

FOTOMICROGRAFIA al MICROSCOPIO con FOTOCAMERE DIGITALI

PROBLEMI OTTICI

A) Per la fotografia al microscopio, alcune prestazioni offerte dalla fotocamera digitale risultano molto utili, ma ciò non dovrebbe costituire un problema in quanto tali prestazioni sono consentite dalla maggioranza degli apparecchi in commercio:

- 1) Possibilità di registrare la foto in bianco e nero (molti preparati non sono colorati).
- 2) Possibilità di “bilanciare il bianco” o “white balance” (WB) anche sulla luce di lampade ad incandescenza (“tungsten” o “indoor”), come avviene quasi sempre al microscopio.
- 3) Possibilità di escludere il flash (inutile al microscopio).
- 4) Possibilità di collegamento con un PC, almeno per scaricare le immagini. Attenzione alla compatibilità dei connettori, dei programmi di driver, ecc.

B) Altre prestazioni sono utili, ma solo per ragioni pratiche, e non sono legate specificamente all'applicazione al microscopio:

- 1) Inferiormente, deve esistere un “attacco”, cioè un foro filettato di fissaggio col passo unificato da ¼ di pollice. In molti casi di macro- e micro-foto è assai utile un treppiede od altro supporto simile.
- 2) L'alimentazione deve essere possibile con batterie ricaricabili di facile reperibilità e basso costo, del tipo “stilo” (AA), per es.
- 3) Deve essere disponibile un alimentatore “da rete” (AC, 220 V) poiché le sessioni al microscopio sono lunghe e nessuna batteria dura a sufficienza.
- 4) Per un anziano presbite o per chi soffre di qualche “ametropia” sferica (miopia, ipermetropia) non superiore a ± 3 D, è preziosa la possibilità di una “regolazione diottrica” nel mirino in modo da non essere obbligati ad indossare gli occhiali.
- 5) Può essere utile la possibilità di “dialogo” fra fotocamera e PC in modo da poter lavorare senza alcuna scheda di memoria montata sulla camera e soprattutto in modo da poter eseguire lo scatto da tastiera o da mouse (“controllo remoto”) senza dover mettere le mani sulla camera (pericolo di vibrazioni!). In assenza di controllo remoto, deve esistere almeno l'autoscatto (scatto ritardato) che consenta di far passare almeno 2 sec fra quando si tolgono le mani dalla fotocamera e quando avviene lo scatto.
- 6) Utile la possibilità di usare il formato 3:2, con una qualità (numero di pixel) di almeno 2 Mb.

C) Sono invece indispensabili altre prestazioni:

1) Mirino reflex, almeno di tipo elettronico (a display). Un mirino esterno all'obbiettivo è ovviamente inutile (punterebbe verso il tavolo), mentre uno reflex è prezioso nella fase preparatoria per controllare la centratura, le vignettature, l'estensione del campo visuale. Infatti, si deve confrontare il campo visibile nel mirino col campo dell'oculare: nel mirino si deve vedere circa lo stesso campo dell'oculare (rettangolo inscritto nel cerchio!); verificare inoltre che il centro del campo del mirino sia in centro anche nell'oculare; infine, esigere che non vi siano ombre negli angoli del formato.

Molte fotocamere possiedono un'uscita “TV”: questo consente di collegare un piccolo televisore con ingresso AV ed usarlo come mirino. Un tale mirino si può porre sul tavolo, a fianco del microscopio, e può consentire inquadratura e messa a fuoco senza arrampicarsi su una sedia per guardare nel mirino della fotocamera, che sarà in genere voltato all'ingiù.

2) Se il mirino reflex è “ottico” (a specchio ribaltabile), deve esserci la possibilità di un sollevamento anticipato dello specchio, anche quando si usa l’autoscatto (sempre per il pericolo di vibrazioni indotte dal movimento dello specchio).

3) Possibilità di scattare col diaframma tutto aperto (“priorità del diaframma”). Ciò può evitare di diaframmare la pupilla d’uscita dell’oculare (nei tipi speciali sotto descritti può arrivare a 5 mm) o comunque di vignettare l’immagine.

4) Deve essere possibile la foceggiatura manuale, o almeno la foceggiatura fissa per oggetti a distanza infinita (come è l’immagine finale di un microscopio correttamente foceggiato). Al microscopio, l’autofocus è quasi inutile data la variabilità della posizione dell’immagine finale, e del resto esso riesce a funzionare solo nelle immediate vicinanze del miglior fuoco del microscopio.

In certe macchine, esiste una funzione detta “Messa a fuoco automatica continua” (C – AF) che consente al meccanismo di Autofocus (AF) di operare in modo continuo, al variare della distanza dell’oggetto. Al microscopio, questo meccanismo può funzionare egregiamente, e quindi fornire fotografie nitide compensando piccoli errori di manovra della micrometrica, purché l’immagine del microscopio sia abbastanza vicina al fuoco ottimale.

5) Non è indispensabile la possibilità di sostituzione dell’obbiettivo (“ottica intercambiabile”) né la presenza di obbiettivi zoom, ma l’accoppiamento fra fotocamera ed oculare (come avviene per fotocamere analogiche o per telecamere) presenta qualche problema ottico:

Primo: il rapporto fra la focale dell’oculare e quella dell’obbiettivo della fotocamera. Secondo: la posizione relativa delle due pupille. Terzo: le dimensioni delle due pupille.

*** Primo problema - Consideriamo un oculare con un “indice di campo” s' ed un sensore CCD con una diagonale d .

s' è una caratteristica dell’oculare, e va da 14 mm (ricette classiche o economiche con $V = 10 \times$) a 26 mm (moderni sistemi grandangolari). Per quanto riguarda d , lo si ricava dai dati della fotocamera (vedi la tabella nel manuale “Problemi tecnici della microscopia...”, Cap. 30.9.5).

La diagonale utile del sensore (d) deve corrispondere nel miglior modo all’indice di campo s' per cui, fra sensore ed immagine intermedia deve esistere un sistema ottico (obbiettivo della fotocamera + oculare o proiettivo) con un ingrandimento M_f pari a d/s' . Ebbene, M_f è pari a f_c/f_{oc} in cui f_c è la focale dell’obbiettivo della fotocamera ed f_{oc} è la focale dell’oculare ($f_{oc} = 250/V_{oc}$, in cui V_{oc} è l’ingrandimento visuale dell’oculare).

Es.: un oculare comune $10 \times / 18$ ($V_{oc} = 10 \times$, $s' = 18$ mm) ha una focale $f_{oc} = 250/10 = 25$ mm. Se il sensore, per es., è da 2/3” (diagonale utile $d = 11$ mm), dovrebbe essere $M_f = 11/18 = 0,6$ circa. Ma deve anche essere $M_f = f_c/f_{oc} = f_c / 25$. Da qui si deduce che la focale dell’obbiettivo della fotocamera deve essere $f_c = M_f \times 25 = 0,6 \times 25 = 15$ mm.

Questa condizione non è difficile da ottenere con i normali obbiettivi, specialmente se del tipo zoom. Ma qui occorre soddisfare all’altra condizione, più stringente, che discutiamo qui sotto.

*** Secondo problema - Ogni obbiettivo ha una “pupilla d’ingresso”, che è l’immagine virtuale del suo diaframma quale è formata dalle lenti che gli stanno davanti: voltando verso il cielo il retro di un obbiettivo e guardandoci dentro dal davanti, si vede un dischetto che è la sua pupilla d’ingresso. Ogni oculare ha una “pupilla d’uscita” (l’immagine impiccolita dell’obbiettivo), altro dischetto (“disco di Ramsden”) attraverso il quale passa il fascio emergente dal microscopio. Ebbene, la pupilla d’ingresso della fotocamera deve coincidere colla pupilla d’uscita dell’oculare, altrimenti il fascio verrà limitato da una delle due pupille e si presenteranno le classiche “vignettature” (angoli scuri nell’immagine o addirittura un cerchio chiaro su fondo scuro).

A questo punto, si presenta il problema: dove si trovano queste pupille?

Quella dell’oculare è “estratta”, cioè esterna al sistema, e la si identifica ponendo un foglio di carta da lucidi o un vetro smerigliato sopra l’oculare (col microscopio acceso!). Si alza o si abbassa il foglio finché il fascio assume il minimo diametro. Si visualizza così diametro e posizione della pupilla d’uscita dell’oculare.

Quella dell'obiettivo della fotocamera invece si può valutare solo con uno stereomicroscopio¹ oppure ad occhio, poiché non è "estratta" come quella dell'oculare, ma interna. Per es., in un obiettivo zoom con rapporto 1 : 10 (focale 6,3 – 63 mm), si è riscontrata una "profondità" della pupilla variabile da 30 a 110 mm.

A questo punto conviene procedere per tentativi: si accende la fotocamera, la si mette sopra l'oculare, ben centrata, e la si sposta su e giù, guardando nel mirino, finché ciò che è visibile nel mirino corrisponde a tutto ciò che si vede nell'oculare e non si vedono vignettature (sarà opportuno variare, simultaneamente, la posizione dello zoom, se presente).

Di solito ciò non avverrà: o l'immagine del microscopio è troppo ingrandita, e se ne vede solo il centro (perdita di risoluzione), oppure si vede solo un'immagine limitata ad un cerchietto, al centro di un campo scuro (per ingrandimento insufficiente o vignettature).

Queste due limitazioni non si possono eliminare quasi mai simultaneamente, mentre possono essere presenti simultaneamente. Uno sfacelo.

La ragione è che le due pupille difficilmente coincidono o, se lo fanno, la focale dell'obiettivo non è quella giusta. Viceversa, se la focale è corretta, non coincidono le pupille.

La cosa si complica negli obiettivi zoom per due motivi:

-- La loro pupilla è molto "interna" (anche oltre 100 mm dietro la superficie della prima lente).

-- La posizione della loro pupilla d'ingresso varia molto mentre si cambia la focale.

Questi due inconvenienti divengono più gravi quanto più ampia è la variazione di focale consentita dallo zoom.

Rimedio: utilizzare oculari speciali "a pupilla alta". Tali oculari hanno maggiore focale di quelli normali, e quindi minore ingrandimento e minor campo angolare.

In commercio sono quasi introvabili², ma si può autocostruirli accoppiando i due obiettivi da un binocolo di recupero, del tipo classico 8 × 30. Questi hanno una focale intorno a 125 mm ed un diametro intorno a 30 – 32 mm.

Mettendoli uno sull'altro colla faccia più convessa in alto (separati da un anellino distanziale di circa 2 mm di spessore) e ponendo la coppia colla faccia inferiore della lente inferiore a circa 45 mm sopra l'orlo del tubo del microscopio (privato dell'oculare normale), è possibile risolvere il problema con quasi tutte le fotocamere e le telecamere del commercio.

Può darsi che sia necessario regolare la distanza fra fotocamera ed oculare speciale, ma in genere l'obiettivo della fotocamera non deve sfiorare la lente superiore dell'oculare. Naturalmente, sarà anche necessario azionare lo zoom, se presente, cioè variare la focale dell'obiettivo per ottenere il miglior accoppiamento colla focale dell'oculare, ricordando che in questo modo, simultaneamente, variano posizione e diametro della pupilla d'ingresso della fotocamera e quindi andrà ritoccata la distanza fra fotocamera e microscopio per evitare vignettature.

L'oculare speciale sopra descritto (figura sotto) ha una focale di circa 65 mm, un indice di campo $s' = 22$ mm, un campo angolare $2\alpha = 16^\circ$, ed accetta un'immagine intermedia a 10 – 15 mm sotto l'orlo del tubo, che è la posizione nominale dell'immagine intermedia nella maggioranza dei microscopi. L'altezza della sua pupilla d'uscita è di circa 73 mm (sopra la superficie superiore della lente superiore). Il suo ingrandimento convenzionale è $250/65 = 3,8 \times$.

¹ Occorre uno stereomicroscopio a basso ingrandimento con una distanza di lavoro uguale o superiore alla "profondità" della pupilla: si pone la fotocamera o la telecamera sotto lo stereomicroscopio, voltata all'insù, in modo che il microscopio ci "guardi dentro"; si metta a fuoco il diaframma dell'obiettivo (potrà convenire accendere l'apparecchio e far penetrare luce nell'obiettivo, in modo da costringere il diaframma a chiudersi in parte: lo si identifica meglio). A questo punto, si foceggi lo stereomicrosc. in modo da vedere a fuoco il diaframma (la sua immagine virtuale, cioè la vera pupilla). Si misuri la distanza (d.) fra orlo inferiore dell'obiettivo del microscopio ed orlo superiore dell'obiettivo della fotocamera. Si tolga la fotocamera, si foceggi su un oggetto piatto e si misuri la distanza di lavoro (WD) del microscopio. Da WD si sottragga d_s e si ottiene la distanza fra orlo dell'obiettivo della fotocamera e pupilla di esso. Se l'obiettivo è zoom, occorre eseguire diverse misure in diverse posizioni dello zoom. Se lo stereomicrosc. porta un oculare micrometrico, si può in questa fase misurare anche il diametro della pupilla in diverse posizioni dello zoom.

² La varietà dei modelli di fotocamere e telecamere in commercio è così elevata che nessun costruttore può prevedere tutte le combinazioni possibili.

l'obiettivo della fotocamera, ma tutto il fascio prodotto dal microscopio viene utilizzato. Se invece la pupilla della fotocamera è più piccola, sarà essa a diaframmare non solo la pupilla d'uscita dell'oculare (possibili vignettature!) ma, indirettamente, anche quella dell'obiettivo del microscopio, con perdita di luminosità e di risoluzione. Occorre dunque verificare che sia evitata quest'ultima condizione, in particolare, in presenza di automatismi.

Infatti, la cosa si complica con molte macchine, in cui molte funzioni sono svolte in maniera automatica, e gli automatismi possono chiudere il diaframma senza avvertire l'utilizzatore. Anche se la macchina consente l'impostazione "con precedenza del diaframma" o "manuale", può accadere che la macchina chiuda il diaframma e provochi vignettature senza che l'operatore possa intervenire. Si può evitare questo riducendo l'illuminazione in modo che l'automatismo sia obbligato a riaprire il diaframma.

Se non per strumenti ad alto livello, i normali raccordi commerciali fra microscopio e fotocamera rappresentano sempre un compromesso: per ogni tipo di oculare, di obiettivo (di fotocamera) e di sensore occorrerebbe un progetto ad hoc; nessun costruttore può prevedere un diverso sistema, ottimizzato per ogni possibile combinazione microscopio-fotocamera.

Potendo smontare l'obiettivo della fotocamera, si potrebbe mettere il sensore direttamente sopra l'obiettivo (del microscopio)³, senza oculare interposto, ma occorrerebbe comunque un'ottica intermedia per portare l'immagine intermedia del microscopio alle dimensioni richieste per ricoprire esattamente il sensore, generalmente assai più piccolo. Ma, anche qui, per ogni combinazione obiettivo (di microscopio)-sensore occorre un sistema ad hoc, che tenga conto anche della correzione dell'obiettivo, che può richiedere uno stadio di "compensazione" per l'aberrazione cromatica laterale.

LA MISURA degli OGGETTI FOTOGRAFATI

Altro problema può nascere quando il normale oculare del microscopio è del tipo micrometrico e contiene qualche reticolo che si desidera fotografare assieme all'immagine dell'oggetto; l'uso dell'oculare micrometrico ha per scopo di eseguire misure (di lunghezza, di superficie, di angoli, ecc.) sull'oggetto osservato. La fotografia simultanea dell'oggetto e del reticolo di misura consente di avere sempre sovrapposta all'oggetto una scala dimensionale e quindi di misurare le dimensioni dell'oggetto indipendentemente dall'ingrandimento successivo, elettronico, fotografico, ecc. L'oculare speciale sopra descritto può contenere un reticolo (da porsi nel suo fuoco anteriore, a livello dell'immagine intermedia), ma ogni volta occorrerebbe smontare dall'oculare micrometrico normale il reticolo in questione ed inserirlo nell'oculare speciale a mezzo di un adeguato supporto, da fabbricare ad hoc ogni volta. Che fare? Usare direttamente l'oculare micrometrico del microscopio non conviene, sia per tutti i problemi appena citati, sia perché il reticolo verrebbe fotografato solo in parte. E allora?

Si ponga l'oculare micrometrico che si desidera usare sul microscopio. Si costruisca ora un'altra ottica intermedia su misura, ed ecco le istruzioni.

Si prenda un obiettivo da binocolo di diametro circa 25 mm e di focale circa 100 mm (può andare quello di un binocolino "roof prism", del tipo 8×25) ed un oculare forte da microscopio, almeno un $15 \times$. Serve ora un tubo metallico del diametro interno/esterno 23/28 mm, di lunghezza pari alla focale dell'obiettivo. Alle due estremità di esso, per tornitura, si ricavi una sede di diametro 23,2 mm per l'oculare e, dall'altra parte, di 25 mm per l'obiettivo, che va montato con la superficie più convessa verso l'esterno. Si realizza così un piccolo cannocchiale "kepleriano", che darà un'immagine rovesciata, ma che raddrizzerà l'immagine già rovesciata fornita dal microscopio. Per la fotocamera, esso si comporta come un "aggiuntivo grandangolare".

Per brevità, chiameremo d'ora in poi **ObC** l'obiettivo di questo cannocchiale ed **OcC** l'oculare forte che gli abbiamo accoppiato. Si verifichi, guardando un panorama lontano, che questo cannocchiale sia focalizzato bene ("all'infinito"); se non lo è, variare la lunghezza del tubo.

³ Occorrerà naturalmente accorciare o togliere il tubo porta-oculari poiché in genere l'immagine intermedia si trova 10 - 15 mm sotto l'orlo superiore del tubo.

Questo cannocchiale si deve montare davanti all'obbiettivo della fotocamera (lo chiameremo **ObF**), con **ObC** a pochi mm da **ObF**. Per il montaggio, si può fissare all'estremità del tubo (dalla parte di **ObC**) un disco del diametro dei filtri previsti per **ObF**; ci si procuri un filtro qualunque per **ObF** e se ne tolga il vetro. L'anello che rimane può servire a fissare il disco citato ad **ObF**.

Si disponga ora la fotocamera, con il cannocchiale montato, davanti all'oculare del microscopio, che chiameremo **OcM**, ad una distanza pari alla somma dell'altezza di pupilla di **OcC** + l'altezza di pupilla di **OcM** (generalmente 10 – 30 mm) e si vari la distanza fra **OcC** ed **OcM** finché, guardando nel mirino (reflex) della fotocamera, si vede tutto il campo di **OcM** completamente circoscritto nel formato.

In sostanza, davanti ad **ObF** si pone un piccolo cannocchiale rovesciato che aumenta il campo angolare di **ObF**, ma ha il vantaggio di possedere una pupilla estratta: la pupilla d'uscita di **OcC** (un oculare ha sempre la pupilla estratta, al di sopra della lente superiore di alcuni mm) diviene ora la sua pupilla d'ingresso. Il problema della coincidenza delle pupille scompare poiché anche **OcM** ha la pupilla estratta.

I dati riportati sopra sono solo indicativi. Affinché il sistema funzioni correttamente, devono rimanere entro certi limiti alcuni fattori, non sempre noti: -- le dimensioni del sensore (CCD od altro) della fotocamera; -- la focale e quindi il campo angolare di **ObF**; -- la posizione ed il diametro della pupilla d'ingresso di **ObF**; -- la focale e quindi il campo angolare di **OcM**; -- idem per **OcC**.

Inoltre, è molto critica la centratura e l'allineamento del cannocchiale rispetto ad **ObF** e rispetto al microscopio, nonché la distanza fra i due oculari.

Se il cannocchiale è ben fissato ad **ObF**, occorrerà che la fotocamera si trovi su un supporto orientabile e foceggiabile, ed a questo scopo può andar bene un treppiede fotografico, purché fra le zampe di esso ci sia spazio per il microscopio. Meglio sarebbe disporre di un supporto "a braccio mobile", come si usa per muovere uno stereo-microscopio su un tavolo.



A sinistra: Esempio di cannocchiale "aggiuntivo grandangolare" che si può applicare sull'obbiettivo di una fotocamera usando un anello porta-filtri (privato del vetro, al centro della figura). L'obbiettivo del cannocchiale, alloggiato nel disco a sinistra, è rivolto verso la fotocamera; all'estremo destro del cannocchiale, un oculare da microscopio, 15 ×; normale (acromatico). Quest'ultimo va posto sopra l'oculare del microscopio, ad un paio di centimetri di distanza, come si vede nella foto a destra. Un reticolo speciale posto nell'oculare del microscopio risulterà a fuoco assieme all'immagine dell'oggetto, se tutto è stato "messo a fuoco per l'infinito". Sul tubo verticale del microscopio è posto in questa figura un oculare di misura "a tamburo", con graduazione fissa e riga mobile.