Il triangolo dell’esposizione sotto il microscopio

Spartaco Santi
novembre 2026

In fotografia impariamo presto che ogni immagine nasce dall’equilibrio tra ISO, tempo di esposizione e diaframma. In microscopia questo equilibrio non scompare, ma cambia profondamente natura. Quando osserviamo cellule, tessuti o organelli, non stiamo più soltanto “scattando una foto”: stiamo cercando di estrarre informazione da pochissimi fotoni.



Il diaframma → Apertura Numerica (NA)

Come di evince dallo schema sopra, nella fotografia il diaframma controlla:

- quantità di luce
- profondità di campo
- risoluzione/percezione di nitidezza

In microscopia il vero equivalente è l'Apertura Numerica (NA) dell'obiettivo.



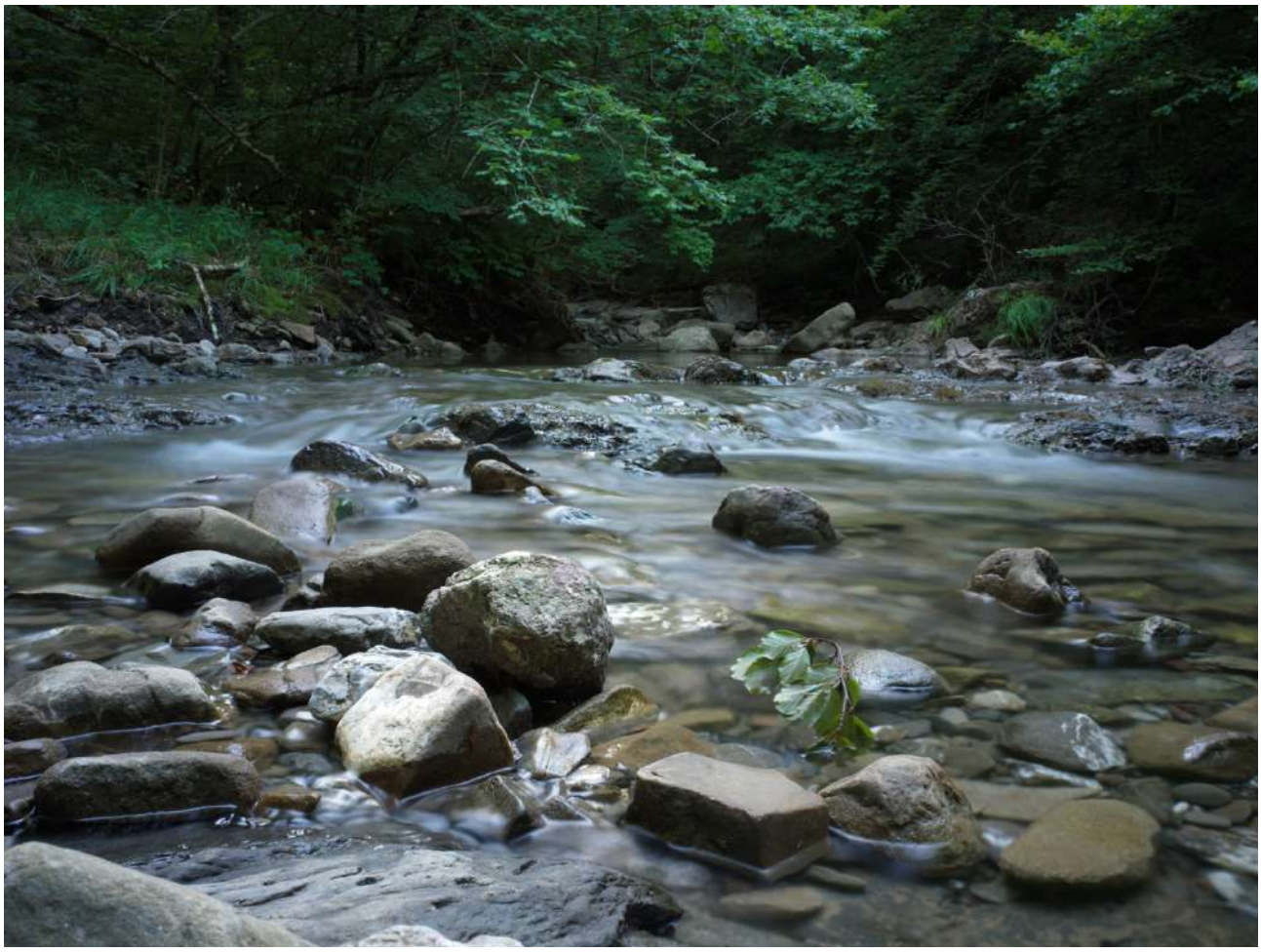
Una NA elevata permette al sistema ottico di raccogliere una porzione più ampia dei raggi di luce provenienti dal soggetto, con il risultato di aumentare la quantità di segnale utile; allo stesso tempo migliora la risoluzione perché riduce il limite di diffrazione e consente di distinguere dettagli più fini, mentre come conseguenza diretta rende molto più stretta la profondità di campo, facendo sì che solo un intervallo molto sottile lungo l'asse ottico appaia nitido.

Fotografia	Microscopia
f/1.4 - 1.0	Alta NA > 1.49
Tanta luce	Tanti fotoni raccolti
Sfocato pronunciato	Profondità di campo micrometrica
Alta separazione soggetto/sfondo	Sezionamento ottico

Il tempo di esposizione → bleaching e fototossicità

Il tempo di esposizione ha un ruolo centrale sia in fotografia sia in microscopia, ma con significati e conseguenze molto diversi. In fotografia, aumentare il tempo di esposizione significa semplicemente lasciare entrare più luce sul sensore: questo permette di ottenere immagini più luminose e, soprattutto, di trasformare il movimento in un elemento creativo. Tempi lunghi possono rendere morbida l'acqua, disegnare scie luminose o introdurre un effetto di "flusso" nel paesaggio, anche se richiedono il controllo del mosso del soggetto o della fotocamera.

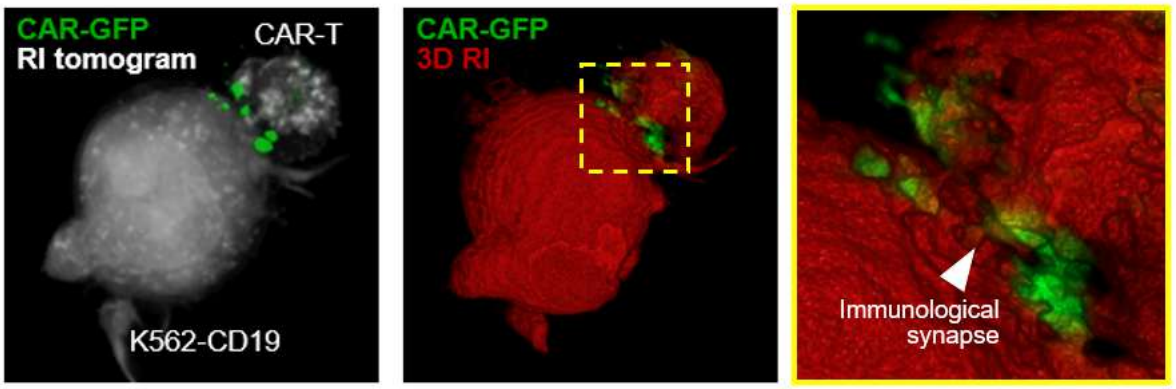
In questo contesto entrano spesso in gioco i filtri a densità neutra (ND), che riducono la quantità di luce che raggiunge il sensore. Questo permette di usare tempi di esposizione molto lunghi anche in pieno giorno, aprendo la possibilità a immagini particolari in cui il tempo diventa visibile: nuvole che si allungano nel cielo, persone che si dissolvono nei movimenti urbani, superfici d'acqua completamente levigate. In altre parole, il filtro ND non serve solo a "gestire la luce", ma a manipolare il tempo come elemento estetico.



Torrente Savena. Hasselblad X2D 100C + Hasselblad XCD 38mm f/2.5 V: 9s - f/27.0 - ISO 64

In microscopia il principio è simile per quanto riguarda il segnale — tempi più lunghi permettono di raccogliere più fotoni e quindi ottenere immagini più nitide e meno rumorose — ma entra in gioco un vincolo completamente diverso: la luce non è più solo informazione, è anche interazione con un sistema vivo o sensibile. Allungare l'esposizione può infatti portare a bleaching dei fluorofori, cioè la perdita irreversibile di fluorescenza, e soprattutto a fototossicità, con danni cellulari che alterano la fisiologia del campione o ne compromettono la vitalità.

Per questo, nel live imaging moderno, il problema non è soltanto evitare il mosso o migliorare il segnale, ma trovare un equilibrio molto più delicato: osservare sistemi biologici nel tempo senza interferire con il loro comportamento, fino al punto cruciale in cui il limite non è più ottico ma biologico — cioè riuscire a non danneggiare ciò che stiamo cercando di misurare.



Live Imaging in microscopia olotomografica (basata sull'indice di rifrazione) in combinazione con segnale di fluorescenza (verde) che identifica una sinapsi immunologica

ISO → gain elettronico

In fotografia, quando si aumentano gli ISO si tende spesso a pensare che il sensore diventi più "sensibile alla luce", ma in realtà non è così: il sensore raccoglie sempre la stessa quantità di fotoni, quello che cambia è l'amplificazione del segnale elettrico prodotto da quei fotoni. In altre parole, si sta semplicemente "alzando il volume" dell'informazione già acquisita, insieme però anche a quello del rumore.

Un principio molto simile esiste anche in microscopia digitale, dove la gestione del segnale è ancora più critica perché spesso si lavora con quantità estremamente basse di luce. Nei sistemi basati su sensori CCD o sCMOS, il segnale può essere amplificato tramite guadagno analogico o digitale, mentre nei sistemi EMCCD (Electron Multiplying CCD) l'amplificazione avviene prima della lettura, attraverso una cascata di moltiplicazione elettronica che aumenta drasticamente il segnale utile prima che il rumore di lettura diventi dominante.

Tutto questo porta direttamente a un concetto fondamentale: il rapporto segnale-rumore, o Signal-to-Noise Ratio (SNR), che si può esprimere in forma molto semplice come:

$$SNR = S / N$$

*dove **S** è il segnale utile e **N** è il rumore di fondo*

In microscopia, il punto cruciale non è semplicemente ottenere un'immagine "bella" o luminosa, ma riuscire a distinguere ciò che è reale (cioè il segnale biologico o fluorescente di interesse) da ciò che è casuale, come il rumore elettronico del sensore o la fluorescenza di fondo. A bassi livelli di luce, il problema non è quindi solo vedere meno, ma capire se ciò che si vede è davvero informazione o solo fluttuazione statistica. Per questo, la scelta tra CCD, sCMOS ed EMCCD non è solo una questione di risoluzione o velocità, ma soprattutto di quanto efficacemente ciascun sistema riesce a mantenere alto l'SNR in condizioni di segnale estremamente debole.



Il vero triangolo della microscopia

Il triangolo dell'esposizione in fotografia — ISO, tempo e diaframma — è uno strumento di controllo: serve a dosare la luce per costruire l'immagine desiderata. In microscopia biologica, invece, la luce non è mai solo controllo ma anche interazione. Ogni fotone raccolto porta informazione, ma può anche indurre danno nel campione. Per questo il vero triangolo diventa un equilibrio tra fotoni raccolti, risoluzione e perturbazione del sistema osservato.

È qui che il pensiero di Werner Heisenberg offre una chiave di lettura particolarmente suggestiva. Il principio di indeterminazione ci ricorda che, nel mondo quantistico, l'osservazione non è separabile dall'interazione con il sistema osservato: misurare significa inevitabilmente interagire. Naturalmente, in microscopia biologica non siamo di fronte allo stesso fenomeno fisico descritto da Heisenberg, ma il parallelismo è illuminante. Per osservare una cellula dobbiamo illuminarla, e quella stessa luce può modificarne l'equilibrio, alterarne le funzioni o comprometterne la vitalità. Il paradosso è che lo strumento che ci permette di conoscere il sistema può diventare anche una causa della sua trasformazione. Così, mentre in fotografia la luce costruisce l'immagine, in microscopia biologica diventa parte integrante dell'esperimento. Il nostro compito non è semplicemente ottenere l'immagine più dettagliata possibile, ma trovare il punto in cui l'informazione raccolta è sufficiente a comprendere il fenomeno senza alterarlo in modo significativo.

In fondo, il vero limite della microscopia non è soltanto quanto riusciamo a vedere, ma quanto possiamo osservare senza cambiare ciò che stiamo cercando di capire.