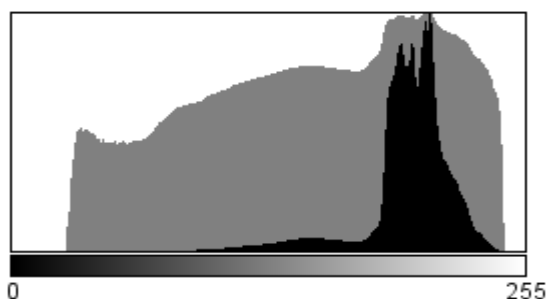
Fot 28. Fotografia preparatu przyżyciowego *Daphnia sp.*. Obiektyw PZO 10x/0.24.

Canon EOS 1100D: ISO 100, czas 1/50. Stos 16 fotografii.

Źródło: Opracowanie własne.

3.9.3. Fotografia w oświetleniu skośnym.

Technika dla fotografii preparatów przyżyciowych niezabarwionych lub słabo zabarwionych, jak na zdjęciu 29. Podobnie jak w jasnym polu, histogram o pikie tła na granicy jasnej strony. Ze względu na gradient, pik tła jest bardziej rozciągnięty, jak na rycinie 15. Przysłona apertury służy do nadawania kontrastu poprzez decentrowanie. Jeśli obiekt jest ruchliwy, należy dobrać czas taki, aby ruch nie powodował rozmycia a histogram zoptymalizować poprzez regulację światłoczułości ISO i zastosowanie filtrów obniżających natężenie światła ND.



Ryc 15. Histogram fotografii 29. Wyraźny pik tła z ciemnej strony z dobrze rozciągniętą częścią odpowiedzialną za szczegóły obiektu.

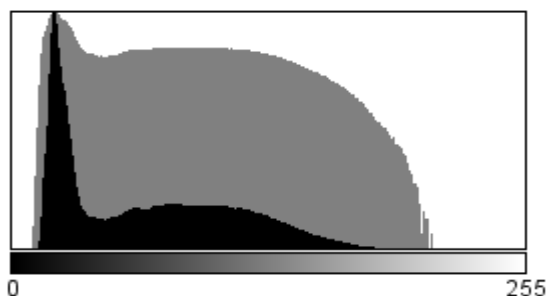
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 29. Fotografia preparatu przyżyciowego *Daphnia sp.* Obiektyw PZO 10x/0.24.
Sony a6000: ISO 100, czas 1/100, przysłona zdecentrowana przysłaniając 40% Na.
Źródło: Opracowanie własne.

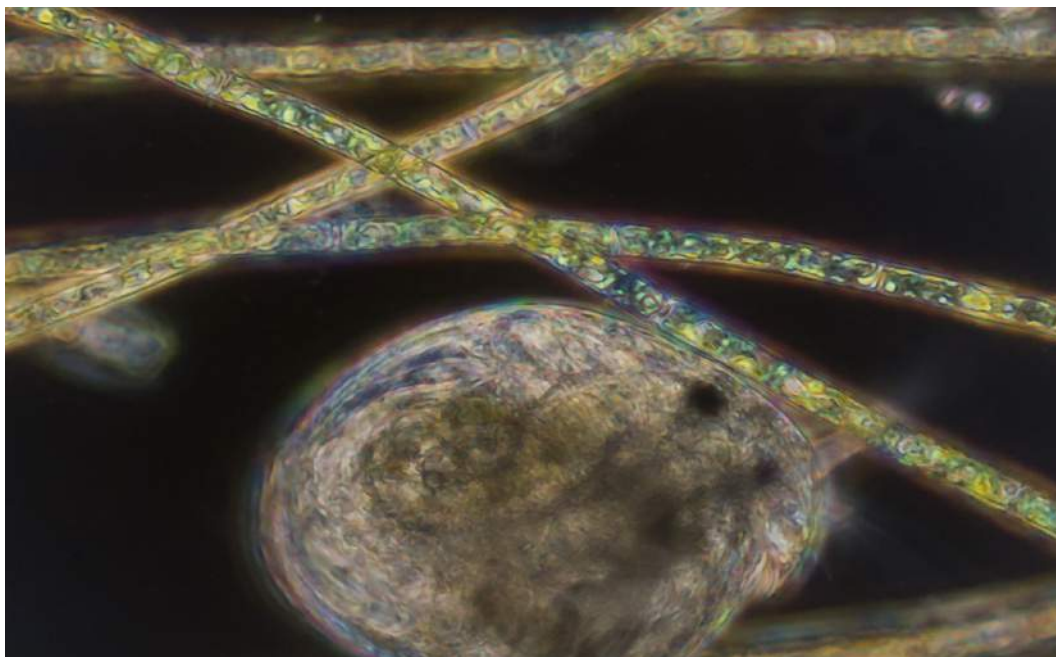
3.9.4. Fotografia w kontraście fazowym

Technika dla fotografii preparatów przyżyciowych niebarwionych i niekontrastowych, jak na zdjęciu 30. W zależności od użytej płytki fazowej oraz relacji pomiędzy obiektem a tłem pik tła znajduje się ze strony jasnej lub ciemnej. Piksele odpowiadające za obiekt, w związku z efektem halo, są wyraźnie odsunięte od piksu tła, jak na rycinie 16. Przysłona jest stała i nie podlega regulacji ze względu na to, technika ta nie nadaje się do fotografii grubych obiektów ani łączenia głębi ostrości. Jeśli obiekt jest ruchliwy, priorytetem powinien być czas naświetlania kosztem ISO.



Ryc 16. Histogram fotografii 30. Wyraźny pik tła z ciemnej strony z dobrze rozciągniętą i wyraźnie odsuniętą częścią odpowiedzialną za szczegóły obiektu.

Źródło: Opracowanie własne.



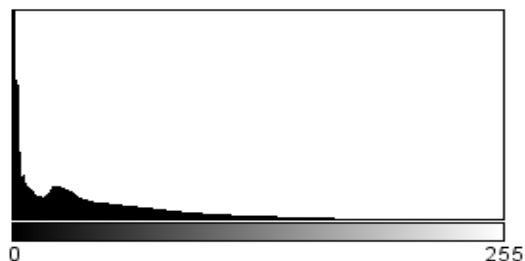
Fot 30. Fotografia preparatu przeżyciowego *Daphnia sp.* Obiektyw PZO 10x/0.24.

Sony a6000: ISO 100, czas 1/60.

Źródło: Opracowanie własne.

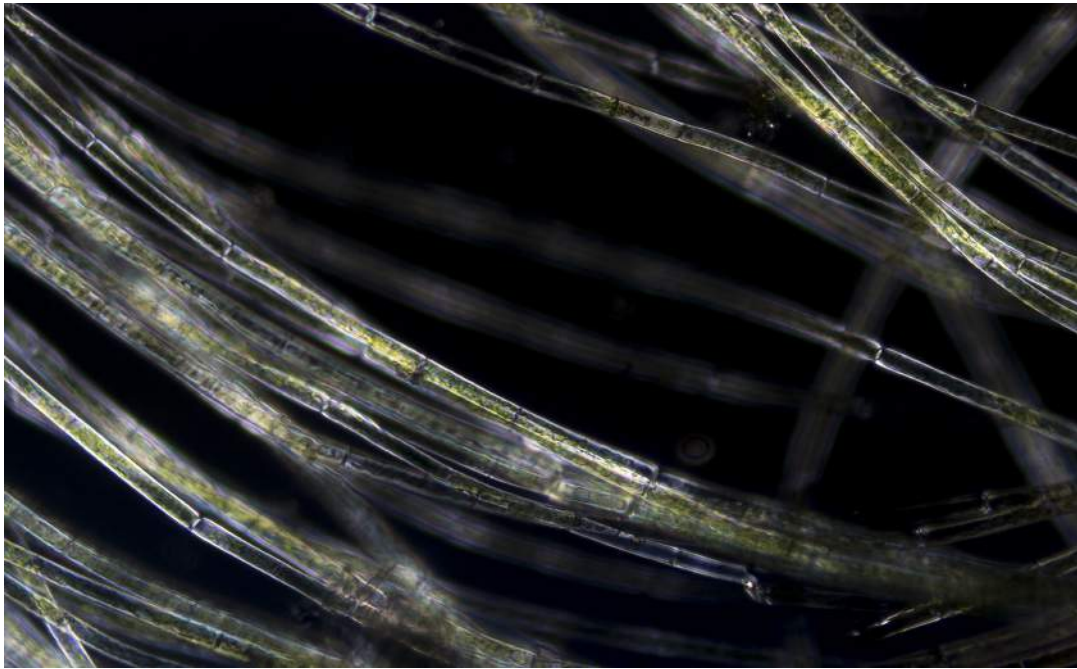
3.9.5. Fotografia w świetle spolaryzowanym.

Technika dla fotografii preparatów anizotropowych, z reguły nie ruchliwych, jak na fotografiach 31 i 32. Tło jest ciemno szare, dlatego pik znajduje się ze strony ciemnej. Piksele odpowiadające za detale obiektu, są wyraźnie odrzucone w kierunku strony jasnej histogramu, jak na rycinie 17. Metoda ta wymaga dużej mocy oświetlacza, jednak ze względu na statyczność obiektów, możliwe jest zachowanie niskiej światłoczułości ISO kosztem wydłużenia ekspozycji. Nieco inaczej wygląda histogram w przypadku zastosowania kompensatorów, jak na fotografii 32, gdzie zastosowano ćwierćfalówkę. Wtedy histogram przybiera formę nieregularną jak na rycinie 18.

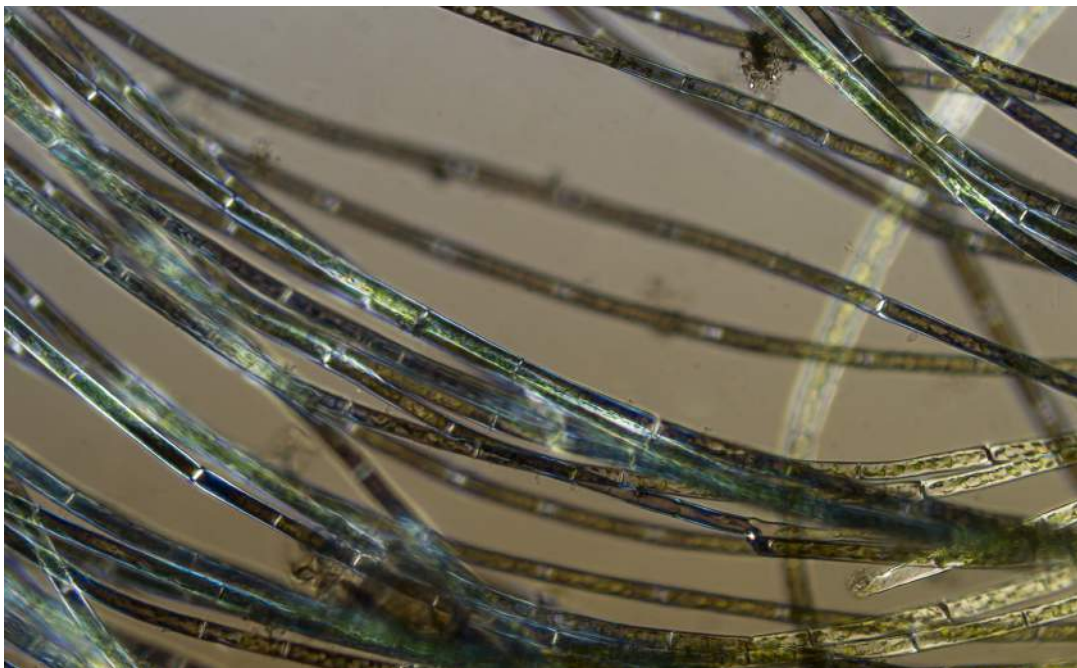


Ryc 17. Histogram fotografii 31. Wyraźny pik tła z ciemnej strony z odrzuconą częścią pikseli odpowiadających za szczegóły obiektu.

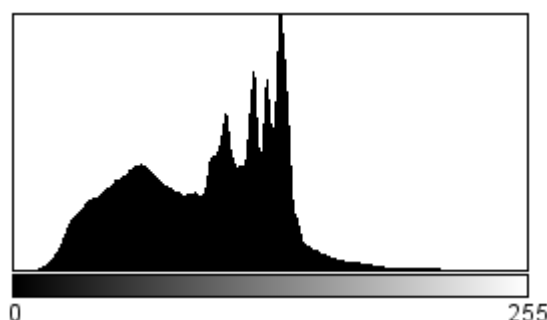
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 31. Fotografia preparatu przeżyciowego z glonami nitkowatymi. Obiektyw PZO 10x/0.24.
Sony a6000: ISO 100, czas 0,60 sekundy.
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 32. Fotografia preparatu przeżyciowego z glonami nitkowatymi, jak na fotografii 31 ale z wykorzystaniem ćwierćfalówki. Obiektyw PZO 10x/0.24. Sony a6000: ISO 100, czas 0,60 sekundy.
Źródło: Opracowanie własne.

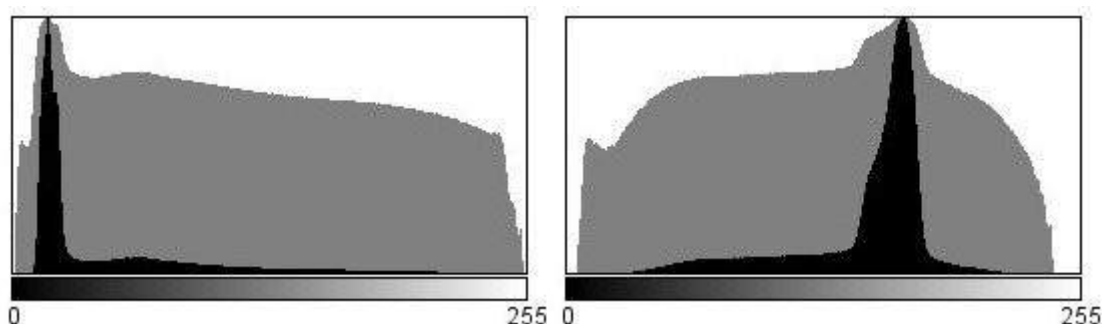


Ryc 18. Histogram fotografii 32. Po zastosowaniu ćwierćfalówki histogram przybiera formę nieregularną, lub zbliżoną do rozkładu normalnego.

Źródło: Opracowanie własne.

3.9.6. Fotografia w kontraście dyferencjalno-interferencyjnym DIC.

Technika dla fotografii preparatów przeźyciowych barwionych i niebarwionych, z pełną kontrolą barwy tła i obiektu, jak na zdjęciach 33 i 34. Histogram może przybrać kształt zbliżony do jasnego lub ciemnego pola oraz wartości pośrednie ze względu na możliwość regulacji odcienia tła i kontrastu, jak na rycinie 19. Metoda wymaga bardzo dużej mocy oświetlacza ale ze względu na bardzo małą głębię ostrości szczególnie nadaje się do tworzenia stosów i rekonstrukcji 3D. W takim wypadku przysłona aperturowa powinna być całkowicie otwarta. Czas otwarcia migawki powinien zostać dobrany tak, aby ruchy obiektu nie powodowały rozmycia detali na fotografii. Światłoczułość ISO powinna być dobrana tak, aby histogram był maksymalnie rozciągnięty.



Ryc 19. Po lewej: Histogram fotografii 33. Po prawej: Histogram fotografii 34. W zależności od wprowadzonej różnicy drogi optycznej, histogram może przybrać formę zbliżoną do ciemnego lub jasnego pola.

Źródło: Opracowanie własne.



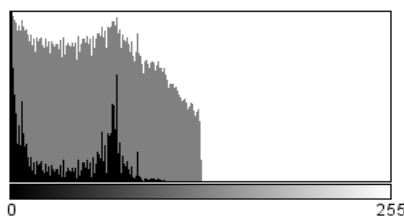
Fot 33. Fotografia preparatu przeżyciowego *Daphnia* sp. Zastosowano duże opóźnienie fali odniesienia. Obiektyw PZO 10x/0.24. Sony a6000: ISO 100, czas 1/3 sekundy.
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 34. Fotografia preparatu przeżyciowego *Daphnia* sp. zastosowano małe opóźnienie fali odniesienia. Obiektyw PZO 10x/0.24. Sony a6000: ISO 100, czas 1/13 sekundy.
Źródło: Opracowanie własne.

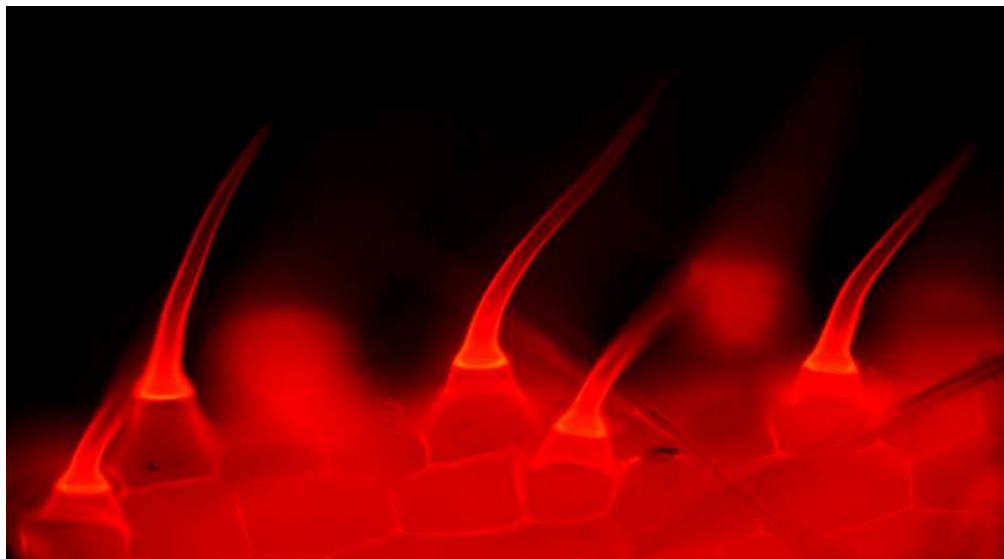
3.9.7. Fotografia we fluorescencji

Technika do fotografii autofluorescencji własnej obiektu, oraz przeżyciowych obiektów fluorochromowanych, jak na fotografii 35. Histogram jest zbliżony wyglądem do histogramu ciemnego pola, jednak obok wyraźnego pik tła, występują dodatkowe piki dla każdego kanału barwnego, jak na rycinie 20. Przysłona aperturowa powinna być maksymalnie otwarta. W przypadku fotografii obiektów ruchliwych czas należy ustalić na taki, aby ruchy preparatu nie powodowały rozmycia na fotografii a histogram doprowadzić do optymalnego poprzez regulację światłoczułości ISO. Dla uniknięcia szumów może być konieczne użycie lampy błyskowej. W przypadku długich ekspozycji, szumy zależą już nie tylko od ISO, ale również od czasu otwarcia migawki. W przypadku fotografii obiektów statycznych, należy doświadczalnie dobrać optymalny czas naświetlania i światłoczułość. Parametry te będą się różnić dla poszczególnych modeli aparatów, jak wykazano w rozdziale 3.5. .



Ryc 20. Histogram fotografii 35. Wyraźny pik tła z ciemnej strony oraz silnie oddalony pik odpowiedzialny za barwę czerwoną.

Źródło: Opracowanie własne.



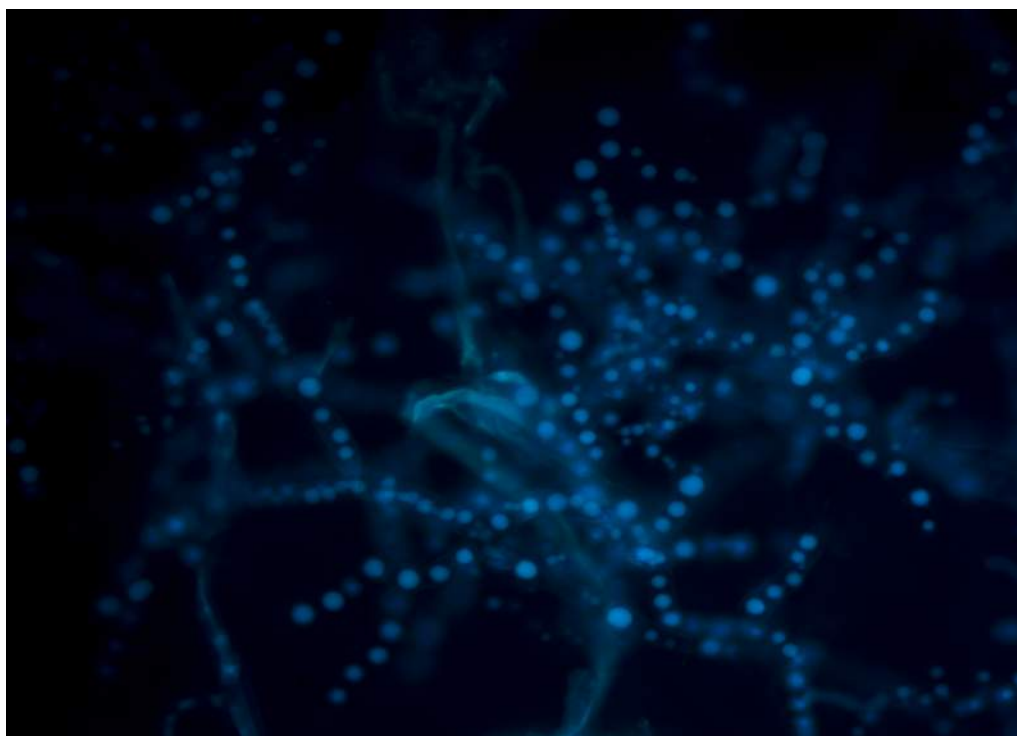
Fot 35. Fotografia preparatu przeżyciowego włosków na liściu *Zebrina pendula*. Fluorescencja zielona wzbudzana lampą HBO 100W. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 20x/0.50. Sony a6000: ISO 100, czas 1 sekunda.

Źródło: Opracowanie własne.

3.9.7 Fotografia we fluorescencji wraz z kontrastem fazowym lub DIC

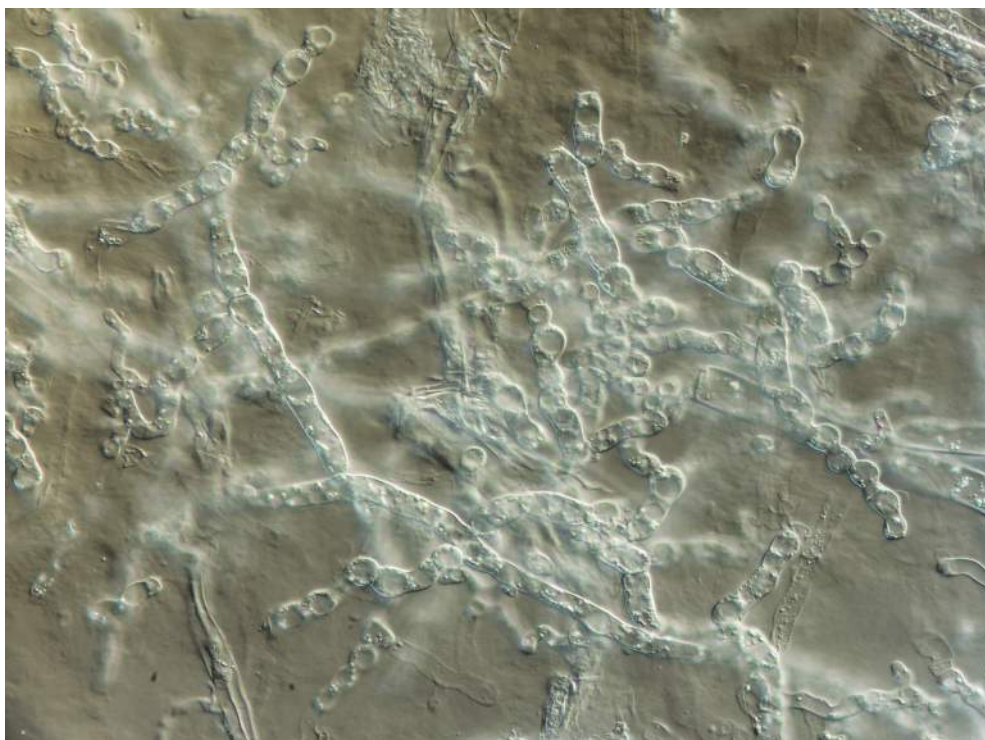
Możliwe są dwa podejścia do łączenia techniki fluorescencji i kontrastu fazowego bądź Nomarskiego. Pierwszy polega na wykonaniu dwóch fotografii: -pierwszej optymalnej dla fluorescencji, jak na zdjęciu 36 -drugiej, w technice tworzącej obraz tła, obiektów pozbawionych zdolności fluorescencji, jak na zdjęciu 37.

Następnie zdjęcia te są komputerowo łączone, w jedno wynikowe, jak na fotografii 38. Sposób ten ma tę zaletę, że gwarantuje dobrą ekspozycję wszystkich parametrów, jednak wymaga pracy z programem komputerowym. Drugi sposób polega na ustawieniu mikroskopu i aparatu optymalnie na fluorescencję, a następnie uruchomieniu oświetlacza kontrastu fazowego/DIC i eksperymentalne ustawienie wartości, która nie zaburzy obrazu fluorescencyjnego. W przypadku użytkowania lampy żarowej lub halogenowej, ze względu na niskie napięcie, może być konieczne użycie filtrów korygujących barwę lub zwiększenie mocy lampy i użycie filtrów szarych. Fotografia wykonana w ten sposób oraz omówienie funkcjonowania filtrów znajduje się w rozdziale 3.6. .



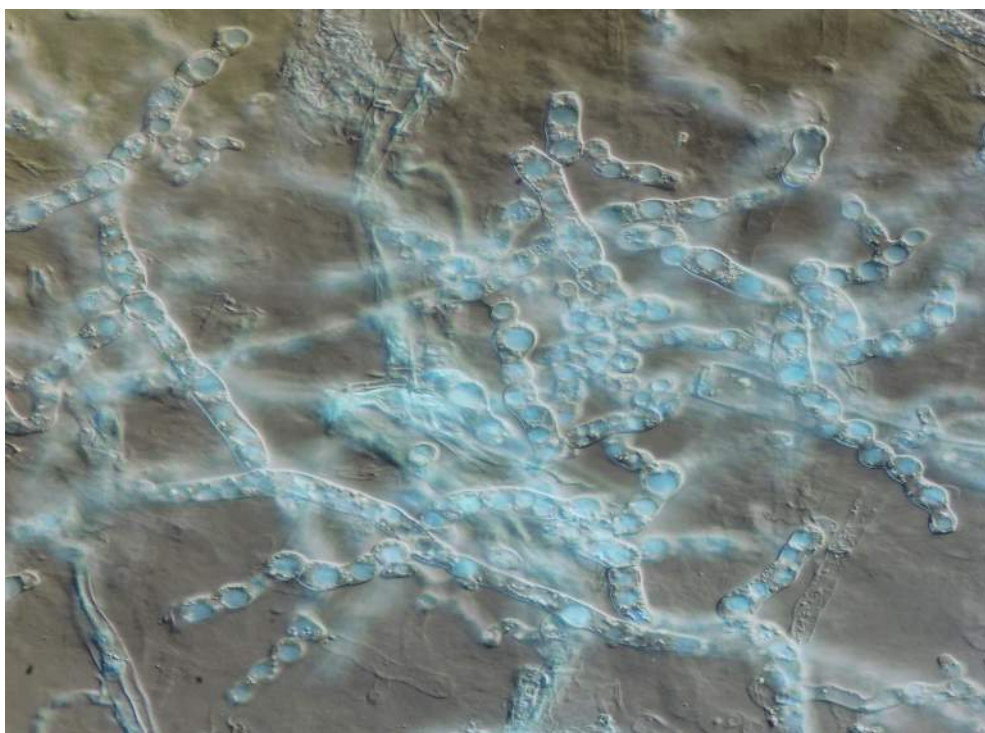
Fot 36. Fotografia preparatu przeżyciowego strzępek *Rhizoctonia sp.* barwionego DAPI. Fluorescencja UV wzbudzana lampą HBO 100W. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sony a6000: ISO 100, czas 5 sekund.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 37. Fotografia preparatu przeżyciowego strzępek *Rhizoctonia sp.* w kontraście DIC. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sony a6000: ISO 100, czas 5 sekund.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 38. Fotografia będąca komputerowo wykonanym kompozytem zdjęć 36, wykonanego we fluorescencji i 37, wykonanego w DIC.

Źródło: Opracowanie własne.

3.10. Komputerowe wywoływanie fotografii.

Wykonując fotografie w formacie JPEG lub TIFF, dobór większości parametrów pozostawia się oprogramowaniu aparatu fotograficznego lub kamery mikroskopowej. Każda kolejna korekcja i operacja na tych formatach wiąże się z pogarszaniem jakości zdjęcia. Dzięki wykorzystaniu formatu RAW, możliwe jest automatyczne wywoływanie fotografii z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego, z późniejszymi poprawkami ręcznymi. Poniższa procedura jest zmodyfikowaną i rozszerzoną dla potrzeb aparatów fotograficznych propozycją przedstawioną w [1] (D. B. Murphy 2002).

3.10.1. Kadrowanie.

Przed przystąpieniem do dalszej obróbki zdjęcia, należy je wykadrować. Operacja ta polega na obcięciu zbędnych elementów zdjęcia takich jak brzegi przysłony polowej i nadmiar nadmiarowe tło. Dzięki temu z histogramu usunięte zostają zbędne piksele i łatwiejsza jest jego ocena przy dalszych etapach optymalizowania fotografii. Możliwe jest również usunięcie punktów będących efektami zanieczyszczenia matrycy światłoczułej. Fotografia JPEG jest przedstawiona na zdjęciu 39, natomiast wykadrowana fotografia RAW jest przedstawiona na zdjęciu 40.



Fot 39. Fotografia preparatu przyżyciowego *Daphnia sp.* w kontraście DIC Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 20x/0.50. Sony a6000: ISO 100, czas 1/50 sekundy.

Źródło: Opracowanie własne.



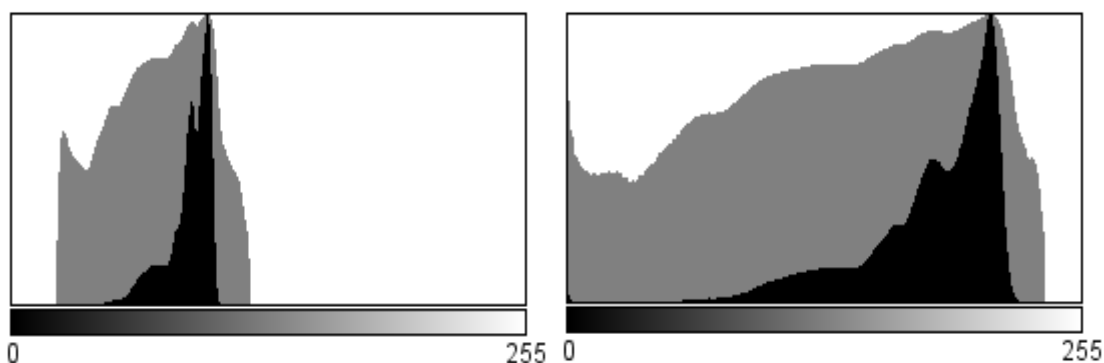
Fot 40. Fotografia 39 po wykadrowaniu brzegów przysłony połowej oraz nadmiarowego tła.
Źródło: Opracowanie własne.

3.10.2. Korekcja histogramu.

Dzięki możliwości precyzyjnego operowania na histogramie, możliwe jest szybkie i bezstratne korygowanie histogramu. Możliwe jest selektywne rozjaśnienie lub przyciemnienie poszczególnych obiektów na fotografii, zmiana jasności i kontrastu ogólnego poprzez przesuwanie i rozciąganie histogramu. Po poprawieniu fotografii 40, otrzymano fotografię 41, o optymalnym rozkładzie pikseli. Zmianę wyglądu histogramu przedstawia rycina 21.



Fot 41. Fotografia 40 po zoptymalizowaniu histogramu poprzez jego rozciągnięcie, rozjaśnienie pikseli odpowiadających za tło, przesunięcie pikseli odpowiadających za obiekt w stronę ciemną.
Źródło: Opracowanie własne.



Ryc 21. Po lewej: histogram fotografii 40. Po prawej histogram fotografii 41. Prawy histogram jest prawidłowo rozciągnięty w całej skali szarości.

Źródło: Opracowanie własne.

3.10.3. Odszumianie.

Normalnym zjawiskiem jest występowanie szumów na fotografii. Ich usuwanie wiąże się z utratą ostrości, dlatego dobrze jest ręcznie ustalić poziom odszumiania poprzez inspekcję pikseli pod dużym powiększeniem cyfrowym. Pozostawienie tej operacji automatyce aparatu może się wiązać z utratą krytycznych informacji lub poziomem szumów wyższym niż optymalny. Efekt ręcznego odszumiania przedstawia fotografia 41.

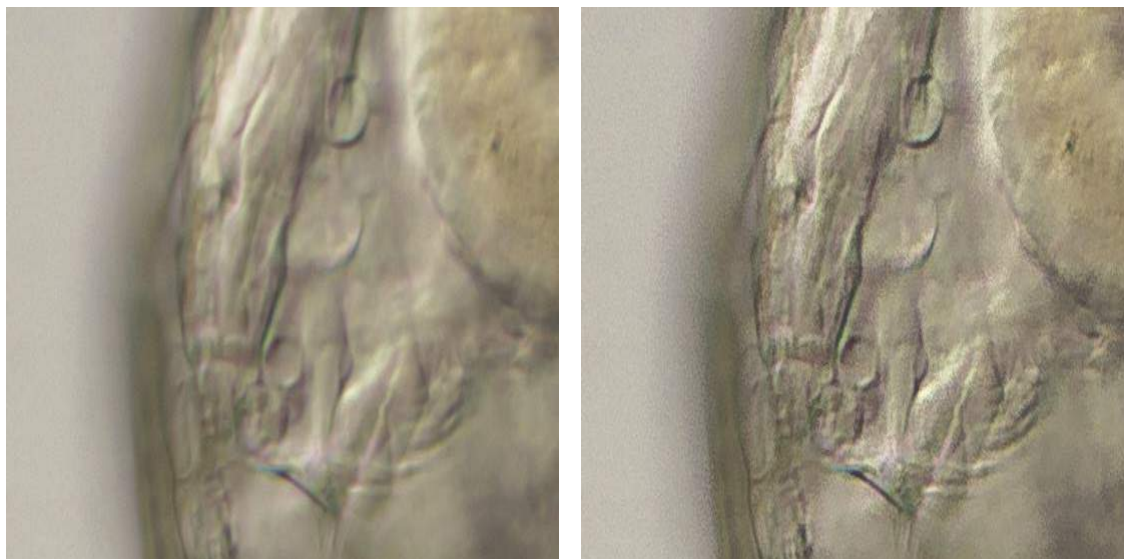


Fot 41. Wykadrowany fragment fotografii 41. Po lewej: przed zastosowaniem odszumiania. Po prawej: po komputerowym odszumianiu. Usunięto ziarnistość przy zachowaniu wszystkich detali.

Źródło: Opracowanie własne.

3.10.4. Wyostanie.

Fotografie JPEG i TIFF są automatycznie wyostane przez oprogramowanie aparatu zgodnie z algorytmem uwzględniającym niedoskonałości obiektywów i matrycy. Fotografie RAW znacznie ustępują ostrością ponieważ nie zostawały poddawane procesowi wyostania. W związku z tym, że w przypadku mikroskopii aparat jest pozbawiony informacji o parametrach obiektywu, korzystniejsze jest ręczne wyostanie. Dzięki wykorzystaniu odpowiedniego oprogramowania komputerowego, możliwe jest ręczne ustawienie parametrów tak obszar ignorowany w procesie, promień i ilość wyostania. Dzięki temu unika się wzmacniania szumów i precyzyjnie dobiera parametry dla nadania obiektowi naturalnego wyglądu. Efekt manualnego wyostania przedstawia fotografia 42.



Fot 42. Wykadrowany fragment fotografii 41. Po lewej: przed zastosowaniem wyostania. Po prawej: po komputerowym wyostaniu. Wybrano elementy podlegające wyostaniu, oraz intensywność procesu.

Źródło: Opracowanie własne.

3.10.5. Usuwanie aberracji chromatycznej i winety.

Każdy obiektyw cechuje się nierównomierną transmitancją w całym polu odwzorowanego obrazu oraz pewną ilością aberracji chromatycznej. W przypadku fotografii, aparat wczytuje dane o ich obecności z elektroniki obiektywu, w mikroskopii takich danych brak i proces ten musi odbyć się ręcznie z wykorzystaniem odpowiedniego oprogramowania. Operacja jest prosta i polega na wybraniu barwy aberracji chromatycznej i jej intensywności oraz gradientu winety. Następnie program automatycznie usunie je na podstawie dostarczonych informacji. Zdjęcie przed usunięciem aberracji chromatycznych przedstawia fotografia 43,a po jej usunięciu - 44.



Fot 43. Wykadrowany fragment fotografii 41 przed zastosowaniem korekcji aberracji chromatycznej widocznej w formie czerwono-brunatnych i zielono-niebieskich linii na granicy obiektu i tła
Źródło: Opracowanie własne.



Fot 44. Wykadrowany fragment fotografii 41 po zastosowaniu korekcji aberracji chromatycznej. Usunięto barwę czerwono brunatną oraz zieloną. Widoczne są pozostałości barwy niebieskiej.
Źródło: Opracowanie własne.

3.10.6. Konwersja do formatu TIFF/JPEG i normalizacja fotografii.

Końcowym etapem jest konwersja do powszechnie uznanego formatu. Jest to zazwyczaj JPEG, o dużej kompresji i małym rozmiarze. Jeśli istotne jest zachowanie informacji na granicy zdolności rozdzielczej lub późniejszy wydruk w wysokiej jakości, lepszy jest format TIFF, który dodatkowo cechuje się większą rozpiętością tonalną niż JPEG. Należy wybrać stopień kompresji co stanowi o kompromisie pomiędzy jakością a rozmiarem, liczbę pikseli na cal – standardem jest trzysta, oraz normalizację kolorów do RGB w przypadku dystrybucji cyfrowej lub palety CMYK dla wydruku. Zdjęcie wynikowe obróbki komputerowej i normalizacji przedstawia fotografia 45.



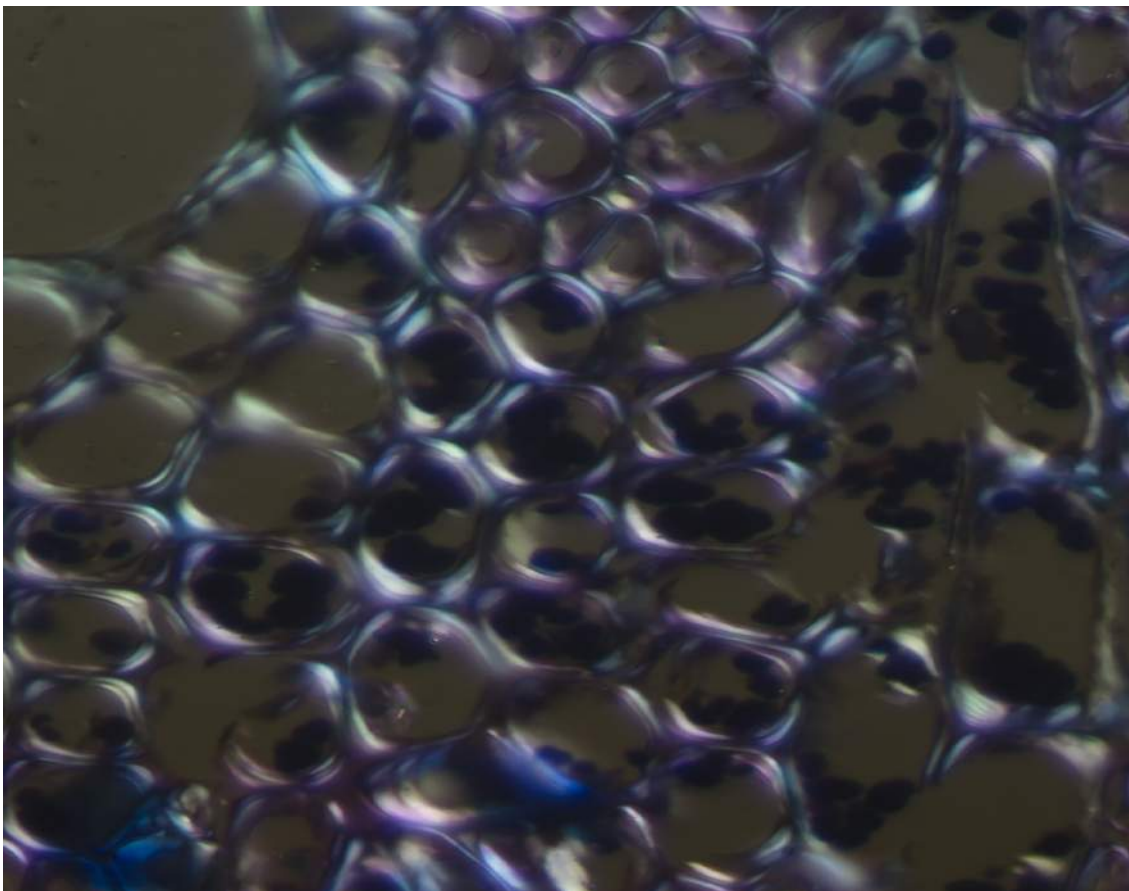
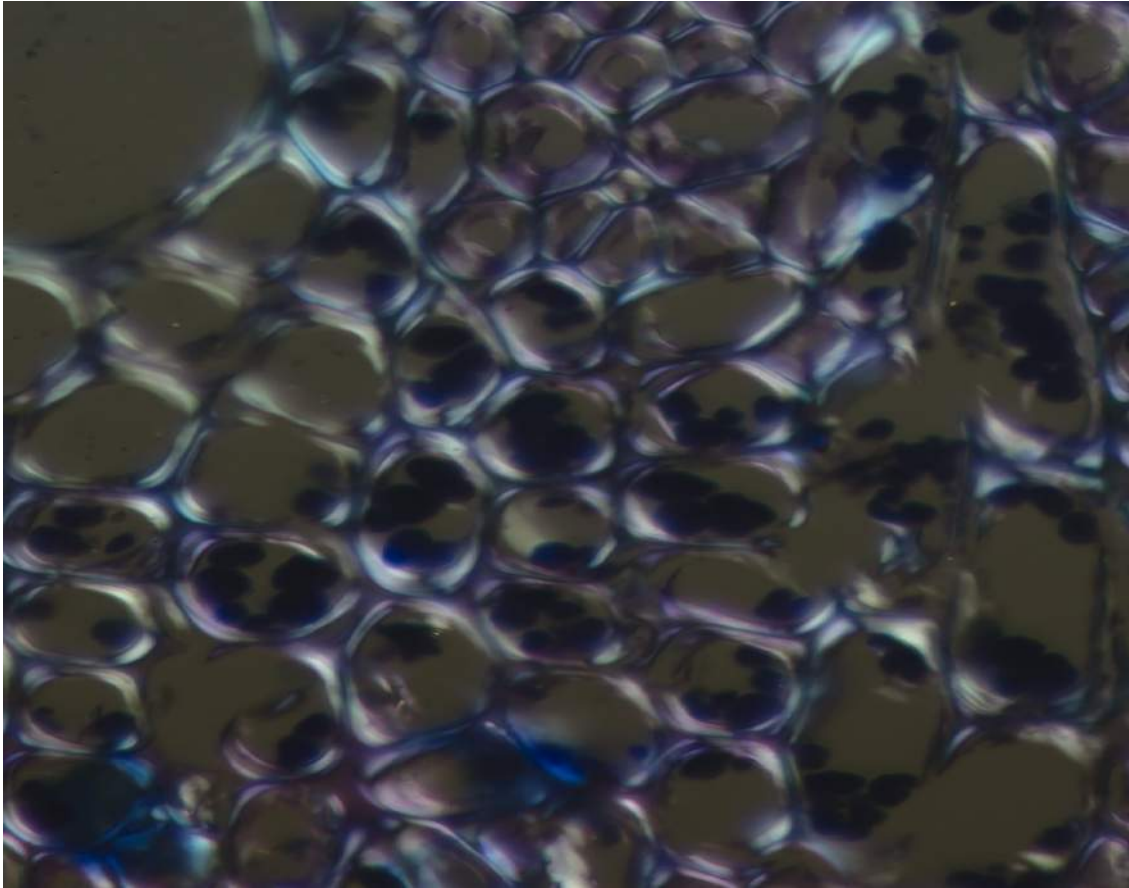
Fot 45. Fotografia będąca końcowym efektem komputerowego wywoływania i optymalizacji zdjęcia 39. Zastosowano: kadrowanie, eliminację zabrudzeń matrycy, optymalizację histogramu, odsumianie, wyostrażanie, korekcję winety, usuwanie aberracji chromatycznej, optymalizację do sRGB.
Źródło: Opracowanie własne.

3.11. Stereopary.

Stereopary są zazwyczaj wykonywane na mikroskopach stereoskopowych poprzez wykonywanie fotografii naprzemiennie poprzez prawe i lewe soczewki Galileusza, znajdujące się nad obiektywem głównym. Możliwe jest również wykonywanie stereopar na mikroskopach klasycznych i odwróconych we wszystkich technikach poprzez decentrowanie przysłony aperturowej w taki sposób, aby uzyskać pożądany kąt konwergencji. Procedura jest identyczna jak w przypadku oświetlenia skośnego, jednak jedną fotografię wykonuje się z przesłoną przesuniętą w lewą stronę, a drugą w prawą stronę względem osi mikroskopu. Jeśli nie ma możliwości decentrowania przysłony w kondensorze, możliwe jest zastosowanie przysłony wykonanej ręcznie i umieszczenie jej tuż pod kondensorem. Stereopary mogą być następnie prezentowane równolegle lub połączone komputerowo z użyciem okularów. Zdjęcia wykonane w ten sposób przedstawia fotografia 46. Zdjęcia należy oglądać z odległości około 40 centymetrów, z płaskim przedmiotem pomiędzy oczyma a stereoparami. Przedmiot ten powinien być umieszczony w taki sposób, aby lewe oko widziało jedynie lewą fotografię, a prawe jedynie prawą.

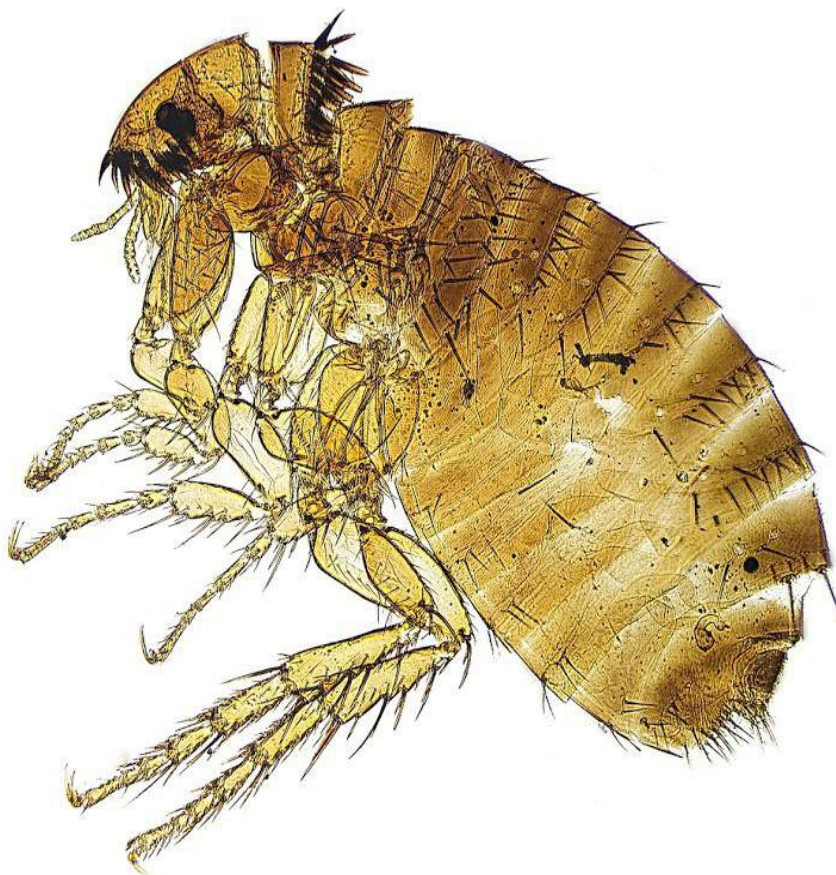
Fot 46. (strona 65) Wykadrowana fotografia barwionego przekroju anatomicznego rośliny naczyniowej w kontraście DIC wykonana metodą decentrowania przysłony. Obiektyw Nikon CFN Plan Fluor 40x/0.75. Sony a6000: ISO100, czas 0.6 sekundy.

Źródło: Opracowanie własne.



3.12. Panoramy.

Zdjęcia panoramiczne są efektem połączenia wielu mniejszych fotografii w płaszczyznach poziomych "X" i "Y". Dzięki temu możliwe jest tworzenie nieograniczonych rozmiarem obrazów dużych obiektów, z wysoką rozdzielczością, oferowaną przez silne obiektywy o wysokich aperturach. Zdjęcia powinny być wykonywane w taki sposób, aby każde kolejne w pewnym stopniu zachodziło na siebie. Zalecane jest wykonywanie fotografii w trybie manualnym, który zapewni powtarzalność ekspozycji i ułatwi ich późniejsze składanie komputerowe. Zdjęcia panoramiczne mogą być wykonane z wykorzystaniem programu aparatu fotograficznego lub poprzez komputerowe składanie wielu mniejszych fotografii. Program aparatu nie oferuje żadnej możliwości ingerencji w fotografię, natomiast proces komputerowy może być w pełni kontrolowany i zawiera takie elementy jak mieszanie warstw i korekcję geometryczną gwarantujące wysoką jakość kompozytu. Komputerowo wygenerowaną panoramę przedstawia fotografia 47.



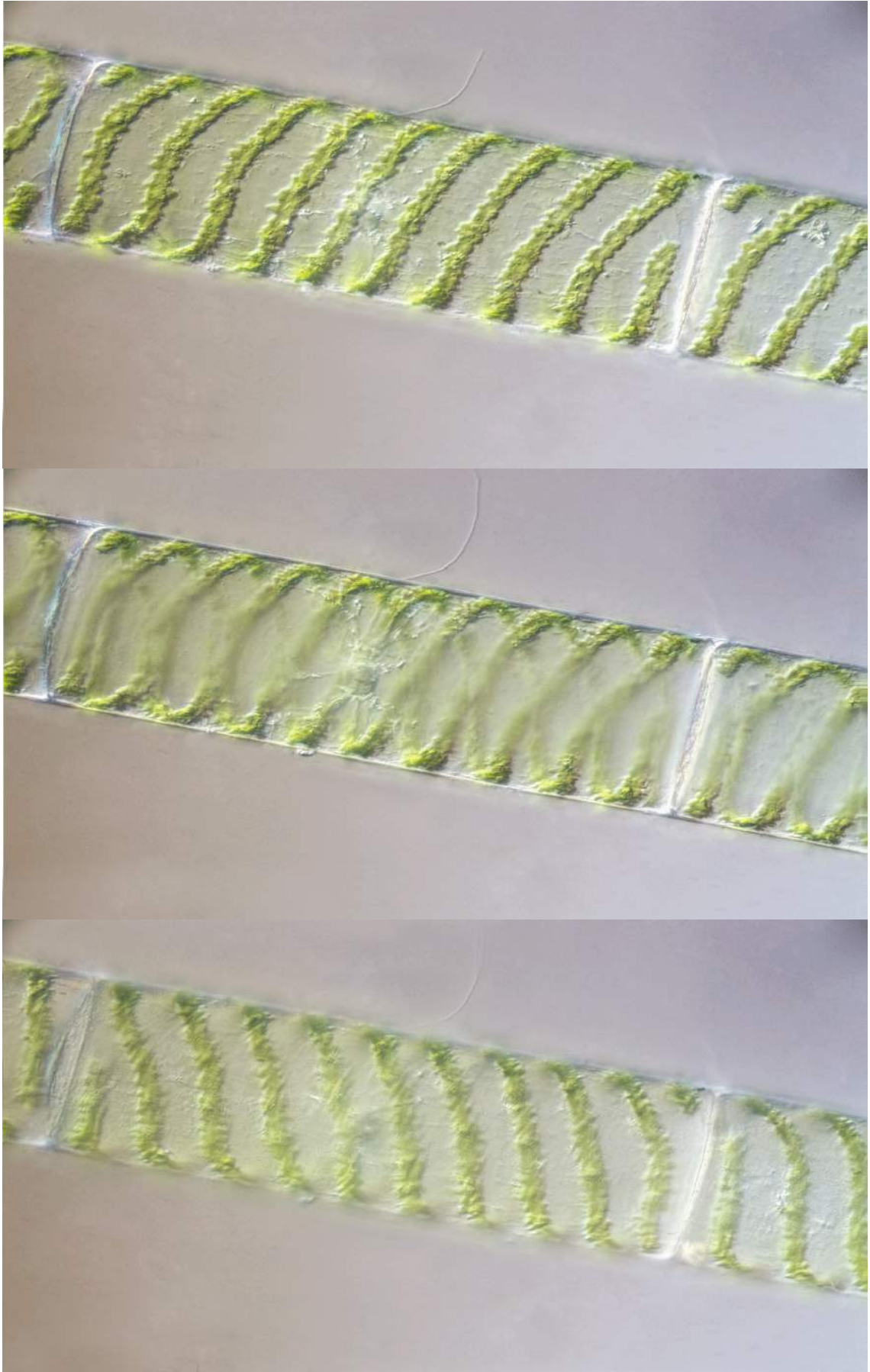
Fot 47. Fotografia *Ctenocephalides canis*. Obiektyw PZO 10x/0.24. Panorama z dziewięciu fotografii.
Źródło: Opracowanie własne.

3.13.1. Stosy.

Stosy stanowią szereg fotografii jednego obiektu, wykonanych na różnych poziomach głębi ostrości osi "Z". Fotografie te można zaprezentować w formie pliku zawierającego wszystkie ujęcia i wyświetlającego go naprzemiennie, przykładowo w formacie GIF. Innym sposobem jest komputerowe połączenie wszystkich tych zdjęć w jedno, zawierające ostre fragmenty wszystkich składowych. Fotografie należy wykonywać tak, aby poziomy ostrości zachodziły na siebie. Dzięki temu algorytm jest w stanie wybrać ostre fragmenty i prawidłowo połączyć je w jedno ujęcie. Pierwszą metodę stosuje się w wypadku obiektów częściowo przezroczystych, które dają fotografie z ostrymi detalami w tym samym punkcie "X,Y" na wielu płaszczyznach osi "Z", jak na zdjęciu 48. Druga metoda jest stosowana do obiektów nieprzezroczystych, w których punkt "X, Y" zawiera ostre detale jedynie na jednej płaszczyźnie osi "Z", jak na zdjęciu 49.

Fot 48. (strona 68) Fotografie preparatu przeżyciowego *Spirogyra sp.* w kontraście DIC wykonane na różnych poziomach głębi ostrości. Po połączeniu w plik GIF mogą być wyświetlane naprzemiennie dla zobrazowania budowy wewnętrznej.

Źródło: Opracowanie własne.



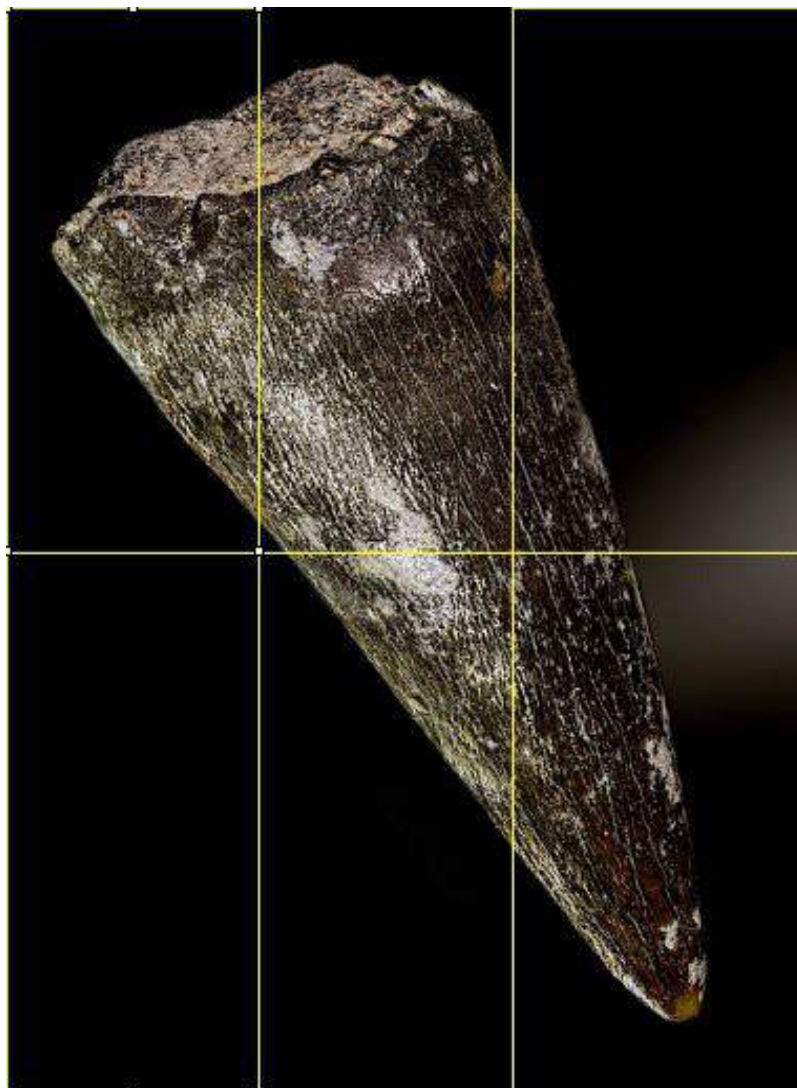


Fot 49. Fotografia wypreparowanej *Musca domestica*. Światło odbite przez obiektyw, mikroskop stereoskopowy PZO 5x. Sony a6000: ISO 100, przysłona domknięta do 1/3 NA, czas 1/40 sekundy. Stos z 48 fotografii.

Źródło: Opracowanie własne.

3.13.2. Stosy panoramiczne.

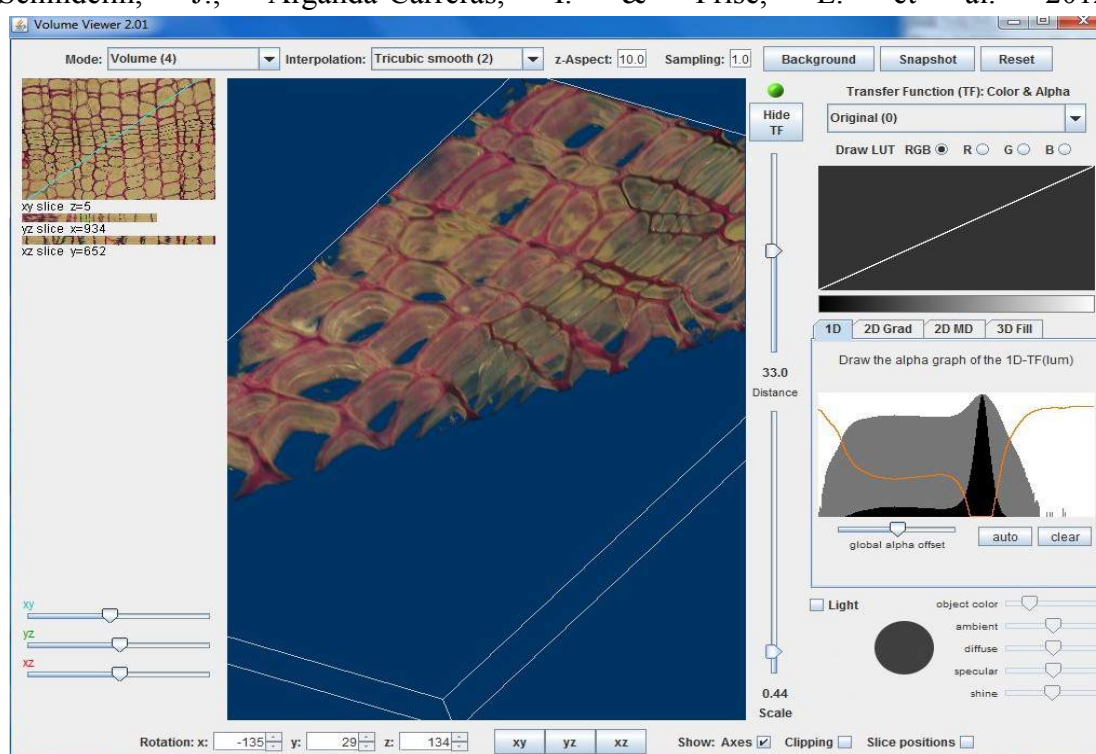
Stosy panoramiczne stanowią kompozycje wielu stosów osi "Z" połączonych w płaszczyźnie poziomej "X, Y". Najpierw powinno się wykonać szereg fotografii osi "Z" i połączyć je w stos, a następnie zmienić płaszczyznę "X, Y" powtarzając proces aż do objęcia kadrem całego obiektu. Następnie stosy są łączone komputerowo w płaszczyźnie "X, Y" identycznie jak w przypadku panoram. Stos panoramiczny przedstawia fotografia 50.



Fot 50. Stos panoramiczny skamieniałego zęba o długości 9 mm, odnalezionego na stanowisku w Krasiejowie.. Światło odbite przez obiektyw. Mikroskop stereoskopowy PZO 5x. Sony a6000: ISO 100, przysłona domknięta do 1/3 NA, czas 1/40 sekundy. Granice stosów zaznaczono liniami. Źródło: Opracowanie własne.

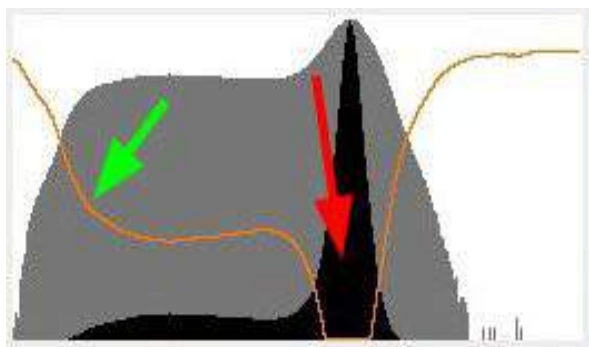
3.13.3. Projekcje 3D

Posiadając stos lub stos panoramiczny, wykonane metodą pierwszą, oraz znając odległości pomiędzy poszczególnymi zdjęciami w osi "Z" (w przypadku serii skrawków, jest to ich grubość, w przypadku szeregu fotografii na jednym obiekcie, jest to wartość obrotu śruby mikrometrycznej) możliwe jest utworzenie trójwymiarowej rekonstrukcji obiektu. Serię skrawków należy najpierw poddać procesowi wyrównywania, a następnie wykadrować interesujący fragment. Tak przygotowaną serię lub szereg wprowadza się do stosu i z wykorzystaniem odpowiedniego programu wykonuje się symulację trójwymiarową fotografowanego obiektu, jak na zdjęciu 51. Dzięki umiejętności czytania histogramu wybiera się piksele odpowiedzialne za tło i je usuwa, a piksele odpowiedzialne za obiekt wzmacnia lub osłabia względem siebie w celu uzyskania czytelnego obrazu, jak przedstawiono na rycinie 21 i zdjęciu 52. Efekt można przedstawić w formie pliku odczytywanego przez program, lub w formacie GIF, jak na zdjęciu 53. Proces został wykonany w programie FIJI, na podstawie [5] (Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. 2012)



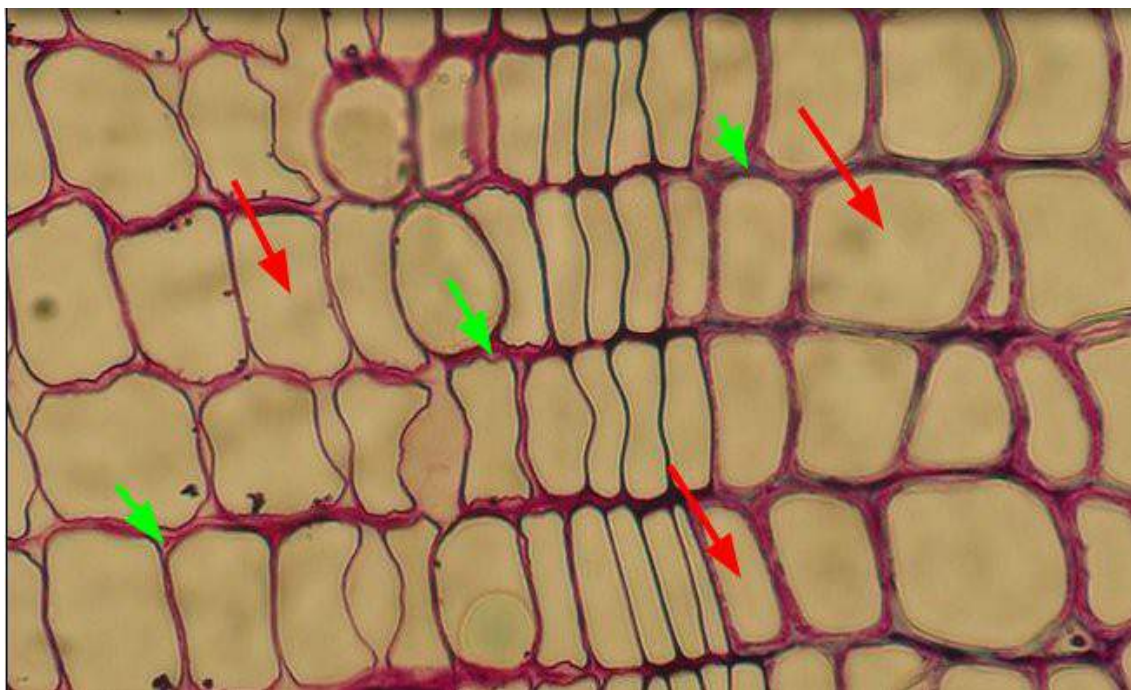
Fot 51. Zrzut ekranu z programu Volume Viewer 2.01, będącego wtyczką programu FIJI. Wprowadzono wyrównany stos, wykonany z szeregu przekrojów anatomicznych jak na fotografii 52, zadano grubość skrawków oraz rozmiar pikseli w mikrometrach, po czym uzyskano złożoną automatycznie bryłę 3D. Histogram dostosowano tak, jak na rycinie 21.

Źródło: Opracowanie własne.



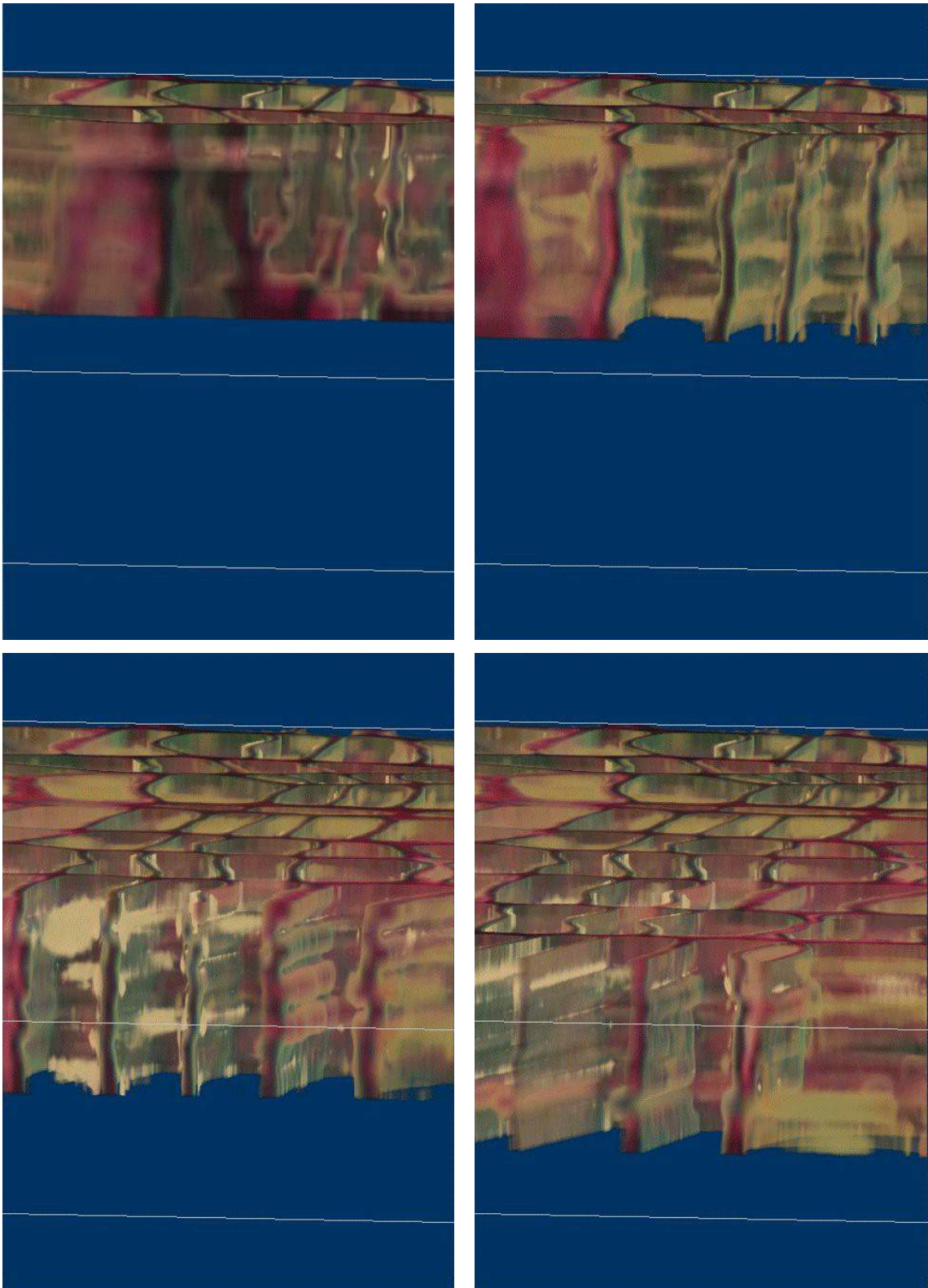
Ryc 21. Histogram bryły z fotografii 51. Pomarańczową linią zaznaczono w jaki sposób program będzie traktował piksele. Czerwoną strzałką zaznaczono piksele wycięte, odpowiadające za tło. Zieloną strzałką zaznaczono granice pomiędzy pikselami poddanymi rozjaśnieniu (po lewej) lub przyciemnieniu (po prawej) na bryle 3D.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 52. Jedno ze zdjęć użytego do stworzenia fotografii 51. Czerwonymi i zielonymi strzałkami zaznaczono obszary dotknięte poprzez operacje na histogramie, jak na rycinie 21.

Źródło: Opracowanie własne.



Fot 53. Przykładowe cztery z trzydziestu sześciu fotografii składowych pliku GIF, będącego efektem zapisu stosu 3D z programu ImageJ.

Źródło: Opracowanie własne.

3.14.1. Nagrywanie filmów.

Większość aparatów fotograficznych posiada także funkcje nagrywania wideo. Procedura nagrywania filmów jest identyczna jak wykonywania fotografii, z dodatkiem dodatkowego parametru w postaci liczby klatek na sekundę. Aby film wyglądał na płynny dla oka, powinien mieć 30 klatek na sekundę lub więcej. Czas ekspozycji jest ograniczony przez liczbę klatek. Możliwe jest zastosowanie mniejszej liczby klatek z wydłużonym czasem ekspozycji. W takiej sytuacji jakość ekspozycji rośnie, jednak maleje płynność wyświetlania i zamiast płynnego przejścia z ujęcia do ujęcia, następuje gwałtowny przeskok. W przypadku mało ruchliwych obiektów, nagrywanie z niską liczbą klatek na sekundę, może być wykorzystane do tworzenia filmów typu "time lapse".

3.14.2. Tworzenie filmów poklatkowych.

Filmy poklatkowe (z *ang.* - *time lapse*) stanowią przedstawienie procesu trwającego przez wiele minut, godzin lub nawet dni, w postaci kilku sekundowego, lub kilkunastuminutowego filmu. Metoda ta umożliwia zaobserwowanie i przedstawienie zmian zachodzących powoli, trudnych do zauważenia z wykorzystaniem konwencjonalnych sposobów rejestracji. Filmy te tworzy się poprzez nagrywanie wideo z niską liczbą klatek na sekundę lub poprzez wykonywanie szeregu fotografii w równych odstępach czasu, a następnie komputerowym połączeniu ich w formę filmową. W niektórych modelach aparatów fotograficznych, możliwe jest automatyczne wykonywanie szeregu fotografii w określonych odstępach czasu. W innych konieczne jest zastosowanie zewnętrznych urządzeń sterujących, lub manualne wykonywanie ekspozycji.

4.1. PODSUMOWANIE.

Na podstawie analizy wynikowych fotografii i histogramów wykazano, że metody dokumentacji z wykorzystaniem konsumenckich aparatów fotograficznych gwarantują mikrofotografie o wysokiej jakości, stanowiące materiał zarówno do analizy jakościowej i ilościowej. Możliwości operowania na takim materiale są takie same lub większe, niż na dedykowanych kamerach mikroskopowych. Jak wykazano w [3] (Matthew J. Parry-Hill, Kimberly M. Vogt, John D. Griffin, and Michael W. Davidson, 2013), zdolność rozdzielcza matryc CCD i CMOS dorównuje lub przewyższa optyczną zdolność rozdzielczą mikroskopów, pod warunkiem, że zagęszczenie i rozmiar pikseli jest odpowiedni. Aparat o rozdzielczości 12MPX lub większej i rozmiarze matrycy APS-C, będzie zapewniał maksymalne wykorzystanie zdolności rozdzielczej większości obiektywów mikroskopowych. Metoda ich podłączenia do mikroskopu jest prosta i tania. Aparat fotograficzny nadaje się szczególnie dobrze do fotografii preparatów anatomicznych roślin naczyniowych. Ze względu na wysoką jakość wynikowych fotografii, możliwe jest pełne wykorzystanie zdolności rozdzielczej obiektywu i pełne oddanie detali oraz barwy, nieosiągalne z wykorzystaniem dedykowanych kamer mikroskopowych w porównywalnym pułapie cenowym.

Najlepszym aparatem do mikrofotografii jest lustrzanka z możliwością blokady lustra, lub bezlusterkowiec. Możliwe jest wykorzystanie aparatów z wbudowanym obiektywem. Aparat powinien posiadać migawkę hybrydową "EFSC" i tryb pracy "Live view" umożliwiający ocenę parametrów ekspozycji oraz prezentację materiału większemu gronu odbiorców. Tryb manualny zapewnia pełną kontrolę ekspozycji, wciąż możliwe jest zastosowanie automatyki. Lepszy od optycznego, jest wziernik elektroniczny. Możliwa jest dokumentacja na mikroskopie terenowym, bez dodatkowego osprzętu. Optymalny rozmiar matrycy to popularny w aparatach konsumenckich APS-C. Dla pełnego wykorzystania matrycy pełnoklatkowej może być niezbędne zastosowanie okularu projekcyjnego. Aparat powinien mieć możliwość wykonania ekspozycji bez podłączonego obiektywu dedykowanego lub niezbędny będzie adapter naśladujący elektronikę takiego obiektywu. Ogromną zaletą aparatów fotograficznych jest możliwość współpracy z lampą błyskową, która jest wysoce użyteczna przy mikrofotografii obiektów ruchliwych. Dzięki formatowi RAW, możliwa jest bezstratna obróbka i późniejsza bezstratna konwersja do JPEG lub TIFF.

Konsumenckie aparaty fotograficzne posiadają bogate możliwości zdalnego sterowania oraz połączenia z dodatkowymi urządzeniami automatyzującymi czynności takie jak składanie stosów, panoram i brył 3D.

4.2. SUMMARY.

Basing on analysis of the resulting photograph and histograms, author demonstrated that the method of recording with using a consumer cameras ensure high quality of the photomicrography, able to use them for qualitative and quantitative analysis. Possibilities of usage for such photomicrographies are equal or larger than the images produced via dedicated microscope camera. As shown in [3], resolving power of CCD and CMOS matrix are equals or exceeds the resolving power of optical microscopes, provided that the density and size of pixels is adequate. The camera with a resolution of 12MPX or more and size of APS-C sensor, will provide maximum usage of resolving power for most microscopic lenses. The method of their connection to the microscope is simple and cheap. Photographic camera is particularly well suited for anatomical slides of vascular plants. Due to the high quality of the resulting photographs, it is possible to take full advantage of the resolving power of the lens and full detail and color reproduction, unobtainable when using dedicated microscope cameras in the comparable price.

Best choice for microphotography is DSLR camera with the ability to lock the mirror, or mirrorless, interchangeable-lens camera. It is possible to use cameras with built-in lens. The camera should have an "EFSC" hybrid shutter and "Live wiew" mode for enabling the assessment of exposure and the presentation of material greater audience. Manual mode provides full control of exposure, it is still possible to use of automatic modes. Electronic wiewfinder is better than optical. It is possible to perform documentation on the field microscope, without additional hardware. The optimal size of matrix, is a popular in consumer cameras APS-C size. To fully make use of full frame sensor, it may be necessary to use photo eyepiece. The camera should have the possibility of exposure without dedicated lens attached, or the electronic adapter will be required to mimic such a lens. The great advantage of consumer cameras is their ability to work with flash lamp, which is highly useful for photomicrography of mobile objects. With the RAW format, it is possible to make use of lossless processing and subsequent

conversion to JPEG or TIFF. Consumer photographic cameras offer a wealth of possibilities for remote control and connection with additional automatic devices for activities such as making stacks, panoramas and 3D projections.

5. Literatura.

- [1] Douglas B. Murphy. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley-Liss 2002, ISBN 0-471-23429-6. str.: 307-315.
- [2] Kenneth R. Spring, Michael W. Davidson. "Digital Imaging in Optical Microscopy". 2012. www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/digitalimagingdetectors.html
24.06.2015
- [3] Matthew J. Parry-Hill, Kimberly M. Vogt, John D. Griffin, and Michael W. Davidson. „Digital Camera Resolution Requirements for Optical Microscopy". 2013. www.microscopyu.com/tutorials/java/digitalimaging/pixelcalculator/index.html
24.06.2015
- [4] Pluta Maksymilian. *Mikroskopia optyczna*. Warszawa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. 1982. ISBN 83-01-02835-1. str.: 134-152, 155-156.
- [5] Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "*Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772.
- [6] Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods* 9, 671-675, 2012.