

顯微攝影——讓我們重現眼底下的小小世界

顏鴻選

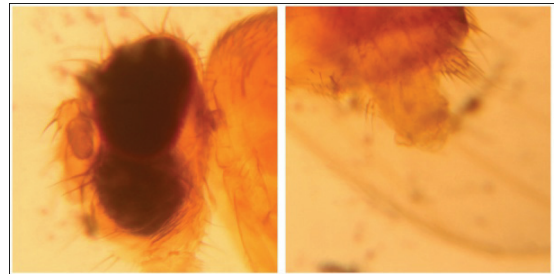
國立臺灣師範大學 地球科學系

壹、前言

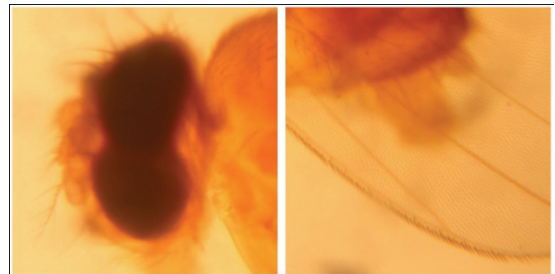
還記得第一次透過顯微鏡，窺視玻片上那小小世界時的情景嗎？在高倍放大的作用之下，原先不起眼的小點此時此刻，竟成了一幅幅令人震撼不已的畫面。但想用相機拍下影像的同時，卻發現不管怎麼樣調整，都無法得到一個完全清晰的影像。筆者在近半小時裡，拍攝了 200 多幅不同焦平面的果蠅影像，又花了數小時以影像處理軟體，將這批影像逐張組合成如封面圖片所示，細節清晰而能讓人一眼便為之驚豔的果蠅照片。

原來當我們使用一般的顯微鏡進行觀察時，顯微鏡的焦點只能隨著所調整的焦距固定在某一個特定的深度，且這個深度的範圍會隨著越大的放大倍率變得越窄，這個現象稱之為「淺景深」，或景深很淺；再加上觀測物不論是標本、還是活體，都有一定的厚度，因此我們只能依照想觀察的部分，調整焦距。以果蠅為例，當果蠅頭部清晰時，翅膀的部分便會失焦，如圖一 a 所示；反之，當我們調整焦距至翅膀清晰時(圖一 b)，頭部影像就會變得模糊，這常造成我們觀察上的不便。

針對「淺景深」的問題，市面上與網路許多影像處理軟體，有不同的處理方式。



圖一 a 頭部焦點清晰的影像



圖一 b 翅膀焦點清晰的影像

其中筆者所使用的一個專用軟體：「赫立肯焦點(Helicon Focus)」，便是透過整合多幅不同焦平面的影像，疊合成一幅處處焦點準確的完整作品。「赫立肯焦點」是一個需要付費的軟體，基本款一年要價 30 美元，無限期版則為 92 美元；但可下載擁有完整功能的 30 天試用版體驗，本文即是以試用版本完成影像部分的處理。有興趣的讀者可逕行至官網瀏覽：Helicon Soft 的官方網站 <http://www.heliconsoft.com/>

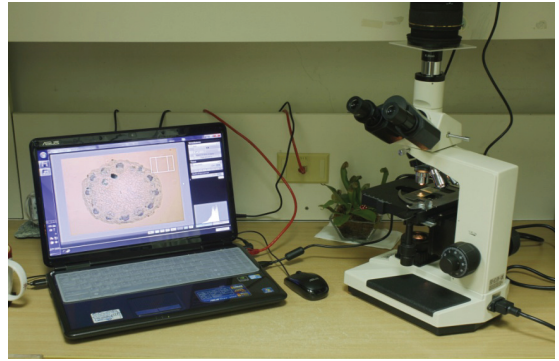
貳、影像拍攝步驟

在用顯微鏡拍攝影像之前，最好使用能架設相機的顯微鏡，或是自行想辦法將相機固定在同一位置上以進行拍攝。筆者在目鏡上加入一塊壓克力板（圖二），不但能防止鏡頭直接與目鏡接觸而刮傷，更能穩固地放置好相機。如果硬度及透光率皆更高的玻璃取代壓克力，效果應該更好。



圖二：在目鏡上加入一塊壓克力板

為了配合一般顯微鏡的視野大小，鏡頭應選用接近人眼視野的焦段較為理想，以避免過大或過小的取景，才能拍攝出張力十足的照片。要注意的是，為了方便接下來的後續處理部分，影像必須具備一致性，所以在拍攝的過程中應盡量不去觸碰相機。如今市面上的相機大多能以電腦進行操控（圖三），相機對焦及曝光等等的設定，都可以在電腦上完成作業，不但減少對相機的外力介入，在電腦大螢幕上的檢視過程，也更能精確的調整焦點和曝光值。



圖三：以電腦進行操控相機，對焦及曝光等等的設定，都在電腦上完成作業

器材準備完成，接下來就是調整顯微鏡的部分了。放入要拍攝的標本後，先調整出一適當的放大倍率，以選定所需要的畫面大小，並微調相機的角度完成構圖。若顯微鏡有調整光源大小和聚光程度等功能，則逐一調整出適合的進光量及視野範圍。

一幅好的影像往往構築在精準的對焦之上，尤其在「赫立肯焦點」的應用上更是如此。其原理即是建立在「一批不同焦平面上」的「精確對焦影像」的拼湊。簡單的說，對焦的好壞左右了最終的結果。想想，在 200 多幅影像中，有一幅稍微失焦的影像，則拼合的影像中，便有一處影像模糊，真是「一粒老鼠屎，壞了一鍋粥」。

此處對於焦點調校的部分，有顯微鏡本身和相機鏡頭兩個部分，其中顯微鏡的焦點會隨著我們要觀察的部位而有所調整；但相機鏡頭的焦點，則在完成對焦後，便不應再有更動。所以先針對標本的某一區域，調整顯微鏡焦點至最清晰為止，接

著再精確地調整相機鏡頭的焦距。

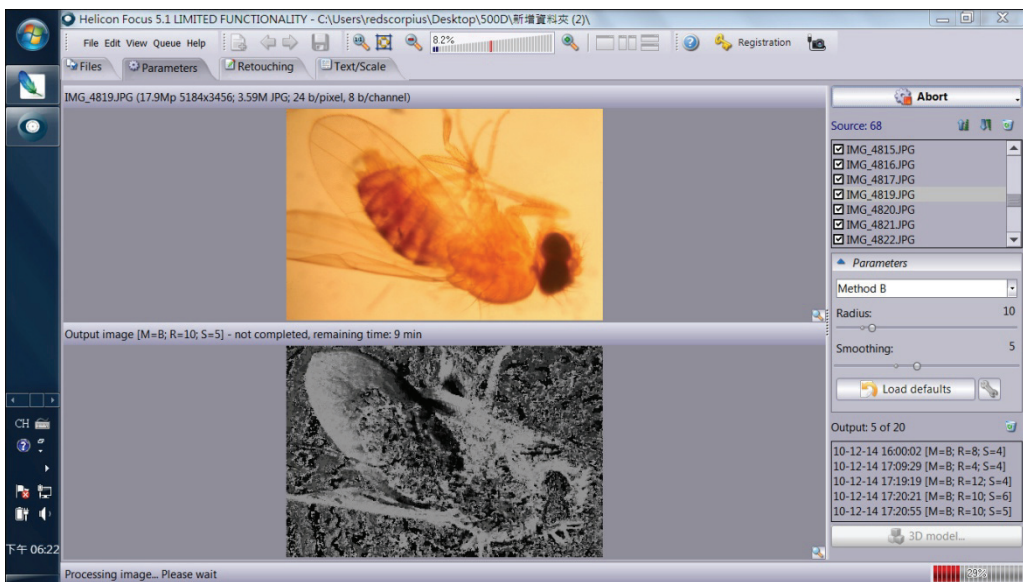
完成相機鏡頭的對焦作業後，就是最關鍵的步驟了。在拍攝之前，我們先微調顯微鏡的焦點，並仔細觀察目標焦平面的變化，記錄最上及最下層時的刻度，最後則由最上層的焦平面起，每調整對焦座的最小刻度一次、拍攝一幅影像，直至最下層的焦平面為止，在這一被「包圍」的影像中，便包含了目標各個不同部位的清晰影像，在將這批影像整理至一資料夾後，接著就是影像處理和電腦合成的部分了。

參、軟體操作流程

辛苦地完成影像拍攝後，接著就要以影像處理軟體進行後續的堆疊程序了。首先至「赫立肯焦點」下載頁面 http://www.heliconsoft.com/focus_downloads.html，下

載「赫立肯焦點」並完成安裝，使用者們在這裡可依自己的電腦規格挑選需要的版本。

開啟軟體後點選檔案(file)建立一個新的專案(Add new item(s))，匯入所要處理的全部影像，接著點選參數(parameter)進行參數的設定，在這裡我們需要調整的有兩項，分別為半徑 (Radius) 和平滑度 (Smoothing)；依照影像的多寡和焦平面的複雜程度，半徑是最直接影響結果的選項，需要配合畫素的大小去做調整，我們可由軟體的原始設定值起，以「包夾」的方式逐步找出最合適的數據。但是遇到標本重疊的部分時，如圖四中果蠅的翅膀和尾部，都能見到屬於不同焦平面的影像，會發生「上層結構被破壞來顯現下層」或「犧牲下層細節以呈現上層」的狀況，這便需要使用者自己的判斷與選擇了。



圖四

在完成半徑值的選擇後，最後再嘗試幾次平滑度，找出最想要的銳利程度。

經過多次嘗試後，會得到多幅不同參數設定的影像，列表在軟體右下角的輸出(Output)處，但要注意軟體的儲存上限是20幅。我們即可由其中挑選出想要的影像進行儲存，如此一來便大功告成。

如果想獲得更滿意的結果，需要使用其它的影像處理軟體，針對影像的亮度、對比等進行調整，讓影像能更進一步地貼近我們的視野，完美呈現顯微鏡下的小小世界。

肆、結語

「赫立肯焦點」這類的影像堆疊軟體，其設計目的就是為了解決光學上所無可避免的「淺景深」問題，所以用以執行的影像應為景深較淺者，若使用的影像景深太深，

則不但無法再增加影像的細膩度，反而可能破壞原有的細節。

另一方面，在原始影像的拍攝上，若不同焦平面間能有越密集的影像，則最終輸出的影像層次也會越加細膩，但過多的影像卻也可能造成軟體無法辨識而適得其反。所以其中的平衡點，就得靠使用者自己的拿捏了。相信在經過多方的嘗試後，大都能獲得宛若專業等級的顯微攝影作品。

科技與軟體的搭配，讓有心嘗試的人，都能一圓近乎完美的顯微攝影夢。

參考文獻

- 如何將顯微影像拍得更立體 <http://tw.myblog.yahoo.com/espa-richard/article?mid=3542&next=1431&l=a&fid=6>
- 博物標本照片後製作業(二) <http://tw.myblog.yahoo.com/hosl660729/article?mid=570&prev=572&l=a&fid=22&sc=1>