

(c) Heribert Cypionka

[Questo testo viene visualizzato nella finestra di aiuto di PICOLAY]

Si prega di utilizzare la guida online (brevi riferimenti, tutorial, consigli e trucchi) per ottenere supporto con i processi di lavoro e con gli esempi. Potete trovarlo in PICOLAY alla voce "Help | Short Reference (HTML)" o all'indirizzo www.picolay.de alla voce "Manual" e "Tutorial".

PICOLAY (da **P**ICture **O**ver**L**AY) è un programma per computer Windows (TM) progettato per la generazione di immagini migliorate e proiezioni tridimensionali da una serie di immagini digitali.

PICOLAY è un programma gratuito e viene fornito senza alcuna garanzia. L'autore non è responsabile per la perdita di dati o per qualsiasi altro danno causato da PICOLAY. Conservate sempre un backup di tutte le immagini elaborate con PICOLAY. Il copyright del programma rimane di proprietà dell'autore.

Si prega di citare il sito web (**www.picolay.de**) quando si utilizza PICOLAY per la produzione di immagini pubblicate.

[==>] **Caratteristiche principali**

Anche se PICOLAY è un programma piccolo e molto facile da usare, ha funzioni potenti. È progettato per

- Focus stacking (impilaggio del Focus): PICOLAY genera immagini nitide con una maggiore profondità del Focus da una serie di immagini scattate a livelli di Focus sequenziali (i cosiddetti z-stacks).

- impilaggio basato su colori target invece che su aree nitide,

- una media delle immagini,

- l'aggiunta o sottrazione di immagini,

- allineamento automatico di posizioni e dimensioni se le immagini non sono perfettamente congruenti,

- regolamento automatico della luminosità di immagini in una stack,

- uno sfondo perfetto oppure bilanciamento del bianco nel caso di inquinamento o gradienti nel percorso del raggio,

- la possibilità di aggiungere testo e una barra di scala alle immagini.

PICOLAY genera animazioni di serie di immagini sia come slide show che come gif animato. Ci sono molte altre funzioni di ritocco per migliorare le immagini modificando parametri come nitidezza, contrasto, dimensioni, ecc.

Le caratteristiche speciali di PICOLAY sono varie routine per generare viste tridimensionali, proiezioni e animazioni:

- Generazione di immagini tridimensionali da una singola pila scattate in una prospettiva costante.

- Generazione di immagini 3D rotanti, immagini di sovrapposizione rosso-ciano e immagini per la visione incrociata o parallela, e file MPO o immagini interlacciate per le TV 3D.

- 'Hologram stacking', una routine che rende visibili le strutture solitamente nascoste dal normale processo di impilaggio.

Così PICOLAY offre gratuitamente un po' di 'microscopia confocale'. Ha anche diverse funzioni per modificare i parametri generali dell'immagine come nitidezza, contrasto, luminosità, saturazione del colore, correzione gamma, ridimensionamento e ritaglio.

Visitate **www.picolay.de** per ulteriori informazioni.

[==>] **Installazione**

Scaricate l'ultima versione di PICOLAY da www.picolay.de. PICOLAY è un'applicazione portatile. La routine di installazione può installare il programma in qualsiasi cartella, su scheda SD o chiavette USB. Immagini di esempio e file di aiuto sono installati in una sottocartella. Se i file di aiuto non vengono trovati durante il runtime PICOLAY li cercherà su internet. L'installazione non modifica alcun file di sistema.

ATTENZIONE

Si consiglia di installare PICOLAY in una sottocartella diversa dalla cartella dei programmi di Windows. Altrimenti potrebbero esserci conflitti con i diritti di amministratore oppure si deve avviare il programma con un clic del tasto destro del mouse su "Esegui come amministratore".

[==>] **picolay.ini**

L'ultima cartella da cui sono state caricate le immagini, viene automaticamente salvata sotto 'picolay.ini' e verrà riutilizzata nella sessione successiva.

[==>] **Focus stacking per l'utente impaziente** //Quick focus stacking for the impatient user

- Selezionare le immagini (File | Aggiungi immagini o Ctrl-A)
- Cliccare su Stack operations | Stack con i parametri attuali o premere il tasto Ctrl-F1 per avviare la routine di impilamento con i parametri standard preimpostati.
- Se necessario, variare i parametri come descritto di seguito.

[==>] **Finestra principale: Menu File** // File menu

Aggiungi immagine(i) | Ctrl-A //Add images

- Permette di selezionare una lista di immagini da elaborare. Tutte le immagini devono essere selezionate dalla stessa cartella e le immagini risultanti verranno salvate anche lì.

Cancella l`elenco // Clear list

- rimuove tutte le immagini dalla lista senza cancellarle.

Impilare più sottocartelle // stack multiple sub-folders

- consente di impilare le immagini in più sottocartelle con un solo clic. I risultati saranno salvati nella cartella di livello superiore. Fate attenzione ad impostare i parametri come 'allineamento delle immagini' e 'Salva mappe di profondità' prima di iniziare questa routine.

'Salva risultato come', 'Salva mappa di profondità come', 'Stampa finestra dei risultati come' // 'save result as', 'save depth map as', 'print result window as'

- consente di salvare e stampare i risultati in modo specifico.

- Esci da PICOLAY | Ctrl-Q // Exit PICOLAY

- termina il programma. Vi verrà chiesto se i nuovi file generati da PICOLAY devono essere conservati o cancellati dal disco.

[==>] **Formati d'immagine che PICOLAY può gestire** // Image formats PICOLAY can handle

PICOLAY può (teoricamente) gestire d'immagini fino a $2^{16}-1 = 65535$.

Può aprire e salvare immagini con il seguente formato:

- JPEG (*.jpeg, *.jpg)
- Bitmap (*.bmp)
- PNG (*.png)
- MPO (*.mpo)

I file MPO possono essere generati dalle prime due immagini jpg contrassegnate nella lista. Se aprite un file MPO, questo verrà diviso e i due file jpg in esso contenuti verranno visualizzati separatamente.

- GIF (*.gif)

PICOLAY può generare file gif animate ma non mostrare l'animazione.

- RAW (*.dng, *.Cr2, *.nef)

Per le immagini RAW è necessario aver installato il CODEC appropriato per Adobe, Canon o Nikon. Si prega di controllare i siti web corrispondenti per il download.

- Le immagini TIF (*.tiff o *.tif) possono essere aperte, ma saranno modificate internamente. PICOLAY non può salvare i file tif.

[==>] **Impostare il formato del file per il salvataggio** // Setting the file format for saving

Il formato del file da salvare si definisce sotto "Opzioni" (vedi sotto).

È facile trasformare una lista di immagini da un formato all'altro: Basta cliccare su "Opzioni" e selezionare il formato di destinazione sotto [Salva con nome=]. Poi cliccate su 'Migliora', (eventualmente modificate alcuni parametri) ed eseguite 'Applica a tutte le immagini contrassegnate'.

[==>] **Immagini risultanti generate da PICOLAY** // Resulting images generated by PICOLAY

La maggior parte delle routine PICOLAY genera file che vengono automaticamente salvati e aggiunti (non marcati) alla lista delle immagini (vedi sotto). La maggior parte dei nuovi file hanno nomi che iniziano con 'py'. PICOLAY non sovrascriverà le immagini originali, ma sovrascriverà i file 'py' con lo stesso nome senza preavviso! I file risultanti sono generati nella stessa directory delle immagini analizzate. Pertanto si raccomanda vivamente di copiare le immagini di ogni pila da analizzare in una cartella separata.

Quando si esce da PICOLAY viene chiesto se tutti i file 'py' della lista devono essere cancellati (non lasciando residui sul disco). Se li cancellate, assicuratevi di averli salvati prima del risultato finale sotto un nome che non inizi con 'py'. (si può raggiungere sotto 'lista delle immagini | Rinominare i file contrassegnati con un nome').

Eccezioni: clip, enh, xy e per file

Se si decide di ritagliare un rettangolo da TUTTE LE IMMAGINI MARCATE ('modificare | ritagliare tutte le immagini marcate') i risultati saranno salvati sotto 'clip' + nome del file originale. Allo stesso modo, le serie di immagini migliorate saranno salvate sotto 'enh' + nome del file originale, le immagini elaborate dalle subroutine di autoallineamento x-/y- o di auto-regolazione della luminosità saranno salvate rispettivamente sotto 'xy' oppure 'by'+ nome del file originale.

Se selezionato sotto 'Opzioni' il nome originale della prima immagine marcata nella lista verrà messo davanti ai nomi py generati da PICOLAY.

[==>] **Selezionare le immagini** // Select pictures

Il primo passo è quello di selezionare le immagini. Cliccare su 'File' e 'Aggiungi immagini'. Poi cliccate sulla prima immagine della serie, tenete premuto il tasto SHIFT e cliccate sull'ultimo file di immagini della vostra serie. Per selezionare solo una parte dei file dalla vostra directory, potete tenere premuto il tasto CTRL e cliccare su ogni file separatamente.

Una volta selezionate le immagini, i loro nomi vengono visualizzati nella casella di riepilogo a sinistra. PICOLAY mette i file in ordine alfabetico. Fate attenzione che i nomi abbiano la stessa sequenza dei livelli del vostro z-stack. La sequenza può essere invertita sotto "Elenco immagini".

Suggerimento 1: Per familiarizzare con PICOLAY utilizzate prima di tutto immagini di piccole dimensioni (e copiatele in una directory separata prima di iniziare!)

[==>] **Sfogliare l'elenco delle immagini** // Browsing the image list

Le immagini selezionate possono essere visualizzate cliccando nella casella di riepilogo o con i tasti freccia su e giù. Facendo doppio clic sui nomi si possono selezionare [X] ... o deselezionare [] ... i file per l'ulteriore elaborazione. In alternativa si possono alternare tutti i contrassegni, cancellare le immagini selezionate, cancellare la lista ecc. sotto la voce del menu 'Lista immagini'.

Si può ingrandire e rimpicciolire cliccando su [-] di [+] nella finestra dell'immagine.

Naturalmente in questo caso PICOLAY non modificherà le immagini originali. Un clic sul numero al centro riporta alla vista al 100%.

Una caratteristica speciale di PICOLAY è la seguente: Quando avete ingrandito o avete selezionato una certa parte di un'immagine, la posizione e le dimensioni saranno mantenute costanti durante lo scorrimento di altre immagini nella lista.

[==>] **Gestione della 'Lista immagini'** // Handling the 'Image list'

Sotto la voce del menu 'image list' si può invertire l'ordine dei file immagine. Questo è rilevante perché PICOLAY presuppone che la prima immagine mostri il livello superiore e perché solo la prima immagine può essere aggiunta o sottratta dal resto della lista. (Alla fine si dovrà rinominare il file da aggiungere prima di selezionarlo).

È anche possibile capovolgere il segno (facendo doppio clic) e cancellare dal disco alcuni o tutti i file selezionati. Inoltre, è possibile rinominare i file contrassegnati sostituendo i caratteri nella sequenza dei caratteri del nome. Questa funzione è utile, ad esempio per sfuggire alla cancellazione automatica dei file 'py...' al termine del programma.

È possibile cancellare la lista (senza cancellare alcun file), o aggiungere nuove immagini, o generare file mpo per visualizzarli, ad es. su una TV 3D.

[==>] **Generare un file MPO** // Generate an MPO file

Per questa funzione verranno utilizzate le prime due immagini jpg contrassegnate nella lista. Il nuovo file mpo viene salvato nella cartella corrente senza mostrare il nome nella lista. (Prima di generare un file MPO dovrete utilizzare i metodi disponibili nella finestra 3d-view per ottenere le immagini jpg adatte per la vista dell'occhio sinistro e dell'occhio destro).

[==>] **Generazione di un'immagine gif animata** // Generating an animated gif image

La presentazione può essere trasformata in un unico file gif animato. Si prega di considerare che un gran numero di immagini risulta in file di grandi dimensioni (la dimensione del file aumenta con il quadrato delle dimensioni dell'immagine!) Non dategli un nome senza il ".gif" alla fine.

Le immagini gif animate possono essere aperte, ma l'animazione non sarà (ancora) visualizzata da PICOLAY. I browser Internet possono mostrare l'animazione senza bisogno di un driver speciale.

[==>] F12 **Slide show delle immagini selezionate** // Slide show of selected images

Con il tasto F12 o sotto "Elenco immagini | Avvia presentazione" è possibile ottenere una presentazione animata di tutte le immagini contrassegnate. Sotto 'Opzioni' si può regolare la velocità di visualizzazione delle immagini. Inoltre, raggiunto la fine della lista, si può impostare se lo show deve tornare indietro o ripartire dalla prima immagine. Cliccando sull'immagine o sulla lista si interrompe lo show. Questa funzione può essere utilizzata sia per la pila originale che per le rotazioni 3D a passi generati da PICOLAY, o per qualsiasi altra serie di immagini.

[==>] **Finestra immagine: Modalità di visualizzazione** // Image window: Display modes

[==>] [Schermo intero] / [Metà schermo] // [Full screen] / [Half screen]
Cliccando su [Full screen] o [Half screen] si cambia la dimensione del display.

[==>] [Adatta alla finestra] / [Imposta al 100%] // [Fit to window], [Set to 100%]

Cliccando su [Fit to window] o [Set to 100%] si cambia la dimensione delle immagini.

[==>] Ingrandisci o rimpicciolisci // Zoom in or out

Cliccando su [+] di [-] nella finestra dell'immagine (così come nella finestra dei risultati) si modifica il fattore di zoom.

[==>] **Finestra immagine: Funzioni di modifica** // Image window: Edit functions
Sotto 'Modifica' si può copiare un'immagine o parti di essa negli appunti. Altre funzioni sono 'Ritaglia' o incolla un'immagine dagli appunti.

Con 'Ritaglia tutte le immagini contrassegnate (crop all marked images)' si può selezionare l'area interessante nel vostro z-stack per l'ulteriore elaborazione. In questo caso i nuovi nomi dei file saranno 'clip' + <nome originale>.

Il contenuto della finestra dell'immagine può essere copiato nella finestra dei risultati come 'Risultato' o come 'Mappa di profondità'. Questa funzione può essere utilizzata per apportare modifiche ai risultati dell'impilaggio o alla mappa di profondità, prima di utilizzarli per le proiezioni 3D.

[==>] Finestra immagine: Migliora l'immagine // Enhance image

Quando viene visualizzata un'immagine selezionata, potete modificare una serie di parametri dell'immagine cliccando su "Migliora immagine" sul bordo superiore della finestra. Controllate prima il risultato, poi applicare le modifiche. Non esiste la funzione 'Annulla' come nelle altre routine.

Tuttavia, verrà generato un nuovo file. Se si 'Applica' il miglioramento ad una singola immagine, il risultato sarà salvato automaticamente sotto 'pyenhanced-01.jpg' (con numeri crescenti alla fine). Inoltre, si può salvare il risultato visualizzato selezionando 'Salva risultato con nome' o Ctrl-S).

Le trasformazioni selezionate possono essere applicate a tutte le immagini contrassegnate se la casella corrispondente è selezionata. In questo caso i risultati saranno salvati sotto 'enhy' + <nome originale>.

Selezionate il formato del file delle immagini generate sotto 'Opzioni | Salva con nome'.

[==>] Finestra immagine: Funzioni del mouse // Mouse functions

La funzione standard è il 'Rettangolo' utilizzato per selezionare le aree da ritagliare o copiare negli appunti.

Suggerimento: Impostare il fattore di zoom al 100% o al 50% per ottenere la visualizzazione più veloce delle azioni del mouse.

Ci sono diversi altri 'Strumenti del mouse (mouse tools) selezionabili:

[==>] Mouse: Ritocco con il pennello // Retouching with paintbrush

Il "Pennello" è usato per dipingere sull'immagine. Cliccando con il tasto destro del mouse sull'immagine, la pipetta verrà alimentata con il colore sotto la punta, indicato nella finestrella degli strumenti. Muovendo il mouse con il tasto sinistro premuto (o il tasto Ctrl!) si dipinge sull'immagine con i bordi in dissolvenza. È possibile ripristinare l'immagine fino all'ultima posizione del mouse cliccando su 'Undo' (situato sopra l'immagine) o premendo 'Ctrl-Z'.

Lo spessore della linea del pennello è indicato da un cerchio tratteggiato, e viene regolato nella finestra aggiuntiva dello strumento. Infine si può scegliere se le modifiche devono essere 'Salvate con un nuovo nome' che dà un nuovo file chiamato 'pyenhanced-...' o 'Sovrascrivi immagine corrente'.

[==>] Mouse: pulire lo sfondo // Clean background

Questa funzione aiuta a inserire un oggetto in uno sfondo omogeneo senza che sia necessario un uso molto accurato del pennello. Per prima cosa, cliccate con il tasto destro del mouse sul colore della vostra immagine che volete impostare come sfondo. Poi (a sinistra) cliccate sul blocco "Colore di sfondo" dello strumento "Pennello del mouse | Pennello" per definire questo colore come sfondo. Ora impostate la larghezza del pennello ad un valore piuttosto alto (per esempio, da 16 a 64) e circondate il vostro oggetto con il tasto sinistro del mouse premuto. Ogni volta che le patch dell'area dello sfondo non sono sovraverniciate, cliccate con il tasto destro del mouse su queste patch e riprovate. Se parti del vostro oggetto vengono sovraverniciate per errore, potete usare la funzione Undo e potete impostare i campi di tolleranza per la luminosità e la deviazione del colore su valori più bassi.

[==>] **Mouse: 'Clona nell'immagine del risultato'** // 'Clone to result image'
'Clonare nell'immagine del risultato' copia l'area sotto il cerchio del mouse nella finestra dell'immagine nella stessa posizione della finestra del risultato (indicata da un anello in entrambe le finestre). Ciò consente l'impilamento manuale. La mappa di profondità manterrà le informazioni sul livello utilizzato per la clonazione, permettendo così una corretta proiezione 3D. Solo le immagini originali utilizzate per l'impilamento devono essere marcate durante la clonazione nella finestra dei risultati. Per il posizionamento esatto, la larghezza del pennello può essere regolata come descritto sopra, e si può ingrandire cliccando su [+].

[==>] **Mouse: 'Clona all'interno dell'immagine'** // 'Clone within image'
Questa funzione permette di clonare aree all'interno della stessa immagine, ad esempio per sovrascrivere elementi di disturbo con uno sfondo indisturbato. Prima cliccate con il tasto destro del mouse sulla posizione di destinazione. Poi cliccare con il tasto sinistro del mouse sulla sorgente e muovere delicatamente il mouse attraverso l'area di origine osservando i cambiamenti nella zona di destinazione, che è indicata da un secondo anello.

[==>] **Mouse: 'Inserisci testo'** // 'Insert text'
Si apre una nuova finestra per la selezione di una stringa di testo, del carattere, del colore e della direzione (verticale o orizzontale).
Un clic successivo posiziona il testo sull'immagine. Usate 'Annulla' (undo) e ripetete il posizionamento del testo fino a quando non siete soddisfatti del risultato. Poi 'Salva' il risultato.
Potete aggiungere il testo a tutte le immagini contrassegnate se spuntate la casella corrispondente.

[==>] **Mouse: 'Inserire la barra di scala'** // 'Insert scale bar'
Si apre una nuova finestra per la definizione delle dimensioni e del colore di un rettangolo. Un successivo clic sull'immagine posiziona la barra. Usate 'Annulla' e ripetete il posizionamento della barra fino a quando non siete soddisfatti del risultato. Poi 'Salva' il risultato.
Potete aggiungere la barra di scala a tutte le immagini contrassegnate se spuntate la casella corrispondente.

[==>] **Operazioni di stack** // 'Stack operations'
Una volta selezionate le immagini, vengono abilitati vari compiti. Le operazioni di impilamento possono essere avviate con i tasti Ctrl-F1, F2...F12 delle corrispondenti voci del menu. Le operazioni vengono applicate solo alle immagini contrassegnate.

[==>] **Impilaggio basato su strutture pertinenti**
Questo è l'impilamento normale della messa a fuoco. PICOLAY può fare anche l'impilatura "a colori" o "a ologramma" (vedi sotto).

[==>] Ctrl-F1 **Impilaggio con le impostazioni correnti** // stack with current settings
Il tasto Ctrl-F1 o cliccando su 'impilare con i parametri correnti' si avvia la routine di impilaggio utilizzando i parametri correnti. Nella finestra di destra si può seguire come il risultato diventa nitido passo per passo. Al termine, nella finestra di sinistra viene visualizzata una sovrapposizione dell'immagine nitida e della mappa di profondità. Questo dovrebbe aiutarvi a valutare le prestazioni.

Il primo risultato non sempre rappresenta l'ottimale. Spesso capita di dover modificare alcuni parametri per migliorarlo. Questo può essere fatto anche prima di iniziare la routine di impilatura.

[==>] **F2 Modificare parametri di impilaggio** // Edit stacking parameters
Premere F2 'Set Stacking parameters' per regolare i parametri prima del impilaggio. Si apre un nuovo pannello a destra, dove è possibile regolare alcuni parametri. Qui l'elenco dei parametri e i loro effetti:

[==>] **'Soppressione del rumore'** // 'Noise suppression'
è impostato su un valore che permette la separazione tra uno sfondo liscio e aree con strutture. In questo modo si evita che vengano selezionati piccoli disturbi o rumori anziché filtrarli. I pixel rumorosi (a basso contrasto) saranno mediati, dando uno sfondo liscio. Se il valore è troppo alto, si potrebbero perdere i dettagli.

[==>] **'Allargare o restringere le pezze'** // 'Narrow or widen patches'
sposta le transizioni tra le aree strutturate e quelle non strutturate. Questa funzione diventa visibile solo con valori di contrasto superiori a 1. I valori positivi sono usati per riempire i vuoti non nitidi all'interno di un oggetto. I valori negativi restringono il bordo esterno di una struttura.

[==>] **'Filtro:'** (Smart o 1 - 10)'.
definisce il filtro per il rilevamento dei dettagli dell'immagine. Con 'Smart' il filtro sarà flessibile a seconda delle strutture nelle diverse aree dell'immagine. È anche possibile fissare il filtro ad un valore compreso tra 1 (fine) e 10 (grossolano).

[==>] **'Scegliere i fotogrammi in basso o in alto'** // 'Prefer bottom or top frames'
definisce in che misura le strutture nei telai superiori devono coprire quelle situate più in profondità nella pila (e nell'oggetto visualizzato). I valori negativi spostano le aree a basso contrasto verso il retro.

[==>] **'Allineare le immagini'** // 'Align images'
corregge gli spostamenti e le variazioni di dimensione delle immagini. Deve essere fatto se la vostra pila è stata generata a basso ingrandimento e, in particolare, se è stata scattata con uno stereomicroscopio. Ci sono due opzioni: '1x' eseguirà l'allineamento durante il processo di impilatura, iniziando dall'ultima immagine della lista. '2x' genererà prima le immagini allineate, iniziando dal centro della pila. Le immagini allineate saranno salvate con nuovi nomi (xy...). Sotto 'Opzioni' potete disattivare la correzione delle dimensioni e/o attivare un'ulteriore correzione della rotazione nella vostra pila.

[==>] **'Test 4 impostazioni filtro'** // 'Test 4 filter settings'
genera quattro diversi risultati di impilamento variando la dimensione del filtro e la soppressione del rumore. Questo potrebbe aiutare a trovare facilmente i parametri perfetti... I parametri applicati sono documentati nei nomi dei file (vedi paragrafo successivo).

[==>] **'Miglioramento automatico'** // 'Auto-enhance'.
aumenta la nitidezza e il contrasto del risultato.
Cliccando su 'Go' si avvia la routine di impilaggio. Potete seguire il processo nella finestra dei risultati. Infine, un file non contrassegnato con nome, ad esempio

'pysharp_min6_pa3_pr5_fil5_it.jpg' verrà salvato e aggiunto alla casella di riepilogo (list box) con 'pysharp' che significa file PICOLAY basato sulla nitidezza, e 'sup6_pa3_pr5' che descrive i parametri applicati per la soppressione del rumore, l'ingrandimento delle pezze (patch) e/o la preferenza dei fotogrammi superiori. '_en' indica che l'immagine risultante è stata automaticamente migliorata.

[==>] **Mappa di profondità** // Depth map

In concomitanza con l'immagine nitida, viene generata una mappa che mostra da quale livello è derivato ogni singolo pixel. La mappa di profondità è utile per trovare i parametri di impilaggio perfetti. Le aree grigie indicano dove i pixel sono stati mediati in quanto non sono state rilevate strutture nitide. Le informazioni contenute nella mappa vengono utilizzate anche per generare immagini e proiezioni tridimensionali (vedi sotto). Per salvare automaticamente la mappa di profondità, attivare questa funzione sul pannello dei parametri di

.

Per vedere la mappa e passare dall'immagine impilata alla mappa di profondità cliccare su '[Flip view=] Result' (o '[Flip view=] Depth map'). Il giallo indica i livelli più alti e il blu i livelli più bassi della pila. Se prima selezionato sotto 'Opzioni', la mappa di profondità viene salvata automaticamente come 'pymap...' e aggiunta alla lista delle immagini (non marcata).

Di nuovo: Si può migliorare l'immagine risultante cliccando su [Migliora immagine (enhance image)] come descritto sopra.

[==>] F3 **Impilaggio a colori** // Colour-based stacking

L'avvio di 'Impilaggio basato sui colori' nella finestra principale o 'F3' apre la routine di impilaggio basato sui colori. Viene visualizzato un nuovo pannello 'Imposta colori target'. È possibile definire un colore target cliccando nell'immagine originale con il tasto destro del mouse, oppure inserendo il valore dei canali RGB nei campi corrispondenti del pannello, oppure cliccando sui quadrati rosso, verde, blu, nero e bianco.

Soprattutto il bianco e nero (R/G/B = 0/0/0 e/o 255/255/255) forniscono informazioni interessanti sulla vostra pila di immagini!

Cliccando su 'Go' si otterrà un'immagine composta da quei pixel ORIGINALI della pila Z che sono più vicini al colore di destinazione. Questa funzione è particolarmente utile per le immagini a contrasto di fase e gli oggetti colorati.

L'impilaggio a colori genera anche una mappa di profondità (vedi sopra) e apre le seguenti possibilità tridimensionali:

Se si seleziona la casella con 'Escludere tutti colori non target (Strip non-target part)', il colore target sarà filtrato dalla pila mentre gli altri colori vengono trascurati.

L'immagine risultante viene salvata come 'pycolour_r0_g0_b0.jpg' (con numeri che indicano i valori RGB) e aggiunta alla lista delle immagini (non marcata). Se selezionata sotto 'Opzioni' la mappa di profondità viene salvata come 'pycolour2Dmap_r0_g0_b0.jpg'.

[==>] F4 **La media delle immagini** // Average of images

L'immagine media si ottiene premendo il tasto F3 delle "operazioni di impilaggio" nella finestra principale. L'immagine risultante viene salvata come 'pymean.jpg' e aggiunta alla lista delle immagini (non marcata). [Di nuovo: i file più vecchi con lo stesso nome saranno sovrascritti!]

Per migliorare la qualità del risultato si può aumentare la nitidezza e il contrasto utilizzando [Enhance image]. In alcuni casi questo dà un risultato eccellente, paragonabile all'impilaggio basato sulla nitidezza.

Creare la media potrebbe essere altrettanto utile, se si vogliono combinare diverse immagini prodotte da PICOLAY. Per esempio, provate cosa succede se si fa la media delle immagini finali tra i pixel più scuri e più chiari...

[==>] F5 **Inserire immagini intermedie** // Insert intermediate images

Questa funzione genera immagini aggiuntive inserite tra gli originali. Questo può essere utile per transizioni fluide in una proiezione di diapositive o per proiezioni 3D, se volete aumentare il numero di livelli. Il nome delle nuove immagini otterrà una 'i' aggiunta alla fine.

[==>] F6 **Allineamento automatico delle immagini e ridimensionamento** //

Auto-align images and resize

Se alcune delle immagini originali sono spostate rispetto alla loro posizione orizzontale/verticale, alla rotazione, o se variano le dimensioni dell'oggetto, è possibile compensarlo utilizzando la funzione di autoallineamento. Questa routine sarà particolarmente utile per le immagini scattate attraverso uno stereomicroscopio, dove l'oggetto appare in movimento con il Focus, così come per le immagini macro, dove gli oggetti appaiono più grandi quando l'obiettivo si avvicina. Le immagini risultanti saranno salvate sotto la voce 'xy' + <nome file originale>. Utilizzate questa funzione prima dell'impilaggio.

Sotto 'Opzioni' la funzione di ridimensionamento può essere disattivata o riattivata. Se è necessaria una correzione della rotazione, anche questa deve essere attivata sotto 'Opzioni'.

CONSIGLIO: Se l'allineamento non è perfetto, una seconda esecuzione potrebbe dare un risultato migliore.

CONSIGLIO: Se avete dei pixel caldi sul vostro chip o della polvere nel vostro sistema ottico, si raccomanda di prendere delle immagini non nitide sopra e sotto l'oggetto, di fare una media di queste e di sottrarle tramite la routine 'Imposta sfondo/ campo piatto' (F10), vedi sotto. In caso contrario, queste particelle potrebbero crescere fino a formare delle linee di disturbo.

Nota: Se invece le immagini nella vostra pila non vengono spostate, la funzione 'Auto-allineamento e ridimensionamento' potrebbe compromettere il risultato dell'impilamento.

[==>] F7 **Regolazione automatica della luminosità** // Auto-adjust brightness

Se alcune delle immagini nella vostra pila differiscono per quanto riguarda la luminosità, provate a 'Auto-regolare la luminosità' per compensarla. Le immagini risultanti saranno salvate sotto 'by'+ <nome file originale>. Utilizzate questa funzione prima di impilare.

[==>] F8 **Impostare il bilanciamento del bianco** // Set white balance

Con questa funzione si può correggere il bilanciamento del bianco della/e immagine/i. Basta cliccare con il tasto destro del mouse sullo sfondo e poi su 'Vai (go)'. Le immagini corrette saranno salvate automaticamente con 'py' inserito davanti al nome del file originale. Questi file possono essere utilizzati per un'ulteriore elaborazione PICOLAY dopo aver modificato il contrassegno in modo corrispondente.

[==>] F9 **Aggiungere o sottrarre un'immagine** // Add or subtract an image
PICOLAY permette di aggiungere (o sottrarre) la prima immagine della lista a tutte le immagini successive. Tenete presente che i valori RGB superiori a 255 e inferiori a 0 non sono ammessi e saranno tagliati automaticamente.

[==>] F10 **Impostare la correzione del campo di sfondo** // Set background/flat field correction
Selezionando un 'Fattore' di -1 (un fattore negativo significa sottrarre) questa funzione può essere utilizzata per eliminare gli elementi di disturbo presenti in tutte le immagini della vostra pila (ad esempio, 'pixel caldi' o particelle di polvere sulle vostre lenti). La funzione non si limita a sottrarre la prima immagine (risulterebbero immagini quasi nere) ma aggiunge i valori RGB necessari per raggiungere il colore di sfondo che avete selezionato cliccando precedentemente nell'immagine con il tasto DESTRO del mouse. Il risultato migliore si ottiene di solito quando selezionate il colore di sfondo naturale.

[==>] F11 **Dividere per la prima immagine** // Divide by 1st image
Questa funzione dividerà tutte le immagini contrassegnate per la prima immagine contrassegnata nella lista. Questo viene fatto in base al colore utilizzando i valori RGB 0-255 per ciascuno dei canali. Ad esempio, se la prima immagine (divisore) ha un valore di 127 nel canale rosso, allora il canale R delle altre immagini sarà diviso per 255/127 (cioè moltiplicato per $127/255 = 0,5$).

[==>] **Montare due immagini affiancate** // Mount 2 images side by side
Genera e salva una bitmap chiamata 'sbs...(nome originale).bmp' dalle prime due immagini contrassegnate nella lista. La funzione può essere utile per combinare la vista destra e sinistra delle immagini stereo.

[==>] **Finestra principale: Opzioni** // Options

Salva con nome // 'Save as'

- imposta quale formato viene utilizzato per le immagini generate da PICOLAY (bmp, jpg, gif, png, o lo stesso dell'originale).

File con nome forniti di codice temporale // 'Name files with time stamp'

- aggiunge un codice temporale di 5 caratteri all'inizio del nome del file (che aumenta in ordine alfabetico ogni 1/10 di secondo)

Aggiungere il nome originale al file py // 'Add original name to py file'

- aggiunge al file py il nome della prima immagine contrassegnata nella lista

Ridimensionamento durante l'allineamento // 'Resize during alignment'

- permette di disattivare la correzione delle dimensioni durante l'allineamento, il che è utile con le pile di macrofotografia ma non con le pile di microfotografia.
(L'impostazione standard è: ON)

Correzione delle rotazioni nel allineamento // 'Correct rotation w/alignment'

- dovrebbe essere acceso se le immagini necessitano di correzioni di rotazione nella pila. (L'impostazione standard è: OFF)

Rapporto di ritaglio larghezza/altezza // 'Cropping ratio width:height'

- consente di ritagliare manualmente (preimpostate) o con rapporti fissi di larghezza e altezza, quando ritagliate una singola o tutte le immagini contrassegnate della vostra lista.

Sfondo // 'Background'

- consente di impostare uno sfondo blu scuro o grigio sulle finestre PICOLAY.

Parametri di slide show // 'Slide show parameters'

- consente di impostare la durata di visualizzazione di ciascuna delle immagini di una presentazione (e di una gif animata) (in msec), e se la presentazione inizia dalla prima diapositiva o se si va all'indietro una volta raggiunta la fine della lista.

Mappa di profondità capovolta // 'Flip depth map'

- inverte i colori della mappa di profondità dall'alto verso il basso verso l'alto. (Risultati simili si ottengono quando si usa 'Elenco immagini | Invertire l'ordine delle immagini' prima del processo di impilamento).

Salva la mappa di profondità come bitmap in bianco e nero // 'Save depth map as greyscale bitmap'

- genererà una mappa di profondità in scala di grigi che potrebbe essere utilizzabile da altri programmi come Stereophoto Maker.

Modalità anaglifo // Anaglyph mode

- consente di gestire i problemi di colore delle immagini anaglifi. Si può ridurre l'intensità del colore della metà o applicare l'algoritmo Dubois che sposta i colori su un modello più piacevole (ma non realistico).

[==>] **Finestra principale: Aiuto** // Help

Questo manuale viene visualizzato sotto "Aiuto | Manuale". È possibile passare dalla versione inglese, tedesca, francese, spagnolo e italiana. Per ulteriori suggerimenti ed esempi consultare il "Riferimento breve (HTML)" o controllare www.picolay.de.

- Fate attenzione a scaricare la versione più recente. La data di rilascio della versione PICOLAY che state utilizzando viene visualizzata nella parte superiore della finestra principale.

- Sto ancora sviluppando il programma. Fatemi sapere eventuali commenti, problemi e suggerimenti.

[==>] **Finestra dei risultati**

La finestra di destra viene utilizzata per visualizzare i risultati. Si possono cambiare le dimensioni della finestra e la risoluzione dell'immagine come per la finestra immagine (sinistra).

Capovolgere la visualizzazione // 'flip view'

- Cliccando su **[Flip view=]** si passa dalla visualizzazione del risultato dell'impilaggio alla mappa di profondità.

Modifica // 'Edit'

- Le funzioni 'Edit' si limitano a copiare l'immagine nella finestra dell'immagine di sinistra o negli appunti.

Sinossi // 'Synopsis'

-[Synopsis=] ON forza la finestra di destra nella stessa posizione e nello stesso fattore di zoom di quella finestra a sinistra. Questo è particolarmente utile se si dispone di immagini separate per l'occhio sinistro e per quello destro che si desidera ingrandire.

Vista 3D // 3D view

- La "vista 3D" apre una nuova finestra che permette di impostare i parametri 3D.

Generazione di immagini tridimensionali

Come descritto sopra, le routine di impilaggio (sia quelle basate sulla nitidezza che quelle basate sul colore) generano mappe di profondità (dal blu al giallo, pixel di sfondo in grigio), indicando i livelli utilizzati in ogni posizione. Le informazioni di profondità in questa mappa possono essere utilizzate per produrre varie proiezioni tridimensionali e immagini virtuali 3D.

[==>] Introduzione alle funzioni 3D

Mentre le proiezioni 3D sono abbastanza comuni e facili da guardare, le vere immagini 3D richiedono la generazione di due diverse immagini per l'occhio destro e quello sinistro e una tecnica speciale per l'osservazione. Tuttavia, esse danno una percezione completamente diversa e affascinante!

Alcune persone possono fissare con occhi paralleli o incrociati le due immagini presentando l'oggetto ad angoli leggermente diversi (2 - 4°). Dopo un po' di tempo vedono tre immagini, quella al centro dà un effetto 3D. A seconda degli occhi paralleli o incrociati, la fronte e lo sfondo appaiono scambiati.

Con occhi paralleli è difficile guardare immagini più ampie della distanza tra i nostri occhi (circa 6,5 cm). La visione con occhi incrociati permette di vedere l'effetto anche con immagini più grandi. Molte persone non sono in grado di vedere l'effetto 3D in due immagini adiacenti. In questo caso gli occhiali rosso-ciano (anaglifi) e una sovrapposizione delle diverse viste possono essere la soluzione.

Basandosi su una sola serie di immagini scattate in una prospettiva costante, PICOLAY genera proiezioni 3D a rotazione libera che possono dare un'impressione spaziale naturale (soprattutto se animate) così come genera immagini adatte per la visione parallela o con gli occhi incrociati e le sovrapposizioni rosso-verde.

Una caratteristica speciale è l'"Hologram stacking" - la visualizzazione di strutture che comunemente sono coperte dalle comuni procedure di impilaggio: Se un oggetto ha più di uno strato con strutture interessanti di solito rimane visibile solo quello con il contrasto più alto. Utilizzando proiezioni 3D con angolo di visualizzazione variabile, questo problema può essere risolto con PICOLAY.

[==>] **Utilizzo di PICOLAY per la generazione di viste 3D**

Cliccando su 'Genera viste 3D' nel menu principale o su [3D view] nella finestra dei risultati del impilaggio si apre una nuova finestra che permette di produrre diversi tipi di immagini 3D: coppie di immagini stereo sintetiche per la visione incrociata o parallela, overlay rosso-verde per l'uso di occhiali rosso-verde, file MPO per le TV 3D, paesaggi 3D liberamente ruotabili derivati dalla mappa di profondità, e il cosiddetto impilamento ologramma.

Le dimensioni (larghezza e altezza) delle immagini 3D saranno uguali a quelle delle immagini originali. Tuttavia, le proiezioni lasceranno un po' di spazio inutilizzato. Questo sarà riempito dal colore di sfondo selezionato nel pannello corrispondente.

[==>] **Lunghezza dell'asse Z** // Length of Z axis

L'asse Z (profondità dell'oggetto) è definito rispetto all'altezza dell'immagine (asse Y). Se lo strato più basso e quello superiore della vostra pila z hanno una distanza di 100 µm e l'altezza dell'immagine è di 200 µm il valore corretto sarebbe del 50 (%). Un valore di 0 non darà alcun effetto 3D. Un valore troppo grande comporterà la separazione degli strati dell'oggetto.

[==>] **Ingrandisci la profondità dei pixel** // Enlarge pixel depth

Questa funzione viene utilizzata per riempire le fessure orizzontali e verticali nelle immagini 3D. Valori più grandi per la lunghezza dell'asse Z e l'angolo di visualizzazione (pannello destro) richiedono valori più grandi e viceversa.

[==>] **Proiezione basata sulla mappa di profondità** // Projection based on depth map

Le proiezioni 3D generate sono basate sulla mappa di profondità generata durante il precedente processo di accatastamento.

[==>] **Impilamento di ologrammi** // Hologram Stacking

Questo richiederà una nuova lettura di tutte le immagini -> vedi sotto.

[==>] **Immagini da generare** // Images to be generated

Definisce il formato delle immagini 3D da generare. Se la vista 3D è disattivata, verranno prodotte singole immagini che, tuttavia, possono essere ruotate intorno ai 3 assi.

Le immagini prodotte sono denominate, ad esempio, 'pyrecy_x0_y0_z0.jpg' con i numeri dopo x, y e z che indicano gli angoli di rotazione dei tre assi.

[==>] **Stereo**

Se selezionate 'Stereo', verranno generate due immagini con angoli di visione leggermente diversi (per l'occhio sinistro e destro). L'angolo di visualizzazione viene impostato a destra.

Le immagini prodotte possono essere sovrapposte come immagini rosso-ciano. In alternativa si possono produrre diversi modi di visualizzazione: due immagini separate, immagine MPO, oppure 2, 3 o 4 immagini combinate sul un pannello. Quest'ultimo ha il vantaggio che si possono vedere effetti 3D indipendentemente dal fatto che l'osservatore stia fissando con occhi incrociati o paralleli sul pannello. Le immagini in alto daranno un'impressione convessa, quelle in basso una concava - o viceversa.

[==>] **Rilievo** // Relief

- La funzione di rilievo aggiunge luce (pixel luminosi provenienti dall'alto a sinistra) e ombre alla proiezione. Questo può essere utile se non è possibile una visualizzazione stereo. L'ombreggiatura si basa sulla mappa di profondità, che può essere sovrapposta

alla struttura (in bianco e nero). La densità dei punti e l'intensità delle ombre sono regolate in una finestra separata.

[==>] **Angolo di visualizzazione** // Viewing angle

- Il nostro angolo di visione 3D è più ampio quando siamo seduti vicino allo schermo di un monitor che in una sala conferenze. Pertanto un valore di 3° potrebbe essere buono per un monitor TV, mentre per un pubblico più numeroso il valore dovrebbe essere ridotto a 1,5 o 2°.

[==>] **Distanza** // Distance

- PICOLAY posiziona lo strato intermedio di una pila di immagini a livello dello schermo. Le strutture più vicine appariranno davanti allo schermo. Per evitare che questi ultimi tocchino le finestre delle immagini (violazione dell'immagine 3D) si dovrebbe aumentare il valore della distanza spostando in questo modo l'oggetto nella parte posteriore.

[==>] **Immagine anaglifi** // Red-cyan

- Gli anaglifi sono immagini che mostrano un effetto 3D utilizzando diversi filtri di colore per l'occhio sinistro e destro. Questi possono causare deviazioni di colore, in particolare se sono presenti nell'oggetto colori simili a quelli dei filtri. Per compensare questo problema, si possono provare tre diversi set di filtri [Full color, Half color e Optimised (Dubois)], selezionabili in Opzioni.

[==>] **Impilaggio ologrammi (basato sulla nitidezza)** // Based on sharp structures

- L'impilamento olografico richiede un valore di soglia per assicurarsi che solo i pixel con una nitidezza minima rimangano visibili mentre gli altri vengono soppressi. Spesso il contrasto minimo dovrebbe essere impostato su un valore più alto rispetto a quello utilizzato per l'impilamento basato sulla normale nitidezza. È inoltre necessario impostare una dimensione del filtro (il filtro "intelligente" non è utilizzabile in questo caso). Per rendere tutti i livelli visibili in una serie di immagini risultanti, si dovrebbe usare 'Stepwise rotation'(rotazione a passi).

[==>] **Impilaggio ologrammi (basato sul colore)** // Color-based

- Per l'impilaggio di ologrammi a base di colore devono essere definiti il colore target e la tolleranza. Per impostare il colore, cliccate con il tasto destro del mouse nell'immagine originale o utilizzare la funzione di definizione del colore nella finestra per impilaggio a colori.

Se si seleziona il nero o il bianco come colore target, potrebbe essere necessario un ampio valore di tolleranza. Anche in questo caso, è possibile produrre coppie di immagini per la visione in stereo o immagini con sovrapposizione di rosso-ciano.

[==>] **Sfondo** //Background

Come sfondo utilizzato per i pixel al di sotto del contrasto minimo potete utilizzare la media di tutte le immagini o un colore selezionato. Dopo aver cliccato su "Colore" è possibile impostarlo con un clic destro in un'immagine originale o dopo aver cliccato sulla barra dei colori. Un colore di sfondo fisso è utile se si desidera ruotare il campione nello spazio.

[==>] **Ringraziamenti** //Acknowledgements

Eberhard Raap ha portato molti miglioramenti al programma grazie a critiche costruttive e suggerimenti utili da parte degli utenti. Ringrazio Jöran März, Wolfgang Ebenhöf e Cora Kohlmeier per il supporto matematico, Stefan Layer per diversi buoni suggerimenti e Wolfgang Franke per il prezioso supporto nella decifrazione del formato MPO. Bernard Jenni (FR), Aurelia Selhorst (IT) e Luis & Lluís Gines (ES) hanno preparato e curato le traduzioni in diverse lingue - grazie a voi!

Heribert Cypionka
Institut für Chemie und Biologie des Meeres
Universität Oldenburg, Germany

[==>] e-mail: [heribert.cypionka\[at\]uni-oldenburg.de](mailto:heribert.cypionka[at]uni-oldenburg.de)
[==>] Internet: **www.picolay.de** e **www.microbial-world.com**