

FOTOGRAFEREN VAN MICROSCOOPBEELDEN

Johan Steketee

Jan Vethlaan 9, 3141 KJ Maassluis

Steketee, J. 2010. Photography through the microscope. Coolia 53(4): 181–185.

Recent developments in digital microscope cameras now allow good quality microphotography for a reasonable price. This paper shows a number of examples, and considerations about the type of camera that is suitable for this purpose.

Fotograferen van microscoopbeelden was in het analoge tijdperk een moeizame bezigheid omdat je als beginner pas na het ontwikkelen van de film tot de ontdekking kwam dat het beeld over- of onderbelicht was. Met de introductie van de digitale camera is het al een stuk eenvoudiger en we zien dan ook op bijv. waarneming.nl geregeld mooie microscoopfoto's verschijnen. Toch blijft het vaak nog een heel gepruts om de juiste instelling van de camera te vinden en lang niet iedere camera heeft de juiste zoominstelling.

Sinds kort is er een microscoopcamera op de markt (zie Tabel 1) waarmee het mogelijk is om op eenvoudige wijze heel mooie foto's te maken, die direct op de computer/laptop opgeslagen kunnen worden. Een trinoculaire tubus is niet nodig want men kan de camera heel simpel in plaats van een oculair op de microscoop bevestigen (Figuur 1).

Figuur 1. Opstelling met camera op de microscoop in de plaats van een van de oculairen. Op het scherm van de laptop verschijnt het microscoopbeeld 'live'.

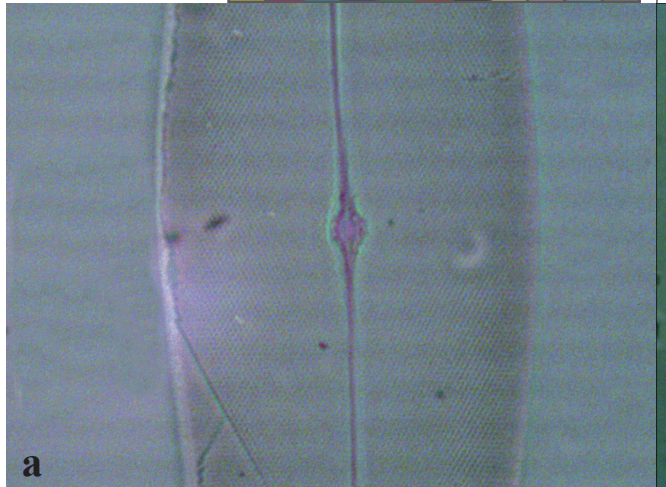
Type	sensor (pixels)	sensor (mm)	Prijs ca.
1.3M	1280 × 1024	4,6 × 3,7 mm ²	€ 200
3.0M	2048 × 1536	6,6 × 4,9 mm ²	€ 330
5.0M	2592 × 1944	5,7 × 4,3 mm ²	€ 400
9.0M	3488 × 2616	6,1 × 4,6 mm ²	€ 750

Tabel 1. De camera waar het in dit artikel over gaat is de Bresser MicroCam. De verschillende uitvoeringen staan in deze tabel. Met een meegeleverde 30 mm adapter past de camera ook in de oculair opening van een stereomicroscop.



Zelfs een monoculaire microscoop biedt geen problemen, en voor mensen die vaak moeite hebben met het turen door de microscoop is zo'n camera wellicht een prima oplossing omdat voor hen het bekijken van een (laptop)scherf heel wat minder inspannend is. Een bijkomend voordeel is dat met de bijgeleverde software behalve beeldbewerkingen zoals verscherpen, contrast vergroten, kleur aanpassen, ook metingen verricht kunnen worden aan alle details van de opgeslagen beelden, iets wat met een gewone digitale camera normaal alleen kan als ook de oculair-micrometer in beeld is. De schatting van de afmetingen van sporen is dan beperkt tot die sporen die precies onder de micrometer liggen.

a



Theoretische achtergrond

In eerste instantie is men misschien geneigd om, afgezien van de prijs, te kiezen voor de hoogste resolutie met een pixelafstand van $1,75\text{ }\mu\text{m}$ ($6100/3488$), maar met de beste optische microscopen kunnen we met veel kunst en vliegwerk ($100\times$ olie-immersie objectief met numerieke apertuur 1,30 en blauw licht) details met een grootte van $0,18\text{ }\mu\text{m}$ nog net onderscheiden. Door het objectief wordt deze afstand vergroot tot $100 \times 0,18 = 18\text{ }\mu\text{m}$ in het tussenbeeld en de lens van de camera heeft een vergrotingsfactor van 0,5 dus op de camerasensor wordt die afstand $9\text{ }\mu\text{m}$. Als men nu weet dat voor het goed afbeelden van een lijnenpaar (minstens) 2 pixels nodig zijn, dan kan zelfs camera 1 dit nog halen, want die heeft een pixelafstand van $3,6\text{ }\mu\text{m}$ ($4600/1280$). De derde camera, die een hogere prijs heeft, kan met zijn pixelafstand van $2,2\text{ }\mu\text{m}$ ($5700/2592$) royaal alle details van de microscoopbeelden weergeven. We hadden de beschikking over beide camera's om de verschillen te kunnen beoordelen. De hogere resolutie van de vierde camera is weinig zinvol omdat het scheidend vermogen van de microscoop de beperkende factor is. Details die in een microscoopbeeld niet meer te onderscheiden zijn, kun je ook met een camera met hogere resolutie nooit zichtbaar maken.

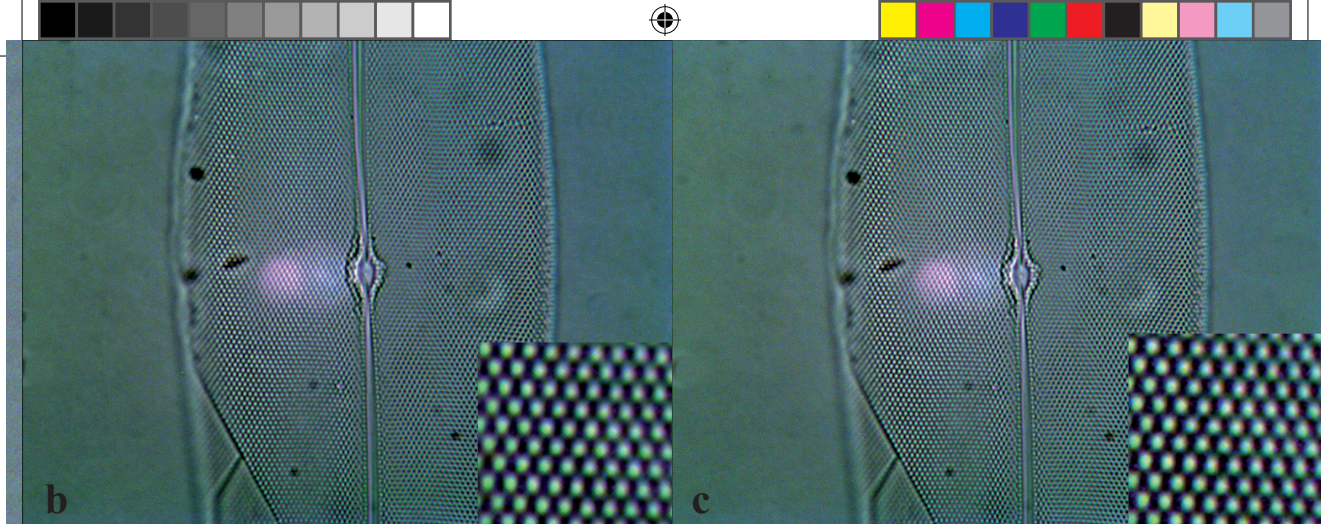
Uit metingen blijkt dat de brandpuntsafstand van de lens 15 mm bedraagt. De lensdiameter D (met het oculair opzetverloopstuk) bedraagt 18 mm, zodat het diafragmagetal $F = f/D = 15/18 = 0,83$ bedraagt. De scherptediepte is daardoor zeer gering, theoretisch minder dan 1 mm, hetgeen betekent dat bij een $40\times$ objectief een diepteverschil in het preparaat van $1\text{ }\mu\text{m}$ al leidt tot een waarneembare onscherpte in een foto van ca. 20 cm breedte.

Praktische resultaten

Allereerst bekeken we met de 5.0M camera in de oculairtubus van een Olympus CH2 microscoop een Diatomeeën Testplaatje met daarin een preparaat van *Pleurosigma angulatum* (een diatomee) waarvan de fijne details ongeveer $0,32\text{ }\mu\text{m}$ groot zijn. Een $40\times$ objectief met Numerieke Apertuur (NA) 0,65 kan theoretisch details van $0,47\text{ }\mu\text{m}$ nog net gescheiden weergeven, maar schiet dus tekort voor ons preparaat, zoals ook blijkt uit de foto, genomen in de hoogste resolutie van 2592 (Figuur 2a).

Het heeft ook geen enkele zin om een nog hogere resolutie te kiezen, want ons microscoop-





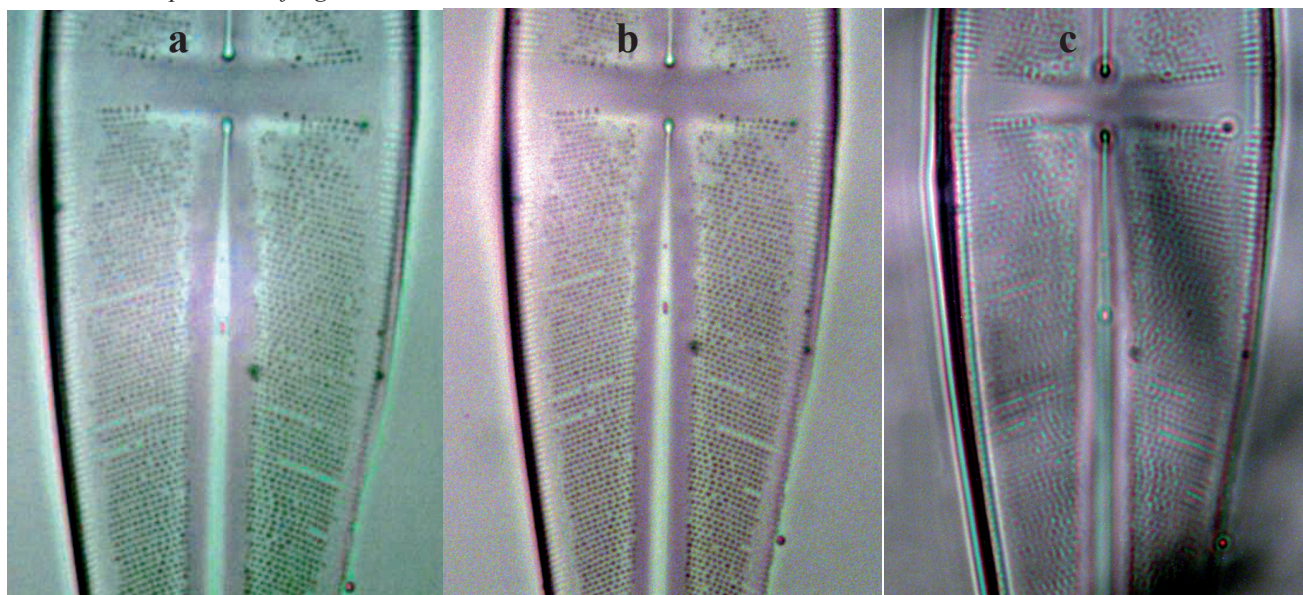
Figuur 2. *Pleurosigma angulatum* gefotografeerd met verschillende objectieven en camera's. a) 40× objectief, 5.0M camera; b) 100× objectief, 1.3M camera; c) 100× objectief, 5.0M camera. De camera is steeds bij hoogst mogelijke resolutie gebruikt.

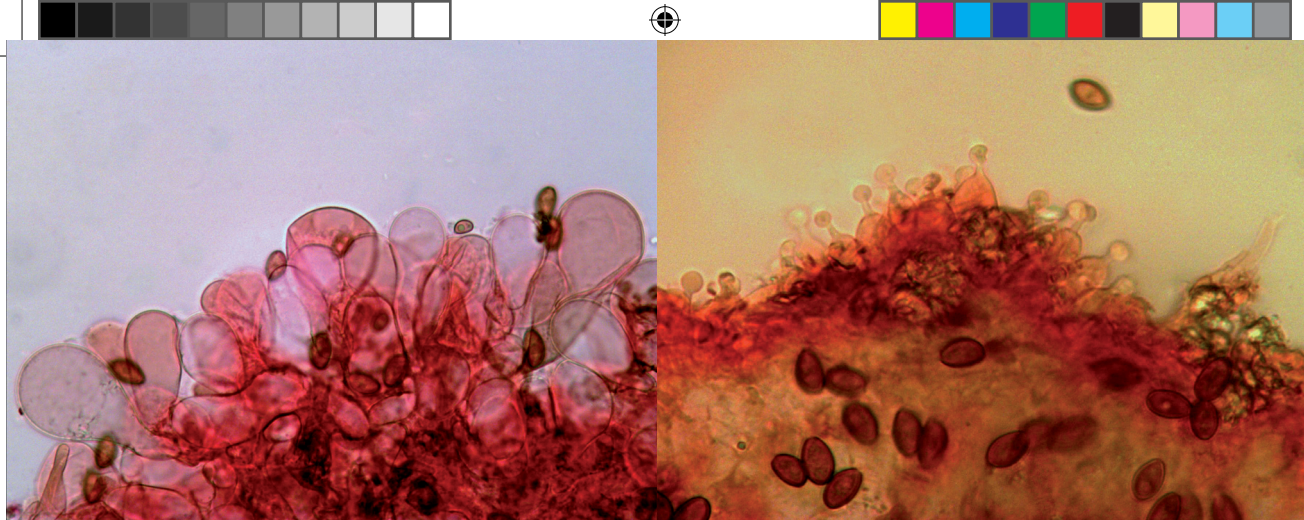
objectief kan deze details niet weergeven. Gelukkig heeft onze microscoop nog een ander objectief, een 100× met $NA = 1,3$, dat details van $0,23\ \mu\text{m}$ nog kan scheiden. (Zoals bekend moet je, om die hoge waarde van NA te bereiken, wel immersie-olie gebruiken.) Daarmee zijn de foto's 2b en c gemaakt. Figuur 2b met een cameraresolutie van 1280 (MicroCam 1.3) en Figuur 2c met 2592 pixels (MicroCam 5.0).

Ook hier is nog steeds het microscoop-objectief bepalend voor de detaillering van het beeld en niet de gebruikte camera. Zelfs in de sterk vergrote detailbeelden (inzet in figuren 2b en c) zien we nog nauwelijks verschil. Pas wanneer we beide op A4 formaat afdrucken, zien we in de opname van Figuur 2c een miniem verschil in het contrast waarmee de details worden afgebeeld.

Omdat het merendeel van het microscoopwerk toch met het 40× objectief wordt gedaan – het gaat immers om structuren met details die veel groter zijn dan $0,23\ \mu\text{m}$ – zijn in Figuur 3 beeldduitsneden van een andere diatomee, *Stauroneis phoenicenteron*, weergegeven. Deze diatomee kan met een goed en schoon 40× objectief nog prima worden afgebeeld, hoewel de afmetingen van de details ongeveer slechts $0,45\ \mu\text{m}$ bedragen. In deze ten opzichte van het origineel tweemaal vergrote beelden is ook hier nauwelijks verschil te zien tussen de

Figuur 3. Foto's van de diatomee *Stauroneis phoenicenteron* met verschillende camera's door een 40× objectief. a) 1.3M camera; b) 5.0M camera; c) 5.0M camera, maar met te klein apertuurdiafragma.





Figuur 4. Hoedhuid (links) en cheilocystiden (rechts) van een Breeksteeltje (*Conocybe spec.*), gefotografeerd met de 5.0M camera. (Foto's: Grieta Fransen)

opnamen met de beide camera's. Met de camera is ook mooi te demonstreren wat er gebeurt als men een te klein apertuurdiafragma gebruikt: diverse fijnere details zijn uit het beeld verdwenen omdat het scheidend vermogen van het microscoop-objectief is aangetast. (Fig. 3c)

De camera is voorzien van automatische witbalans- en belichtingstijd-regeling, zodat het wel erg eenvoudig is om een goed plaatje of zelfs een video-opname te maken. Figuur 4 geeft enkele voorbeelden in de resolutie 2592. Beide preparaten waren bewerkt met congorood.

Sporen meten

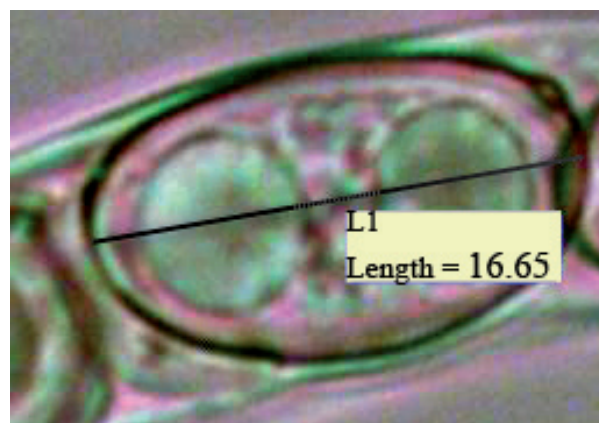
Ook het meten van sporen en andere objecten met behulp van de microfoto's is zeer eenvoudig: Trek een lijn van het ene uiteinde naar het andere en na een muisklik komt de lengte meteen in beeld, weliswaar eerst in aantallen pixels, maar door een calibratietabel op te roepen, verandert deze waarde in μm en ook bij alle volgende metingen zien we meteen de lengte in μm (Figuur 5).

Conclusie

De scherptediepte van de lens is door het kleine diafragmagetal ($F=0,83$) zeer gering en daarom is de camera eigenlijk minder geschikt om opnamen te maken met de stereomicroscoop: slechts een heel beperkt gedeelte van de diepte van een voorwerp kan scherp worden afgebeeld. Waar men bij de gewone microscoop de scherptediepte nog kan vergroten door het verkleinen van het apertuurdiafragma (oppassen voor detailverlies, zie figuur 3c) is dat bij een stereomicroscoop niet mogelijk en ook de camera zelf bezit geen diafragma.

De resolutie van de MicroCam 1.3 (1280) is ruim voldoende om alle details die we met de microscoop kunnen onderscheiden goed weer te geven. De scherpte van deze details is bij de 5.0 camera iets beter, wat pas tot uitdrukking komt bij sterke vergroting van de beelden.

Voor mensen die snel vermoeid raken bij het turen door de microscoop, is het een goede oplossing om het beeld (ook naderhand) op het computerscherm rustig te kunnen bestuderen.



Figuur 5. Meting van sporenlengte (detailopname).



Vooral het meten van sporen (of andere onderdelen) is zeer eenvoudig en veel nauwkeuriger dan met de oculairmicrometer. Het grote voordeel is dat men dit ook achteraf in het opgeslagen beeld kan uitvoeren.

De cameralens ($f = 15 \text{ mm}$) beeldt ca. $12 \times 9 \text{ mm}$ van het tussenbeeld af op de sensor en dat is ongeveer 50% van het hele veld dat door het oculair (WF 10 $\times$) zichtbaar is. Bij de MicroCam 1.3 is dat iets kleiner, namelijk 40%. Dat is een goed compromis, vooral voor eenvoudige microscopen, waarbij de vervorming naar de randen sterk toeneemt. In de informatie die op het internet beschikbaar is, wordt steeds vermeld dat de camera voorzien is van een 0,25 lens in plaats van de 0,5 lens die in werkelijkheid wordt meegeleverd. Met de meer verkleinende lens zou een tweemaal zo groot veld worden afgebeeld, met mogelijke randvervorming. Vermoedelijk is men daarom overgegaan op een lens met vergroting 0,5.

De camera is bij diverse bedrijven te koop. Via een van de leden van de NMV kunnen de camera's met ca 6% korting worden geleverd. Voor belangstellenden is een korte nederlandse handleiding verkrijgbaar bij de auteur.

Met dank aan Grieta Fransen voor het maken van enkele van de foto's (Figuur 4) en aan Joop van der Lee voor het beschikbaar stellen van een MicroCam 1.3M.

Alle foto's zijn gemaakt door de schrijver, tenzij anders vermeld.



OPROEP

WIE MAAKT IJZERSULFAATKRISTALLEN?

Toversteentjes worden ze ook wel genoemd. De groene kristallen van Fe(II)SO_4 , waarmee je vooral bij Russula's oranje, roze of groene kleurreacties op de steel kunt krassen. Ze zijn niet zomaar te koop, en je kunt ze dus ook niet bij Atte bestellen (zie pag. 219).

Ze zijn wel zelf te maken. Recepten daarvoor staan in Coolia: door Friedjof vd Berg (Coolia 15(1): 11 (1971)), en Jan Hoogschagen (Coolia 43(4): 202 (2000)).

Wie wil dat eens proberen, en het resultaat op de Nieuwjaarsbijeenkomst op 8 januari 2011 voor belangstellenden beschikbaar stellen?

Iedere spontane actie wordt op prijs gesteld. Neem voor de coördinatie toch even contact op met Marjo Dam (marjo_dam@hotmail.com).

