

Mario Kanka

**Bildrekonstruktion in der digitalen
inline-holografischen Mikroskopie**

Bildrekonstruktion in der digitalen inline-holografischen Mikroskopie

Mario Kanka



Universitätsverlag Ilmenau
2011

Impressum

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Angaben sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Diese Arbeit hat der Fakultät für Maschinenbau der Technischen Universität Ilmenau als Dissertation vorgelegen.

Tag der Einreichung: 5. Januar 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Sinzinger
(Technische Universität Ilmenau)

2. Gutachter: Dr. Rainer Riesenberg
(Institut für Photonische Technologien e.V., Jena)

3. Gutachter: Prof. Dr. Hans Jürgen Kreuzer
(Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada)

Tag der Verteidigung: 16. Mai 2011

Technische Universität Ilmenau/Universitätsbibliothek

Universitätsverlag Ilmenau

Postfach 10 05 65

98684 Ilmenau

www.tu-ilmenau.de/universitaetsverlag

Herstellung und Auslieferung

Verlagshaus Monsenstein und Vannerdat OHG

Am Hawerkamp 31

48155 Münster

www.mv-verlag.de

ISBN 978-3-86360-010-5 (Druckausgabe)

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2011000175

Titelfoto: Veit Henkel | Fakultät für Maschinenbau, TU Ilmenau

für Jonas und Fabian

Kurzzusammenfassung

Ein kohärent beleuchtetes Pinhole erzeugt sphärische Wellenfronten, welche durch ein mikroskopisches Objekt beeinflusst werden. Das hinter dem Objekt entstehende Interferenzmuster heißt Hologramm und wird mit einem 2D-Bild-Detektor aufgezeichnet. In der digitalen inline-holografischen Mikroskopie wird mit einem Computer aus einem solchen Hologramm ein Bild des mikroskopischen Objekts rekonstruiert. Das 1. Rayleigh-Sommerfeld Beugungsintegral beschreibt die Wellenausbreitung in skalarer Näherung und eignet sich zur Rekonstruktion von Inline-Hologrammen für eine linsenlose Mikroskopie. Der numerische Aufwand ist aufgrund einer notwendigen Interpolation des Hologramms direkt abhängig von der optischen Auflösung im Objektbild. Bei Verwendung von 2D-Bild-Sensoren (CCD, CMOS) mit 4 Millionen oder mehr Pixel sowie handelsüblicher Desktop-PCs ist mit Rekonstruktionszeiten von mehreren Minuten und oft auch mit einem die Kapazitäten des Computers übersteigenden Speicherbedarf zu rechnen.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei neue Rekonstruktionsmethoden für die linsenlose digitale inline-holografische Mikroskopie vorgestellt. Diese Methoden berechnen das 1. Rayleigh-Sommerfeld Integral für sphärische Wellenfronten. Dabei wird das Hologramm ähnlich einem Schachbrett in identisch große Teilhologramme zerlegt. Diese Teilhologramme werden nacheinander phasen-modifiziert, interpoliert und zu einer neuen Wellenfront wieder zusammengefügt. Auf diese Weise sind die Anforderungen an den Speicher des Computers erheblich reduziert. Die Methoden führen die notwendige Interpolation des Hologramms indirekt im Fourier-Raum aus, sodass der numerische Auf-

wand nicht länger von der optischen Auflösung abhängt. Die erste der Methoden verursacht geringfügige Interpolationsartefakte, welche mit der zweiten, einer um den Faktor 2.5 langsameren Methode vermieden werden. Mit einer weiteren Methode zur Vorfilterung des Hologramms ist es nun auch möglich, einen beliebigen Ausschnitt der Objektebene zu rekonstruieren. Ein Desktop-PC (2.66 GHz) rekonstruiert ein Hologramm mit 4 Millionen Pixel in etwa 6 Sekunden. Spezielle Hardware-Komponenten wie Grafikkarten kamen dabei nicht zum Einsatz. In Experimenten wurden Hologramme von $1\ \mu\text{m}$ großen Polymethylmethacrylat-Kugeln (PMMA) ohne abbildende Optik detektiert und Bilder dieser Kugeln mit einer NA von 0.7 rekonstruiert, wobei das lichtübertragende Medium Luft war (Brechungsindex $n = 1$). Das dabei rekonstruierte, erweiterte Bildfeld hatte einen Durchmesser von etwa $260\ \mu\text{m}$. Damit im Zusammenhang wird eine Dimensionierung für ein digitales inline-holografisches Mikroskop vorgeschlagen sowie die sich daraus ergebenden Grenzen und mögliche Erweiterungen diskutiert.

Abstract

A coherently illuminated pinhole generates spherical wave fronts, which are modified by microscopic samples. The interference pattern behind the sample is called hologram and will be detected by a 2D-Image-Sensor. In digital inline holographic microscopy a computer reconstructs an image of microscopic samples. The first Rayleigh-Sommerfeld diffraction integral describes a scalar wave propagation which can be used to reconstruct inline-holograms for a lensless microscopic imaging. The numerical effort depends directly on the optical resolution, which is caused by a necessary hologram interpolation. Using image sensors (CCD, CMOS) with 4 million or more pixels, a desktop-PC usually takes a calculation time of some minutes and requires often too much memory for a direct calculation.

This work introduces two new reconstruction techniques for lensless digital inline holographic microscopy. The methods solve the first Rayleigh-Sommerfeld diffraction integral for spherical wave fronts. The hologram will be disjoined into a set of identically sized sub-holograms similar to a chessboard pattern. All these sub-holograms will be individually phase-modified, interpolated, and finally joined to a new wave front. Thus the memory requirements are reduced considerably. The techniques indirectly interpolate the hologram in the Fourier domain so that now the numerical efforts are independent off the optical resolution. The fast technique causes minor interpolation artifacts. With a more precise technique these artifacts are removed, where the calculation time is only raised by a factor of 2.5. A further new hologram filter method enables the reconstruction of detail images of large-area

objects. A common desktop-PC (2.66 GHz) reconstructs a hologram with 4 million pixels in about 6 seconds, where specialized hardware like graphics processing units (GPU) are not needed. In experiments holograms of 1 μm poly(methyl methacrylate) beads (PMMA) were directly detected by a CMOS sensor chip without any imaging optics. Images of these beads was reconstructed with an NA of 0.7 and an extended field of view with a diameter of 260 μm . In addition a dimensioning for a digital inline-holographic microscope is proposed and the resulting limitations as well as some extensions are discussed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Die digitale inline-holografische Mikroskopie	7
2.1	Grundlagen	7
2.2	Inline-Holografie	11
2.3	Rekonstruktion	13
2.4	Bestimmung der Wellenfront	16
2.5	Ausbreitung der Wellenfront	18
2.5.1	Paraxiale Näherungen	22
2.5.2	Sphärische Näherungen	24
3	Neue Rekonstruktionstechnik für die inline-holografische Mikroskopie	29
3.1	Bestimmung der Wellenfront	29
3.2	Ausbreitung der Wellenfront	34
3.2.1	Prinzip der Superposition von Teilhologrammen	39
3.2.2	Technik zur Ausbreitung sphärischer Wellenfronten	46
3.2.3	Bildgebung mit dem Rayleigh-Sommerfeld Integral	53
3.2.4	Rekonstruktion eines Bildausschnitts	58
4	Bildgebung mit einem digitalen inline-holografischen Mikroskop	63
4.1	Dimensionierung und Eigenschaften der Bildgebung . .	63
4.1.1	Dimensionierung des Aufbaus	63
4.1.2	Auflösungsvermögen	68

4.1.3	Bildfelddurchmesser	73
4.2	Experimenteller Aufbau	77
4.2.1	Laser	77
4.2.2	Pinhole	79
4.2.3	Detektor	80
4.3	Experimentelle Ergebnisse	81
5	Zusammenfassung und Ausblick	95

1 Einleitung

In der optischen Hellfeld-Mikroskopie wird ein beleuchtetes Objekt mit Hilfe eines Objektivs vergrößert abgebildet. Das erzeugte Zwischenbild kann mit einem Okular nochmals vergrößert betrachtet werden. Im Falle einer voll kohärenten Beleuchtung entsteht bereits vor dem Objektiv ein Interferogramm. Dieses, zusammen mit der bekannten Beleuchtungswelle, ermöglicht bereits die Rekonstruktion eines Objektbilds.

Die Holografie als ein Verfahren zur Aufzeichnung von Interferogrammen und zur Rekonstruktion von Wellenfronten wurde erstmals 1948 von Dennis Gabor vorgeschlagen [1]. Der Begriff Holografie stammt aus dem Griechischen und bedeutet „das Ganze aufzeichnen“. Dabei wird ein Objekt mit einer kohärenten Lichtquelle beleuchtet und das dahinter entstehende Interferenzmuster mit einer Fotoplatte aufgenommen. Die in Amplitude und Phase bekannte Beleuchtung dient als Referenzwelle. Der vom Objekt gestörte Teil der Referenzwelle heißt Objektwelle. Das gemessene Interferenzmuster wird durch die Phasendifferenzen beider Wellen strukturiert und heißt Hologramm. Nach Entfernen des Objekts wird zur Rekonstruktion der Objektwelle die mit dem Hologramm belichtete Fotoplatte wiederholt mit der Referenzwelle beleuchtet. An dem Ort, wo sich zuvor das Objekt befand, entsteht ein Bild desselben. Gabor nutzte eine Quecksilberdampfampe als Lichtquelle und erzeugte die nötige Kohärenz mit einem Farbfilter und einer Lochblende, folgend auch *Pinhole* genannt [2]. Die beschriebene Anordnung, bei der sich die Lichtquelle, das Objekt und das Aufnahmemedium auf einer Achse befinden, heißt *Inline-* oder *On-Axis-Holografie*. Anstelle der optischen Rekonstruktion durch wiederholte Beleuchtung werden seit Mit-

te der 1960er Jahre digitalisierte Hologramme auch numerisch mit Hilfe von Computern rekonstruiert [3, 4, 5]. Seit den 1990er Jahren können Hologramme mit CCD-Detektoren (*Charged Coupled Device*) bereits in digitaler Form aufgenommen werden [6]. Diese Art der Detektion zusammen mit der numerischen Rekonstruktion wird in der optischen Metrologie als digitale Holografie bezeichnet [7]. Neben dem eigentlich interessierenden reellen Bild des Objekts kommt es bei der Rekonstruktion von Hologrammen zu unerwünschten Sekundärbildern, einem virtuellen Bild und einem aus der Intensitätsverteilung der Objektwellenfront hervorgehenden sogenannten *DC-Term*. Ein in der Literatur oft genannter Nachteil der Inline-Holografie ist die räumliche Überlagerung des reellen Bilds durch diese unerwünschten Sekundärbilder. Bei der 1962 von Leith und Upatnieks vorgeschlagenen Zweistrahlmethode, auch *Offline-* oder *Off-Axis-Holografie* genannt, wird ein Laserstrahl mit Hilfe eines Strahlteilers in zwei zueinander kohärente Strahlengänge aufgeteilt. In einen dieser Strahlengänge wird das Objekt eingebracht, während der verbleibende als ungestörte Referenz dient. Hierbei kann bereits durch leichte Verkipfung der beiden Strahlengänge zueinander eine räumliche Trennung der bei der Rekonstruktion entstehenden Sekundärbilder vom gewünschten reellen Bild erreicht werden [8].

Die wesentlich einfachere Anordnung der digitalen Inline-Holografie erscheint jedoch für die Mikroskopie reizvoller. Durch geeignete Dimensionierung des Inline-Aufbaus kann eine Abschwächung des virtuellen Bilds, auch *Twin-Image* genannt, erreicht werden [9]. Der DC-Term, das sogenannte *Zero-Order-Image*, ist in der Praxis aufgrund der eingeschränkten Objektausdehnung vernachlässigbar klein. Eine verbesserte Bildgebung im Sinne einer Beseitigung des DC-Terms und des virtuellen Bilds ist zudem durch numerische Methoden möglich [10, 11]. In der inline-holografischen Mikroskopie generiert das mit einem Laser beleuchtete Pinhole aufgrund der Beugung einen Beleuchtungskegel. Die Intensitätsverteilung in einer zur Pinhole-Ebene parallelen Beobachtungsebene entspricht im Fernfeld dem Betragsgesetz einer Bessel-

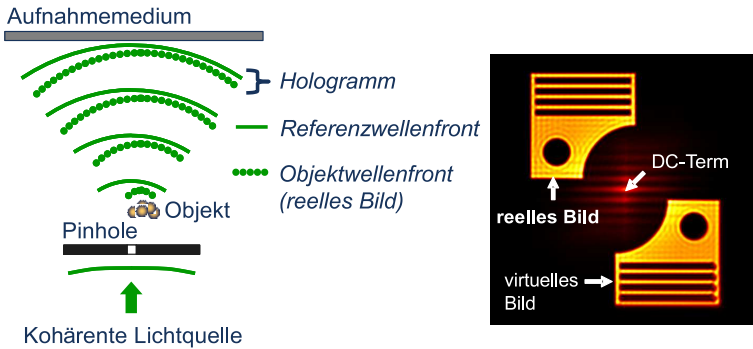


Abbildung 1.1: Bildgebung mit der Inline-Holografie. Links: Die durch das Pinhole auf gebeugte Referenzwelle beleuchtet das Objekt. Hinter dem Objekt kommt es zur Interferenz zwischen der so entstandenen Objektwelle und der Referenzwelle. Rechts: Neben dem realen Bild (der Objektwelle) kommt es bei der Rekonstruktion zu zwei weiteren, oft störenden Sekundärbildern, dem virtuellen Bild und dem DC-Term.

Funktion erster Art und Ordnung [12]. Der Ort ihres ersten Nullstellenrings definiere nun den Öffnungswinkel des Beleuchtungskegels. Ist der Pinhole-Durchmesser kleiner als das 1.22-fache der Wellenlänge, wird dieser Öffnungswinkel größer als 180° und das Pinhole entspricht in guter Näherung einer Punktlichtquelle. Für die Laserlichtwellenlänge 661 nm gilt dies für Pinholes mit weniger als 800 nm Durchmesser. Der vom Pinhole ausgehende Beleuchtungskegel begrenzt in einer Objektebene die laterale Ausleuchtung abzubildender Objekte. Die Ausdehnung des Detektors, dessen Abstand zum Objekt und der Brechungsindex des licht-übertragenden Mediums bestimmen die numerische Apertur des inline-holografischen Aufbaus. Die optische Auflösung im Objektbild wird durch die numerische Apertur sowie durch die Pinhole-Größe und die Lichtwellenlänge begrenzt. Das Pinhole beugt den ankommenden Laserstrahl auf und es entsteht eine sphärischen Wellenfront, welche das mikroskopische Objekt beleuchtet. Hinter dem Objekt kommt es zur Interferenz zwischen der vom Pinhole und der vom Ob-

jekt ausgehenden Wellenfronten, wobei sich mit zunehmenden Beobachtungsabstand die Interferenzstrukturen vergrößern. Dank diesem Effekt wird die erreichbare optische Auflösung für das Objektbild nicht durch die Pixel-Periode des zur Aufnahme des Hologramms eingesetzten Detektors bestimmt. Während das Hologramm mit einer Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$ bis $24 \mu\text{m}$ kommerzieller CCDs detektiert wird, kann die Größe kleinster abbildbarer Objektstrukturen die Laserlichtwellenlänge von z.B. 532 nm oder 661 nm erreichen. Auf diese Weise ermöglicht die digitale Inline-Holografie eine objektiv-lose Mikroskopie [13, 14].

Der Stand der Technik ist dadurch gekennzeichnet, dass die sehr einfache Inline-Anordnung die Rekonstruktion mikroskopischer Details einer Objektwelle in Amplitude und Phase erlaubt [15, 16, 17, 18]. Die digitale Bildrekonstruktion hat im letzten Jahrzehnt mit der digitalen Direktaufzeichnung über CCD- bzw. CMOS-Chips und immer leistungsfähiger werdenden Mikroprozessoren an Bedeutung gewonnen. Der Öffnungswinkel des Beleuchtungskegels spielt eine entscheidende Rolle für die optische Auflösung. Zur Maximierung dieses Öffnungswinkels werden Pinholes mit Durchmessern nahe der Wellenlänge benötigt. Eine Nanotechnologie für die Pinhole-Präparation ist erst seit einigen Jahren zugänglich. Die Rekonstruktion einer hohen optischen Auflösung im Objektbild verursacht einen entsprechend hohen numerischen Aufwand in Datenmenge und Rechenzeit [19]. Die in der Praxis oft verwendeten paraxialen Näherungen, wie die Fresnel-Transformation [20, 21], reduzieren den numerischen Aufwand um Größenordnungen. Diese sind jedoch nur für kleinere numerische Aperturen bis etwa 0.1 gültig, was die optische Auflösung im Objektbild stark einschränkt. Eine geeignetere Rekonstruktionsmethode für die inline-holografische Mikroskopie wurde 1992 von H. J. Kreuzer vorgeschlagen [22]. Hierbei wird das Hologramm auf eine Sphäre mit der Pinhole-Position als Mittelpunkt übertragen. Mit dieser Technik ist eine mikroskopische Bildgebung in einer Rechenzeit von nur wenigen Sekunden gegeben, wobei eine numerische Apertur von etwa 0.5 erreicht wurde [15]. Der durch

die dabei verwendeten Näherungen verursachte Fehler wird mit zunehmendem Detektionsabstand kleiner. Günstige Detektionsabstände sind durch zahlreiche praktische Anwendungen mit Werten im Bereich von 15 mm bis 300 mm belegt [13, 14, 23, 24]. Um eine hohe numerische Apertur realisieren zu können, wurden Detektoren mit einer entsprechend großen Kantenlänge von 9 mm bis 7 cm verwendet.

Gegenstand der Arbeit ist die Erarbeitung schneller und effektiver Rekonstruktionsmethoden für die inline-holografische Mikroskopie. Ziel ist die Rekonstruktion numerischer Aperturen größer als 0.5 und die Anwendung der Methoden für kompaktere inline-holografische Aufbauten. Dabei sollen Hologramme durch handelsübliche CCD- bzw. CMOS-Chips mit 4 bis 16 Millionen Pixel und einer Pixel-Periode von $1.7 \mu\text{m}$ bis $9 \mu\text{m}$ in einem Abstand von 2 mm bis 8 mm zum Objekt aufgezeichnet werden. Die Rekonstruktionsmethoden sollen insbesondere für kompakte digitale inline-holografische Multi-Chip-Mikroskope, bestehend aus einem Detektor-Chip, einem Pinhole-Chip sowie einem weiteren Chip (LED) zur Beleuchtung des Pinhole-Chips einsetzbar sein. Zunächst wird der Stand der Technik in der digitalen inline-holografischen Mikroskopie mit Pinhole-Beleuchtung beschrieben und bewertet (Kapitel 2). Es folgt eine ausführliche Darstellung der neu entwickelten numerischen Methoden zur Rekonstruktion von Inline-Hologrammen sowie zur Ausbreitung sphärischer Wellenfronten (Kapitel 3). Anschließend wird eine Dimensionierung für ein inline-holografisches Mikroskop vorgeschlagen und das dabei zu erwartende optische Auflösungsvermögen sowie die Bildfeldgröße diskutiert (Kapitel 4). Im experimentellen Teil der Arbeit (Kapitel 4) wird der zur Hologrammgenerierung notwendige experimentelle Aufbau beschrieben, die Bildgebung mit Hilfe der vorgestellten neuen Rekonstruktionsmethoden demonstriert sowie deren Leistungsfähigkeit hinsichtlich der erreichten optischen Auflösung und des numerischen Aufwands quantifiziert.

2 Die digitale inline-holografische Mikroskopie

2.1 Grundlagen

Die Interferenz bildet die Grundlage für die Holografie und kann mit Hilfe der Theorie elektromagnetischer Wellen beschrieben werden. Hierbei wird das Licht durch ein elektrisches Feld \vec{E} beschrieben. Im freien Raum verhält sich Licht wie eine transversale Welle, d.h. der Vektor \vec{E} schwingt senkrecht zur Ausbreitungsrichtung \vec{k} des Feldes. Im Falle linear polarisierter Wellen befinden sich an jedem Ort \vec{r} und zu jeder Zeit t der Schwingungsvektor \vec{E} und der Ausbreitungsvektor \vec{k} in ein und derselben Schwingungsebene [12]. In der vorliegenden Arbeit wird der vektorielle Charakter des Lichts vernachlässigt und das Feld als eine skalare Größe E betrachtet. Eine skalare, harmonische, ebene Welle an einem Ort $\vec{r} = (x, y, z)$ und zur Zeit t ist durch

$$E(\vec{r}, t) = a \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t + \vartheta) \quad (2.1)$$

gegeben, wobei a die nicht negative Amplitude des Feldes ist und \cdot das Skalar- oder Innenprodukt bezeichnet. Die Phase des Feldes berechnet sich damit aus der Summe eines ortsabhängigen, eines zeitabhängigen sowie eines konstanten Terms, der sogenannten Anfangsphase ϑ . Die Länge des sogenannten Wellenzahl- oder k -Vektors \vec{k} heißt Wellenzahl und ist mit

$$k = \|\vec{k}\| = \frac{2\pi}{\lambda}$$

gegeben, wobei λ die Wellenlänge, d.h. die räumliche Periode, und λ^{-1} entsprechend die Raumfrequenz des Wellenfelds definiert. Die zeitliche Periode τ bzw. die Frequenz τ^{-1} ist mit der Winkelgeschwindigkeit ω über

$$\omega = \frac{2\pi}{\tau}$$

gegeben. Der Quotient aus räumlicher und zeitlicher Periode ergibt die Ausbreitungsgeschwindigkeit c der Wellenfront, d.h. für Licht im Vakuum gilt

$$\frac{\lambda}{\tau} = c = 299792458 \text{ m/s.}$$

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird stets Luft als lichtübertragendes Medium angenommen, sodass der Brechungsindex vereinfachend

$$n := 1$$

gesetzt und in Formeln und Ausdrücken vernachlässigt wird.

Die Intensität eines Wellenfeldes ist proportional zum zeitlichen Mittel über dem Quadrat der Feldgröße E [12, 7], d.h.

$$I = \epsilon_0 c \langle E^2 \rangle_t = \epsilon_0 c \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} E^2 dt,$$

wobei ϵ_0 die elektrische Feldkonstante bezeichnet. Mit Gleichung (2.1) ergibt sich für die Intensität einer skalaren, harmonischen, ebenen Welle

$$I = \epsilon_0 c a^2 \left\langle \cos^2 \left(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t + \vartheta \right) \right\rangle_t = \frac{\epsilon_0 c}{2} a^2.$$

Die Korreliertheit der Phase eines Wellenfeldes zu unterschiedlichen Zeiten heißt zeitliche Kohärenz. Ein Maß für den Grad der zeitlichen Kohärenz ist mit

$$\begin{aligned} \gamma(\Delta t) &= \frac{\Gamma(\Delta t)}{\Gamma(0)} & (2.2) \\ \Gamma(\Delta t) = \langle EE^* \rangle_t &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} E(t + \Delta t) E^*(t) dt \end{aligned}$$

gegeben. Diese Kohärenzfunktion γ kann mit Hilfe eines *Michelson Interferometers* gemessen werden. Hierbei trifft die Welle auf einen Strahlteiler und verlässt diesen auf zwei unterschiedlichen Wegen. An beider Wege Ende befinden sich Spiegel, sodass die Welle nun durch den Strahlteiler wieder zusammengeführt wird. Durch unterschiedlich gewählte Abstände für die beiden Spiegel und eine leichte Verkipfung beider Strahlengänge kann nun mit einem 2D-Bild-Detektor abhängig vom Kohärenzgrad γ ein Interferenzmuster gemessen werden. Die räumliche Kohärenz dagegen meint die Korrelation der Phase an zwei Orten einer Wellenfront und kann mit einem *Young Interferometer* bestimmt werden.

Nach komplexer Ergänzung des mit Gleichung (2.1) gegebenen skalaren Wellenfeldes

$$\begin{aligned} E(\vec{r}, t) &:= a \exp(i(\varphi - \omega t)) = \exp(i\varphi) \exp(-i\omega t) \\ \varphi &:= \vec{k} \cdot \vec{r} + \vartheta \end{aligned}$$

separieren die Abhängigkeiten von Ort und Zeit faktoriell. Im Folgenden wird die zeitliche Variation des Feldes vernachlässigt. Die komplexe Amplitude

$$A(\vec{r}) = a \exp(i\varphi(\vec{r}))$$

beschreibt die Wellenfront mit einer nur vom Ort abhängigen Phase φ [7, S.7]. Zur Bestimmung der Intensität wird auf den Vorfaktor $\epsilon_0 c/2$ verzichtet, womit vereinfachend gilt

$$I = |A|^2 = a^2.$$

In Übereinstimmung mit dem Superpositionsprinzip ist ein Feld E , welches sich aus zwei Feldern E_1 und E_2 ergibt, durch ihre Summe

$$E = E_1 + E_2$$

gegeben. Weicht die Gesamtintensität $I = |E|^2$ von der Summe der Einzelintensitäten $I_1 = |E_1|^2$ und $I_2 = |E_2|^2$ ab, spricht man von optischer

Interferenz [12, S.353]. Es seien

$$\begin{aligned} A_1(\vec{r}) &= a_1 \exp\left(i(\vec{k}_1 \cdot \vec{r} + \vartheta_1)\right) \\ A_2(\vec{r}) &= a_2 \exp\left(i(\vec{k}_2 \cdot \vec{r} + \vartheta_2)\right) \end{aligned}$$

die komplexen Amplituden zweier ebener und vollständig kohärenter Wellenfronten mit gleicher Frequenz und Wellenlänge. Die Intensität ihrer Überlagerung ergibt sich zu

$$\begin{aligned} I &= |A_1 + A_2|^2 \\ &= I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \Delta\varphi \\ \Delta\varphi &= (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \cdot \vec{r} + \vartheta_1 - \vartheta_2 \end{aligned} \quad (2.3)$$

und es folgt

$$I_1 + I_2 - 2\sqrt{I_1 I_2} = I_{\min} \leq I \leq I_{\max} = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}. \quad (2.4)$$

Der Term $2\sqrt{I_1 I_2} \cos \Delta\varphi$ in Gleichung (2.3) heißt Interferenzterm. Für eine Phasendifferenz $\Delta\varphi \in \{(2c)\pi : c \in \mathbb{Z}\}$ gilt $I = I_{\max}$ und man spricht von vollständig konstruktiver Interferenz. Vollständig destruktive Interferenz mit $I = I_{\min}$ liegt vor, wenn $\Delta\varphi \in \{(2c+1)\pi : c \in \mathbb{Z}\}$ gilt. Zur Charakterisierung der Intensitätsverteilung im Raum werden ein Differenzvektor \vec{k}_Δ und ein Summenvektor \vec{k}_Σ gemäß

$$\begin{aligned} \vec{k}_\Delta &= \vec{k}_1 - \vec{k}_2 \\ \vec{k}_\Sigma &= \vec{k}_1 + \vec{k}_2 \end{aligned}$$

definiert. Da beide k-Vektoren \vec{k}_1 und \vec{k}_2 von gleicher Länge $k = 2\pi/\lambda$ sind, gilt

$$\vec{k}_\Delta \perp \vec{k}_\Sigma.$$

Der Ort geht linear in den Kosinus des Interferenzterms der Gleichung (2.3) ein, womit die resultierende Intensitätsverteilung entlang eines Richtungsvektors \vec{e} der Länge $\|\vec{e}\| = 1$ einer Kosinusfunktion mit

der Periode δ entspricht. Nur in einer zu \vec{k}_Δ senkrechten Ebene ist die Periode unendlich und die Intensität nimmt dort einen konstanten Wert an, d.h. $\delta_{\max} = \infty$ für $\vec{e} \perp \vec{k}_\Delta$. Die minimale Periode δ_{\min} für den Abstand zweier Ebenen mit maximaler Intensität liegt für $\vec{e} \parallel \vec{k}_\Delta$ vor und ergibt sich aus der Forderung

$$\left\| \vec{k}_\Delta \right\| \delta_{\min} = 2\pi.$$

Bezeichnet α den halben Öffnungswinkel zwischen den beiden k-Vektoren \vec{k}_1 und \vec{k}_2 , dann gilt $\left\| \vec{k}_\Delta \right\| = 4\pi \sin \alpha / \lambda$ und der Abstand δ_{\min} ist gegeben mit

$$\delta_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \alpha}. \quad (2.5)$$

2.2 Inline-Holografie

Die Holografie, ein Verfahren zur Aufzeichnung und Rekonstruktion von Wellenfronten, wurde erstmals 1948 von Dennis Gabor vorgestellt und für die Anwendung in der Elektronen-Strahl-Mikroskopie vorgeschlagen [1]. Das zugrunde liegende Prinzip kann auf jede Form elektromagnetischer Wellen angewendet werden [25]. Bei einer sogenannten *Inline*-Anordnung wird das abzubildende Objekt in den Strahlengang zwischen einer kohärenten Lichtquelle und einem lichtempfindlichen Medium zur Aufzeichnung der Intensitätsverteilung eingebracht. Dabei kommt es zur Interferenz zwischen der am Objekt gestreuten Welle und der als Referenzwelle bekannten Beleuchtung. Das entstandene Interferenzbild heißt Hologramm. Dieses wird zur Rekonstruktion der Objektwellenfront wiederum mit der Referenzwelle beleuchtet, wodurch ein Bild des Objekts entsteht, jedoch auch oft unerwünschte Sekundärbilder auftreten. Zur Erzeugung der notwendigen Kohärenz nutzte Gabor in seinem Aufbau eine Quecksilberdampflampe mit einem Farbfilter und einer Lochblende [2].

Die Entwicklung hochkohärenter Laserlichtquellen durch Prokhorov, Basov und Towns in den 1950er Jahren [26] ermöglichte Leith und

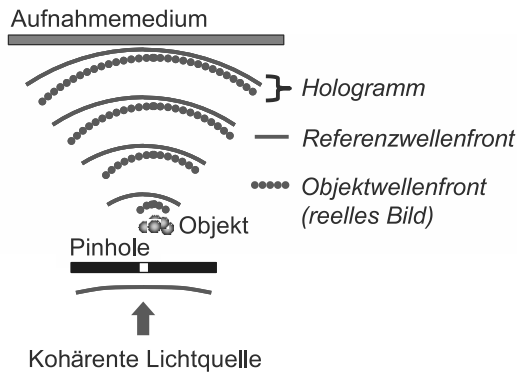


Abbildung 2.1: Skizze einer inline-holografischen Anordnung.

Upatnieks 1962 die Einführung einer Zweistrahlmethode, der *Offline-Holografie* [8]. Dabei wird der Laserstrahl mit Hilfe eines Strahlteilers in zwei zueinander kohärente Strahlengänge aufgeteilt. Während in einen dieser Strahlengänge das Objekt eingebracht wird, dient der zweite als ungestörte Referenz. In der Hologrammebene werden Objekt- und Referenzstrahl wieder zusammengeführt, wobei mit einem hinreichend großen Winkel zwischen beiden Strahlen die bei der Rekonstruktion entstehenden Sekundärbilder von dem Bild des Objekts räumlich getrennt sind. Die hohe Kohärenz verwendeter Laserlichtquellen führt jedoch auch dazu, dass Streulicht und Reflexionen an Grenzflächen optischer Bauelemente, wie Strahlteiler und Linsengruppen, das Hologramm kohärent überlagern und so störende Linien-, Ring- oder auch statistisch wirkende *Speckle*-Muster verursachen.

Bei der Inline-Holografie mit Pinhole-Beleuchtung kommt es bei entsprechender Dimensionierung zwischen der Beleuchtungs- und Objektwelle zu Gangunterschieden von nur wenigen Wellenlängen. Damit können für eine inline-holografische Abbildung auch Lichtquellen mit eingeschränkter zeitlicher Kohärenz eingesetzt werden. Die Bildqualität kann erheblich verbessert werden, wenn Streulicht und Reflexionen

nicht länger mit der Hologrammwelle interferieren und es damit zu einer weniger störenden inkohärenten Überlagerung kommt. Mit modernen Lichtquellen wie LEDs kann genau dies erreicht werden, wobei gleichzeitig die zur Bildgebung notwendigen Interferenzen erhalten bleiben [27, 28, 29, 30]. Das Kohärenzvolumen einer solchen Lichtquelle kann für den verwendeten Inline-Aufbau über Filter und Aperturblenden passend eingestellt werden [31, 32].

Die in den 1960er Jahren einsetzende Verfügbarkeit von Computern ließ erstmals eine numerische Rekonstruktion digitalisierter Hologramme zu [3, 4, 5]. Hierbei ist die 1965 von Cooley und Tukey vorgestellte schnelle Fourier Transformation (*fast Fourier transform*, FFT) nach wie vor von essentieller Bedeutung für die praktische Anwendung der Holografie [33]. Mit der Entwicklung elektronischer 2D-Bild-Detektoren (CCD, CMOS) können Hologramme ohne weiteres in Videorate gemessen und in digitaler Form in einen Computer übertragen werden [6, 9, 23, 34]. Diese Art der Detektion zusammen mit der numerischen Auswertung von Hologrammen wird in der optischen Metrologie als digitale Holografie bezeichnet [7].

Zusammen mit dem einfachen Aufbau der klassischen Inline-Anordnung nach Gabor, insbesondere dem Verzicht auf eine abbildende Optik, eignet sich die digitale Inline-Holografie für eine objektivlose Mikroskopie und findet ihre Anwendung im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums, im UV [35] und IR [36] sowie mit Elektronen- [37] und Röntgenstrahlung [38, 39].

2.3 Rekonstruktion

Ein einfacher digitaler inline-holografischer Aufbau umfasst einen Laser zur kohärenten Beleuchtung, ein Pinhole zur Aufbeugung des Laserstrahls, einen 2D-Bild-Detektor (CCD, CMOS) zur Aufzeichnung des Hologramms sowie einen Computer zur numerischen Rekonstruktion der Objektwelle. Ist das Pinhole in etwa von der Größe einer Wel-

Wellenlänge des Lasers, entsteht hinter dem Pinhole eine sphärische Wellenfront. Während sich in der Pinhole-Ebene die Intensität der Beleuchtungswelle auf die Fläche des Pinholes konzentriert, kann eine Detektorfläche von mehreren Quadratmillimetern bei entsprechend gewähltem Abstand vollständig ausgeleuchtet werden. Der Detektor wird nun derart positioniert, dass die Intensität in der Detektormitte maximal ist und am Detektorrand einen vorgegebenen Schwellwert nicht überschreitet. Die Intensitätsverteilung in einer Objektebene zwischen Pinhole und Detektor erscheint entsprechend dem Strahlensatz verkleinert. Der bei der Detektorpositionierung gewählte Schwellwert definiert gleichzeitig den in einer Objektebene zwischen Pinhole und Detektor ebenso verkleinerten Beleuchtungsbereich derart, dass die mit geringerer Intensität beleuchteten Objekte nicht signifikant an der Entstehung des Hologramms beteiligt sind. Mit zunehmendem Beobachtungsabstand wird der von einer Pixel-Position des Detektors ausgehende Öffnungswinkel zu diesem Beleuchtungsbereich kleiner, womit die Strukturen im Hologramm größer werden.

Die Phasenverteilung der als Referenz dienenden Beleuchtung unterliegt nicht diesem Vergrößerungseffekt, da die örtliche Variation der Phase vom Winkel γ zwischen Wellenfront- und Detektor-Normalen abhängt. Im Folgenden wird immer von 2D-Bild-Detektoren mit für beide Dimensionen identischen Pixel-Perioden $\Delta x = \Delta y$ ausgegangen. Eine verlustfreie Darstellung der Wellenfront innerhalb der Detektorfläche ist gewährleistet, wenn gemäß dem Abtasttheorem von Nyquist-Shannon [40] für die Pixel-Periode Δx und die Wellenlänge λ die Ungleichung

$$\Delta x < \frac{\lambda}{2 \sin \gamma} \quad (2.6)$$

gilt. Die Pixel-Periode heutiger Detektoren erreicht typischerweise 5 bis 10 Wellenlängen sichtbaren Lichts. Aus diesem Grund gilt für eine Anwendung in der Mikroskopie die Ungleichung (2.6) gewöhnlich nur für einen kreisförmigen Ausschnitt der Detektorfläche. Eine verlustfreie

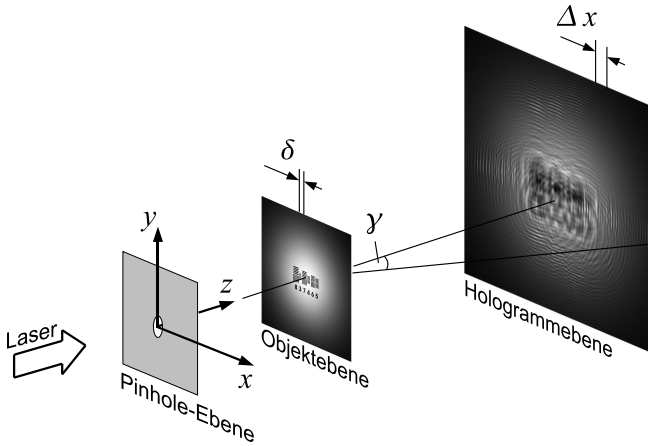


Abbildung 2.2: Schema zur digitalen inline-holografischen Mikroskopie. Die optische Auflösung δ in der Objektebene hängt vom Öffnungswinkel γ ab und wird nicht durch die Pixel-Periode Δx des Detektors beschränkt.

Darstellung der Phasenverteilung mit der gegebenen Pixel-Periode des Detektors ist jedoch nicht notwendig, da die bekannte Phase der Beleuchtung bei der numerischen Rekonstruktion berücksichtigt werden kann.

Die kleinstmöglich auflösbare Struktur in der Objektebene sei mit

$$\delta = \frac{\lambda}{\sin \gamma} \quad (2.7)$$

gegeben [41]. Dabei bezeichnet γ den durch Abstand und Ausdehnung des Detektors definierten halben Öffnungswinkel von einem Objekt auf der optischen Achse. Mit dem zuvor auf $n = 1$ gesetzten Brechungsindex bezeichnet $\sin \gamma$ bereits die numerische Apertur (NA) des abbildenden Systems. Aufgrund der Vergrößerung des Hologramms bei größer werdenden Detektorabständen ist die optische Auflösung δ im Objektbild nicht durch die Pixel-Periode Δx des Detektors beschränkt. Die

optische Auflösung δ im Objektbild hängt dabei von der NA, insbesondere von Abstand und Ausdehnung des Detektors ab, womit $\delta \ll 2\Delta x$ erreicht werden kann.

2.4 Bestimmung der Wellenfront

Die Rekonstruktion des Objekts mit Hilfe nur eines Hologramms (*Single Exposure Reconstruction*, kurz *SER*) [42, 43] kann in zwei Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt besteht in der Bestimmung der Objektwellenfront in der Hologrammebene (Detektorebene) mit Hilfe des gemessenen Hologramms und der Referenz. Die rekonstruierte Objektwellenfront wird dann in einem zweiten Schritt zur Bildgebung in eine Objektebene ausgebreitet. Im Folgenden bezeichne

$$O(x, y) = a_O(x, y) \exp(i\varphi_O(x, y)) \quad (2.8)$$

die komplexwertige Objektwellenfront in der Hologrammebene und

$$R(x, y) = a_R(x, y) \exp(i\varphi_R(x, y)) \quad (2.9)$$

die komplexwertige Referenzwellenfront mit den reellen Amplituden a_O , a_R und den Phasen φ_O , φ_R . Das Hologramm I , die Intensität der kohärenten Überlagerung beider Wellenfronten, kann ausmultipliziert als Summe von vier Wellenfronten dargestellt werden, d.h.

$$I = |O + R|^2 = OO^* + OR^* + RO^* + RR^*, \quad (2.10)$$

wobei hier vereinfachend die Abhängigkeit von der Position (x, y) in der Detektorebene vernachlässigt wird und '*' die komplexe Konjugation bezeichnet. Die Intensität der Referenzwelle ist bekannt und kann subtrahiert werden. Das resultierende Kontrast-Hologramm oder *Contrast-Image* [9] wird mit der komplexwertigen Referenz multipliziert, d.h.

$$\begin{aligned} (I - RR^*) R &= (OO^* + OR^* + RO^*) R \\ &= |O|^2 R + |R|^2 O + R^2 O^*. \end{aligned} \quad (2.11)$$

Bis auf den Vorfaktor $|R|^2$ entspricht der zweite Summand bereits der gesuchten Objektwelle. Der Faktor $|O|^2$ des ersten Summanden in (2.11) wird *Zero-Order-Image* oder *DC-Term* genannt [7]. Für den Fall, dass die Objektwelle viel kleiner als die Referenzwelle ist, d.h. $|O|^2 \ll |R|^2$, kann dieser Summand vernachlässigt werden. Der dritte Summand entspricht in etwa der komplex konjugierten Objektwelle und wird *Zwillingsbild*, *virtuelles Bild* oder auch *Twin-Image* genannt. Für den Fall einer ebenen Referenzwellenfront mit konstantem Wert in der Detektorebene befinden sich das reelle und das virtuelle Bild im gleichem Abstand zum Detektor, das eine davor und das andere dahinter. Wird ein mikroskopisches Objekt von einem Pinhole beleuchtet, ist die sphärische Pinhole-Wellenfront in der Detektorebene weniger gekrümmt als die sphärische Objektwelle. Dies hat zur Folge, dass das Twin-Image R^2O^* wiederum einen größeren Krümmungsradius aufweist als die Pinhole-Welle R , womit dieses nun hinter dem Pinhole fokussiert. Abhängig vom Abstand zwischen Pinhole und Objekt ist das Twin-Image in der Objektebene entsprechend stark defokussiert. Dies ausnutzend kann durch geeignete Dimensionierung des Aufbaus dessen störender Einfluss abgeschwächt werden [9].

Die mit dem Beleuchtungs-Pinhole bei zunehmendem Abstand verbundene Vergrößerung der Hologrammstrukturen macht die Abbildung mikroskopischer Details bis hin zur Lichtwellenlänge unabhängig von der Pixel-Periode des Detektors. Eine auf optischer Rekonstruktion basierende numerische Rekonstruktion des Objekts bringt, wie zuvor beschrieben, eine Superposition der gewünschten Objektwellenfront mit drei störenden Termen hervor. Der gewöhnlich dominierende Störterm, die Intensitätsverteilung der Beleuchtung, kann durch eine weitere Messung ohne Objekt bestimmt und im Zuge der numerischen Rekonstruktion vom Hologramm subtrahiert werden. Das Zero-Order-Image kann auf numerischem Wege [11, 44] und das Twin-Image durch geeignete Dimensionierung des Aufbaus abgeschwächt werden [9]. Für die Abbildung ausschließlich flacher Objekte in nur einer Ebene, z.B. auf einem

Glasträger, genügt eine Fokusposition um die Probe abzubilden und für nicht selbstleuchtende Objekte kann dann mit Hilfe der Energieerhaltung die Objektwelle selbst, d.h. ohne Twin- oder Zero-Order-Image, rekonstruiert werden [10, 45].

Zur Abbildung des Objekts ohne die holografischen Störterme wird in der Praxis oft die fehlende Phaseninformation der Objektwelle mittels Mehrfachmessung (*Multiple Exposure Reconstruction*, kurz *MER*) bestimmt. Zum Beispiel können die Beugungsbilder eines Objekts in verschiedenen Abständen gemessen werden. Vergleichend wird eine Schätzung der Objektwellenfront numerisch in genau diese Ebenen ausgebreitet. Abweichungen zwischen den gemessenen und berechneten Intensitäten werden oft in einem iterativen Verfahren wiederholt zur Korrektur der Schätzung benutzt. Für eine möglichst genaue Bestimmung wird oft ein ganzer Stapel von Messungen eingesetzt [46], wobei bereits zwei Messungen eine Rekonstruktion der Objektwelle ermöglichen [47, 48]. Bekannte iterative Algorithmen sind der Gerchberg-Saxton-Algorithmus [49], der Yang-Gu-Algorithmus [50, 51] und darauf basierende Fienup-Varianten [52]. Ein verbessertes Konvergenzverhalten konnte von A. Grjasnow, A. Wuttig und R. Riesenberg mit Hilfe der Methode konjugierter Gradienten gezeigt werden [53].

2.5 Ausbreitung der Wellenfront

Im zweiten Rekonstruktionsschritt wird die in der Hologrammebene rekonstruierte Objektwellenfront $U(x, y)$ in eine Objektebene ausgebreitet. Ein Bild des Objekts $D(x, y)$ kann mit dem 1. *Rayleigh-Sommerfeld Integral* [54]

$$D(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} \left(-ik - \frac{1}{r} \right) U(x', y') \frac{\exp(-ikr)}{r} \cos(\vec{n}, \vec{r}) dy' dx' \quad (2.12)$$

berechnet werden. Hierbei ist $k = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl und λ die Wellenlänge des Lichts sowie $\vec{n} = (0, 0, 1)$ der Normalenvektor der Holo-

grammebene. Weiter bezeichnet

$$r = \|\vec{r}\| = \sqrt{(x' - x)^2 + (y' - y)^2 + z_0^2} \quad (2.13)$$

die Länge des Verbindungsvektors \vec{r} der Koordinatenpaare und z_0 den Abstand zwischen Bildpunkt und Hologrammebene.

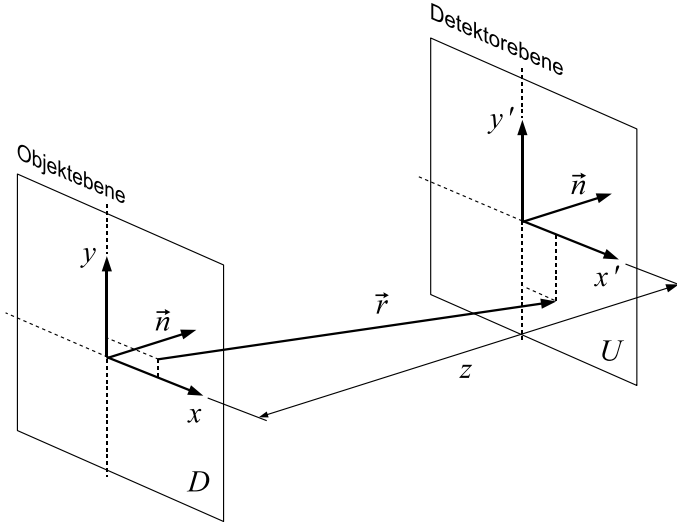


Abbildung 2.3: Skizze zur Wellenfrontausbreitung. Die in der Detektorebene (Hologrammebene) bestimmte Wellenfrontverteilung $U(x', y')$ wird in die Objektebene ausgebreitet. Im Abstand z_0 entsteht ein Bild $D(x, y)$ des Objekts.

Analog kann das Bild D auch durch Ausbreitung des Winkelspektrums des Eingangsfelds, der sogenannten *Angular-Spectrum-Propagation* oder kurz *AS-Method*, berechnet werden. Die hierbei eingesetzte zweidimensionale Fourier-Transformation sowie ihre Inverse sind mit

$$\mathcal{F}\{g\}(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) \exp(-i2\pi(f_x x + f_y y)) \, dx dy \quad (2.14)$$

$$\mathcal{F}^{-1}\{G\}(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} G(f_x, f_y) \exp(i2\pi(x f_x + y f_y)) \, df_x df_y \quad (2.15)$$

definiert, wobei f_x und f_y die entsprechenden Raum-Frequenzen bezeichnen. Ein Bild des Objekts wird dann durch

$$D(x, y) = \mathcal{F}^{-1} \{ \mathcal{F} \{ U \} (f_x, f_y) \cdot H(f_x, f_y) \} \quad (2.16)$$

mit der Übertragungsfunktion für die Ausbreitung des Lichts im freien Raum

$$H(f_x, f_y) = \exp \left(-i2\pi z_0 \sqrt{\lambda^{-2} - f_x^2 - f_y^2} \right) \quad (2.17)$$

berechnet [55]. Ein Beweis der Äquivalenz der Gleichungen (2.12) und (2.16) wurde 1967 von G. C. Sherman auf Grundlage einer Arbeit von H. Weyl erbracht [56, 57, 58].

Die optische Auflösung δ im Objektbild D hängt von der über Abstand und Ausdehnung des Detektors definierten numerischen Apertur (NA) und der verwendeten Lichtwellenlänge ab. Die diskrete Variante der Angular-Spectrum-Propagation ermöglicht durch Anwendung der schnellen Fourier Transformation (FFT) die Rekonstruktion eines Objektbilds bei geringem numerischen Aufwand [33]. Als Abbildung zwischen den zugehörigen Matrizen der die Wellenfelder beschreibenden Stützstellen erzwingt die FFT jedoch eine identische Pixel-Periode sowohl in der Hologramm- als auch in der Objektebene. In der digitalen inline-holografischen Mikroskopie ist die Detektor-Pixel-Periode Δx gewöhnlich größer als die gewünschte optische Auflösung δ im Objektbild, sodass eine Interpolation des Hologramms um den Faktor $2\Delta x/\delta$ nötig wird. Die für die Rekonstruktion der vollen NA nötige Interpolation stellt sich als Kompromiss zwischen optischer Auflösung und numerischem Aufwand dar [19]. Soll etwa ein Hologramm mit 4 Millionen Pixel um den Faktor 16 in beiden Dimensionen interpoliert werden, führt dies zu einem Speicherbedarf von 7.6 GB bei Fließkommadarstellung mit 32 Bit Genauigkeit. Eine solche Datenmenge ist mit der heutigen Computertechnologie zu bewältigen, jedoch gehören heute auch Bild-Detektoren mit 12 und mehr Millionen Pixel zum Stand der Technik. Ein von Zhang *et al.* vorgestelltes Prinzip für einen Algorithmus zur

Rekonstruktion der vollen, durch Detektorausdehnung und -abstand definierten NA vermeidet das Halten des interpolierten Hologramms im RAM des Computers [59]. Die Interpolation des Hologramms wird indirekt über entsprechend viele Ausbreitungen mit Sub-Pixel verschobenen Impulsantworten ausgeführt. Dieses Vorgehen führt jedoch zu einer entsprechend langen Rechenzeit, sodass der Kompromiss zwischen optischer Auflösung und numerischem Aufwand bestehen bleibt.

In einem experimentellen Aufbau mit Objektiven macht die aufgrund der Abbildung effektiv verkleinerte Pixel-Periode des Detektors eine Interpolation unnötig [35, 60, 61]. Kombiniert mit Hochleistungsrechen-technik ermöglicht dies die Rekonstruktion von Hologrammen bei Videorate [62]. Die optische Auflösung in der Objektebene hängt nun jedoch auch von dem verwendeten Objektiv ab. Auch der Einsatz moderner parallelisierender Rechentechnik wie Multi-Core-CPU's, FPGAs [62] oder GPU's [63] in der digitalen holografischen Mikroskopie wird umso attraktiver, je geringer der numerische Aufwand ist.

Als ein weiterer Ansatz zur Reduzierung des Rechenaufwands sind verschiedene Näherungen weit verbreitet. Die durch Abstand und Ausdehnung des Detektors sowie der verwendeten Lichtwellenlänge gegebene optische Auflösung kann hierbei zusätzlich durch die verwendete Näherung eingeschränkt sein. Paraxiale Näherungen sind nur für geringe numerische Aperturen gültig (oft $NA < 0.1$). Sie spielen jedoch für die inline-holografische Mikroskopie aufgrund ihrer geringen numerischen Anforderungen zusammen mit einer abbildenden Optik noch immer eine bedeutende Rolle [6, 20, 64, 65, 66]. Bei Verzicht auf abbildende Optiken können auch mehrere Hologramme mit geringer NA, jedoch für unterschiedliche Ausschnitte der Objektwelle zu einer hochaufgelösten Abbildung des Objekts verwendet werden [65, 66, 67, 68, 69]. Sphärische Näherungen liefern effizientere Algorithmen zur Rekonstruktion von Einzel-Hologrammen für die objektivlose Mikroskopie im Sinne eines signifikant gesteigerten optischen Auflösungsvermögens ($NA \approx 0.5$) bei etwa gleichem numerischen Aufwand, wie dem unter

paraxialen Näherungen gegeben [9, 13, 14, 15, 70].

2.5.1 Paraxiale Näherungen

Das 1. Rayleigh-Sommerfeld Integral (2.12) kann im Falle eines viel größeren Abstands r verglichen mit der Wellenlänge λ , d.h. $r \gg \lambda$, vereinfacht werden zu

$$D(x, y) = -\frac{i}{\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} U(x', y') \frac{\exp(-ikr)}{r} \cos(\vec{n}, \vec{r}) \, dy' dx'. \quad (2.18)$$

Der Winkel zwischen den Vektoren \vec{n} und \vec{r} wird als vernachlässigbar klein angesehen, sodass $\cos(\vec{n}, \vec{r}) \approx 1$ gilt. Für den Phasenterm $\exp(-ikr)$ wird der mit Gleichung (2.13) gegebene Abstand als eine analytische Funktion $r(a)$ im Parameter

$$a := \frac{(x - x')^2 + (y - y')^2}{z_0^2}$$

in ihre Taylor-Reihe um $a = 0$ entwickelt und durch den in a linearen Anteil

$$r \approx z_0 \left[1 + \frac{(x - x')^2 + (y - y')^2}{2z_0^2} \right]$$

abgeschätzt. Der zweite im Integranden vorkommende Abstand r unter dem Bruchstrich wird durch z_0 ersetzt und man erhält das sogenannte Fresnel-Integral bzw. die damit definierte Fresnel-Transformation

$$D_{\text{Fresnel}}(x, y) = -\frac{i \exp(-ikz_0)}{z_0 \lambda} \times \iint_{-\infty}^{\infty} U(x', y') \exp\left(-\frac{ik}{2z_0} [(x - x')^2 + (y - y')^2]\right) \, dy' dx'. \quad (2.19)$$

Die Güte dieser Näherung nimmt dem Ansatz nach mit kleiner werdenden a zu, worin die Paraxialität dieser Näherung begründet liegt. Die Gültigkeit der Fresnel-Näherung wird in der Literatur oft mit Hilfe eines Kriteriums der Art

$$z_0^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} [(x - x')^2 + (y - y')^2]_{\max}^2 \quad (2.20)$$

für die laterale Ausdehnung der Felder $U(x', y')$, $D_{\text{Fresnel}}(x, y)$ bzw. den Detektionsabstand z_0 quantifiziert [55]. In folgendem Zahlenbeispiel wird die Ausdehnung des mikroskopischen Objekts vernachlässigt. Der Detektor mit 2048×2048 Pixel und einer Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$ befindet sich mittig über dem Objekt, sodass vereinfachend

$$\left[(x - x')^2 + (y - y')^2 \right]_{\max} \approx (1024 \cdot 3.5 \mu\text{m})^2 \approx (3.5 \text{ mm})^2$$

abgeschätzt werden kann. Nach Kriterium (2.20) ergibt sich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 661 \text{ nm}$ ein Mindestabstand von 56 mm , was die numerische Apertur (NA) in diesem Beispiel auf 0.06 begrenzt. Das diskrete Analogon zum Integral (2.19) reskaliert die Pixel-Periode Δx des Hologramms zu

$$\Delta x' = \frac{\lambda z_0}{N \Delta x}$$

für den abgebildeten Ausschnitt der Objektebene, wobei beide Bilder $N \times N$ Pixel enthalten [7, S. 95]. Dieser Reskalierungseffekt macht eine Interpolation des Hologramms unnötig. Er kann jedoch auch dazu führen, dass der Bildausschnitt in der Objektebene das Objekt nicht mehr vollständig überdeckt. Zur Vermeidung dieser Situation und der damit verbundenen Abbildungsfehler wurde von Wang *et al.* eine *Multi-Step Fresnel Propagation* vorgeschlagen [21].

Ist die Ausdehnung des Objekts verglichen mit dem Beobachtungsabstand z_0 vernachlässigbar klein, gilt für die Fresnel-Transformation zusätzlich die Fraunhofer-Näherung mit

$$r \approx z_0 \left[1 + \frac{x'^2 + y'^2 - 2(xx' + yy')}{2z_0^2} \right].$$

Das resultierende Integral

$$D_{\text{Fraunhofer}}(x, y) = -\frac{i \exp(-ikz_0)}{z_0 \lambda} \times \int \int_{-\infty}^{\infty} U(x', y') \exp\left(-ik \frac{x'^2 + y'^2}{2z_0}\right) \exp\left(-\frac{ik}{z_0} (xx' + yy')\right) dy' dx'. \quad (2.21)$$

entspricht der Fourier-Transformation (Gl.(2.14), S.19) des Eingangsfelds nach einer Phasentermmultiplikation, wobei der zusätzliche Faktor $(\lambda z_0)^{-1}$ im Fourier-Exponenten zu einer Reskalierung des Felds führt.

In der digitalen Fourier-Holografie [7] wird zudem die Phasentermmultiplikation des Eingangsfelds unterlassen, d.h.

$$D_{\text{Fourier}}(x, y) = -\frac{i \exp(-ikz_0)}{z_0 \lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} U(x', y') \exp\left(-\frac{ik}{z_0}(xx' + yy')\right) dy' dx'. \quad (2.22)$$

Eine NA von $1/\sqrt{2} \approx 0.71$ lässt nach Gleichung (2.7) eine optische Auflösung von $\delta = \lambda\sqrt{2}$ zu, wobei der Detektorabstand z_0 der halben Detektorausdehnung entspricht. Die bereits im Fresnel-Integral verwendeten Näherungen sind jedoch für solch kurze Abstände nicht gültig. Eine Kombination mehrerer Messungen unter paraxialen Bedingungen mit unterschiedlichen Detektor- bzw. Probenpositionen oder aber auch durch Beleuchtung der Probe aus verschiedenen Richtungen generiert eine sogenannte synthetische Apertur [64, 68, 71, 69, 65]. Die so verbesserte optische Auflösung ist jedoch mit erhöhtem experimentellen und numerischen Aufwand verbunden.

2.5.2 Sphärische Näherungen

Ist die Größe des Objekts im Vergleich zum Beobachtungsabstand r vernachlässigbar klein, führt eine Veränderung des Detektorabstands in guter Näherung zu einer auf dem Strahlensatz basierenden Reskalierung des Hologramms. In diesem Fall kann ausgehend von einer ebenen Detektorfläche die Verteilung der Objektwellenfront über eine einfache Koordinatentransformation auf eine Sphäre übertragen werden. Die Objektwellenfront wird dann mit Hilfe ihrer Verteilung \tilde{U} auf einer solchen Sphäre W mit konstantem Abstand f zur mittleren Objektposition $\mathbf{p}_O = (x_O, y_O, z_O)$ gemäß

$$U(\mathbf{p}') = \tilde{U}(\mathbf{p}') \frac{\exp(ikf)}{f} \quad (2.23)$$

beschrieben. Hierbei ist $\mathbf{p}' = (x', y', z')$ ein Punkt auf der Sphäre W und $\exp(ikf)/f$ eine von \mathbf{p}_O ausgehende Kugelwellenfront mit $f = \|\vec{f}\|$ sowie $\vec{f} = \mathbf{p}' - \mathbf{p}_O$. Das Bild des Objekts als Funktion D von $\mathbf{p} = (x, y, z)$ wird berechnet durch Einsetzen der Verteilung (2.23) in das Integral (2.18)

$$D(\mathbf{p}) = -\frac{i}{\lambda} \iint_W \tilde{U}(\mathbf{p}') \frac{\exp[-ik(r-f)]}{rf} \cos(\vec{n}, \vec{r}) dS, \quad (2.24)$$

wobei $r = \|\vec{r}\|$, $\vec{r} = \mathbf{p}' - \mathbf{p}$ und \vec{n} mit $\vec{n} = \vec{f}/f$ den Normalenvektor des Flächenelements dS auf W bezeichnet. Kann der Betrag $d = \|\vec{d}\|$ des mit $\vec{d} = \mathbf{p} - \mathbf{p}_O$ definierten Richtungsvektors gegenüber r vernachlässigt werden, gilt

$$r - f \approx \vec{f} \cdot \vec{d}/f.$$

Die bei der Ausbreitung nach dem *Fresnel-Huygens-Prinzip* [12] von \mathbf{p}' ausgehende Kugelwellenfront wird demnach durch eine ebene Wellenfront genähert. Der Winkel zwischen \vec{r} und \vec{f} wird als vernachlässigbar klein angenommen, sodass $\cos(\vec{n}, \vec{r}) = 1$ gesetzt werden kann. Das Flächenelement dS wird durch das zugehörige Raumwinkelement $f^2 d\Omega$ und r im Nenner des Integranden (2.24) durch f ersetzt. Die Gültigkeit dieser Näherungen ist auf eine geringe Ausdehnung des abzubildenden Objekts beschränkt, womit sich das resultierende, sogenannte Debye-Integral [56, 54, 72]

$$D_{\text{Debye}}(\mathbf{p}) = -\frac{i}{\lambda} \iint_{\Omega} \tilde{U}(\mathbf{p}') \exp[-ik\vec{f} \cdot \vec{d}/f] d\Omega \quad (2.25)$$

insbesondere zur Abbildung mikroskopischer Objekte eignet.

Ein von H. J. Kreuzer ursprünglich für niederenergetische Elektronen-Punktquellen (*Low Energy Electron Point Sources*, kurz *LEEPS*) entwickelter Algorithmus [22, 73] wird seit den 1990er Jahren erfolgreich zur holografischen Abbildung von Makromolekülen [13], biologischen Proben [14] sowie in der Unterwasser-Mikroskopie und Mikroflu-

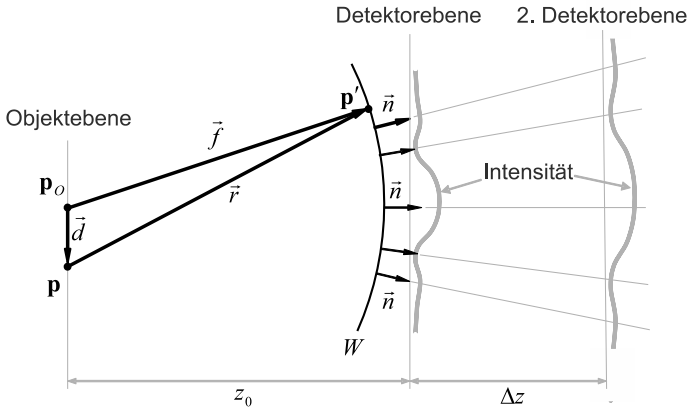


Abbildung 2.4: Skizze zur Wellenfrontausbreitung in sphärischer Näherung. Ist das Objekt im Vergleich zum Beobachtungsabstand z_0 von vernachlässigbarer Ausdehnung, führt eine Verschiebung des Detektors um Δz zu einer Vergrößerung des Beugungsbilds entsprechend dem Strahlensatz mit dem Ursprung in der mittleren Objektposition \mathbf{p}_0 .

dik [9] eingesetzt. Mit der Abbildung von 800 nm großen Polystyren-Kugeln bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm wurde die Rekonstruktion einer numerischen Apertur (NA) von etwa 0.5 gezeigt [15]. Der Algorithmus basiert auf der *Kirchhoff-Helmholtz-Transformation* [22]

$$D_{\text{Kirchhoff-Helmholtz}}(\mathbf{p}) = \frac{1}{4\pi} \iint_W U(\mathbf{p}') \exp[-ik\mathbf{p} \cdot \mathbf{p}' / \|\mathbf{p}\|] dS, \quad (2.26)$$

wobei in Übereinstimmung mit dem Debye-Integral (2.25) die mittlere Objektposition als Koordinatenursprung $\mathbf{p}_0 = (0, 0, 0)$ gewählt wurde.

Zu Beginn dieses Abschnitts wurde gefordert, dass ein veränderter Detektorabstand in guter Näherung zu einer auf dem Strahlensatz basierenden Reskalierung des Hologramms führt. In diesem Fall weist insbesondere die Objektwellenfront eine in ebenso guter Näherung winkelabhängige Verteilung auf. Eine solche Verteilung sollte der Fourier

Transformierten des Objektbilds ähnlich sein, sodass die aus dem Hologramm und der Referenz rekonstruierte Objektwelle über eine Koordinatentransformation

$$x' = x_0 + z_0 \left[f_x \sqrt{\lambda^2 - f_x^{-2} - f_y^{-2}} \right]^{-1} \quad (2.27)$$

$$y' = y_0 + z_0 \left[f_y \sqrt{\lambda^2 - f_x^{-2} - f_y^{-2}} \right]^{-1} \quad (2.28)$$

direkt in die Fourier-Transformierte F des Objektbilds

$$F(f_x, f_y) = U(x', y') \frac{r}{z_0} \exp(ikr) \quad (2.29)$$

$$r = \sqrt{(x' - x_0)^2 + (y' - y_0)^2 + z_0^2}$$

überführt werden kann. Dabei ist (x', y') ein Punkt in der Detektorebene, (x_0, y_0) die mittlere Objektposition in der Objektebene, z_0 der Abstand zwischen beiden parallelen Ebenen und (f_x, f_y) das über die Gleichungen (2.27) und (2.28) zu (x', y') gehörige Frequenzenpaar. Schließlich kann über eine Fourier-Transformation ein Bild des Objekts

$$D_{k\text{-Vektor}}(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} F(f_x, f_y) \exp(i2\pi(f_x x + f_y y)) df_y df_x \quad (2.30)$$

berechnet werden. Diese Abbildung wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit k -Vektor-Transformation genannt und bildet einen wichtigen Baustein der im Folgenden noch entwickelten Rekonstruktionstechniken. Mit einer ähnlichen Technik gelang Takaki und Ohzu bereits 1999 die Abbildung einer Balkenstruktur der Periode $2 \mu\text{m}$ mit einem Helium-Neon Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$), womit eine NA von 0.32 erreicht wurde [70].

3 Neue Rekonstruktionstechnik für die inline-holografische Mikroskopie

3.1 Bestimmung der Wellenfront

Ausgehend von einem gemessenen Hologramm erfolgt die Rekonstruktion des Objekts in zwei Schritten. Der erste Schritt besteht in der Bestimmung der Objektwellenfront in der Detektorebene. Diese wird dann in einem zweiten Schritt zur Bildgebung des Objekts in eine ihrer Fokusebenen ausgebreitet. Wie zuvor wird vorausgesetzt, dass der vektorielle Charakter aller auftretenden Wellenfronten vernachlässigt werden kann, sodass ihre Darstellung in skalarer Form, d.h. als eine komplexwertige Verteilung, genügt. Die nicht direkt messbare Phasenverteilung in der Detektorebene kann durch Auswertung einer auf ihre Bestimmung zielenden Mehrfachmessung ermittelt werden. In der Literatur finden sich dazu zahlreiche Messmethoden und Algorithmen [53, 50, 49, 52, 51]. An dieser Stelle wird die unbekannte Objektwelle mit Hilfe eines einzelnen Hologramms I geschätzt. Das Hologramm entspricht dem Betragsquadrat der Summe der Objektwelle O und der Referenzwelle R , d.h.

$$\begin{aligned} I &= |R + O|^2 = (R + O)(R + O)^* \\ &= |R|^2 + OR^* + O^*R + |O|^2, \end{aligned} \quad (3.1)$$

wobei $'^*$ ' für die komplexwertige Konjugation mit $(a + ib)^* = a - ib$ steht. Wie bereits im Abschnitt 2.4 wird die bekannte Intensitätsver-

teilung $|R|^2$ der Referenzwelle R als dominierender Störterm bei der Rekonstruktion vom Hologramm I subtrahiert, womit man ein sogenanntes Kontrast-Hologramm bzw. *Contrast-Image* [9]

$$I - |R|^2 = OR^* + (OR^*)^* + |O|^2 \quad (3.2)$$

erhält. Analog zur optischen Rekonstruktion durch wiederholte Beleuchtung des Hologramms wird das Kontrast-Hologramm mit der Referenzwelle multipliziert:

$$U_I := (I - |R|^2) R \quad (3.3)$$

$$= |R|^2 O + O^* R^2 + |O|^2 R. \quad (3.4)$$

Der erste Summand, die mit einem nicht negativen Vorfaktor $|R|^2$ multiplizierte Objektwelle, heißt reelles Bild, der zweite Summand heißt virtuelles Bild bzw. Twin-Image und der dritte Zero-Order-Image bzw. DC-Term. Die Schätzung U_I entspricht dem bereits mit Gleichung 2.11 (Abschnitt 2.4, S. 16) angegebenen klassischen Rekonstruktionsansatz, der aus folgendem Grund im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Hologrammauswertung verwendet wird. Das Beugungsbild eines Pinholes entspricht im Fernfeld einer Airy-Funktion, einer um die optische Achse rotationssymmetrischen Verteilung. Bis zu ihrem ersten Beugungsminimum nimmt die Intensität bei zunehmenden Abstand zur optischen Achse monoton ab. Aus diesem Grund bewirkt der Faktor $|R|^2$ eine Dämpfung der für die optische Auflösung wichtigen hohen Ortsfrequenzen der Objektwelle. Um dies zu vermeiden, könnte mit entsprechender Gegenormierung die Schätzung

$$U_{II} := (I - |R|^2) R / |R|^2 \quad (3.5)$$

$$= O + O^* R^2 / |R|^2 + |O|^2 R / |R|^2$$

gewählt werden. Wird die Intensität der Referenzwelle $|R|^2$ mit Hilfe einer weiteren Messung ohne Objekt bestimmt, kann die Division von

Messwerten bei einem zu geringen Wertebereich des Detektors zu numerischen Instabilitäten führen. Aus diesem Grund soll auch Schätzung U_{II} hier nicht der Rekonstruktion der Objektwellenfront dienen.

Zur Herleitung der neuen Schätzung U wird zunächst Gleichung (3.5) zu

$$\begin{aligned} U_{\text{II}} &= \left(2\operatorname{Re} \{OR^* / |R|\} + |O|^2 / |R| \right) R / |R| \\ &= \left(2\operatorname{Re} \{OR^* / |R|\} + |O|^2 / |R| \right) \exp \left(i\varphi^{(0)} \right) \end{aligned} \quad (3.6)$$

umgestellt, wobei $\operatorname{Re} \{ \}$ auf den Realteil einer komplexen Zahl abbildet und $\varphi^{(0)}$ die Phase der Referenzwelle bezeichnet. Stellt man sich R und O als Vektoren in der komplexen Ebene vor, so entspricht $\operatorname{Re} \{OR^* / |R|\}$ der Länge des auf die Gerade $\{a \exp(i\varphi^{(0)}) : a \in \mathbb{R}\}$ projizierten Vektors O . Insbesondere für den Fall $|O| < |R|$ kann hierfür auch die Näherung

$$\operatorname{Re} \{OR^* / |R|\} \approx \sqrt{I} - |R| \quad (3.7)$$

verwendet werden. Die mit

$$\begin{aligned} U &:= \left(\sqrt{I} - |R| \right) R / |R| \\ &= \left(\sqrt{I} - |R| \right) \exp \left(i\varphi^{(0)} \right) \end{aligned} \quad (3.8)$$

definierte, neue Schätzung für die unbekannte Objektwelle ist numerisch stabil. Im Vergleich mit U_{II} führt U darüber hinaus zu einer Abschwächung des Zero-Order-Images, wie Abbildung 3.1 anhand simulierter Daten zeigt. Diese Abschwächung kann für $|O| < |R|$ mit der auf die Größe des Zero-Order-Images normierten Fehlerfunktion

$$w_{\text{ZOI}}(O) := \frac{2(\sqrt{I} - |R|) - 2\operatorname{Re} \{OR^* / |R|\}}{|O|^2 / |R|} \in [0, 1] \quad (3.9)$$

charakterisiert werden. Ihr Wert gibt an, zu welchem Anteil das Zero-Order-Image in U enthalten ist. Vollständig unterdrückt ist dieses, wenn

die Phasen der Objektwelle und der Referenzwelle eine Differenz von 0 oder π aufweisen und die Fehlerfunktion w_{ZOI} damit den Wert Null annimmt. Für den Fall $\sqrt{I} = |R|$ folgt mit den Gleichungen (3.5) und (3.6)

$$|O|^2 / |R| = -2\text{Re} \{OR^* / |R|\},$$

womit $w_{\text{ZOI}}(O) = 1$ ist und U das Zero-Order-Image vollständig erhält. Abbildung 3.1 zeigt diese Fehlerfunktion für die Referenzwelle $R = 1$ und Objektwellen verschiedener Intensität und Phase. Es seien nun aufgrund eines hinreichend großen Abstands zwischen Pinhole und Objekt die Krümmungsradien der Referenz- und Objektwellenfront derart verschieden, dass im Hologramm die Funktion $\arg(OR^* / |R|)$, d.h. die Phasendifferenz von Referenz- und Objektwelle, nahezu gleichverteilte Werte im Intervall $[0, 2\pi[$ annimmt. Ausgehend von dem mit U_{II} rekonstruierten Objektbild ist für das mit U rekonstruierte Bild mit einem Zero-Order-Image von ungefähr halb so großer Amplitude, d.h. einem viertel der Intensität, zu rechnen.

Der Detektor verfügt über N Zeilen mit jeweils N Pixeln und einer Pixel-Periode von Δx in beiden Dimensionen. Das Hologramm $I(x, y)$ werde übereinstimmend mit dem Abtasttheorem von Nyquist-Shannon [40] bereits durch die Werte

$$\begin{aligned} \mathbf{I}_{m,n} &= I(x_m, y_n) & (3.10) \\ x_m &= x_0 + m\Delta x \\ y_n &= y_0 + n\Delta x \\ m, n &= 0, 1, \dots, N - 1 \end{aligned}$$

an den Pixel-Positionen des Detektors vollständig beschrieben. Dabei bezeichnet Δx die Pixel-Periode des 2D-Detektors in beiden Dimensionen. Folgend wird eine Schätzung der Objektwelle $\mathbf{U}_{m,n}$ an einer Pixel-Position (m, n) des Detektors als Produkt

$$\mathbf{U}_{m,n} = \mathbf{A}_{m,n} \mathbf{S}_{m,n} \quad (3.11)$$

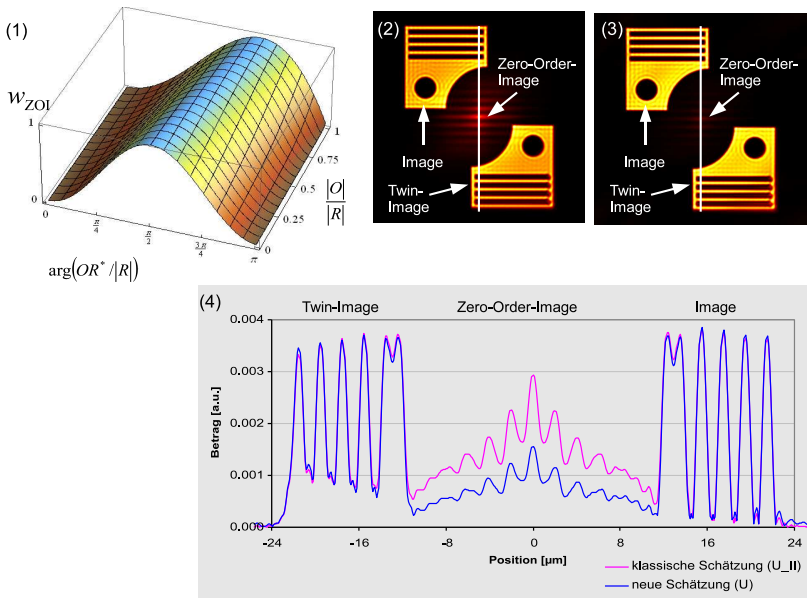


Abbildung 3.1: Numerische Dämpfung des Zero-Order-Images. (1) Darstellung der Fehlerfunktion $w_{ZOI}(O)$ für Objektwellen O , wobei $|O| < |R|$ gilt und R die Referenzwelle ist. Sie gibt Auskunft über den in der neuen Schätzung U verbleibenden Anteil des Zero-Order-Images, wobei dieses mit dem Faktor 0 vollständig unterdrückt wird und mit 1 erhalten bleibt. (2) Beispiel einer klassisch rekonstruierten Ebene mit örtlich getrennten Image, Twin-Image und Zero-Order-Image. (3) Die gleiche, jetzt mit der neuen Schätzung U rekonstruierte Szene. (4) Die Schnittdarstellung der Amplitudenverteilungen zeigt ein auf die Hälfte abgeschwächtes Zero-Order-Image, was sich mit nahezu gleichverteilten Werten für die Funktion $\arg(OR^*/|R|)$ erklären lässt.

reeller Zahlen $\mathbf{A}_{m,n}$ und komplexer Phasenterme $\mathbf{S}_{m,n}$ beschrieben. Die reellwertigen Amplituden sind ausgehend von Gleichung (3.8) durch die Differenzen

$$\mathbf{A}_{m,n} := \sqrt{\mathbf{I}_{m,n}} - |\mathbf{R}_{m,n}| \quad (3.12)$$

gegeben, wobei $|\mathbf{R}|$ mit Hilfe einer weiteren Messung ohne Objekt be-

stimmt wird. Der Phasenterm \mathbf{S} ist dann

$$\mathbf{S}_{m,n} := \exp\left(i\varphi^{(0)}(x_m, y_n)\right), \quad (3.13)$$

wobei $\varphi^{(0)}$ die als bekannt vorausgesetzte Phasenverteilung der Beleuchtung bezeichnet. Analog zu der im Ort kontinuierlichen Funktion U ist mit

$$\mathbf{U}_{m,n} = \mathbf{A}_{m,n} \mathbf{S}_{m,n} = \left(\sqrt{\mathbf{I}_{m,n}} - |\mathbf{R}_{m,n}|\right) \exp\left(i\varphi^{(0)}(x_m, y_n)\right) \quad (3.14)$$

das diskrete Analogon der neuen Schätzung für die unbekannte Objektwellenfront in der Detektorebene gegeben.

3.2 Ausbreitung der Wellenfront

Ein Bild \mathbf{D} des Objekts wird ausgehend von der Objektwelle \mathbf{U} in der Detektorebene mit Hilfe der diskreten Version der sogenannten *Angular-Spectrum-Propagation* bzw. *AS-Method* nach Gleichung (2.16) (auf der Seite 20) berechnet, d.h.

$$\mathbf{D} = \text{DFT}^{-1} [\text{DFT} [\mathbf{U}] \cdot \mathbf{H}], \quad (3.15)$$

wobei DFT die zweidimensionale diskrete Fourier Transformation [26] mit ihrer Inversen DFT^{-1} bezeichnet und ' \cdot ' für die elementweise Multiplikation steht. Mit der Pixel-Periode Δx , der Ausbreitungsdistanz z_0 und der Wellenlänge λ ist die Frequenzantwort \mathbf{H} zur Wellenausbreitung im freien Raum mit den Einträgen

$$\mathbf{H}_{m,n} := H(\xi_m, \eta_n) := \exp\left(-i2\pi z_0 \sqrt{\lambda^{-2} - \xi_m^2 - \eta_n^2}\right) \quad (3.16)$$

gegeben, wobei

$$\xi_m = \frac{m - N/2}{N\Delta x}, \quad \eta_n = \frac{n - N/2}{N\Delta x}, \quad m, n = 0, 1, \dots, N - 1 \quad (3.17)$$

gilt [55]. Bei dieser Art der Wellenausbreitung zwischen zwei Ebenen ist die Pixel-Periode des Objektbilds \mathbf{D} und die der Objektwelle in der

Hologrammebene \mathbf{U} identisch. Ausgehend von der Pixel-Periode des Detektors ist die aus dem Hologramm hervorgehende Schätzung der Objektwelle vor der Ausbreitung in die Objektebene bis zu der für das Objektbild gewünschten optischen Auflösung zu interpolieren. Damit hängt der numerische Aufwand auch von der optischen Auflösung der rekonstruierten Objektwelle ab.

Die Objektwellenfront kann aber auch mit Hilfe einer Koordinatentransformation von der Messebene auf eine Sphäre um die mittlere Objektposition übertragen werden. Die Abweichung von der tatsächlichen Objektwellenfront auf dieser Sphäre wird kleiner bei kleiner werdender Objektgröße bzw. größer werdendem Abstand zum Detektor. Im Gegensatz zur Ausbreitung zwischen Ebenen ist hier keine Interpolation der Wellenfrontverteilung nötig, um die mit der numerischen Apertur gegebene optische Auflösung zu erhalten. Grund hierfür ist, dass die sphärische Objektwellenfront erwartungsgemäß nur geringfügig von dieser Sphäre abweichen wird. Die somit dort geringe Variation der Objektwelle ist dann mit der durch den Detektor gegebenen Pixel-Zahl im Sinne des Nyquist-Shannon Theorems [40] verlustfrei darstellbar. Die im Abschnitt 2.5.2 beschriebenen sphärischen Näherungen basieren auf derartigen Koordinatentransformationen und bilden eine Basis für schnelle, leistungsfähige Algorithmen für die objektivlose inline-holografische Mikroskopie [15, 9, 13, 70, 14]. In Übereinstimmung mit dem Fresnel-Huygens-Prinzip geht bei der Ausbreitung der Objektwellenfront von jedem Punkt eine Kugelwelle aus. Diese Kugelwellen werden bei den sphärischen Näherungen durch ebene Wellen ersetzt. Dadurch kommt es, abhängig vom Abstand zur mittleren Objektposition als dem Entwicklungsursprung der Koordinatentransformation, zu Aberrationen bei der Rekonstruktion des Objektbilds. In erster Linie können diese mit einem Astigmatismus und einer Bildfeldwölbung beschrieben werden. Zur Quantifizierung dieser Aberrationen wird ein Gitter der Periode δ mit einem Laser der Wellenlänge λ kohärent beleuchtet. Ein 2D-Bild-Detektor wird im Abstand z_0 zum Gitter positio-

niert, sodass die Laserlichtquelle, das Gitter und der Detektor sich in dieser Reihenfolge auf einer Achse befinden. Diese optische Achse definiert die z -Achse des verwendeten Koordinatensystems, welche zudem senkrecht auf der Gitterebene sowie auf der Detektorebene steht. Der Ursprung $(0, 0, 0)$ des Koordinatensystems befindet sich in der Gitterebene und die Mitte der Detektorfläche bei $(0, 0, z_0)$. Mit $r := \|\vec{r}\|$ ist die Länge des Richtungsvektors $\vec{r} := (x, y, 0)$ vom Koordinatenursprung zu einem Punkt $(x, y, 0)$ in der Gitterebene bezeichnet. Um mit Hilfe der Wellenfrontverteilung in der Detektorebene die Periode δ des Gitters optisch aufzulösen, muss der Detektor über Ausdehnung und Abstand eine numerische Apertur (NA) von

$$\text{NA} = \frac{\lambda}{\delta}$$

realisieren [41]. Der Radius $r_\delta > 0$ gibt nun die Größe des zugehörigen Kreisgebiets innerhalb der Detektorfläche an, sodass

$$\frac{r_\delta}{\sqrt{z_0^2 + r_\delta^2}} = \frac{\lambda}{\delta}$$

gilt. Wird diese Gleichung quadriert und nach r_δ^2 aufgelöst, erhält man

$$r_\delta^2 = \frac{\lambda^2}{\delta^2 - \lambda^2} z_0^2.$$

Schließlich muss im Falle $\delta > \lambda > 0$ die Detektorfläche einen Kreis mit dem Radius

$$r_\delta = \frac{\lambda}{\sqrt{\delta^2 - \lambda^2}} |z_0| \tag{3.18}$$

überdecken, um das Gitter bei beliebiger Verdrehung innerhalb der Gitterebene auflösen zu können. Die im Abschnitt 2.5.2 diskutierten sphärischen Näherungen verursachen einen Astigmatismus, welcher nun

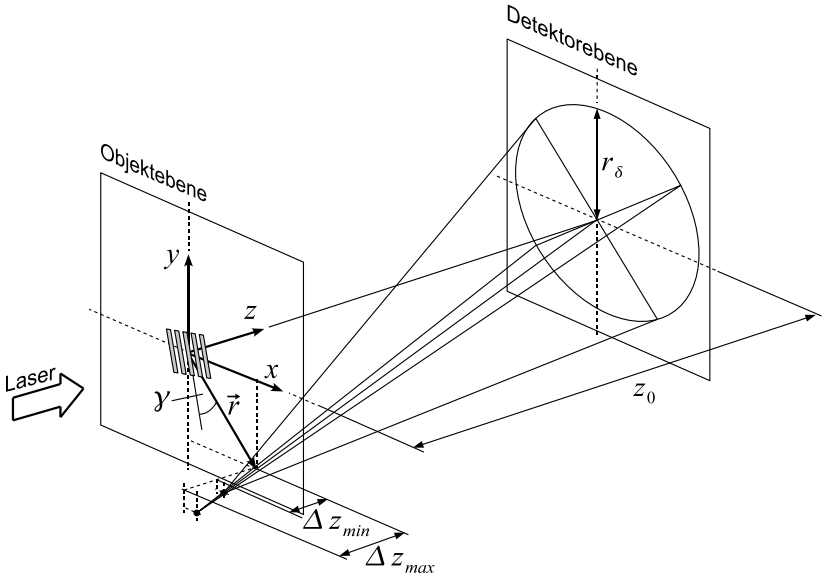


Abbildung 3.2: Skizze zum Astigmatismus der k-Vektor-Transformation.

mit Hilfe der Funktionen

$$\rho(x) = \sqrt{z_0^2 + x^2}$$

$$\Delta z_{\min}(r) = \rho(r) - \rho(0) \quad (3.19)$$

$$\Delta z_{\max}(r) = \frac{\rho(r) - \rho(0) + \rho(r_\delta) - \rho(r_\delta - r) - r_\delta r / \rho(r_\delta)}{1 - \rho(0) / \rho(r_\delta)} \quad (3.20)$$

wie folgt quantifiziert werden kann. Bezeichnet γ den Winkel zwischen den Linien des Gitters und einem Ortsvektor \vec{r} in der Gitterebene, dann werden die am Ort \vec{r} befindlichen Gitterlinien im Abstand $|z_0| + \Delta z(r, \gamma)$ zur Detektorebene voneinander getrennt abgebildet, wobei gilt

$$0 \leq \Delta z_{\min}(r) \leq \Delta z(r, \gamma) \leq \Delta z_{\max}(r). \quad (3.21)$$

Wie in Abbildung 3.3 exemplarisch für die k-Vektor-Transformation



Abbildung 3.3: Simulation der auf k-Vektor Transformation basierenden Rekonstruktion von Hologrammen. 1) Das abzubildende Objekt besteht aus drei Einzelstrukturen in einer Ebene mit jeweils 500 nm breiten, opaken Balken. Der laterale Abstand zwischen den Zentren zweier benachbarter Balkengruppen beträgt $50 \mu\text{m}$. Die Wellenlänge der kohärenten Beleuchtung ist mit $\lambda = 661 \text{ nm}$ gegeben. 2) Wird das Hologramm in einem Abstand von 7 mm zur Objektebene aufgezeichnet, sind im rekonstruiertem Objektbild alle Balkengruppen aufgelöst. 3) Ausgehend von einem Hologramm in 3.5 mm Entfernung sind im rekonstruierten Objektbild die Balken der linken Gruppe nicht länger getrennt abgebildet. 4a) Eine nochmalige Halbierung des Detektionsabstands auf 1.75 mm führt dazu, dass nur nach die Balken der zentralen Gruppe getrennt abgebildet werden können. 4b) Mit einer weiteren Ausbreitung der Objektwelle um $0.7 \mu\text{m}$ sind die Balken der linken Gruppe getrennt. 4c) Die Balken der rechten Gruppe werden $1.6 \mu\text{m}$ unterhalb der ursprünglichen Objektebene aufgelöst abgebildet.

dargestellt, erhält man bei festem \vec{r} die minimale Defokussierung für zu \vec{r} parallele Gitterlinien und die maximale Defokussierung für dazu

senkrechte Gitterlinien, d.h.

$$\Delta z_{\min}(r) = \Delta z(r, 0) \quad (3.22)$$

$$\Delta z_{\max}(r) = \Delta z(r, \pi/2). \quad (3.23)$$

Mit Ungleichung (3.21) kann der im Radius $r = \|\vec{r}\|$ anwachsende Fehler in der Bildebene mit Hilfe der maximalen Defokussierung $\Delta z_{\max}(r)$ nach oben abgeschätzt werden. Insbesondere ist für eine fest vorgegebene Auflösung δ und einen festen Bildfeldradius r_0 ein Mindestabstand z_0 zum Detektor ermittelbar, sodass $\Delta z_{\max}(r_0)$ unterhalb eines zuvor festgelegten Schwellwerts bleibt. Mit der Anwendung sphärischer Approximationen in der inline-holografischen Mikroskopie kann demnach die durch die Geometrie des Aufbaus gegebene numerische Apertur in einem vom Detektorabstand abhängigen Ausschnitt der Objektebene rekonstruiert werden. Mit zunehmender Ausdehnung des Objekts oder auch bei zu klein gewählten Detektorabständen nehmen auch die Aberrationen sphärischer Näherungen zu, bis schließlich eine Abbildung des gesamten Objekts mit der vollen im Hologramm enthaltenen optischen Auflösung nicht mehr möglich ist.

3.2.1 Prinzip der Superposition von Teilhologrammen

Der im Folgenden beschriebene Algorithmus wurde für die hochauflösende objektivlose inline-holografische Mikroskopie entwickelt. Er zielt auf eine exakt-skalare Wellenausbreitung nach dem 1. Rayleigh-Sommerfeld Integral bei gleichzeitig reduziertem numerischen Aufwand. Wie in den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.3 näher beschrieben wird, entsteht hinter einem Pinhole ein Beleuchtungskegel. Die kreisförmige Ausleuchtung in der Objektebene begrenzt bei der Rekonstruktion die Größe des Objektbilds und ist entsprechend dem Verhältnis zwischen Pinhole-Objekt-Abstand und Pinhole-Detektor-Abstand kleiner als die Ausleuchtung in der Detektorebene. Die Idee besteht nun darin, das aus dem Hologramm rekonstruierte Feld \mathbf{U} bereits in der Detektorebene in

eine Menge von Teilfeldern $\mathbf{U}^{(k,l)}$ identischer Größe, im Folgenden „Kacheln“ oder *Tiles* genannt, zu zerlegen. Im Vergleich mit dem Feld \mathbf{U} kann eine solche Kachel $\mathbf{U}^{(k,l)}$ unter geringerem numerischen Aufwand interpoliert und in die Objektebene ausgebreitet werden. Dabei ist die laterale Ausdehnung einer Kachel größer zu wählen, als die in der Objektebene vorliegende kreisförmige Ausleuchtung. Zusammen mit der identischen Größe aller Kacheln entsteht in der Objektebene bereits durch ihre Summe ein Bild des Objekts.

Vereinfachend verfüge der Detektor über $N \times N$ Pixel, wobei $N = 2^n$ mit $n \in \mathbb{N}$ gilt. Darüber hinaus sei ein $T = 2^t$ mit $t \in \mathbb{N}$ und $t < n$ gegeben, d.h. T teilt N . Das Feld \mathbf{U} wird in T^2 Kacheln $\mathbf{U}^{(k,l)}$ für $k, l = 0, 1, \dots, T - 1$ mit jeweils $\nu \times \nu$ Werten zerlegt, wobei

$$\nu := \frac{N}{T} = 2^{n-t}$$

gesetzt wird. Dabei ist T so zu wählen, dass die Größe $\nu\Delta x \times \nu\Delta x$ einer Kachel $\mathbf{U}^{(k,l)}$ in der Hologrammebene nach Ausbreitung in die Objektebene das dort beleuchtete Objekt vollständig überdecken wird. Nach Gleichung (3.14) sind diese Kacheln Produkte reeller Amplituden $\mathbf{A}_{m',n'}$ und komplexer Phasenterme $\mathbf{S}_{m',n'}$ mit $m', n' = 0, 1, \dots, \nu - 1$. Wie in Abschnitt 4.1.1 noch beschrieben wird, kann für eine gegebene Detektor-Pixel-Periode Δx ein Mindestabstand zum Objekt mit dem Ziel einer alias-freien Aufzeichnung von Inline-Hologrammen angegeben werden. Wird dieser Abstand eingehalten, ist zudem die Amplitudenverteilung des Feldes innerhalb der Detektor-Fläche bereits durch die $N \times N$ Werte an den Pixel-Positionen vollständig beschrieben [40]. Um eine ebenso alias-freie Darstellung des Phasenterms zu erhalten, ist abhängig von der numerischen Apertur (NA) mit Ungleichung (2.6) (S. 14) eine kleinste obere Schranke für die notwendige Pixel-Periode gegeben. Die mit $\Delta x/T$ gegebene Pixel-Periode erfülle diese Bedingung, d.h.

$$\Delta x/T < \frac{\lambda}{2\text{NA}}.$$

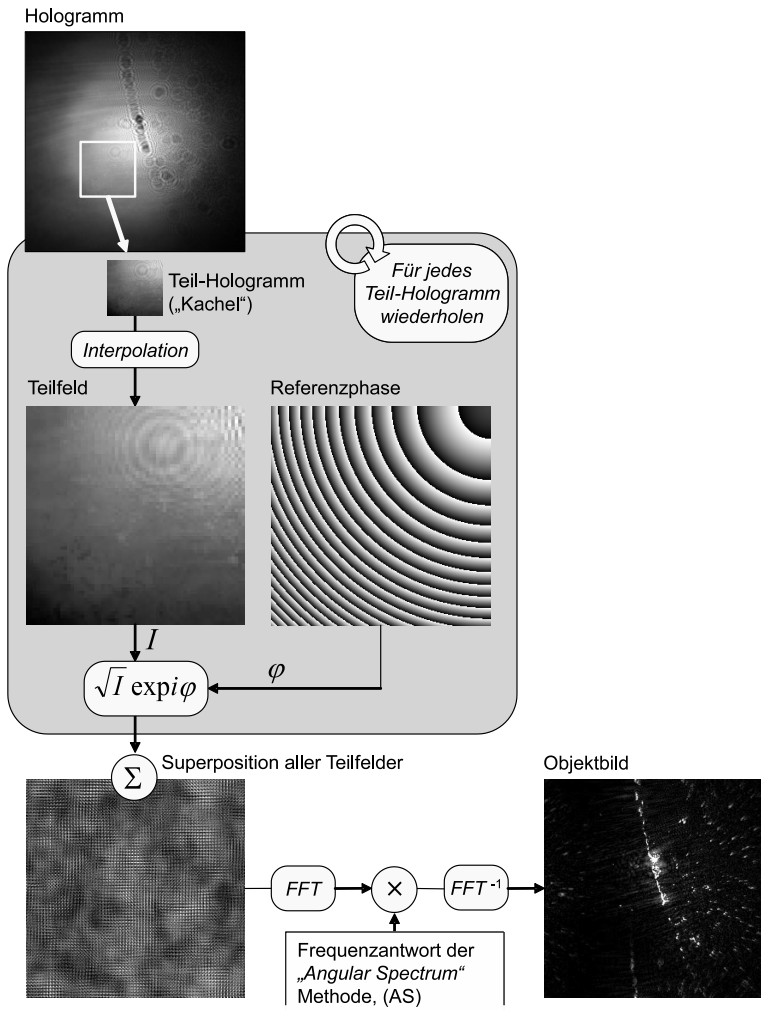


Abbildung 3.4: Prinzip der Kachel-Superposition für die Ausbreitung sphärischer Wellenfronten.

Damit enthält jede um den Faktor T interpolierte Kachel $\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)}$ wieder $N \times N$ Pixel. Hierfür wird das $\nu \times \nu$ Amplituden-Array $\mathbf{A}^{(k,l)}$ zu einem Array der Größe $N \times N$ reskaliert, indem jeder Pixel durch ein $T \times T$ Pixel-Array ersetzt wird, d.h.

$$\begin{aligned}\hat{\mathbf{A}}_{m,n}^{(k,l)} &= \mathbf{A}_{\lfloor (kN+m)/T \rfloor, \lfloor (lN+n)/T \rfloor}, \\ \lfloor x \rfloor &= \max \{a \in \mathbb{Z} : a \leq x\}, \\ m, n &= 0, 1, \dots, N-1.\end{aligned}\tag{3.24}$$

Der Phasenterm $\mathbf{S}^{(k,l)}$ in der Detektorebene $\{(x, y, 0) : x \in \mathbb{R}, y \in \mathbb{R}\}$ entspricht dem einer Kugelwelle [12, S. 442] mit ihrem Ursprung in der Pinhole-Position (x_0, y_0, z_0) , d.h.

$$\hat{\mathbf{S}}_{m,n}^{(k,l)} = \exp \left(i\varphi_{\text{KW}} \left(x_m^{(k)}, y_n^{(l)} \right) \right),\tag{3.25}$$

$$\varphi_{\text{KW}}(x, y) = -\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + z_0^2},\tag{3.26}$$

$$x_m^{(k)} = \frac{\Delta x}{T} (kN + m - TN/2),$$

$$y_n^{(l)} = \frac{\Delta x}{T} (lN + n - TN/2).$$

Die interpolierten Kacheln

$$\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)} = \hat{\mathbf{A}}^{(k,l)} \cdot \hat{\mathbf{S}}^{(k,l)}\tag{3.27}$$

können für die Pixel-Periode $\Delta x/T$ frei von Diskretisierungsaberrationen in die Objektebene ausgebreitet werden. In der Detektorebene bezeichnen die Indizes k und l einer Kachel $\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)}$ die Position des Ausschnitts im Feld \mathbf{U} . Aufgrund der zyklischen Randbedingungen der mit Gleichung (3.15) definierten Wellenausbreitung ist die laterale Position der entsprechenden Kachel in der Objektebene

$$\hat{\mathbf{D}}^{(k,l)} = \text{DFT}^{-1} \left[\text{DFT} \left[\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)} \right] \cdot \hat{\mathbf{H}} \right]\tag{3.28}$$

um ein ganzzahliges Vielfaches der Kachelgröße mehrdeutig, wobei $\hat{\mathbf{H}}$ analog zu Gleichung (3.16), hier für die Pixel-Periode $\Delta x/T$, gegeben

ist. Zur Erklärung dieser Aussage bezeichne $\hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)}$ die Kachel (i, j) in der Objektebene nach Ausbreitung der Kachel (k, l) über eine Faltung im Ortsraum, d.h.

$$\hat{\mathbf{D}}_{m,n}^{(k,l;i,j)} = \sum_{m'=0}^{N-1} \sum_{n'=0}^{N-1} \hat{\mathbf{U}}_{m',n'}^{(k,l)} K_{\text{RS}}(x_m^{(i)} - x_{m'}^{(k)}, y_n^{(j)} - y_{n'}^{(l)}, z_0). \quad (3.29)$$

Der Kern K_{RS} des 1. Rayleigh-Sommerfeld Integrals [54, S. 16] beschreibt die Ausbreitung des Lichts in skalarer Näherung entsprechend der Frequenzantwort $H(f_x, f_y)$ [57, 58]. Die mit Gleichung (3.28) definierte lateral periodische Wellenausbreitung führt zu einer Faltung mit unendlich vielen Kernfunktionen K_{RS} , welche in einem 2D-Gitter mit den Perioden $\nu\Delta x$ angeordnet sind, d.h. zwischen den Gleichungen (3.28) und (3.29) gilt die Beziehung

$$\hat{\mathbf{D}}^{(k,l)} = \sum_{(i,j) \in \mathbb{Z} \times \mathbb{Z}} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)}. \quad (3.30)$$

Damit enthält $\hat{\mathbf{D}}^{(k,l)}$ das gesamte von $\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)}$ ausgehende Licht in der Objektebene.

Im Folgenden existiere stets ein Indexpaar (i_0, j_0) derart, dass jede an der entsprechenden Position befindliche Kachel $\hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i_0,j_0)}$ das Objekt vollständig überdeckt. Diese Forderung führt zu einer durch die Objektausdehnung definierten, minimal zulässigen Kachelgröße. Der daraus resultierende maximal zulässige Faktor T schränkt durch $T = 2^t, t \in \mathbb{N}$ zunächst die in der Objektebene erreichbare Auflösung $\Delta x/T$ stark ein. Zur Lösung dieses Problems kann eine Reskalierung oder auch eine Vorfilterung des Hologramms angewendet werden. Letzteres wird in einem der folgenden Abschnitte noch näher erläutert. Im Falle der geforderten vollständigen Überdeckung enthält

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma := \sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i_0,j_0)} \quad (3.31)$$

alle im Hologramm enthaltenen Informationen über das Objekt während die Summe aller restlichen Kacheln verschwindet, d.h.

$$\sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \end{bmatrix}, \text{ für } (i,j) \neq (i_0, j_0).$$

Zusammen mit Gleichung (3.30) erhält man

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma = \sum_{k,l=0}^{T-1} \left(\hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i_0,j_0)} + \sum_{(i,j) \in \mathbb{Z} \times \mathbb{Z} \setminus \{(i_0,j_0)\}} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)} \right) = \sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l)} \quad (3.32)$$

und mit Gleichung (3.28) sowie der Linearität der Fourier-Transformation folgt

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma = \text{DFT}^{-1} \left[\text{DFT} \left[\sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\mathbf{U}}^{(k,l)} \right] \cdot \hat{\mathbf{H}} \right]. \quad (3.33)$$

Bleibt das Objekt in seiner Ausdehnung weiterhin durch die Kachelgröße beschränkt, kann es bei beliebiger lateraler Lage auf maximal vier Kacheln $\hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)}$ für $i \in \{i_0, i_0 + 1\}$ und $j \in \{j_0, j_0 + 1\}$ verteilt liegen. Durch die Ausbreitung nach Gleichung (3.33) werden diese vier Kacheln zu einer einzigen aufaddiert, was einer zyklischen Verschiebung des Objekts im Array $\hat{\mathbf{D}}^\Sigma$ entspricht. Damit bleiben Abbildungsfehler durch sich gegenseitig überlappende Teile des Objekts ausgeschlossen.

Zusammenfassend ist zur Rekonstruktion mit Sub-Pixel Auflösung eine Interpolation des Feldes \mathbf{U} zur Vermeidung von Diskretisierungsartefakten (Aliasing) notwendig. Ein Hologramm mit $N \times N$ Werten und einem optischen Auflösungsvermögen, welches in etwa um den Faktor T feiner ist als die Pixel-Periode des Detektors, führt durch Interpolation zu einem Feld \mathbf{U} mit $NT \times NT$ Werten. Dem so um T^2 erhöhten numerischen Aufwand für die Ausbreitung des Winkelspektrums nach Gleichung (3.15) steht eine hohe Redundanz im rekonstruierten Feld \mathbf{D}

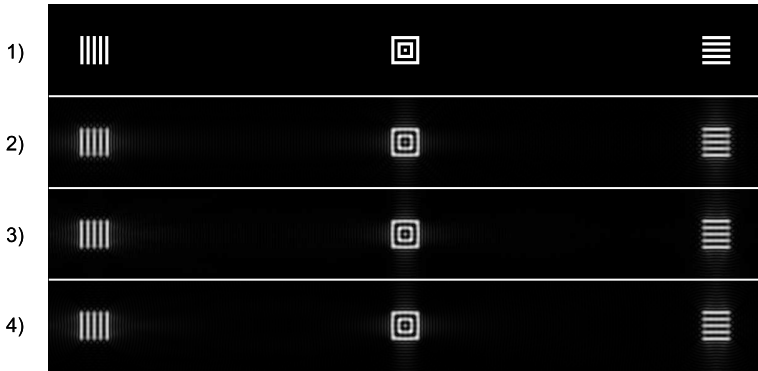


Abbildung 3.5: Simulation der auf Kachel-Superposition basierenden Rekonstruktion von Hologrammen. 1) Wie zuvor in Abbildung 3.3 werden die drei Balkengruppen mit Hilfe der in verschiedenen Abständen simulierten Hologramme rekonstruiert. Unabhängig vom Abstand 2) 7 mm, 3) 3.5 mm bzw. 4) 1.75 mm werden alle drei Balkengruppen in ein und der selben, ursprünglichen Objektebene optisch getrennt abgebildet.

gegenüber. Denn Hologramme mit Sub-Pixel Auflösung, d.h. solche die mit einer entsprechend großen numerischen Apertur aufgenommen werden, sind dann frei von Alias-Effekten, wenn das mikroskopische Objekt nur einen geringen Teil der Detektorfläche ausfüllt. Somit überdeckt das abgebildete Objekt nur einen kleinen Ausschnitt des ausgebreiteten Felds \mathbf{D} . Die mit Gleichung (3.33) dargestellte neue Technik zur skalaren Wellenausbreitung sphärischer Wellenfronten vermeidet diese Redundanz indem die Größe des Zielfelds der zu erwartenden Objektgröße angepasst wird. Der Algorithmus kann in zwei Schritte unterteilt werden: der Berechnung der Kachelsuperposition nach Gleichung (3.27)

$$\hat{\mathbf{U}}^\Sigma := \sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\mathbf{U}}^{(k,l)}$$

sowie der daraufhin notwendig periodischen Ausbreitung nach Glei-

chung (3.33)

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma = \text{DFT}^{-1} \left[\text{DFT} \left[\hat{\mathbf{U}}^\Sigma \right] \cdot \hat{\mathbf{H}} \right].$$

Die N^2T^2 Phasentermmultiplikationen, die N^2T^2 Summationen und die bei der Ausbreitung eingesetzte schnelle Fourier-Transformation (FFT) führen zu einem numerischen Aufwand von

$$\mathcal{O}(2N^2T^2 + 2N^2 \log_2 N).$$

Dieser Aufwand kann erheblich reduziert werden indem sowohl die Interpolation als auch der überwiegende Teil an Phasentermmultiplikationen durch ihnen äquivalente Operationen im Fourier-Raum ersetzt werden.

3.2.2 Technik zur Ausbreitung sphärischer Wellenfronten

Die komplexwertige Objektwelle \mathbf{U} in der Detektorebene wird wie zuvor ausgehend von einem Hologramm und einer Referenzmessung mit Hilfe der Gleichungen (3.14) und (3.12) approximiert, wobei vereinfachend ein Detektor mit $N \times N$ Pixeln für $N = 2^n$ und $n \in \mathbb{N}$ angenommen wird. Gemäß Gleichung (3.26) wird die Phasentermverteilung \mathbf{S} durch die einer Kugelwelle mit ihrem Ursprung in der Pinhole-Position (x_0, y_0, z_0) beschrieben, d.h.

$$\begin{aligned} \mathbf{S}_{m,n} &= \exp(i\varphi_{\text{KW}}(x_m, y_n)), \\ x_m &= \Delta x (m - N/2), \\ y_n &= \Delta x (n - N/2), \\ m, n &= 0, 1, \dots, N - 1. \end{aligned} \tag{3.34}$$

Die realisierte numerische Apertur (NA) zusammen mit der gegebenen Pixel-Periode Δx und der Wellenlänge λ genüge nicht der Ungleichung (2.6) (Seite 14). Folglich kann die Funktion $\exp(i\varphi_{\text{KW}}(x, y))$ bei einem Stützstellenabstand von Δx nur innerhalb eines Kreisgebiets

mit Mittelpunkt $(x_0, y_0, 0)$ ohne Informationsverlust abgetastet werden. Für eine Ausbreitung in die Objektebene ohne Abbildungsfehler durch Aliasing muss das Feld \mathbf{U} interpoliert werden. Die Idee besteht wiederum in der Zerlegung von \mathbf{U} in T^2 Kacheln mit jeweils $\nu \times \nu$ Werten, wobei

$$\nu = N/T = 2^{n-t}, \quad N = 2^n, \quad T = 2^t, \quad n, t \in \mathbb{N}, \quad t < n$$

gilt. Der Teiler T wird so gewählt, dass einerseits bereits eine Kachel mit der Kantenlänge $\nu \Delta x$ das Objekt vollständig überdeckt und andererseits innerhalb jeder Kachel die Funktion $\exp(i\varphi_{KW}(x, y))$ nach Multiplikation mit dem Phasenterm einer ebenen Welle das Nyquist-Shannon Theorem (Ungleichung (2.6)) für die Pixel-Periode Δx erfüllt. Insbesondere wenn

$$T > \frac{N \Delta x}{z_0} \sqrt{2 \left(\frac{\Delta x}{\lambda} \right)^2 - \frac{1}{2}} \quad (3.35)$$

gilt, kann für jede Kachel bereits der komplex konjugierte Phasenterm der durch den Ortsvektor vom Pinhole zum Kachelzentrum definierten ebenen Welle gewählt werden. Um dies zu zeigen bezeichne $\mathbf{r}_T \in \mathbb{R}^3$ den Punkt in der Detektorebene mit minimalen Abstand zur Pinhole-Position \mathbf{r}_S und \mathbf{r}_F den Mittelpunkt einer beliebigen Kachel in der Detektorebene, d.h. der Vektor $\mathbf{r}_T - \mathbf{r}_S$ steht senkrecht zur Detektorebene und es gilt

$$\|\mathbf{r}_F - \mathbf{r}_S\| \geq \|\mathbf{r}_T - \mathbf{r}_S\| = |z_0|.$$

Die vom Pinhole ausgehende Kugelwellenfront nimmt in \mathbf{r}_T ihren minimalen Radius an und ist damit in einer infinitesimalen Umgebung um diesen Punkt maximal gekrümmt. Der lineare Anteil der Phasenverteilung φ_{KW} , welcher die mittlere Kippung der Pinholewelle innerhalb der zu \mathbf{r}_F gehörenden Kachel angibt, entspricht der einer ebenen Welle mit einem zu $\mathbf{r}_F - \mathbf{r}_S$ parallelen Normalenvektor. Die verbleibende Variation der Phasenverteilung einer um ihre Kippung korrigierten und damit

zentrierten Kachel wird nach vorheriger Überlegung maximal, wenn für den Mittelpunkt der Kachel $\mathbf{r}_F = \mathbf{r}_T$ gilt. Es bleibt zu zeigen, dass die aus Ungleichung (3.35) resultierende Kachelgröße klein genug gewählt wurde, um innerhalb dieser Kachel die Funktion $\exp(i\varphi_{\text{KW}}(x, y))$ mit einer Pixel-Periode von Δx verlustfrei darzustellen. Die Wellenfront variiert maximal in den Umgebungen der Kachelecken, d.h. bei maximalen Abstand

$$d = \nu \frac{\Delta x}{\sqrt{2}} \quad (3.36)$$

zum Kachelzentrum \mathbf{r}_F und gleichzeitig maximalen Einfallswinkel von

$$\sin \alpha = \frac{d}{\sqrt{d^2 + z_0^2}}. \quad (3.37)$$

Entsprechend der damit verbundenen maximalen Variation der Phase wird der Weg

$$f^{-1} = \frac{\lambda}{\sin \alpha} \quad (3.38)$$

zum einmaligen Durchlaufen ihres Wertebereichs $[0, 2\pi[$ minimal. Nach dem Abtasttheorem muss $2\Delta x < f^{-1}$ für die Pixel-Periode Δx erfüllt sein und die Gleichungen (3.37) sowie (3.38) liefern

$$2\Delta x < \frac{\lambda}{d} \sqrt{d^2 + z_0^2}. \quad (3.39)$$

Beide Seiten der Ungleichung sind nicht negativ, womit man durch Quadrieren und Umstellen

$$\frac{1}{d^2} > \frac{2}{z_0^2} \left(2 \left(\frac{\Delta x}{\lambda} \right)^2 - \frac{1}{2} \right)$$

erhält. Die Anwendung der Gleichung (3.36) und der Wurzelfunktion führt dann schließlich zur Behauptung (3.35).

Es wird nun für jedes Kachelindexpaar (k, l) ein Frequenzenpaar

$(f_x^{(k,l)}, f_y^{(k,l)})$ derart gewählt, dass die mit

$$\mathbf{U}_{m',n'}^{(k,l)} := \mathbf{U}_{k\nu+m',l\nu+n'} \mathbf{P}_{m',n'}^{(k,l)}, \quad (3.40)$$

$$\mathbf{P}_{m',n'}^{(k,l)} := \exp\left(i2\pi(f_x^{(k,l)}m' + f_y^{(k,l)}n')\right), \quad (3.41)$$

$$k, l = 0, 1, \dots, T-1,$$

$$m', n' = 0, 1, \dots, \nu-1$$

definierten Kacheln $\mathbf{U}^{(k,l)}$ die Nyquist-Shannon Bedingung (2.6) (S.14) für die Pixel-Periode Δx erfüllen und damit frei von Diskretisierungsaberrationen (Aliasing) interpoliert werden können. Die zum vorherigen Abschnitt 3.2.1 analoge Vorgehensweise wäre eine Interpolation der Kacheln um den Faktor T , sodass diese nachher $N \times N$ Werte für die Pixel-Periode $\Delta x/T$ enthalten. Eine weitere Multiplikation mit dem zu $\mathbf{P}^{(k,l)}$ komplex konjugierten ebenen Phasenterm würde die ursprünglichen Phasenverteilungen wieder herstellen, wonach die Kacheln in die Objektebene ausgebreitet und zu einem Bild des Objekts zusammengefügt werden könnten. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wäre nur noch eine Ausbreitung für ein Feld der Größe $N \times N$ notwendig [17]. Der numerische Aufwand hängt jedoch noch quadratisch vom Interpolationsfaktor bzw. direkt von der Anzahl T^2 der Kacheln und damit auch von der optischen Auflösung ab.

Mit Hilfe der Fourier-Transformation können die Kacheln $\mathbf{U}^{(k,l)}$ wesentlich effizienter interpoliert und die Multiplikationen mit den zu $\mathbf{P}^{(k,l)}$ komplex konjugierten Phasentermen vermieden werden. Im Fourier-Raum kann eine Kachel durch ein sogenanntes *Zero-Padding* interpoliert werden [74]. Zur Beschreibung der Vorgehensweise bezeichne $\hat{\Omega} : \mathbb{C}^{\nu \times \nu} \rightarrow \mathbb{C}^{N \times N}$ die mit

$$\hat{\Omega} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] = \begin{bmatrix} \mathbf{0}_\delta^\delta & \mathbf{0}_\nu^\delta & \mathbf{0}_\delta^\delta \\ \mathbf{0}_\delta^\nu & \text{DFT} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] & \mathbf{0}_\delta^\nu \\ \mathbf{0}_\delta^\delta & \mathbf{0}_\nu^\delta & \mathbf{0}_\delta^\delta \end{bmatrix}$$

definierte Abbildung, wobei

$$\delta := \frac{N - \nu}{2}$$

sowie

$$\mathbf{0}_w^h := \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \end{bmatrix} \quad \updownarrow h, \quad \text{für } h, w \in \mathbb{N}_+ = \mathbb{N} \setminus \{0\}$$

$$\Leftrightarrow$$

$$w$$

gesetzt werden. Das Feld $\text{DFT}^{-1} \left[\hat{\Omega} [\mathbf{U}^{(k,l)}] \right]$ mit $N \times N$ Werten und der Pixel-Periode $\Delta x/T$ ist das Resultat einer Fourier-Interpolation des phasenzentrierten Feldes $\mathbf{U}^{(k,l)}$. Um die ursprüngliche Phasenverteilung (Gl. (3.34)) zu erhalten, muss die mit Gleichung (3.40) entfernte Kippung wieder hinzugefügt werden. Die Multiplikation mit einem linearen Phasenterm im Ortsraum entspricht einer Verschiebung des Feldes im Fourier-Raum [55]. Um nur Verschiebungen zwischen gegebenen Pixel-Positionen von $\text{DFT} [\mathbf{U}^{(k,l)}]$ zu erhalten, werden die Frequenzen $f_x^{(k,l)}$ und $f_y^{(k,l)}$ auf den mit Gleichung (3.17) gegebenen Wertebereich eingeschränkt, d.h.

$$f_x^{(k,l)} = \frac{\nu_x^{(k,l)}}{\nu \Delta x},$$

$$f_y^{(k,l)} = \frac{\nu_y^{(k,l)}}{\nu \Delta x},$$

$$\nu_x^{(k,l)}, \nu_y^{(k,l)} \in \{-\nu/2, -\nu/2 + 1, \dots, -\nu/2 + (\nu - 1)\}.$$

Genauer wird nun für jede Kachel $\mathbf{U}^{(k,l)}$ genau das ganzzahlige Frequenzparameterpaar $(\nu_x^{(k,l)}, \nu_y^{(k,l)})$ gewählt, welches den Winkel zwischen der zu $\mathbf{P}^{(k,l)}$ gehörenden Wellenfrontnormalen (k-Vektor) und

dem durch die Pinhole-Position und Kachelzentrum definierten Vektor minimiert. Die mit

$$\hat{\Omega}^{(k,l)} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] = \begin{bmatrix} \mathbf{0}_{\delta+\nu_y^{(k,l)} \delta-\nu_x^{(k,l)}} & \mathbf{0}_{\nu}^{\delta+\nu_y^{(k,l)}} & \mathbf{0}_{\delta+\nu_x^{(k,l)}}^{\delta+\nu_y^{(k,l)}} \\ \mathbf{0}_{\delta-\nu_x^{(k,l)}}^{\nu} & \text{DFT} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] & \mathbf{0}_{\delta+\nu_x^{(k,l)}}^{\nu} \\ \mathbf{0}_{\delta-\nu_x^{(k,l)} \delta-\nu_y^{(k,l)}} & \mathbf{0}_{\nu}^{\delta-\nu_y^{(k,l)}} & \mathbf{0}_{\delta+\nu_x^{(k,l)}}^{\delta-\nu_y^{(k,l)}} \end{bmatrix}, \quad (3.42)$$

verallgemeinerte Abbildung $\hat{\Omega}^{(k,l)}$ interpoliert das Feld $\mathbf{U}^{(k,l)}$ und entfernt gleichzeitig die mit Gleichung (3.40) durchgeführte Phasenzentrierung, sodass $\hat{\Omega}^{(k,l)} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right]$ in die Objektebene ausgebreitet werden kann und die Summe aller Kacheln

$$\hat{\mathbf{D}}^{\Sigma} = \text{DFT}^{-1} \left[\sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\Omega}^{(k,l)} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] \cdot \hat{\mathbf{H}} \right]. \quad (3.43)$$

ein Bild des Objekts mit einer Pixel-Periode von $\Delta x/T$ und einer durch die NA gegebenen optischen Auflösung liefert.

Zusammenfassend lässt sich der Algorithmus mit Fourier-Interpolation in drei Schritte gliedern: Zuerst werden für einen Faktor T , welcher mit Ungl. (3.35) nach unten und durch die Objektausdehnung nach oben abzuschätzen ist, die ganzzahligen Frequenzpaare $(f_x^{(k,l)}, f_y^{(k,l)})$ ermittelt und mit Gl. (3.40) die Zerlegung des Feldes \mathbf{U} in die Menge

$$\left\{ \mathbf{U}^{(k,l)} \in \mathbb{C}^{\nu \times \nu} : k, l = 0, 1, \dots, T-1 \right\}$$

phasenzentrierter Kacheln bestimmt. Die für die Frequenzpaare mit Gl. (3.42) definierten Abbildungen $\hat{\Omega}^{(k,l)} : \mathbb{C}^{\nu \times \nu} \rightarrow \mathbb{C}^{N \times N}$ liefern die Fourier-Transformierten der interpolierten und phasenkorrigierten Kacheln in einem zweiten Berechnungsschritt, wobei ihre Summe

$$\hat{\mathbf{U}}^{\Phi} := \sum_{k,l=0}^{T-1} \hat{\Omega}^{(k,l)} \left[\mathbf{U}^{(k,l)} \right] \quad (3.44)$$

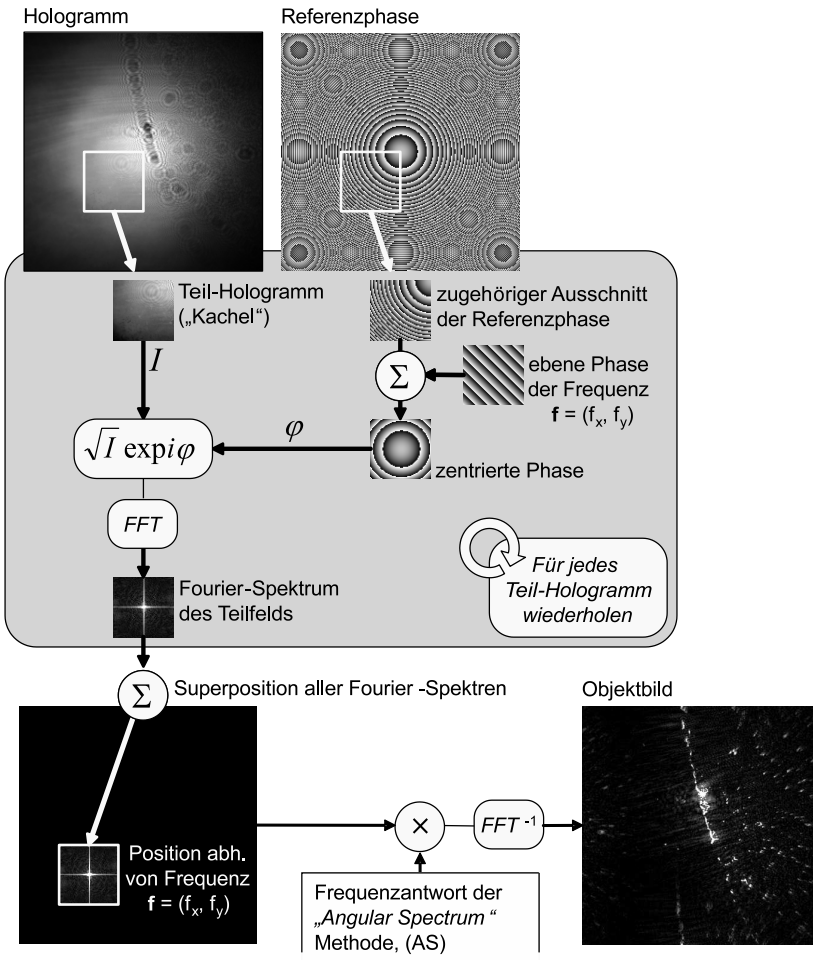


Abbildung 3.6: Prinzip der Kachel-Superposition mit Fourier-Interpolation zur Ausbreitung sphärischer Wellenfronten.

die Fourier-Transformierte der T^2 -fachen Superposition aller Kacheln der Detektorebene ist. Der letzte Schritt besteht in der mit Gl. (3.33) zyklischen Ausbreitung dieses Feldes in die Objektebene, d.h.

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma = \text{DFT}^{-1} \left[\hat{\mathbf{U}}^\Phi \cdot \hat{\mathbf{H}} \right].$$

Der numerische Aufwand setzt sich zusammen aus N^2 Multiplikationen zur Phasenzentrierung, aus T^2 FFTs für die $\nu \times \nu$ großen Kacheln, aus N^2 Additionen zur Summenbildung $\hat{\mathbf{U}}^\Phi$, aus höchstens N^2 Multiplikationen mit der Frequenzantwort $\hat{\mathbf{H}}$ und einer inversen FFT für das $N \times N$ große Ergebnis. Mit $T\nu = N$ und $\nu < N$ lässt sich der Aufwand unabhängig vom Faktor T durch

$$\mathcal{O}(2T^2\nu^2 \log_2 \nu + 2N^2 \log_2 N) \subseteq \mathcal{O}(4N^2 \log_2 N)$$

nach oben abschätzen. Im Vergleich zur Wellenausbreitung nach Gleichung (3.15) (S. 34) ist eine Interpolation des Eingangsfelds bei der Ausbreitung sphärischer Wellenfronten ohne zusätzlichen numerischen Aufwand möglich.

3.2.3 Bildgebung mit dem Rayleigh-Sommerfeld Integral

Der im vorherigen Abschnitt 3.2.2 beschriebene Algorithmus zur skalaren Wellenausbreitung divergenter Wellenfronten ermöglicht eine objektive Abbildung mikroskopischer Objekte bei geringem Aufwand [18] und wird im Folgenden kurz mit FTSP für „*Fourier Domain Tile Superposition Propagation*“ bezeichnet. Die Anwendung der Fourier-Interpolation auf einen Ausschnitt des Feldes (einer Kachel) führt durch die Periodizität der diskreten Fourier-Transformation zu unerwünschten Strukturen. Das diskrete Fourier-Spektrum einer Kachel, bestehend aus nur endlich vielen Frequenzen auf einem äquidistanten Raster, füllt den gesamten 2D-Ortsraum (die Detektorebene) periodisch mit dieser einen Kachel aus. Dadurch treffen die Feldverteilungen zweier sich

gegenüberliegender Kanten aufeinander, was im Allgemeinen zu Unstetigkeiten führt. Insbesondere unterschiedliche Krümmungsradien der Phasenverteilung des Feldes führen oft entlang der Kanten zu Nullstellen. Fügt man alle so interpolierten Kacheln wieder zusammen, zeichnen sich ihre Berührungskanten in Form eines Gitters schmaler Linien ab, wie dies mit Abbildung 3.7 veranschaulicht wird. Da dieses Gitter nur einen geringen Teil der gesamten im Hologramm enthaltenen Information stört, kann dieser Effekt für eine schnelle Rekonstruktion von Inline-Hologrammen vernachlässigt werden.

Der im Folgenden beschriebene exakte Algorithmus zerlegt das Hologramm in jedem Pixel in vier verschieden gewichtete Anteile. Diese vier Sub-Hologramme werden dann mit dem FTSP-Algorithmus in die Objektebene ausgebreitet und wieder zu einem Bild zusammengeführt. Dabei sind in jedem Sub-Hologramm die Kachelkanten unterschiedlich angeordnet und die Intensitäten dort durch passend gewählte Gewichtsfunktionen gleich Null gesetzt. Damit sind die Unstetigkeiten von U an den Kachelkanten als Ursache der zuvor beschriebenen Interpolationsartefakte beseitigt. Ausgehend von der bekannten Pinhole-Position (x_0, y_0, z_0) , einem gemessenen Hologramm \mathbf{I} und einer weiteren Messung der Beleuchtungssituation $|\mathbf{R}|^2$ wird die Objektwellenfront in der Detektorebene mit Hilfe der Gleichung (3.14) approximiert, d.h.

$$\begin{aligned} \mathbf{U}_{m,n} &= \left(\sqrt{\mathbf{I}_{m,n}} - |\mathbf{R}_{m,n}| \right) \exp(i\varphi_{\text{KW}}(x_m, y_n)), \quad (3.45) \\ x_m &= \Delta x (m - N/2), \\ y_n &= \Delta x (n - N/2), \\ m, n &= 0, 1, \dots, N - 1. \end{aligned}$$

Der FTSP Algorithmus berechnet die Fourier-Transformierten der Kacheln sowohl vor als auch nach der Interpolation. Um die FFT effizient einsetzen zu können, ist es sinnvoll für die Anzahl N der Spalten und Zeilen des Feldes sowie den Interpolationsfaktor T die Bedingungen

$$N = 2^n, \quad T = 2^t, \quad n, t \in \mathbb{N}, \quad t < n$$

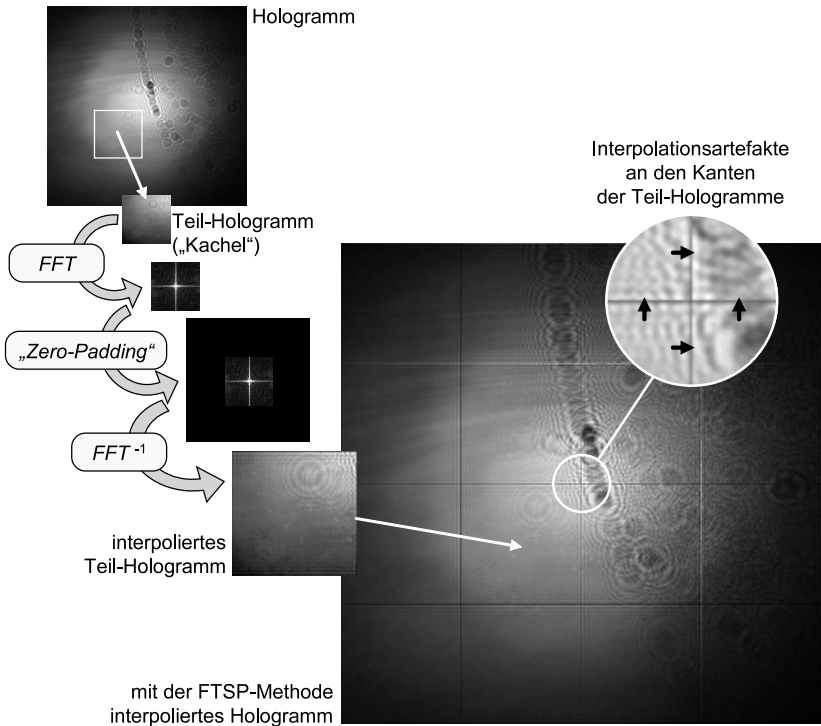


Abbildung 3.7: Entstehung der durch die FTSP-Technik verursachten Interpolationsartefakte. Die Interpolation durch sogenanntes „Zero-Padding“ einer diskreten Fourier-Transformierten unterliegt zyklischen Randbedingungen, sodass die Übergänge zwischen den Teilhologrammen fehlerhaft interpoliert werden.

zu fordern. Wie in den vorherigen Abschnitten soll das $N \times N$ große Feld \mathbf{U} in T^2 Kacheln der Größe $\nu \times \nu$ mit

$$\nu = N/T = 2^{n-t}$$

zerlegt werden. Zuvor wird nun jedoch das Feld durch ein sogenanntes

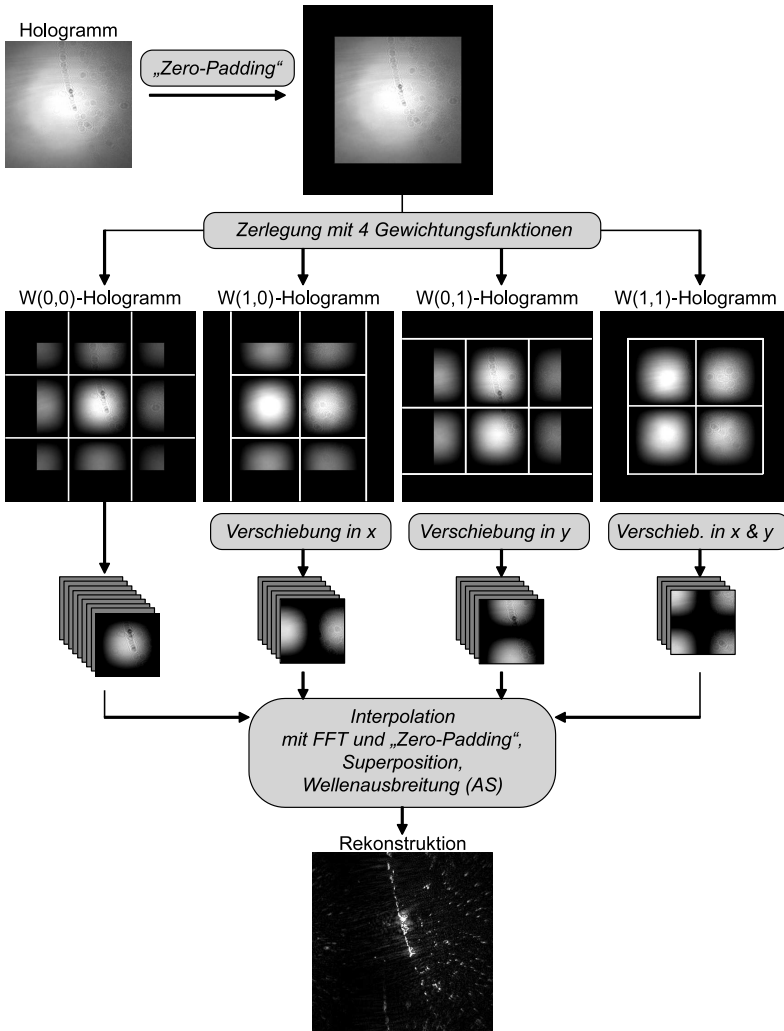


Abbildung 3.8: Vermeidung von Interpolationsartefakten durch vierfache Anwendung der FTSP-Technik auf eine Zerlegung des ursprünglichen Hologramms in vier dem entsprechend gewichtete Hologrammanteile.

Zero-Padding gemäß

$$\bar{\mathbf{U}} := \begin{bmatrix} \mathbf{0}_{\nu/2}^{\nu/2} & \mathbf{0}_N^{\nu/2} & \mathbf{0}_{\nu/2}^{\delta} \\ \mathbf{0}_{\nu/2}^N & \mathbf{U} & \mathbf{0}_{\nu/2}^N \\ \mathbf{0}_{\nu/2}^{\nu/2} & \mathbf{0}_N^{\nu/2} & \mathbf{0}_{\nu/2}^{\nu/2} \end{bmatrix}, \quad \mathbf{0}_w^h := \begin{bmatrix} 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & 0 \end{bmatrix} \begin{matrix} \updownarrow h \\ \\ w \end{matrix}$$

\leftrightarrow

auf $N + \nu \times N + \nu$ vergrößert. Dieses vergrößerte Feld $\bar{\mathbf{U}}$ wird nun mit Hilfe der Gewichtungsfunktionen

$$W^{(k,l)}(x, y) := \sin^2\left(\frac{\pi}{2}k + \frac{\pi}{\nu}x\right) \sin^2\left(\frac{\pi}{2}l + \frac{\pi}{\nu}y\right), \quad k, l \in \{0, 1\} \quad (3.46)$$

mit

$$\sum_{k,l \in \{0,1\}} W^{(k,l)}(x, y) = 1, \quad \forall x, y \in \mathbb{R}$$

in die vier Summanden

$$\begin{aligned} \bar{\mathbf{U}}_{m,n}^{(k,l)} &:= W^{(k,l)}(m, n) \bar{\mathbf{U}}_{m,n} \\ m, n &= 0, 1, \dots, N-1 \end{aligned} \quad (3.47)$$

zerlegt. Jedes Feld $\bar{\mathbf{U}}^{(k,l)}$ wird dann wie zuvor in Kacheln zerlegt, wobei die jeweiligen Nullstellenlinien der Gewichtungsfunktionen die Positionen der Kachelkanten definieren, wie dies in Abbildung 3.8 dargestellt ist. Im Einzelnen erhält man so eine Zerlegung des ursprünglichen Hologramms in T^2 Kacheln aus $\bar{\mathbf{U}}^{(0,0)}$, $(T+1)^2$ Kacheln aus $\bar{\mathbf{U}}^{(1,1)}$ und jeweils $T(T+1)$ Kacheln aus den übrigen beiden Summanden. Alle Kacheln werden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben in ein $N \times N$ großes mit Nullen initialisiertes Feld aufaddiert. Beim Zusammenführen aller Kacheln zu einem Bild des Objekts muss der überwiegende Teil der Kacheln in Abhängigkeit vom Indexpaar der Gewichtungsfunktion um $\nu/2$ Pixel periodisch verschoben werden. Insbesondere werden alle

Kacheln aus $\bar{\mathbf{U}}^{(1,0)}$ in x-Richtung, alle Kacheln aus $\bar{\mathbf{U}}^{(0,1)}$ in y-Richtung und schließlich alle Kacheln aus $\bar{\mathbf{U}}^{(1,1)}$ in beiden Richtungen verschieben. Da zu diesem Zeitpunkt bereits die Fourier-Transformierten der Kacheln vorliegen, kann diese Verschiebungen durch den dazu äquivalenten Vorzeichenwechsel jeder zweiten Spalte bzw. Reihe erfolgen. Im Vergleich mit dem zuvor beschriebenen FTSP Algorithmus steigt der numerische Aufwand mit

$$\mathcal{O}(8T^2\nu^2 \log_2 \nu + 2N^2 \log_2 N) \subseteq \mathcal{O}(10N^2 \log_2 N)$$

etwa um den Faktor 2.5 an, wenn $T\nu = N$ mit $\nu < N$ vorausgesetzt wird.

3.2.4 Rekonstruktion eines Bildausschnitts

Mit der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Rekonstruktionstechnik wird das Hologramm lückenlos in eine Menge identisch großer Teilhologramme („Kacheln“) zerlegt. Wie bereits im Abschnitt 3.2.1 (Seite 43) gefordert, sind bisher nur Kachelgrößen zugelassen, welche das Objekt vollständig überdecken. Zusätzlich ist der Vergrößerungsfaktor T , d.h. das Verhältnis zwischen der Pixel-Periode des Hologramms und der des rekonstruierten Objektbildes, auf eine Potenz der Zahl 2 eingeschränkt. Diese Einschränkungen können zu folgendem Problem führen. Mit dem Faktor $T_0 = 2^t$ erhält man zwar ein hinreichend großes Bildfeld, jedoch mit einer größeren Pixel-Periode als die gewünschte optische Auflösung. Andererseits jedoch kann dabei der nächstgrößere Faktor $T_1 = 2^{t+1}$ die gewünschte Auflösung bei wiederum zu kleinem Bildfeld liefern. Ein solches zu klein gewähltes Bildfeld führt zu periodischen Überlagerungen des Objektbildes mit sich selbst. Mit $\hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i_0,j_0)}$ sei wie zuvor die zum Indexpaar (i_0, j_0) gehörende Kachel der Objektebene bezeichnet, welche nur das von der Kachel $\hat{\mathbf{U}}^{(k,l)}$ der Hologrammebene ausgehende Licht enthält, wobei

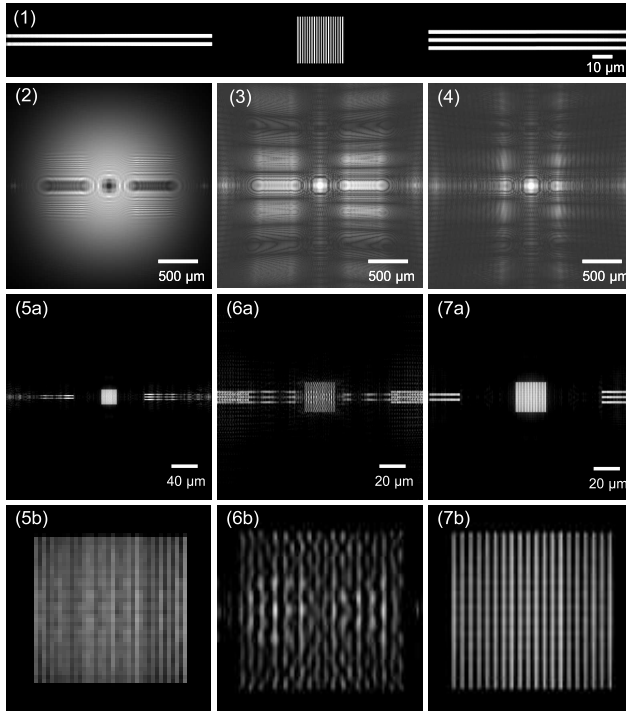


Abbildung 3.9: Simulation zur Detailrekonstruktion mit Hilfe eines vorgefilterten Hologramms. (1) Das abzubildende Objekt besteht aus drei Balkengruppen: links zwei $2\ \mu\text{m}$ breite Balken, rechts drei $2\ \mu\text{m}$ breite Balken sowie mittig eine Gruppe von zwanzig $600\ \text{nm}$ breiten Balken. Es wurde ein Hologramm (2) mit 512×512 Pixel der Größe $5\ \mu\text{m}$ simuliert und daraus die Objektwellenfront (3) rekonstruiert. (5a) Das rekonstruierte Objekt bei einem Vergrößerungsfaktor von $T_0 = 2^3$. (5b) Die mittige Balkengruppe mit der zugehörigen Pixel-Periode $625\ \text{nm}$ ist nicht auflösbar. (6a) Bei der Rekonstruktion mit einem Vergrößerungsfaktor $T_1 = 2^4$ ist das resultierende Fenster in der Objektebene (6b) mit einer Kantenlänge von $160\ \mu\text{m}$ zu klein, sodass es zu periodischen Überlagerungen kommt. (4) Das Hologramm wird auf ein $160\ \mu\text{m}$ großes Zielfenster vorgefiltert. (7a) Die Rekonstruktion dieses vorgefilterten Hologramms enthält keine periodischen Artefakte und auch die mittlere Balkengruppe der Periode $1.2\ \mu\text{m}$ ist nun aufgelöst (7b).

$i_0, j_0, k, l \in \{0, 1, \dots, T_1 - 1\}$ gilt. Die Summe

$$\hat{\mathbf{D}}^\Sigma := \sum_{k,l=0}^{T_1-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i_0,j_0)} \quad (3.48)$$

enthält alle im Hologramm enthaltenen Informationen über das Objekt in dem zu (i_0, j_0) gehörenden Ausschnitt der Größe einer Kachel. Nun sei die Ausdehnung des Objekts größer als die einer Kachel. Die mit Gleichung (3.33) auf der Seite 44 definierte Transformation liefert dann

$$\text{DFT}^{-1} \left[\text{DFT} \left[\sum_{k,l=0}^{T_1-1} \hat{\mathbf{U}}^{(k,l)} \right] \cdot \hat{\mathbf{H}} \right] = \hat{\mathbf{D}}^\Sigma + \sum_{\substack{k,l,i,j=0 \\ (i,j) \neq (i_0,j_0)}}^{T_1-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)}, \quad (3.49)$$

womit der gewünschte Bildausschnitt $\hat{\mathbf{D}}^\Sigma$ mit der in diesem Falle nicht verschwindenden Summe aller übrigen Kacheln der Objektebene überlagert wird, d.h. es gilt

$$\sum_{\substack{k,l,i,j=0 \\ (i,j) \neq (i_0,j_0)}}^{T_1-1} \hat{\mathbf{D}}^{(k,l;i,j)} \neq \begin{bmatrix} 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & 0 \end{bmatrix}.$$

Mit der im Folgenden beschriebenen Vorfilterung werden die im Hologramm enthaltenen Informationen auf den für den gewünschten Bildausschnitt relevanten Anteil reduziert. Der Detektor wird derart in Position gebracht, dass die Intensität am Rand des Detektors einen vorgegebenen Wert nicht überschreitet, was im Abschnitt 4.1.1 noch genauer beschrieben wird. Weiter sei der Abstand zwischen Pinhole und Objekt kleiner als der dort mit Gleichung (4.5) (Seite 67) definierte Maximalabstand. Bei einer Rekonstruktion mit der k-Vektor-Transformation ist die frei wählbare Pixel-Periode bei gleichzeitig geringem numerischen Aufwand vorteilhaft. Im Abschnitt 4.1.2 wird zudem gezeigt, dass in

diesem Fall die für die maximal erreichbare optische Auflösung notwendige Pixel-Periode hinreichend groß ist, um bei gleichbleibenden Pixel-Zahlen den beleuchteten Teil des Objekts vollständig zu überdecken. Das mit der k -Vektor-Transformation für diese Pixel-Periode rekonstruiertes Bild des Objekts enthält die im Hologramm gespeicherte numerische Apertur vollständig bei gleichzeitig maximaler Bildfeldausdehnung. Wie im Abschnitt 2.5.2 beschrieben, kommt es hierbei jedoch zu astigmatischen Aberrationen, welche mit dem Abstand zum Entwicklungsursprung zunehmen. In diesem mit Abbildungsfehlern behafteten Objektbild maximaler Ausdehnung werden nun alle Objektteile maskiert, welche aufgrund der zyklischen Randbedingungen bei der FTSP-Rekonstruktion das Objektbild stören würden. Nach einer Umkehrtransformation enthält das Hologramm nur noch Informationen über den unmaskiert verbliebenen Ausschnitt in der Objektebene. Die im Abschnitt 3.2.3 beschriebene Technik rekonstruiert nun ein Bild des Objekts ohne die anfangs beschriebenen periodischen Überlagerungen sowie ohne die für die k -Vektor-Transformation typischen Aberrationen. Mit Abbildung 3.9 wird die Wirkungsweise exemplarisch anhand simulierter Daten veranschaulicht.

4 Bildgebung mit einem digitalen inline-holografischen Mikroskop

4.1 Dimensionierung und Eigenschaften der Bildgebung

4.1.1 Dimensionierung des Aufbaus

Ein Pinhole wird kohärent mit einem Laser der Wellenlänge λ beleuchtet. Das entstehende Beugungsbild wird im Abstand z_0 zum Pinhole mit einem 2D-Bildsensor (CCD, CMOS) mit $N \times N$ Pixeln sowie einer Pixel-Periode von Δx detektiert. Das im Folgenden verwendete Koordinatensystem hat seinen Ursprung $(0, 0, 0)$ in der Pinhole-Position. Die z -Achse steht senkrecht zur Detektorebene und durchdringt diese in der Mitte des Detektors. Die beiden übrigen Achsen seien parallel zu den Pixel-Zeilen (x -Achse) und -Spalten (y -Achse) gewählt. Ist der Beobachtungsabstand z_0 hinreichend groß gegenüber dem Durchmesser d des Pinholes, kann das zugehörige Beugungsbild als rotations-symmetrisches Produkt einer nicht verschwindenden Funktion und der Bessel-Funktion 1. Art und Ordnung beschrieben werden [12, S. 442]. Das auf der z -Achse befindliche zentrale Maximum ist von konzentrischen dunklen Ringen umgeben, welche zu den Nulldurchgängen der Bessel-Funktion gehören. Für den Winkel α zwischen der z -Achse und

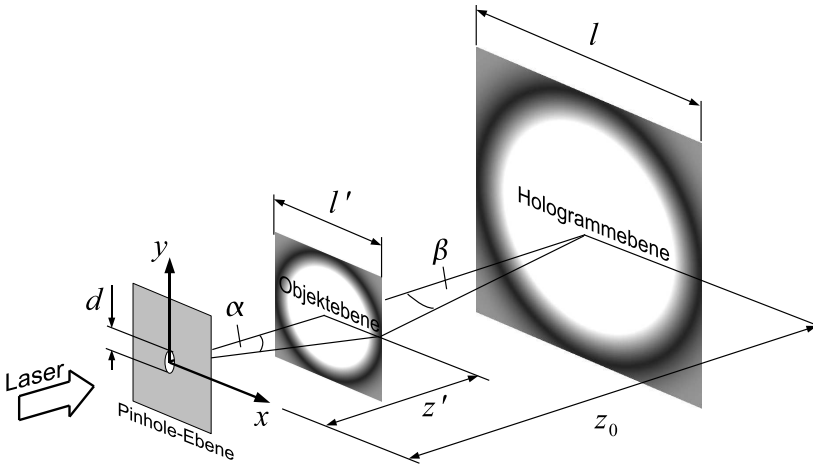


Abbildung 4.1: Skizze zur Dimensionierung einer inline-holografischen Anordnung.

dem ersten Nulldurchgang gilt die Beziehung

$$\sin \alpha = 1.22 \frac{\lambda}{d}. \quad (4.1)$$

Die Position des Detektors $(0, 0, z_0)$ sei über den Abstand z_0 so gewählt, dass der erste dunkle Ring die Detektorkanten berührt, d.h.

$$z_0 = \frac{l}{2} \sqrt{\left(\frac{d}{1.22\lambda}\right)^2 - 1},$$

wobei $l = N\Delta x$ die Kantenlänge des Detektors bezeichnet. Dies ist jedoch nur möglich, wenn der Pinhole-Durchmesser d größer als das 1.22-fache der Wellenlänge λ ist. Verallgemeinert kann in der Detektorebene ein Kreisgebiet mit einer durch einen Schwellwert vorgegebenen minimalen Beleuchtungsintensität gewählt werden. Hierbei definiert der Durchdringungspunkt der optischen Achse den Mittelpunkt des Kreises und der Schwellwert dessen Radius. Der Schwellwert ist dabei so

zu wählen, dass Objekte außerhalb des mit Kreis und Pinhole-Position definierten Kegels zu schwach beleuchtet werden, um das Hologramm störend zu beeinflussen. Die Intensität im 1. Nebenmaximum im Beugungsbild eines Pinholes entspricht 1.75% der Maximalintensität auf der optischen Achse [12, S. 444]. Es sei nun angenommen, dass ein derart schwach beleuchtetes Objekt das Hologramm nicht störend beeinflusst. Die Intensität nimmt zwischen der optischen Achse und dem 1. Nebenmaximum in der Umgebung der 1. Nullstelle beliebig kleine Werte an. Aus diesem Grund wird der Öffnungswinkel des Beleuchtungskegels nun derart verkleinert definiert, dass die Intensität innerhalb des Kegels den zur Maximalintensität relativen Wert $q = 0.0175$ nicht unterschreitet. Der Beobachtungsabstand ergibt sich dann mit Hilfe der Beziehung

$$\left| \frac{J_1\left(\pi \frac{d}{\lambda} \sin \alpha\right)}{\pi \frac{d}{\lambda} \sin \alpha} \right|^2 = \frac{q}{1 - \sin^2 \alpha}, \quad (4.2)$$

wobei J_1 die Bessel-Funktion 1. Art und Ordnung bezeichnet. Für die Wellenlänge $\lambda = 661$ nm, den Pinhole-Durchmesser $d = 1$ μm und den relativen Schwellwert $q = 0.0175$ gilt zum Beispiel für den Öffnungswinkel des Kegels α die Abschätzung $\sin \alpha \approx 0.665$. Ein Detektor mit 2048×2048 Pixel und einer Pixel-Periode $\Delta x = 3.5$ μm wird nach Kriterium (4.2) in einem Abstand von $z_0 \approx 4$ mm zum Pinhole positioniert.

Für die folgenden Betrachtungen wird vorausgesetzt, dass nur der Teil des Objekts signifikant an der Hologrammentstehung beteiligt ist, welcher sich innerhalb des mit der Pinhole-Position und dem halben Öffnungswinkel α definierten Beleuchtungskegels befindet. Weiter bezeichne z' den größten Abstand zwischen einem Objektpunkt und der zum Detektor parallelen Pinhole-Ebene. Der Durchmesser l' des Kegels in dieser obersten Objektebene $\{(x, y, z') : x, y \in \mathbb{R}\}$ ist gegeben mit

$$l' = 2z' \tan \alpha. \quad (4.3)$$

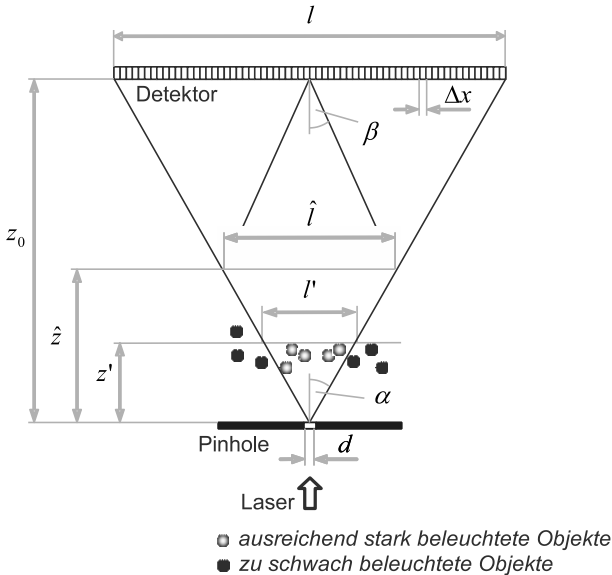


Abbildung 4.2: Beleuchtungskegel bei der Inline-Holografie mit Pinholes. Für die Dimensionierung der Anordnung werden nur die innerhalb des Kegels befindlichen Objekte (grün) berücksichtigt und alle übrigen (rot) vernachlässigt. Der durch die Detektor-Pixel-Periode Δx gegebene maximale halbe Öffnungswinkel β definiert eine obere Grenze für den Durchmesser \hat{l} des Bildfelds sowie für dessen Abstand \hat{z} zum Pinhole.

Es seien nun **a** und **b** zwei Punkte in der obersten Objektebene und **c** ein Punkt in der Detektorebene, wobei alle auch Element des Beleuchtungskegels sind, d.h. es gilt

$$\begin{aligned}
 \mathbf{a}, \mathbf{b} &\in \{(x, y, z') : x^2 + y^2 \leq (l'/2)^2\}, \\
 \mathbf{c} &\in \{(x, y, z_0) : x^2 + y^2 \leq (l/2)^2\}.
 \end{aligned}$$

Der Öffnungswinkel $\sphericalangle(\mathbf{a}, \mathbf{c}, \mathbf{b})$ wird für einen festen Punkt **c** über alle zulässigen Punkte **a** und **b** genau dann maximal, wenn diese den maximalen Abstand l' annehmen und die durch alle drei Punkte definierte Ebene die z-Achse enthält. Dieser Winkel lässt sich bei nun festen **a** und

\mathbf{b} durch Verschieben der Beobachtungsposition \mathbf{c} zur z-Achse hin vergrößern und wird in der z-Achse selbst maximal. Demnach kann ein Hologramm mit der zur Verfügung stehenden Pixel-Periode des Detektors Δx in Übereinstimmung mit dem Theorem von Nyquist-Shannon [40] vollständig aufgezeichnet werden, wenn die Ungleichung

$$\sin \beta < \frac{\lambda}{2\Delta x} \quad (4.4)$$

erfüllt ist (Gl.(2.5), S.11). Hierbei bezeichnet β den halben Öffnungswinkel des Detektionskegels, welcher durch das Detektorzentrum und die kreisförmige Ausleuchtung in einer Objektebene mit dem Abstand \hat{z} zum Pinhole definiert ist. Zusammen mit Gleichung (4.3) erhält man für den Durchmesser \hat{l} der Ausleuchtung in dieser Ebene

$$\hat{l} = 2\hat{z} \tan \alpha \quad \text{sowie} \quad \hat{l} = 2(z_0 - \hat{z}) \tan \beta.$$

Diese beiden Gleichungen liefern aufgrund der Ungleichung (4.4) eine kleinste obere Schranke \hat{z} für den Abstand einer Objektebene zum Pinhole mit

$$\hat{z} = \frac{\tan \beta}{\tan \alpha + \tan \beta} z_0,$$

wobei gilt

$$\tan \alpha = \frac{l}{2z_0} = \frac{N\Delta x}{2z_0} \quad \text{sowie} \quad \tan \beta = \frac{\lambda}{\sqrt{(2\Delta x)^2 - \lambda^2}}.$$

Bei einer Pixel-Periode Δx , einer Pixelanzahl N und einem Pinhole-Detektor-Abstand z_0 ist das Objekt unterhalb der Ebene

$$\{(x, y, \hat{z}) : x, y \in \mathbb{R}\}$$

mit einem Abstand zum Pinhole von

$$\hat{z} = \left(1 + \frac{N\Delta x}{z_0} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\lambda} \right)^2 - \frac{1}{4}} \right)^{-1} z_0 \quad (4.5)$$

zu positionieren, d.h. für den Abstand der obersten Objektebene gilt

$$z' < \hat{z} < z_0.$$

Als Beispiel verfüge der Sensor über 2048×2048 Pixel der Größe $3.5 \mu\text{m}$. Der Abstand zwischen dem mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 661 \text{ nm}$ beleuchteten Pinhole und dem Sensor sei mit 4 mm gegeben. In diesem Fall sollte die Probe nicht weiter als $\hat{z} = 390 \mu\text{m}$ vom Pinhole entfernt sein. Hierbei wurde angenommen, dass Objekte außerhalb des mit der Detektorfläche und der Pinhole-Position definierten Kegels nur vernachlässigbar schwache Interferenzstrukturen verursachen.

4.1.2 Auflösungsvermögen

Eine ebene Wellenfront der Wellenlänge λ breitet sich in einem homogenen Medium aus, wobei wie zuvor der Brechungsindex mit $n = 1$ angenommen wird. In einer zur Wellenfront gekippten Ebene erhält man für Real- und Imaginärteil der Welle einen Sinusterm konstanter Amplitude mit der Periode

$$\delta' = \frac{\lambda}{\sin \alpha'} = \frac{\lambda}{\text{NA}}, \quad (4.6)$$

wobei α' der Einfallswinkel zwischen dem k-Vektor der Wellenfront und der Normalen der Ebene ist. Ein Sinusgitter der Periode δ' in einer zum Detektor parallelen Objektebene kann abgebildet werden, wenn der Detektor alles vom Gitter ausgehende Licht unter allen Einfallswinkeln bis hin zu α' aufnimmt [41]. Mit dem Brechungsindex $n = 1$ entspricht $\sin \alpha'$ der numerischen Apertur (NA) des abbildenden Systems. Die Gleichung (4.6) heißt Gittergleichung für die erste Beugungsordnung und die Periode δ' bei normal einfallendem Licht [12]. Soll demnach eine in der Objektebene befindliche Gitterstruktur abgebildet werden, muss ihr Beugungsbild bis hin zu ihrem ersten Nebenmaximum aufgezeichnet werden.

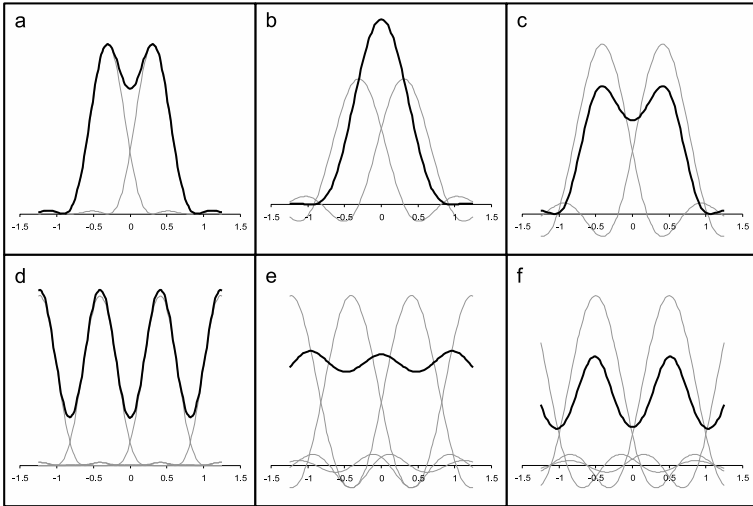


Abbildung 4.3: Vergleich verschiedener Auflösungskriterien hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf unterschiedliche Objekte. Die numerische Apertur (NA) wird identisch zur Wellenlänge in μm gesetzt. (a) Inkohärente Überlagerung (fett) zweier Airy-Funktionen (dünn) mit dem zum Rayleigh-Kriterium gehörenden Minimal-Abstand von $0.61 \mu\text{m}$. (b) Bei kohärenter Überlagerung kann der gleiche Abstand nicht aufgelöst werden. (c) Die beiden zueinander kohärenten Bildpunkte sind erst bei einem Abstand von $0.82 \mu\text{m}$ unterscheidbar. (d) Bei inkohärenter Überlagerung kann vom Fall zweier auf den Fall mehrerer in einer Reihe befindlicher Punktquellen geschlossen werden. (e) Bei mehr als zwei kohärent überlagerten Airy-Funktionen ist der zuvor für zwei Quellen gewählte Abstand zu klein. (f) Das aus der Gittergleichung abgeleitete Auflösungskriterium liefert den auch für mehrere, zueinander kohärente und in einer Reihe angeordnete Punktlichtquellen geltenden Mindestabstand von $1 \mu\text{m}$.

Im Folgenden werden zwei weitere Auflösungskriterien hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für die Holografie diskutiert. Wird eine Punktquelle unter einer begrenzten numerischen Apertur abgebildet, so erhält man als Bild eine sogenannte Airy-Funktion [12]. Nach dem Rayleigh-

Kriterium können zwei inkohärente Punktquellen gleicher Intensität getrennt abgebildet werden, wenn die jeweils erste Nullstelle ihrer Airy-Funktionen mit dem Hauptmaximum der jeweils anderen zusammenfällt [12, 55, 56], d.h. bei einem Abstand von

$$\delta'_{\text{incoh}} = 0.61 \frac{\lambda}{\sin \alpha'}. \quad (4.7)$$

Zwischen ihnen fällt die Intensität auf 73.5% der Maximalintensität ab. Im kohärenten Fall jedoch sind zwei Punktquellen gleicher Intensität und Phase mit einem Abstand von δ'_{incoh} nicht mehr auflösbar, wie in Abbildung 4.3 gezeigt. Erst bei einem Abstand von

$$\delta'_{\text{coh}} = 0.82 \frac{\lambda}{\sin \alpha'} \quad (4.8)$$

fällt die Intensität zwischen beiden Quellen auch im kohärenten Fall auf 73.5% der Maximalintensität ab [56, 75]. Während im inkohärenten Fall das mit Gleichung (4.7) gegebene Rayleigh-Kriterium auch auf mehrere Quellen übertragbar ist, gilt im kohärenten Fall der Faktor 0.82 für nur zwei Punktlichtquellen. Ergänzt man das anfänglich vorliegende Paar von Punktlichtquellen um weitere zu einer eindimensionalen Kette, muss dieser Faktor vergrößert werden und nimmt schließlich den Wert 1 für das anfangs gewählte Abbe-Kriterium (4.6) an. Aus diesem Grund wird zur Bestimmung des optischen Auflösungsvermögens hier das Abbe-Kriterium für Gitterperioden verwendet.

Befindet sich die mittlere Objektposition auf der mit dem Pinhole und dem Detektorzentrum definierten z-Achse lässt sich durch Einsetzen der im vorherigen Abschnitt zur Dimensionierung eingeführten Bezeichnungen Gleichung (4.6) zu

$$\delta' = \frac{\lambda}{N\Delta x/2} \sqrt{(N\Delta x/2)^2 + (z_0 - z')^2} \quad (4.9)$$

umformen. Offensichtlich hängt die erreichbare optische Auflösung bei sonst festen Parametern streng monoton von der Position $z' \in [0, z_0]$ der

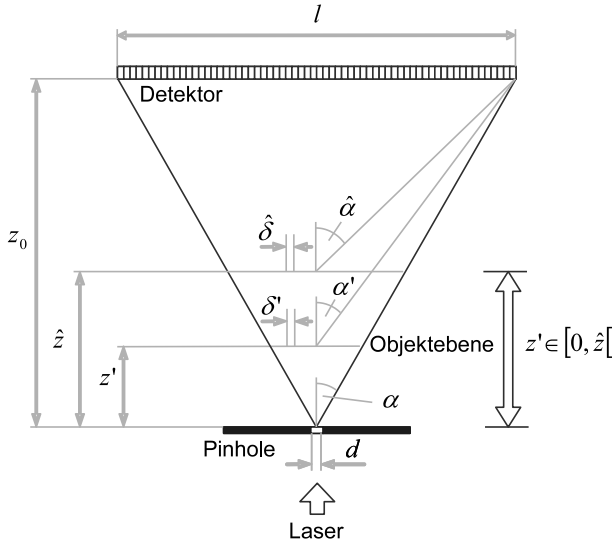


Abbildung 4.4: Optische Auflösung bei der Inline-Holografie mit Pinholes. Der bei der Dimensionierung ermittelte maximale Abstand \hat{z} definiert eine obere Grenze $\hat{\delta}$ für die erreichbare optische Auflösung δ' . Vereinfachend kann die optische Auflösung ausgehend vom durch das Pinhole gegebenen Öffnungswinkel α angegeben werden. Die kleinste auflösbare Strukturgröße in einer Objektebene ist dann direkt von der Größe des Pinholes abhängig, wobei dies zusätzlich durch die Laserwellenlänge beschränkt wird.

Objektebene ab. Dabei ist δ' in $z' = 0$ maximal, wobei der Objektkegel mit dem Beleuchtungskegel zusammenfällt. Die theoretisch höchste optische Auflösung im Sinne eines minimalen δ' würde man für $z' = z_0$ mit $\delta' = \lambda$ erhalten. In einem gemäß Abschnitt 4.1.1 dimensionierten experimentellen Aufbau gilt die mit Gleichung (4.5) definierte kleinste obere Schranke \hat{z} für den Abstand zwischen Objekt und Pinhole-Ebene, wonach die höchste optische Auflösung in einer Objektebene mit dem Abstand $z' = \hat{z} - 0$ zum Pinhole erreicht wird.

Ausgehend von einem Detektor mit $N \times N$ Pixeln und einer Pixel-

Periode Δx wird nun gezeigt, dass zur vollständigen Darstellung der Objektwelle in einer Objektebene zwar kleinere, jedoch nicht mehr Pixel benötigt werden. Wie zuvor angenommen, befinden sich alle abbildbaren Objekte innerhalb des Beleuchtungskegels. Damit genügt, beginnend mit der Kantenlänge $l = N\Delta x$ des Detektors, ein Bildfeld mit einer um den Faktor z'/z_0 reduzierten Kantenlänge l' zur Darstellung des Objekts bei einem Abstand von z' zum Pinhole. Soll ein Bild des Objekts mit der durch den Detektor gegebenen Pixelzahl dargestellt werden, kann wegen $l' = lz'/z_0$ die Pixel-Periode für das Objektbild mit

$$\Delta x' = \frac{z'}{z_0} \Delta x \quad (4.10)$$

um den gleichen Faktor reduziert werden. Die Kantenlänge l' wird für den Abstand $z' = \hat{z}$ zum Pinhole maximal und nimmt dort den Wert $l' = \hat{l}$ an. Diese Objektposition ist streng genommen im Sinne des Abschnitts 4.1.1 nicht zulässig, kann aber als obere Grenze dienend an dieser Stelle hinzugenommen werden. Aufgrund der dort kleinstmöglich auflösbaren Strukturgröße $\hat{\delta}$ mit $\delta'(z') \geq \hat{\delta}$ für alle $z' \in [0, \hat{z}]$ genügt es die Behauptung für eben diese Objektebene mit Hilfe der Ungleichung

$$\Delta \hat{x} = \frac{\hat{z}}{z_0} \Delta x < \frac{\hat{\delta}}{2} \quad (4.11)$$

zu zeigen. Die Gleichung (4.9) wird für $\delta' = \hat{\delta}$ und $z' = \hat{z}$ in Ungleichung (4.11) eingesetzt und es folgt

$$\frac{\hat{z}}{z_0} \Delta x < \frac{\lambda}{N\Delta x} \sqrt{(N\Delta x/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2}.$$

Da sowohl λ , N als auch Δx echt positive Größen sind, erhält man nach Umstellen

$$\frac{\hat{z}}{z_0} \Delta x \frac{N\Delta x}{\lambda} < \sqrt{(N\Delta x/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2}. \quad (4.12)$$

Die Ungleichung (4.4) wird zu

$$\frac{\Delta x}{\lambda} < \frac{1}{2 \sin \beta}$$

umgestellt und für eine engere Abschätzung der rechten Seite von Ungleichung (4.11) in die linke Seite eingesetzt, wonach zu zeigen genügt

$$\frac{\hat{z}N\Delta x}{2z_0 \sin \beta} < \sqrt{(N\Delta x/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2}. \quad (4.13)$$

Hierbei bezeichnet β , wie im vorherigen Abschnitt eingeführt, den halben Öffnungswinkel des Detektorkegels. Unter Verwendung der Größe $\hat{l} = \hat{z}N\Delta x/z_0$ gilt für den Sinus dieses Winkels

$$\sin \beta = \frac{\hat{l}/2}{\sqrt{(\hat{l}/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2}}.$$

Dies, in Ungleichung (4.13) eingesetzt, führt zu

$$\sqrt{\left(\frac{\hat{z}}{z_0}\right)^2 \left(\frac{N\Delta x}{2}\right)^2 + (z_0 - \hat{z})^2} < \sqrt{\left(\frac{N\Delta x}{2}\right)^2 + (z_0 - \hat{z})^2}$$

und mit $0 \leq \hat{z}/z_0 < 1$ folgt schließlich die Behauptung.

4.1.3 Bildfelddurchmesser

Der Detektor verfügt wie zuvor über $N \times N$ Pixel mit der Pixel-Periode Δx in beiden Dimensionen. Wie im Abschnitt 4.1.1 beschrieben, definiert α den halben Öffnungswinkel des Beleuchtungskegels. Dieser ergibt sich aus dem Beugungsbild des Pinholes in der Detektorebene derart, dass ausgehend von der Intensität auf der in der Detektormitte befindlichen optischen Achse die Intensität am Rand des Detektors einen vorgegebenen Schwellwert nicht überschreitet. Der Winkel α hängt neben dem Schwellwert auch vom Pinhole-Durchmesser d und der Wellenlänge λ des Lasers ab. Zur vollen Ausnutzung des Detektors ist dieser mit einem Abstand von

$$z_0 = \frac{l}{2 \tan \alpha} \quad (4.14)$$

zum Pinhole zu positionieren, wobei $l = N\Delta x$ die Kantenlängen der Detektorfläche bezeichnet.

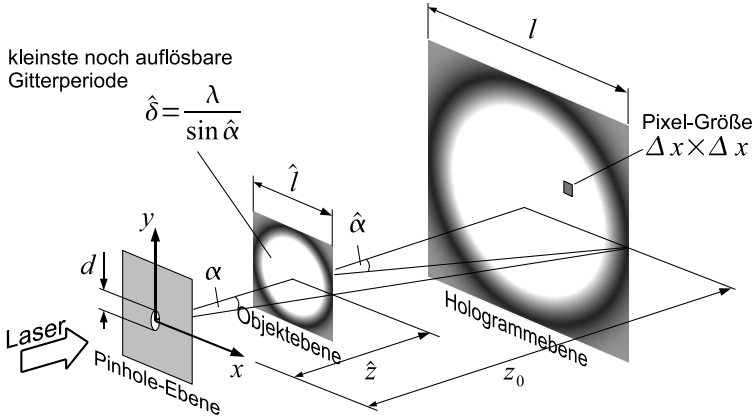


Abbildung 4.5: Zum Bildfeld der In-line-Holografie mit Pinholes.

Ausgehend von Gleichung (4.5) auf der Seite 67 erhält man die kleinste obere Schranke \hat{z} für den Abstand z' zwischen Objekt und Pinhole über die Beziehung

$$\frac{z_0}{\hat{z}} = 1 + \frac{l}{z_0} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\lambda}\right)^2 - \frac{1}{4}}. \quad (4.15)$$

Die kleinstmöglich auflösbare Gitterperiode δ' in einer Objektebene ist durch die in der maximal zulässigen Ebene mit Abstand \hat{z} zum Pinhole erreichbare Periode

$$\hat{\delta} = \frac{2\lambda}{l} \sqrt{(l/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2} \quad (4.16)$$

nach unten beschränkt. Der Durchmesser l' der kreisförmigen Ausleuchtung, welche bei der Rekonstruktion das Bildfeld definiert, wird durch

$$\hat{l} = \frac{\hat{z}}{z_0} l \quad (4.17)$$

für genau diesen Probenabstand \hat{z} nach oben beschränkt. Im Sinne des Abschnitts 4.1.1 ist dieser Probenabstand streng genommen nicht

zulässig, wird jedoch als obere Grenze der Menge aller gültigen Objektpositionen hinzugefügt.

Veränderung der Pixel-Anzahl: Der Detektor verfüge nun über $N_1 \times N_1$ Pixel bei gleichbleibender Pixel-Periode Δx , womit $l_1 := N_1 \Delta x$ die neue Kantenlänge des Detektors bezeichnet. Der neue Abstand z_1 zwischen Pinhole und Detektor ist dann übereinstimmend mit Gleichung (4.14) durch

$$z_1 = \frac{N_1}{N} z_0 \quad (4.18)$$

gegeben. Entsprechend Gleichung (4.15) gilt für den neuen maximalen Probenabstand \hat{z}_1 die Beziehung

$$\frac{z_1}{\hat{z}_1} = 1 + \frac{l_1}{z_1} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\lambda}\right)^2 - \frac{1}{4}}. \quad (4.19)$$

Mit Gleichung (4.18) erhält man

$$\frac{z_1}{\hat{z}_1} = 1 + \frac{N_1 \Delta x}{N_1 z_0 / N} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\lambda}\right)^2 - \frac{1}{4}} = 1 + \frac{l}{z_0} \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\lambda}\right)^2 - \frac{1}{4}}, \quad (4.20)$$

sodass über Gleichung (4.17) schließlich folgt

$$\hat{l}_1 = \frac{\hat{z}_1}{z_1} l_1 = \frac{\hat{z}}{z_0} l_1 \quad \text{sowie} \quad \hat{z}_1 = \frac{N_1}{N} \hat{z}. \quad (4.21)$$

Es wird nun angenommen, dass die aufgrund der neuen Pixel-Anzahl N_1 durchgeführte Anpassung der Abstände (z_0, \hat{z}) zu (z_1, \hat{z}_1) das optische Auflösungsvermögen nicht beeinflusst. Bestätigt wird dies durch Einsetzen von $l_1 = N_1 l / N$ sowie der Gleichungen (4.18) und (4.21) in

(4.16), wonach folgt

$$\begin{aligned}
 \hat{\delta}_1 &= \frac{2\lambda}{l_1} \sqrt{\left(\frac{l_1}{2}\right)^2 + (z_1 - \hat{z}_1)^2} \\
 &= \frac{2N\lambda}{lN_1} \sqrt{\left(\frac{lN_1}{2N}\right)^2 + \left(\frac{N_1}{N}z_0 - \frac{N_1}{N}\hat{z}\right)^2} \\
 &= \frac{2\lambda}{l} \sqrt{(l/2)^2 + (z_0 - \hat{z})^2} \\
 &= \hat{\delta}.
 \end{aligned}$$

Eine Erweiterung des Detektors von $N \times N$ zu $N_1 \times N_1$ Pixel mit gleich bleibender Pixel-Periode Δx führt nach Anpassung der Dimensionierung unter Berücksichtigung des Nyquist-Shannon-Theorems (Unterkapitel 4.1.1) zu einem um den Faktor N_1/N veränderten Bildfeld-durchmesser bei konstant bleibendem optischen Auflösungsvermögen.

Veränderung des Pixel-Abstands: Die Pixel-Periode des Detektors sei nun mit Δx_2 derart gegeben, dass bei einer angepassten Pixel-Zahl von $N_2 \times N_2$ dessen Ausdehnung mit $N_2\Delta x_2 = l$ unverändert bleibt. Damit bleibt auch der Abstand $z_2 = z_0$ zwischen Pinhole und Detektor unverändert. Die Gleichung (4.5) beschreibt mit

$$\hat{z}_2(\Delta x_2) = \left(1 + \frac{l}{z_0} \sqrt{\left(\frac{\Delta x_2}{\lambda}\right)^2 - \frac{1}{4}}\right)^{-1} z_0$$

eine in Δx_2 streng monoton fallende Funktion, wobei stets $\Delta x_2 > \lambda/2$ gefordert wird.

Ein Detektor mit verkleinerter Pixel-Periode ermöglicht bei gültig bleibenden Nyquist-Shannon-Kriterium einen verkürzten Abstand zwischen Probe und Detektor. Die dabei konstant bleibende Detektorfläche führt dabei zu einer Auflösungserhöhung und gleichzeitig über den nun vergrößerten Abstand zwischen Pinhole und Probe zu einem entsprechend vergrößerten Bildfelddurchmesser.

4.2 Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau entspricht der klassischen inline-holografischen Anordnung nach Dennis Gabor [1] und besteht aus einer kohärenten Lichtquelle, einer mikroskopischen Lochblende zur Generierung einer sphärischen Wellenfront sowie einem lichtempfindlichen Medium zur Aufnahme des Hologramms. Als kohärente Lichtquelle kommt eine Laserdiode mit der Wellenlänge 661 nm zum Einsatz. Der Durchmesser

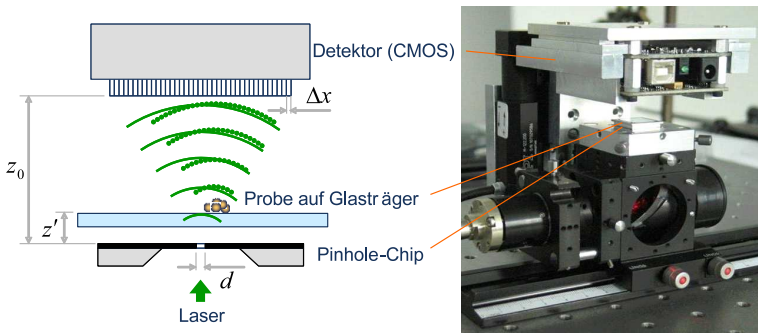


Abbildung 4.6: Aufbau für die linsenlose inline-holografische Mikroskopie. Aus Platzgründen wurde die Laserlichtquelle von der Seite angebracht und der Laserstrahl dann über einen Umlenkspiegel auf das Pinhole gerichtet.

der Lochblende (*Pinhole*) liegt mit 600 nm bis 1.2 μm in der Größenordnung der Laserlichtwellenlänge. Die Aufnahme des Hologramms übernimmt ein CMOS Detektor, wobei die Probe in den Strahlengang zwischen Pinhole und Detektor mit Hilfe eines Glasträgers eingebracht wird. Abbildung 4.6 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus.

4.2.1 Laser

Als kohärente Lichtquelle wurde eine Laserdioden-Strahlquelle aus der Produktserie 51nanoFCM der Firma Schäfter-Kirchhoff GmbH mit ei-

ner Wellenlänge von 661 nm gewählt. Die Laserdiode liefert eine über ein Potentiometer einstellbare zeitlich konstante Ausgangsleistung von maximal 6 mW. Am Ende des angekoppelten polarisationserhaltenden *Single-mode*-Faserkabels liegt ein gaußförmiges Strahlprofil mit einer numerischen Apertur von 0.12 vor. Diese divergente Wellenfront wurde mit Hilfe einer Linsengruppe auf das Pinhole fokussiert. Das durch interne HF-Modulation auf ca. 1.5 nm (FWHM) verbreiterte Spektrum des Lasers führt zu einer auf etwa 300 μm begrenzten Kohärenzlänge. Dies bietet den Vorteil, dass doppelt reflektiertes Licht, z.B. zwischen dem Probenträger und dem Pinhole-Chip, bei einem Grenzflächenabstand von mehr als 160 μm nicht signifikant interferiert und im Hologramm einen nicht störenden, inkohärenten Offset verursacht.

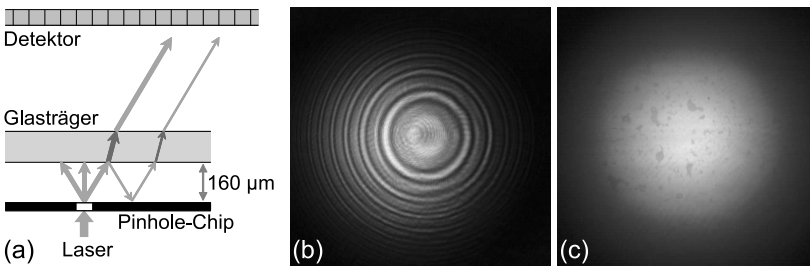


Abbildung 4.7: Doppelreflexion zwischen Glasträger und Pinhole-Chip. (a) Die vom Pinhole ausgehende Welle (dicke Pfeile) wird durch die doppelt reflektierte Welle (dünne Pfeile) überlagert. (b) Die Messung mit einem hochkohärenten Laser (Kohärenzlänge > 1 m) zeigt deutlich die Interferenz zwischen der Pinhole-Welle und dem reflektierten Licht in Form eines konzentrischen Ringmusters. (c) Bei einer zweiten Messung mit einem kurzkohärenten Laser (Kohärenzlänge ca. 300 μm) überlagern sich beide Wellen nahezu inkohärent, sodass ihre Phasenkorrelation nicht länger zeitlich stabil ist und sich nur noch die Intensitäten der Wellen addieren.

4.2.2 Pinhole

Die benötigten Pinhole-Chips wurden von der Abteilung für Mikrostrukturierung des Instituts für Photonische Technologien (IPHT) Jena gefertigt. Ein $490\ \mu\text{m}$ starker Si-Wafer wurde hierbei durch plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (*plasma enhanced chemical vapour deposition*, PECVD) mit einer $1\ \mu\text{m}$ dicken Si_3N_4 -Schicht versehen. In diese Schicht wurden mittels reaktiven Ionenätzen die gewünschten Pinhole-Strukturen eingebracht. Von der gegenüberliegenden Seite wurde die Pinhole-Membran großflächig fotolithografisch freigelegt. Die Si_3N_4 -Schicht ist jedoch im wesentlichen optisch transparent. Um eine optische Blockung zu erreichen, wurde die Schicht zusätzlich durch Kathodenzerstäubung (*Sputtern*) mit einer Reinst-Aluminium-Schicht metallisiert. Damit konnte der Kontrast erheblich gesteigert werden [76]. Auf diese Weise wurden unter anderem Pinholes mit Durchmessern von $1.2\ \mu\text{m}$ bis $600\ \text{nm}$ gefertigt. Die Abbildung 4.8 zeigt den prinzipiellen Aufbau der verwendeten Pinhole-Chips.

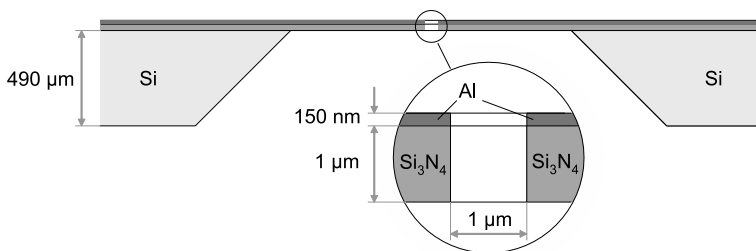


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung eines Pinhole-Chips. Die etwa $1\ \mu\text{m}$ starke Siliziumnitrid-Schicht ist weitestgehend optisch transparent und wurde daher zusätzlich mit einer Reinst-Aluminium-Schicht versehen.

4.2.3 Detektor

Zur Detektion der Hologramme kam ein monochromer CMOS-Sensor IBIS4-6600 der Firma *Cypress Semiconductor Corporation* zum Einsatz. Dieser verfügt über 6.6 Millionen Pixel mit 2210 Zeilen, 3002 Spalten und einer Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$. Zudem ist der Sensor programmierbar, sodass auch ein verkleinerter, benutzerdefinierter Bildausschnitt direkt auslesbar ist. Für eine rasche numerische Auswertung der Hologramme mit Hilfe der schnellen Fourier Transformation (FFT) wurden ausschließlich quadratische Bildausschnitte der Größen 1024×1024 bzw. 2048×2048 gewählt. Der direkt mit dem Sensor-Chip verbundene AD-Wandler gibt Messwerte mit 10 Bit Auflösung aus. Als Einheit der gemessenen Intensitäten wird *counts* gewählt. Die nichtlineare Kennlinie des Sensors wurde durch eine Messreihe bestimmt und über ein Polynom vierten Grades korrigiert [76]. Dem zugehörigen Datenblatt kann ein Sättigungswert von $21500 e^-$, ein Dunkelstromanteil von $78 e^-/s$ sowie ein Detektor-Rauschen von $24 e^-$ (RMS-Wert) entnommen werden. Experimentell wurde bei einem Sättigungswert von 1023 counts ein Dunkelstrom von 16 counts/s , ein Detektor-Rauschen von 3.3 counts und darüber hinaus ein zeitlich konstanter Offset von 97 counts ermittelt [76]. Der Sensor wurde ohne Schutzglas eingesetzt.

4.3 Experimentelle Ergebnisse

Eine experimentelle Anwendung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Rekonstruktionstechniken erfolgte mit Hilfe eines objektivlosen digitalen inline-holografischen Mikroskops nach dem Prinzip von Dennis Gabor [1]. Die auf der Seite 77 befindliche Abbildung 4.6 zeigt ein Foto des Aufbaus. Der verwendete Chip mit einem etwa 800 nm großen Pinhole ist im Abschnitt 4.2.2 (S. 79) und der eingesetzte Laser mit einer Wellenlänge von 661 nm im Abschnitt 4.2.1 (S. 77) beschrieben. Als Probenträger dienten handelsübliche Deckgläser mit den Abmessungen $24 \text{ mm} \times 24 \text{ mm} \times 170 \text{ }\mu\text{m}$, wobei deren Brechungsindex bei der Rekonstruktion nicht berücksichtigt wurde. Die Aufnahme der Hologramme erfolgte mit dem in Abschnitt 4.2.3 (S. 80) beschriebenen CMOS-Sensor. Als erste Testobjekte dienten Polymethylmethacrylat-

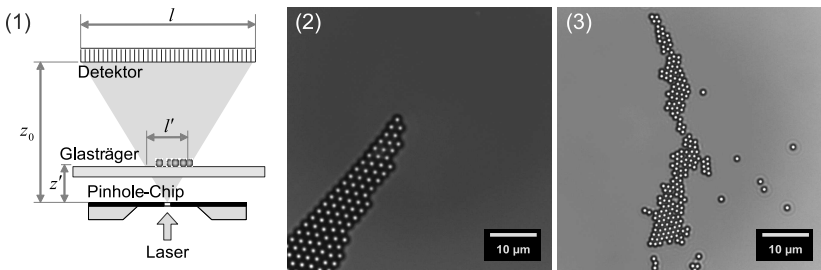


Abbildung 4.9: (1) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und Mikroskop-Aufnahmen (NA 0.75) der abzubildenden Objekte bestehend aus (2) $2.02 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. (3) $1.06 \text{ }\mu\text{m}$ großen Polymethylmethacrylat-Kugeln.

Kugeln (PMMA, Acryl- oder auch Plexiglas) der Firma microParticles GmbH in verschiedenen Größen. Diese wurden in destilliertes Wasser gegeben und die Suspension auf ein Deckglas getropft. Abhängig von der Konzentration entstanden so während des Eintrocknens einschichtige Kugel-Cluster. Die Abbildung 4.9 zeigt Mikroskop-Aufnahmen solcher Proben bestehend aus $2.02 \text{ }\mu\text{m} \pm 0.05 \text{ }\mu\text{m}$ und $1.06 \text{ }\mu\text{m} \pm 0.05 \text{ }\mu\text{m}$

großen PMMA-Kugeln. In der Tabelle 4.1 sind die im Folgenden verwendeten Bezeichnungen der implementierten Algorithmen zur Hologrammrekonstruktion aufgelistet.

Bezeichnung	Technik	Abschnitt
TSP	Ausbreitung einer Summe von Teilhologrammen, „ <i>Tile Superposition Propagation</i> “	3.2.1 (Seite 39)
FTSP	Ausbreitung einer Summe Fourier-transformierter Teilhologramme, „ <i>Fourier-Domain TSP</i> “	3.2.2 (Seite 46)
FTSPx4	4-fache Anwendung der FTSP zur Vermeidung von Interpolationsartefakten	3.2.3 (Seite 53)
SFT	k-Vektor Transformation, „ <i>Spatial Frequency Transform</i> “	2.5.2 (Seite 24)
FoV	„ <i>Field of View</i> “-Vorfilterung mit Hilfe der SFT	3.2.4 (Seite 58)

Tabelle 4.1: Übersicht vorgestellter Rekonstruktionstechniken.

Experiment 1: In einem ersten Experiment wurde ein 2048×2048 Pixel großes Hologramm des mit Abbildung 4.9 (2) dargestellten Objekts, bestehend aus PMMA-Kugeln der Größe $2.02 \mu\text{m}$ ($\pm 0.05 \mu\text{m}$), gemessen. Ausgehend vom Abstand $z_0 = 3850 \mu\text{m}$ zwischen Pinhole und Detektor ergab die Rekonstruktion einen Abstand von $z' = 510 \mu\text{m}$ zwischen Pinhole und Objekt. Zusammen mit der Sensorausdehnung $l = 7.168 \text{ mm}$ (Pixel-Periode $\Delta x = 3.5 \mu\text{m}$) führt dies zu einer numerischen Apertur von etwa 0.73 für Objekte nahe der optischen Achse. Einzelne Objekte können dann mit einer Wellenlänge von $\lambda = 661 \text{ nm}$ getrennt abgebildet werden, wenn der Abstand zwischen ihnen $\delta' = 900 \text{ nm}$ nicht unterschreitet, wonach theoretisch die einander berührenden Kugeln getrennt abbildbar sind. Vergleichend wurde das Hologramm nun erst unter paraxialer Näherung, dann unter sphärischer Näherung und

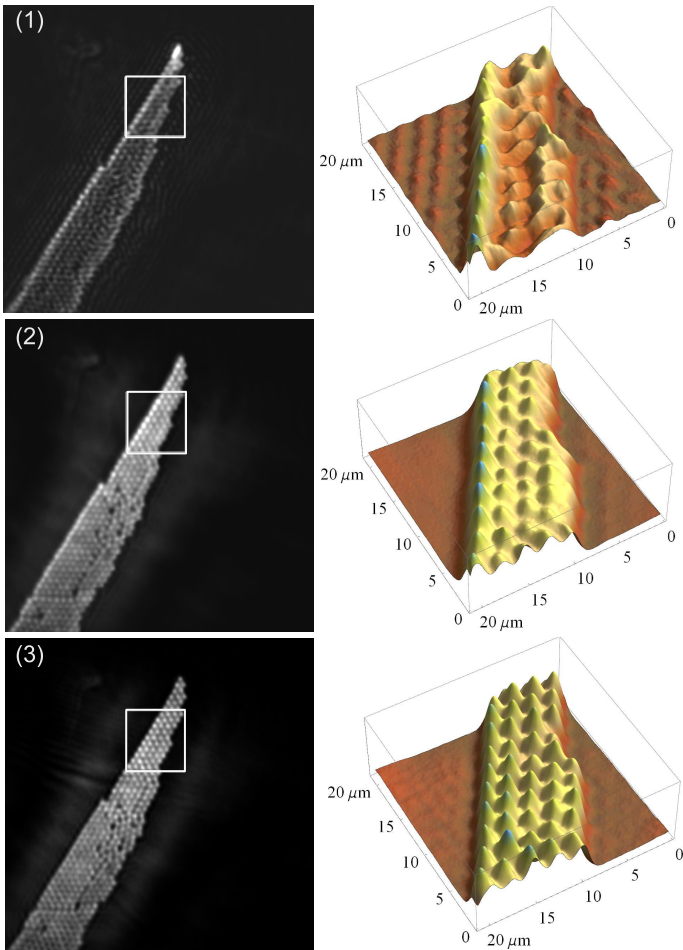


Abbildung 4.10: Objektivlose inline-holografische Mikroskopie transparenter PMMA-Kugeln (Durchmesser $2.02 \mu\text{m}$) mit verschiedenen Rekonstruktionstechniken. (1) Mit der paraxialen Fresnel-Näherung ist die Rekonstruktion einzelner Kugeln nicht möglich. (2) Die DIHM Software basierend auf dem *Kirchhoff-Helmholtz* Integral bildet die einzelnen Kugeln ab. (3) Der FTSP Algorithmus liefert eine Abbildung mit optisch getrennten Kugeln bei höherem Kontrast.

schließlich basierend auf dem Rayleigh-Sommerfeld-Integral rekonstruiert. Abbildung 4.10 illustriert die Ergebnisse der verschiedenen Rekonstruktionstechniken. Im Einzelnen sind dies ein Algorithmus unter Fresnel-Näherung, die im *DIHM Software-Package* von H. J. Kreuzer implementierte Kirchhoff-Helmholtz Transformation [22] sowie der im Abschnitt 3.2.2 erarbeitete FTSP-Algorithmus [18]. Die Pixel-Periode in der Objektebene kann bei den beiden letzteren Algorithmen gewählt werden und wurde auf 218.75 nm festgelegt. Unter paraxialer Näherung können im Falle der gegebenen Dimensionierung die Kugeln nicht getrennt abgebildet werden. Der Grund hierfür ist in ihrer auf nur kleine numerische Aperturen ($NA < 0.1$) eingeschränkte Gültigkeit zu sehen. Sowohl die Rekonstruktion mit Hilfe der DIHM Software als auch der FTSP-Algorithmus liefern die zur Abbildung der Kugeln notwendige optische Auflösung.

Experiment 2: Die durch den Aufbau definierte numerische Apertur (NA) von etwa 0.7 lässt eine Abbildung auch kleinerer Objekte zu. Dies zu verifizieren wurde in einem zweiten Experiment ein Hologramm mit $1.06 \mu\text{m} \pm 0.05 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln gemessen. Die Abbildung 4.9 Teilbild (3) zeigt eine Mikroskop-Aufnahme dieser Probe. Für eine Abbildung sich berührender Kugeln mit einer Beleuchtungswellenlänge von $\lambda = 661 \text{ nm}$ muss eine NA von mindestens 0.63 realisiert werden. Während des Eintrocknens der Suspension schließen sich die Kugeln zu Kugel-*Cluster* mit hexagonaler Anordnung zusammen. Um einzelne Kugeln solcher *Cluster* optisch getrennt abzubilden, kann eine um den Faktor $\sqrt{4/3}$ vergrößerte NA von 0.72 nötig werden. Der Abstand zwischen Pinhole und Detektor wurde mit $z_0 = 4110 \mu\text{m}$ bestimmt, infolgedessen die Probe bei einem Abstand von $z' = 291.6 \mu\text{m}$ zum Pinhole fokussierte. Mit den 2048×2048 Pixeln der Größe $3.5 \mu\text{m}$ erhält man für Objekte nahe der optischen Achse theoretisch eine NA von 0.68 parallel zu einer der Detektorkanten bzw. 0.80 entlang einer Detektor-diagonalen. Die Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse der Rekonstrukti-

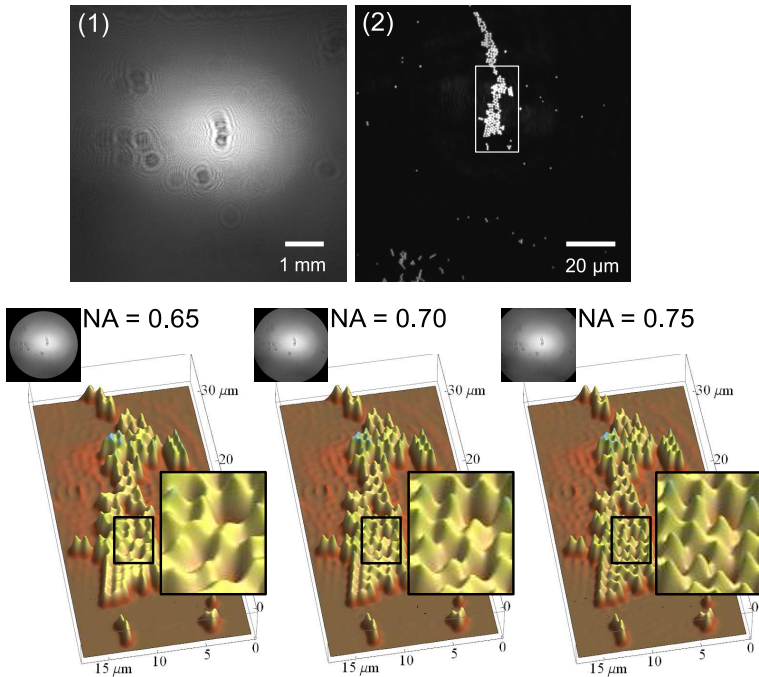


Abbildung 4.11: Objektivlose inline-holografische Mikroskopie transparenter PMMA-Kugeln (Durchmesser $1.06 \mu\text{m}$) bei verschiedenen numerischen Aperturen. (1) Das In-line-Hologramm wurde mit 2048×2048 Pixeln und einer Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$ detektiert. (2) Die FTSP-Rekonstruktion mit einer Pixel-Periode von 218.75 nm bildet die einzelnen Kugeln ab. Die untere Reihe zeigt die Abhängigkeit der Rekonstruktion von der genutzten Detektorfläche, welche durch Maskierung entsprechend einer numerischen Apertur (NA) von 0.65, 0.70 sowie 0.75 variiert wurde. Aufgrund der hexagonalen Anordnung der sich berührenden Kugeln wird die zur Abbildung notwendige NA einen Wert zwischen 0.63 und 0.72 annehmen. Wie in den Detailbildern der 3D-Ansichten zu sehen ist, kommt es auch beim Übergang von 0.70 zu 0.75 noch zu einer Auflösungserhöhung.

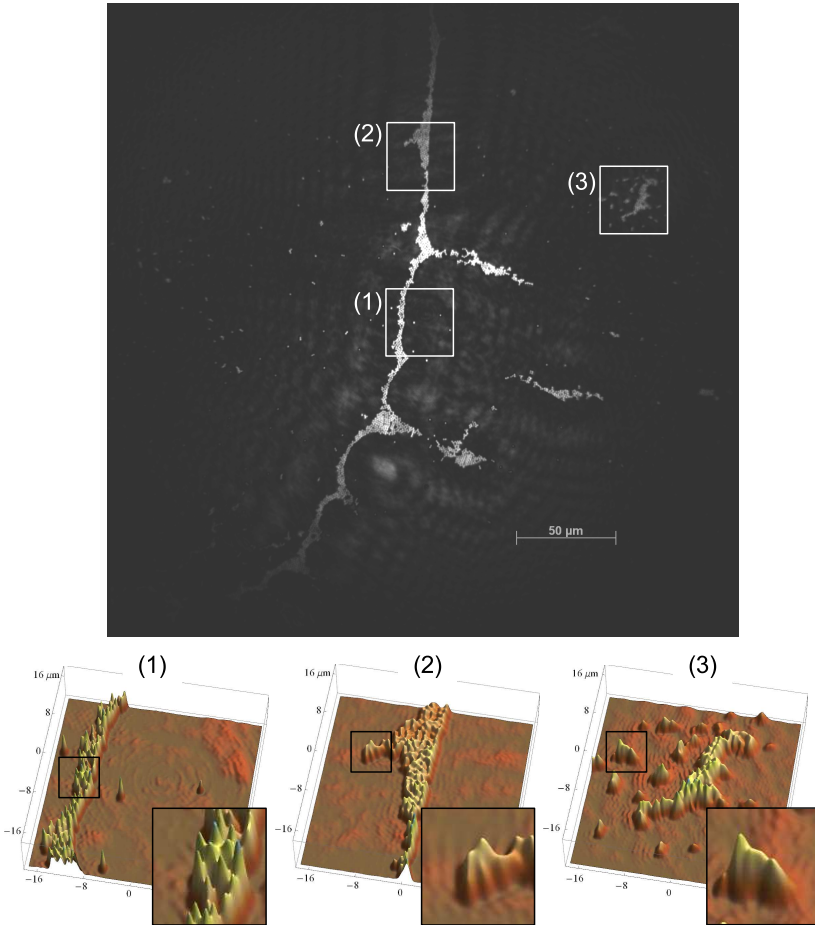


Abbildung 4.12: SFT-Rekonstruktion einer flachen ausgedehnten Szene mit $1.06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln. Nahe der Bildmitte, dem Entwicklungsursprung der SFT-Technik, werden noch einzelne Kugeln abgebildet (1). Mit zunehmendem Abstand zur Bildmitte nehmen die SFT-typischen Aberrationen zu, bis die Kugeln schließlich nicht mehr trennbar sind (2, 3).

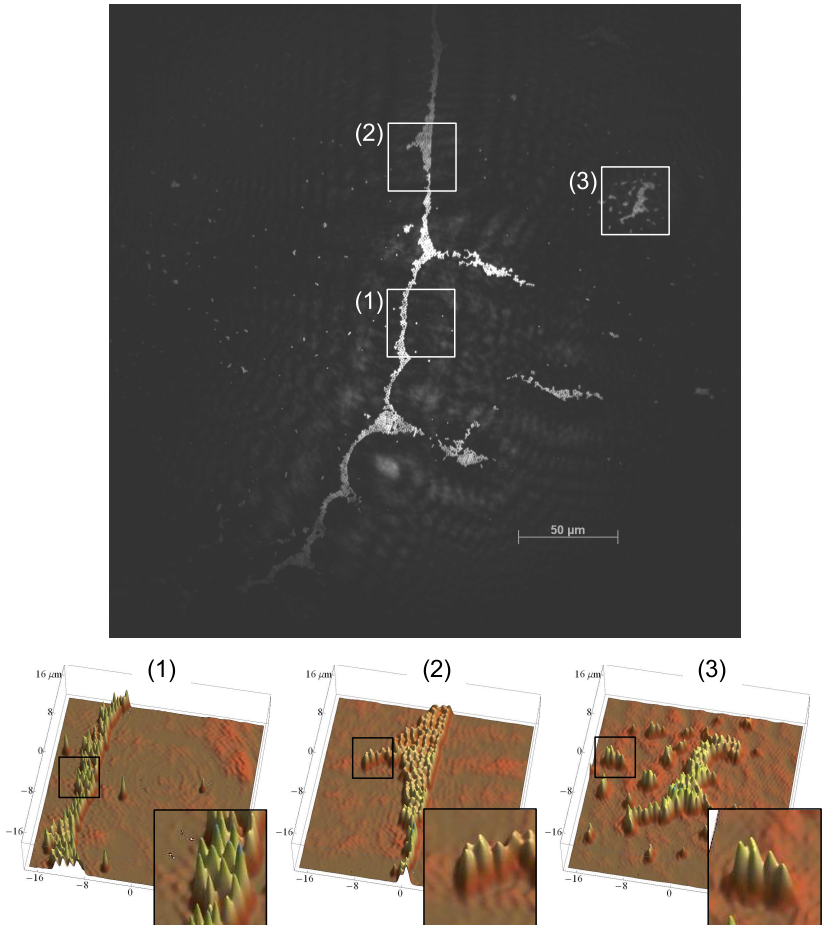


Abbildung 4.13: FTSPx4-Rekonstruktion einer flachen ausgedehnten Szene mit $1.06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln. Im gesamten Bildfeld sind die einzelnen Kugeln voneinander getrennt abgebildet (1, 2, 3).

on mit dem FTSP-Algorithmus. Hierbei wurde der Reskalierungsfaktor $T = 16$ gewählt, sodass die resultierende Pixel-Periode in der Objektebene 218.75 nm beträgt. Anhand dabei angewandter Maskierungen des Hologramms kann auf eine realisierte numerische Apertur von mehr als 0.70 geschlossen werden, wie dies in Abbildung 4.11 dargestellt ist. Diese mit der FTSP-Technik erreichte optische Auflösung kann auch bei sphärischer Näherung, z.B. mit der k-Vektor-Transformation (SFT), für ein hinreichend kleines Gebiet um den Entwicklungsursprung erreicht werden. Aufgrund der geringen lateralen Ausdehnung der bisher abgebildeten Proben kommt es dabei kaum zu den in Abschnitt 3.2 ab Seite 34 beschriebenen astigmatischen Aberrationen.

Experiment 3: In einem dritten Experiment wurde ein Hologramm einer größeren Gruppe der $1.06 \mu\text{m}$ PMMA-Kugeln gemessen. Die Abstände wurden mit $z_0 = 4120 \mu\text{m}$ zwischen Pinhole und Detektor sowie mit $z' = 294 \mu\text{m}$ zwischen Pinhole und Probe bestimmt. Zunächst wurde das Hologramm mit dem SFT-Algorithmus (Tab. 4.1) rekonstruiert. Die Abbildung 4.12 zeigt das rekonstruierte Bild der Objektebene. Die Detailabbildung (1) zeigt die nähere Umgebung des Entwicklungsursprungs der k-Vektor-Transformation (Bildmitte), wo einzelne Kugeln voneinander getrennt abgebildet werden. Mit zunehmenden Abstand zum Entwicklungsursprung nimmt jedoch die Aberration zu und damit das optische Auflösungsvermögen ab, wie die Detailansichten (2) und (3) der Abbildung 4.12 zeigen. Ausgehend vom gleichen Hologramm zeigt Abbildung 4.13 das mit dem FTSPx4-Algorithmus (Tab. 4.1) rekonstruierte Objektbild. In allen Detailabbildungen können die einzelnen Kugeln voneinander unterschieden werden. Die Pixel-Periode des rekonstruierten Objektbilds wurde in beiden Fällen auf 218.75 nm gesetzt. Um eine im gesamten Bild gleichmäßig hohe optische Auflösung zu erhalten, musste aufgrund der geringen Schärfentiefe die Verkippung des Objektträgers (Deckglas) zur Detektorfläche korrigiert werden. Hierbei wurde die Objektebene 1.2% um die y-Achse

und anschließend -0.5% um die x -Achse mit Hilfe einer hierfür entwickelten numerischen Methode gekippt. Die Größe des rekonstruierten kreisförmigen Bildausschnitts kann mit einem Durchmesser von mindestens $260 \mu\text{m}$ angegeben werden (Abb. 4.13).

	Abstand zw. Pinhole und Detektor z_0	Abstand zw. Pinhole und Objekt z'	NA
Experiment 1	$3850 \mu\text{m}$	$510 \mu\text{m}$ ($365 \mu\text{m}$)	0.73 (0.83)
Experiment 2	$4110 \mu\text{m}$	$292 \mu\text{m}$ ($403 \mu\text{m}$)	0.68 (0.80)
Experiment 3	$4120 \mu\text{m}$	$294 \mu\text{m}$ ($405 \mu\text{m}$)	0.68 (0.80)

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der in den Experimenten realisierten Abstände und der damit erreichbaren numerischen Aperturen (NA). Hinter den realisierten Abständen z' zwischen Pinhole und Objekt sind in Klammern die maximal zulässigen Abstände \hat{z} zur alias-freien Aufzeichnung der Hologramme angegeben. Bei Experiment 1 wurde diese Bedingung verletzt, jedoch nahm das hier abgebildete Objekt nur etwa die Hälfte des beleuchteten Bereichs in Anspruch. In diesem speziellen Fall kann der zulässige Maximalabstand auf etwa $650 \mu\text{m}$ vergrößert werden. Die Werte für die NA sind sowohl für die Kantenlänge als auch für die Diagonale (in Klammern dahinter) der Detektorfläche angegeben.

Detailrekonstruktion: Wird nun ausgehend vom gleichen Hologramm ein um den Faktor $T = 64$ vergrößertes Bild des Objekts rekonstruiert, ist der mit der resultierenden Pixel-Periode von 54.69 nm und gleichbleibender Pixel-Zahl gewählte Bildausschnitt in der Objektebene kleiner als das abzubildende Objekt. Dieser Bildausschnitt wird nun durch alle weiteren, das gesamte Objekt überdeckenden Ausschnitte überlagert, wie dies im Abschnitt 3.2.4 beschrieben wurde. Das kann zu einer völligen Zerstörung des Objektbilds führen, wie dies exemplarisch in der Abbildung 4.14 (1b) gezeigt wird. Mit Hilfe der FoV-Filterung (Tab. 4.1) kann der Informationsgehalt des Hologramms auf den für den

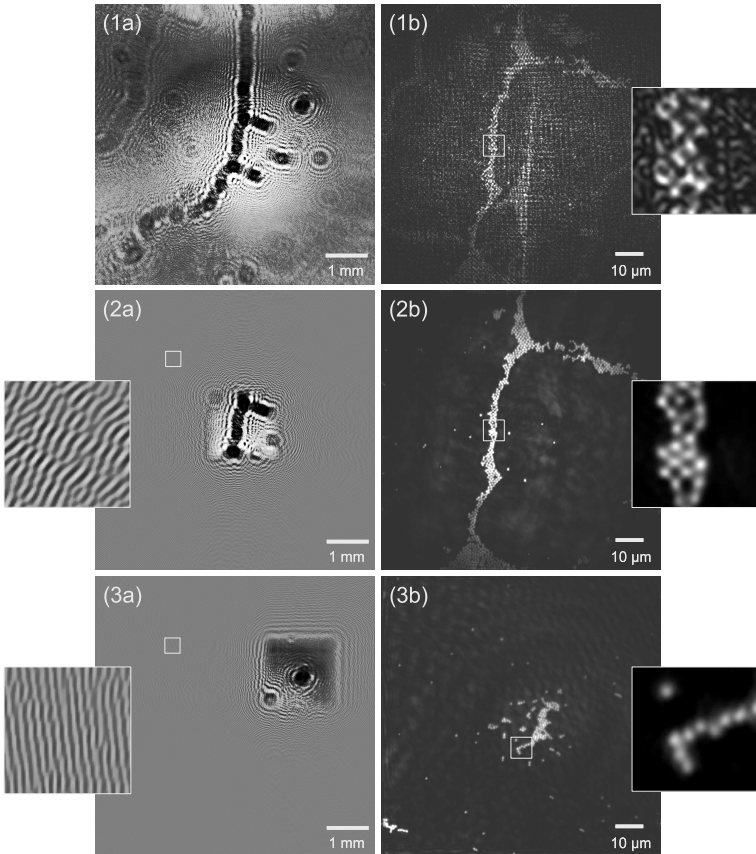


Abbildung 4.14: Rekonstruktion eines Bildausschnitts. Die FTSP-Technik mit Reskalierungsfaktor $T = 64$, angewandt auf das Hologramm (1a) mit 2048×2048 Pixel und einer Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$, führt zu einem Bildausschnitt, der kleiner ist als die Objektausdehnung. Es kommt zu periodischen Überlagerungen, welche das Objektbild zerstören (1b). Wird das Hologramm durch die vorgestellte FoV-Filterung auf einen gewünschten Bildausschnitt der Objektebene reduziert (2a, 3a), können die $1.06 \mu\text{m}$ -PMMA-Kugeln eines zuvor gewählten Ausschnitts der Gesamtscene rekonstruiert werden (2b, 3b).

gewünschten Ausschnitt notwendigen Anteil reduziert werden. Beispiele derart gefilterter Hologramme sind mit den Abbildungen 4.14 (2a) sowie (3a) gegeben. In der Objektebene sind nun alle nicht im gewählten Ausschnitt befindlichen Objektteile entfernt und, wie mit den Abbildungen 4.14 (2b) und (3b) gezeigt, die Szene im gewählten Ausschnitt wiederhergestellt.

Reskalierungsfaktor T	Rechenzeit in Sekunden für					
	1024 × 1024 Bildpunkte			2048 × 2048 Bildpunkte		
	TSP	FTSP	FTSPx4	TSP	FTSP	FTSPx4
2	0.7	0.6	2.1	3.0	2.5	8.7
4	1.1	0.6	1.7	5.7	2.5	7.3
8	2.9	0.6	1.6	15	2.5	6.6
16	9.8	0.6	1.6	55	2.9	6.8
32	39	0.8	1.7	214	3.1	6.8
64	147	0.9	2.0	831	4.0	6.9

Tabelle 4.3: Übersicht der von einem 2.66 GHz Intel Core 2 Duo Prozessor benötigten Rechenzeiten für die Rekonstruktion von Hologrammen mit verschiedene Pixel-Zahlen, Rekonstruktionsmethoden und Reskalierungsfaktoren.

Rekonstruktionsaufwand: Die in der Arbeit vorgestellten Techniken zur Rekonstruktion von Inline-Hologrammen zielen auf eine effiziente Berechnung des Rayleigh-Sommerfeld-Integrals für die skalare Wellenfrontausbreitung. Aus diesem Grund gilt neben der erreichten optischen Auflösung das Interesse der dafür benötigten Rechenzeit. Für die numerische Rekonstruktion der Hologramme wurde ein Desktop-PC mit einem 2.66 GHz schnellen Intel Core 2 Duo E6750 Prozessor auf einem Intel DP35DP Mainboard mit 1333 MHz Busgeschwindigkeit und 2048 MB DDR2 Arbeitsspeicher eingesetzt. Die Implementierungen der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Algorithmen wurden für das Betriebssystem Windows XP erstellt und werden durch die FFTW 3.2.2 Bibliothek zur FFT Berechnung [77] unterstützt. In Tabel-

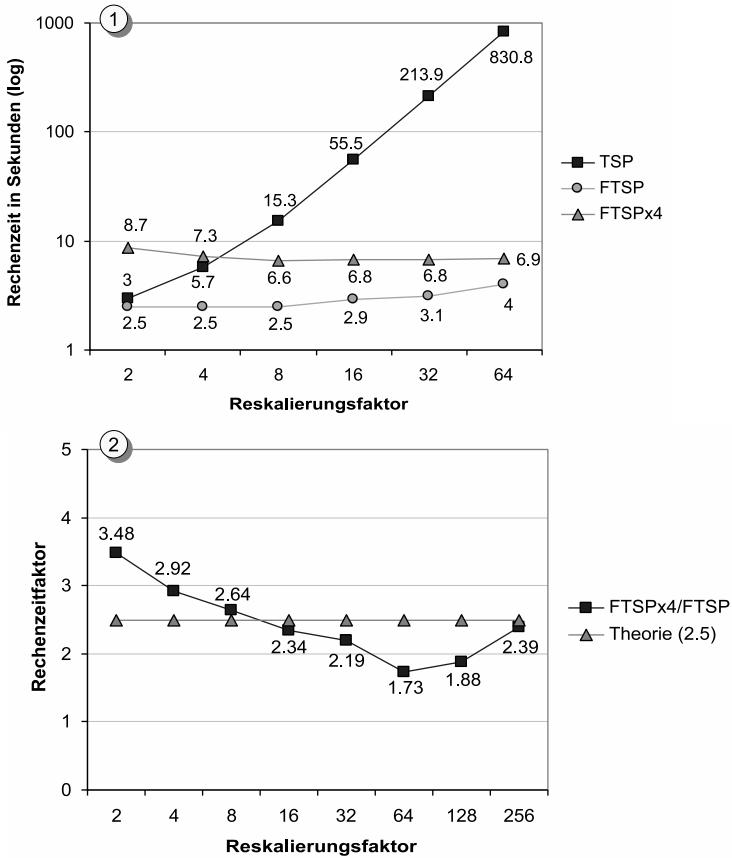


Abbildung 4.15: (1) Diagramm der von einem 2.66 GHz Intel Core 2 Duo Prozessor benötigten Rechenzeiten für die Rekonstruktion eines Hologramms mit 4 Millionen Pixel für verschiedene Rekonstruktionsmethoden und Reskalierungsfaktoren. (2) Das Verhältnis der Rechenzeiten zwischen der FTSPx4- und der FTSP-Technik für verschiedene Reskalierungsfaktoren schwankt um den theoretisch zu erwartenden Wert von 2.5.

le 4.3 sind die benötigten Rechenzeiten zur Rekonstruktion von 1 sowie 4 Mega-Pixel Hologrammen mit Hilfe der in der Tabelle 4.1 aufgelisteten Techniken angegeben. Die am Ende des Abschnitts 3.2.1 bemerkte quadratische Abhängigkeit der TSP-Technik vom Reskalierungsfaktor T sowie die im Abschnitt 3.2.2 festgestellte Unabhängigkeit der FTSP-Technik von diesem Faktor ist mit den Werten der Tabelle 4.3 bestätigt und ist in Abbildung 4.15 grafisch dargestellt. Die zur Vermeidung der durch die FTSP-Technik hervorgerufenen Interpolationsartefakte vorgestellte FTSPx4-Technik benötigt theoretisch eine um den Faktor 2.5 höhere Rechenzeit. Anhand der Werte der Tabelle 4.3 und für zwei weitere Reskalierungsfaktoren konnte für die zugehörigen Implementierungen ein ähnliches Verhältnis zwischen ihren benötigten Rechenzeiten beobachtet werden, wie mit Abbildung 4.15 veranschaulicht wird.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ein kohärent beleuchtetes Pinhole erzeugt eine sphärische Wellenfront, welche durch ein mikroskopisches Objekt beeinflusst wird. Das hinter dem Objekt entstehende Hologramm wird mit einem planaren 2D-Bild-Detektor aufgezeichnet. Seit mehr als einem Jahrzehnt repräsentiert die von H. J. Kreuzer entwickelte Rekonstruktionsmethode den Stand der Technik für die digitale inline-holografische Mikroskopie mit Pinholes [22, 73, 78]. Hierbei wird mit Hilfe einer Koordinatentransformation das Hologramm von der Detektionsebene auf eine sphärische Pinhole-Wellenfront übertragen und von dort mit Hilfe der Kirchhoff-Helmholtz Transformation ein Bild des Objekts rekonstruiert. Von Garcia-Sucerquia *et al.* wurde mit dieser Methode eine numerische Apertur von etwa 0.5 erreicht [15]. Die Methode liefert im Ergebnis einen Algorithmus mit einem hauptsächlich durch die schnelle Fourier Transformation determinierten numerischen Aufwand. Die von einem handelsüblichen Desktop-PC (2.66 GHz) zur Rekonstruktion eines Hologramms mit 1 Million Pixel benötigte Rechenzeit beträgt 1.5 Sekunden. Die dabei auftretende Bildfeldkrümmung nimmt mit größer werdendem Detektionsabstand ab.

Eine alternative Rekonstruktionsmethode für hohe numerische Aperturen ist mit der *Angular Spectrum Method* gegeben. Diese Methode beschreibt die skalare Wellenausbreitung zwischen zwei Ebenen, wobei es ausgehend von einer ebenen Detektorfläche zu keiner Bildfeldkrümmung kommt. Die Methode ist äquivalent zum 1. Rayleigh-

Sommerfeld Integral für die skalare Wellenausbreitung [56, 57, 58]. Von Zhang *et al.* wurde mit Hilfe einer auf dem Rayleigh-Sommerfeld Integral basierenden Methode eine NA von 0.17 realisiert [59]. Die Rekonstruktion mit Hilfe solcher Methoden führt zu einer direkten Abhängigkeit des numerischen Aufwands von der optischen Auflösung [19]. Hervorgerufen wird dies durch die Anwendung der diskreten Fourier Transformation, welche eine identisch große Pixel-Periode in beiden Ebenen erzwingt. Ausgehend von einer für heutige Detektoren üblichen Pixel-Periode von $3.5 \mu\text{m}$ wird aufgrund einer für das Objektbild gewünschten optischen Auflösung von 350 nm eine Interpolation des Hologramms um den Faktor 10 notwendig. Mit dieser Interpolation steigt der numerische Aufwand für die Rekonstruktion etwa um den Faktor 100 an. Bei Verwendung heutiger CCD-Chips mit mehr als 4 Millionen Pixeln und handelsüblicher Desktop-PCs ist mit Rekonstruktionszeiten im Rahmen von Minuten bis Stunden zu rechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Rekonstruktionsmethode, die *Fourier-Domain Tile Superposition Propagation* (FTSP) für die digitale inline-holografische Mikroskopie entwickelt (Abschnitt 3.2.2) [17, 18]. Die Grundidee dieser Methode besteht darin, das Hologramm ähnlich einem Schachbrett in identisch große Teilhologramme zu zerlegen, so dass jedes seinen Teil zur Rekonstruktion ein und desselben Ausschnitts in der Objektebene beiträgt. Aus jedem Teilhologramm wird der entsprechende Ausschnitt der Objektwellenfront, eine sogenannte Kachel, in der Hologrammebene berechnet. Intuitiv würden all diese Kacheln nach ihrer Ausbreitung in die Objektebene sich dort zu einem Bild des Objekts zusammenfügen lassen (Abschnitt 3.2.1). Dies wird vermieden indem die Fourier-Transformierten der Kacheln in ein mit Nullen initialisiertes Feld kumuliert werden. Nur dieses eine resultierende Feld wird schließlich mit Hilfe der *Angular Spectrum Method* in die Objektebene ausgebreitet. Hierbei werden die mit der diskreten Fourier Transformation vorliegenden zyklischen Randbedingungen ausgenutzt. Die laterale Ausdehnung des abzubildenden Objekts muss dabei

vom rekonstruierten Bildfeld vollständig überdeckt werden. Zur Rekonstruktion auch kleinerer Objektbildausschnitte wurde für die FTSP-Methode ein sogenannter *Field of View*-Filter (FoV) entwickelt (Abschnitt 3.2.4). Die im Abschnitt 3.2.3 beschriebene neue Rekonstruktionsmethode basiert auf der FTSP und berechnet das 1. Rayleigh-Sommerfeld Integral für die skalare Wellenausbreitung ohne zusätzliche Näherungen [56, 57, 58]. Die rekonstruierbare numerische Apertur (NA) wird damit nicht durch die Methode beschränkt.

In Experimenten wurden Hologramme von $2.02 \mu\text{m}$ sowie $1.06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln mit einer Laser-Wellenlänge von 661 nm detektiert. Die entwickelten Rekonstruktionsmethoden ermöglichten die Rekonstruktion der PMMA-Kugeln mit einer NA von 0.7 , wobei mit Luft als lichtübertragendes Medium der Brechungsindex $n = 1$ war. Das dabei rekonstruierte kreisförmige Bildfeld hat einen Durchmesser von etwa $260 \mu\text{m}$. Nach entsprechender FoV-Filterung des Hologramms konnten zudem auch kleinerer Objektbildausschnitte rekonstruiert werden. Die für diesen Algorithmus erstellte Rekonstruktions-Software wird durch die FFTW-Library [77] für eine prozessoroptimierte Implementierung der FFT unterstützt. Spezielle Hardware-Komponenten, wie Grafikkarten oder PGAs, wurden nicht eingesetzt. Eine 2.66 GHz Intel Core Duo CPU rekonstruiert mit der FTSP-Methode ein Hologramm von 1024×1024 Pixel in 1.5 Sekunden. Um ein Bild der $1.06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln ausgehend von einem Hologramm mit einem Pixel-Abstand von $7 \mu\text{m}$ zu erhalten, wurde dieses zu einem Bildausschnitt der Objektebene mit einem Pixel-Abstand von 218.75 nm reskaliert. Die Rechenzeit wird überwiegend durch die benötigte Zeit für die FFT determiniert und hängt nicht vom Reskalierungsfaktor ab. Die Möglichkeit der Rekonstruktion bei Video-Frame-Raten besteht bereits durch den Einsatz handelsüblicher Hardware. Eine FFT für 1024×1024 Pixel kann laut Literaturangaben [63] bei 64 bit Genauigkeit in weniger als 20 ms berechnet werden.

Die Bildfeldgröße wird durch die Ausleuchtung in der Objektebe-

ne und damit auch durch den Abstand zwischen Pinhole und Objekt definiert. Bisher wurde experimentell bei einer NA von 0.7 ein Bildfeld-durchmesser von etwa $260 \mu\text{m}$ erreicht. Der Abstand zwischen Pinhole und Objekt war mit ca. $300 \mu\text{m}$ kleiner als der in Abschnitt 4.1.1 hergeleitete maximal zulässige Abstand von ungefähr $400 \mu\text{m}$. Als Grund hierfür ist die momentan noch zu ungenaue axiale Positionierbarkeit der Probe zu nennen. Ein neuer, diesbezüglich erweiterter Aufbau ist bereits geplant. In künftigen Experimenten wird dann die Maximierung des Bildfelds über den Abstand zwischen Pinhole und Objekt angestrebt, was für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zu einer Vergrößerung des Bildfelddurchmessers auf etwa $350 \mu\text{m}$ führt. Bei neuen Experimenten mit 800 nm PMMA Kugeln wurden isoliert liegende Kugelpaare aufgelöst, die Kugeln innerhalb des eigentlich abzubildenden *Clusters* jedoch nicht. Ein Grund hierfür ist vor allem in den hohen Anforderungen an den experimentellen Aufbau zu sehen. Eine NA von 0.83 zur Abbildung eines Kugelpaares erfordert mit der Größe des Detektors einen Abstand zur Probe von etwa 2.4 mm . Um jedoch die hexagonal angeordneten Kugeln eines *Clusters* abbilden zu können, wird eine NA von 0.96 nötig. Der resultierende Abstand von 1.05 mm ist bereits durch die Bauart des verwendeten Detektors nicht realisierbar. Als weitere mögliche Testobjekte können PMMA Kugeln mit Durchmessern um 900 nm verwendet werden. Nachfolgend wären die prinzipiellen Randbedingungen und Grenzen einer hochauflösenden DIHM mit Pinholes für die Anwendung, z.B. biologische Proben, zu präzisieren. Hierbei ist zu erwarten, dass mit größer werdenden Proben die Sekundärbilder das rekonstruierte Bild zunehmend stören. Eine Messstrategie zur Generierung mehrerer, unterschiedlicher Hologramme ein und derselben Probe könnte dieses Problem lösen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Software zur Bildgebung soll künftig in einem noch zu realisierenden kompakten digitalen inline-holografischen Multi-Chip-Mikroskop eingesetzt werden. Dieses besteht aus einem Beleuchtungs-Chip, einem Pinhole-

Chip zur beugungsbedingten Aufweitung des Beleuchtungsstrahls sowie einem Detektor-Chip zur Aufnahme der Hologramme. Um die Abbildungsqualität zu steigern, sind als Beleuchtungs-Chip LEDs mit einem über Farb- und Raumfilter erzeugten, auf die Dimensionierung des Aufbaus zugeschnittenen Kohärenzvolumen vorgesehen [30]. Darüber hinaus soll die klassische Inline-Anordnung im Sinne Gabor's durch ein zweidimensionalen Pinhole-Array-Chip anstelle des Einzel-Pinholes erweitert werden. Als Vorteile einer Pinhole-Array-Beleuchtung sind eine Steigerung des Kontrasts und der Empfindlichkeit [79], eine höhere optische Auflösung [80], ein erweitertes Bildfeld [81] sowie eine verbesserte 3D Bildgebung [82] zu nennen.

In der DIHM hängt die Größe des rekonstruierten Bildfelds auch von der Pixel-Anzahl des Detektors ab. Eine Vergrößerung des Bildfelds kann mit Hilfe eines Detektors höherer Pixel-Zahl erfolgen, wobei nach einer Anpassung der Dimensionierung die optische Auflösung unbeeinflusst bleibt (Abschnitt 4.1.3). Damit wirkt sich der derzeitige Trend zu Bild-Detektor-Chips mit zunehmenden Pixel-Zahlen positiv auf die DIHM aus. Bei einem optischen Mikroskop sind Bildfeld und optische Auflösung bereits durch das Objektiv fixiert, sodass hierbei eine darüber hinaus gehende Erweiterung der Pixel-Zahl des Detektors nicht effektiv ist. Insbesondere bei Köhlerscher Beleuchtung sind die Bilder optischer Mikroskope im Allgemeinen von höherer Qualität als die der DIHM mit Pinholes. Bei der Abbildung eines dreidimensionalen Objekts kommt es zu einer Überlagerung des fokussierten Objektbilds mit dort defokussierten Objektwellen aus anderen Ebenen. In der DIHM wird in diesem Fall das Objektbild mit einem kohärenten Untergrund überlagert, was zu erheblichen Störungen der Abbildung führen kann. Die inkohärente Beleuchtung eines optischen Mikroskops dagegen führt zu einer weniger störenden Überlagerung, welche in erster Linie nur den Kontrast im Objektbild reduziert. Aufgrund des breiteren Spektrums einer Weißlichtquelle, verglichen mit dem der in der DIHM eingesetzten Quelle sichtbaren Lichts, ermöglicht die optische

Mikroskopie eine höhere Auflösung bei gleicher numerischer Apertur. Darüber hinaus kann die Köhlersche Beleuchtung als eine über die Zeit gemittelte Menge von Wellenfronten verstanden werden, die das Objekt aus verschiedenen Richtungen beleuchten. Im Vergleich zu einer ebenen Beleuchtung kann das abbildende Objektiv hierbei ein verbreitertes Ortsfrequenzspektrum übertragen.

Die DIHM mit Pinholes kann bezüglich der Bildqualität erweitert werden, indem mehrere Hologramme mit unterschiedlichen Wellenlängen und unterschiedlichen Beleuchtungswellen aufgenommen und zu einem Bild zusammengeführt werden. Hierbei stellt sich die Frage nach der tatsächlich benötigten Anzahl von Wellenlängen und Beleuchtungswellen für eine sichtbare Annäherung der Bildqualität an die optischer Mikroskope. Insbesondere ist hieran die Hoffnung geknüpft, dass mit Hilfe mehrerer solcher Hologramme die für die Inline-Holografie typischen Sekundärbilder vermieden werden.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Gabor. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098):777, 1948.
- [2] Denis Gabor. Microscopy by reconstructed wave-fronts. *Proc. Royal Society A*, 197:454–487, 1949.
- [3] J. W. Goodman and R. W. Lawrence. Digital image formation from electronically detected holograms. *Applied Physics Letters*, 11(3):77–79, 1967.
- [4] A. W. Lohmann. Reconstruction of vectorial wavefronts. *Appl. Opt.*, 4(12):1667–1668, 1965.
- [5] M. A. Kronrod, N. S. Merzlyakov, and L. P. Yaroslavski. Reconstruction of holograms with a computer. *Sov. Phys.-Tech. Phys. USA*, 17:333–334, 1972.
- [6] Ulf Schnars. Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms. *JOSA A*, 11(7):2011–2015, 1994.
- [7] Ulf Schnars and Werner Jueptner. *Digital Holography*. Springer Berlin Heidelberg New York, 2005.
- [8] E. Leith and J. Upatnieks. Reconstructed wavefronts and communication theory. *J. Opt. Soc. Am.*, 52(10):1123–1128, 1962.
- [9] Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jürgen Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy. *Appl. Opt.*, 45(5):836–850, 2006.

- [10] Tatiana Latychevskaia and Hans-Werner Fink. Solution to the twin image problem in holography. *Phys. Rev. Lett.*, 98:233901, 2007.
- [11] Gu-Liang Chen, Ching-Yang Lin, Ming-Kuei Kuo, and Chi-Ching Chang. Numerical suppression of zero-order image in digital holography. *Opt. Express*, 15(14):8851–8856, 2007.
- [12] Eugene Hecht. *Optik*. Addison-Wesley, 3rd edition, 1994.
- [13] A. Götzhäuser, B. Völkel, M. Grunze, and H. J. Kreuzer. Optimization of the low energy electron point source microscope: imaging of macromolecules. *Micron*, 33:241–255, 2002.
- [14] W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer. Digital in-line holography for biological applications. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98*, pages 11,301–11,305, 2001.
- [15] Jorge Garcia-Sucerquia, Diana Alvarez-Palacio, and Jürgen Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy of colloidal systems of microspheres. In *Adaptive Optics: Topical Meetings on CD-ROM*, page DMB4. OSA, 2007.
- [16] J. Garcia-Sucerquia, D. C. Alvarez-Palacio, and H. J. Kreuzer. High resolution talbot self-imaging applied to structural characterization of self-assembled monolayers of microspheres. *Appl. Opt.*, 47(26):4723–4728, 2008.
- [17] M. Kanka, R. Riesenber, and H. J. Kreuzer. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images. *Opt. Lett.*, 34(8):1162–1164, 2009.
- [18] M. Kanka, A. Wuttig, C. Graulig, and R. Riesenber. Fast exact scalar propagation for an in-line holographic microscopy on the diffraction limit. *Opt. Lett.*, 35(2):217–219, 2010.

- [19] Giancarlo Pedrini, Staffan Schedin, and Hans J. Tiziani. Aberration compensation in digital holographic reconstruction of microscopic objects. *J. Mod. Opt.*, 48:1035–1041, 2001.
- [20] C. J. R. Sheppard and M. Hrynevych. Diffraction by a half-plane: a generalization of the fresnel diffraction theory. *Opt. Lett.*, 16(14):1060–1061, 1991.
- [21] Dayong Wang, Jie Zhao, Fucai Zhang, Giancarlo Pedrini, and Wolfgang Osten. High-fidelity numerical realization of multiple-step Fresnel propagation for the reconstruction of digital holograms. *Appl. Opt.*, 47(19):D12–D20, 2008.
- [22] H. J. Kreuzer, K. Nakamura, A. Wierzbicki, H.-W. Fink, and H. Schmid. Theory of the point source electron microscope. *Ultramicroscopy*, 45:381–403, 1992.
- [23] W. Xu, M. H. Jericho, H. J. Kreuzer, and I. A. Meinertzhagen. Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. *Opt. Lett.*, 28(3):164–166, 2003.
- [24] J. Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer. Immersion digital in-line holographic microscopy. *Opt. Lett.*, 31(9):1211–1213, 2006.
- [25] Jurij I. Ostrowski and Wolfgang Osten. *Deutsch Taschenbücher, Nr.19, Holografie - Grundlagen, Experimente, Anwendungen.* Deutsch (Harri), 3 edition, 1989.
- [26] Leonid Yaroslavsky. *Digital Holography and Digital Image Processing: Principles, Methods, Algorithms.* Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 2004.
- [27] Lluís Martínez-León, Giancarlo Pedrini, and Wolfgang Osten. Applications of short-coherence digital holography in microscopy. *Appl. Opt.*, 44(19):3977–3984, 2005.

- [28] Pia Massatsch, Florian Charrière, Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian D. Depeursinge. Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy. *Appl. Opt.*, 44(10):1806–1812, 2005.
- [29] Giancarlo Pedrini and Hans J. Tiziani. Short-coherence digital microscopy by use of a lensless holographic imaging system. *Appl. Opt.*, 41(22):4489–4496, 2002.
- [30] Paul Petruck, Rainer Riesenberger, Mario Kanka, and Richard Kowarschik. Speckle-free holographic microscopy. In *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*, page DMB6. OSA, 2010.
- [31] P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and U. Huebner. Partially coherent illumination and application to holographic microscopy. In *4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques Conference 2009*, number AIT 2050, pages 71–72, 2009.
- [32] P. Petruck, R. Riesenberger, and R. Kowarschik. Sensitive measurement of partial coherence using a pinhole array. In *Proc. OPTO Sensor+Test*, number 1.3, pages 35–40, 2009.
- [33] James W. Cooley and John W. Tukey. An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Math. Comp.*, 19(90):297–301, 1965.
- [34] Thomas Meinecke, Nail Sabitov, and Stefan Sinzinger. Information extraction from digital holograms for particle flow analysis. *Appl. Opt.*, 49(13):2446–2455, 2010.
- [35] Giancarlo Pedrini, Fucui Zhang, and Wolfgang Osten. Digital holographic microscopy in the deep (193 nm) ultraviolet. *Appl. Opt.*, 46(32):7829–7835, 2007.
- [36] S. C. W. Hyde, N. P. Barry, R. Jones, J. C. Dainty, and P. M. W. French. Sub-100- μm depth-resolved holographic imaging through

- scattering media in the near infrared. *Opt. Lett.*, 20(22):2330–2332, 1995.
- [37] Heinz Schmid, Hans-Werner Fink, and Jürgen Kreuzer. In-line holography using low-energy electrons and photons: Applications for manipulation on a nanometer scale. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 13:2428–2431, 1995.
- [38] Anne-Sophie Morlens, Julien Gautier, Gilles Rey, Philippe Zeitoun, Jean-Pascal Caumes, Marylène Kos-Rosset, Hamed Merdji, Sophie Kazamias, Kevin Cassou, and Marta Fajardo. Submicrometer digital in-line holographic microscopy at 32 nm with high-order harmonics. *Opt. Lett.*, 31(21):3095–3097, 2006.
- [39] Axel Rosenhahn, Ruth Barth, Florian Staier, Todd Simpson, Silvia Mittler, Stefan Eisebitt, and Michael Grunze. Digital in-line soft x-ray holography with element contrast. *J. Opt. Soc. Am. A*, 25(2):416–422, 2008.
- [40] H. Nyquist. Certain topics in telegraph transmission theory. *AIEE Trans.*, 47:617–644, Feb. 1928.
- [41] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikr. Anat.*, 9:413–468, 1873.
- [42] Bahram Javidi and Daesuk Kim. Three-dimensional-object recognition by use of single-exposure on-axis digital holography. *Opt. Lett.*, 30(3):236–238, 2005.
- [43] Daesuk Kim and Bahram Javidi. Distortion-tolerant 3-D object recognition by using single exposure on-axis digital holography. *Opt. Express*, 12(22):5539–5548, 2004.
- [44] Yanchao Dong and Jian Wu. Space-shifting digital holography with dc term removal. *Opt. Lett.*, 35(8):1287–1289, 2010.

- [45] G. Liu and P. D. Scott. Phase retrieval and twin-image elimination for in-line Fresnel holograms. *J. Opt. Soc. Am. A*, 4:159–165, 1987.
- [46] Giancarlo Pedrini, Wolfgang Osten, and Yan Zhang. Wave-front reconstruction from a sequence of interferograms recorded at different planes. *Opt. Lett.*, 30(8):833–835, 2005.
- [47] Yan Zhang, Giancarlo Pedrini, Wolfgang Osten, and Hans Tiziani. Whole optical wave field reconstruction from double or multi in-line holograms by phase retrieval algorithm. *Opt. Express*, 11(24):3234–3241, 2003.
- [48] Yan Zhang, Giancarlo Pedrini, Wolfgang Osten, and Hans J. Tiziani. Reconstruction of in-line digital holograms from two intensity measurements. *Opt. Lett.*, 29(15):1787–1789, 2004.
- [49] R. W. Gerchberg and W. O. Saxton. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures. *Optik*, 35:227 – 246, 1972.
- [50] Guo-zhen Yang, Bi-zhen Dong, Ben-yuan Gu, Jie-yao Zhuang, and Okan K. Ersoy. Gerchberg-Saxton and Yang-Gu algorithms for phase retrieval in a nonunitary transform system: a comparison. *Appl. Opt.*, 33(2):209–218, 1994.
- [51] Yan Zhang, Giancarlo Pedrini, Wolfgang Osten, and Hans J. Tiziani. Image Reconstruction for In-Line Holography with the Yang-Gu Algorithm. *Appl. Opt.*, 42(32):6452–6457, 2003.
- [52] H. H. Bauschke, P. L. Combettes, and D. R. Luke. Phase retrieval, Gerchberg-Saxton algorithm, and Fienup variants: a view from convex optimization. *J. Opt. Soc. Am. A*, 19:1334, 2002.
- [53] Alexej Grjasnow, Andreas Wuttig, and Rainer Riesenber. Phase resolving microscopy by multi-plane diffraction detection. *Journal of Microscopy*, 231(1):115–123, 2008.

- [54] Min Gu. *Advanced Optical Imaging Theory*, volume 75 of *Optical Sciences*. Springer, Berlin, Germany, 1999.
- [55] Joseph W. Goodman. *Introduction To Fourier Optics (2nd International Edition)*. McGraw-Hill, 1996.
- [56] Max Born and Emil Wolf. *Principles of optics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 7. edition, 1999.
- [57] George C. Sherman. Application of the Convolution Theorem to Rayleigh's Integral Formulas. *J. Opt. Soc. Am.*, 57(4):546–547, 1967.
- [58] H. Weyl. Ausbreitung elektromagnetischer Wellen über einem ebenen Leiter. *Annalen der Physik*, 365(21):481–500, 1919.
- [59] Fucai Zhang, Giancarlo Pedrini, and Wolfgang Osten. Reconstruction algorithm for high-numerical-aperture holograms with diffraction-limited resolution. *Opt. Lett.*, 31(11):1633–1635, 2006.
- [60] Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Appl. Opt.*, 38:6994–7001, 1999.
- [61] Vicente Micó, Zeev Zalevsky, Pascuala García-Martínez, and Javier García. Superresolved imaging in digital holography by superposition of tilted wavefronts. *Appl. Opt.*, 45(5):822–828, 2006.
- [62] Yukio Abe, Nobuyuki Masuda, Hideaki Wakabayashi, Yuta Kazo, Tomoyoshi Ito, Shin ichi Satake, Tomoaki Kunugi, and Kazuho Sato. Special purpose computer system for flow visualization using holography technology. *Opt. Express*, 16(11):7686–7692, 2008.
- [63] Lukas Ahrenberg, Andrew J. Page, Bryan M. Hennelly, John B. McDonald, and Thomas J. Naughton. Using commodity graphics

- hardware for real-time digital hologram view-reconstruction. *J. Display Technol.*, 5(4):111–119, 2009.
- [64] Jianglei Di, Jianlin Zhao, Hongzhen Jiang, Peng Zhang, Qi Fan, and Weiwei Sun. High resolution digital holographic microscopy with a wide field of view based on a synthetic aperture technique and use of linear CCD scanning. *Appl. Opt.*, 47(30):5654–5659, 2008.
- [65] Hongzhen Jiang, Jianlin Zhao, Jianglei Di, and Chuan Qin. Numerically correcting the joint misplacement of the sub-holograms in spatial synthetic aperture digital Fresnel holography. *Opt. Express*, 17(21):18836–18842, 2009.
- [66] Vicente Micó and Zeev Zalevsky. Superresolved digital in-line holographic microscopy for high-resolution lensless biological imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 15(4):046027, 2010.
- [67] Ni Chen, Jae-Hyeung Park, and Nam Kim. Parameter analysis of integral Fourier hologram and its resolution enhancement. *Opt. Express*, 18(3):2152–2167, 2010.
- [68] Luis Granero, Vicente Micó, Zeev Zalevsky, and Javier García. Synthetic aperture superresolved microscopy in digital lensless Fourier holography by time and angular multiplexing of the object information. *Appl. Opt.*, 49(5):845–857, 2010.
- [69] Timothy R. Hillman, Thomas Gutzler, Sergey A. Alexandrov, and David D. Sampson. High-resolution, wide-field object reconstruction with synthetic aperture Fourier holographic optical microscopy. *Opt. Express*, 17(10):7873–7892, 2009.
- [70] Yasuhiro Takaki and Hitoshi Ohzu. Fast numerical reconstruction technique for high-resolution hybrid holographic microscopy. *Appl. Opt.*, 38:2204–2211, 1999.

- [71] Marcus Grosse, Johannes Buehl, Holger Babovsky, Armin Kiessling, and Richard Kowarschik. 3D shape measurement of macroscopic objects in digital off-axis holography using structured illumination. *Opt. Lett.*, 35(8):1233–1235, 2010.
- [72] Colin J. R. Sheppard. Validity of the Debye approximation. *Opt. Lett.*, 25(22):1660–1662, 2000.
- [73] H. J. Kreuzer. Low energy electron point source microscopy. *Micron*, 26(6):503–509, 1995.
- [74] Patrick Gaydecki. *Foundations of Digital Signal Processing: Theory, Algorithms and Hardware Design (IEE Circuits, Devices and Systems)*. The Institution of Engineering and Technology, 11 2004.
- [75] Yann Cotte, M. Fatih Toy, Etienne Shaffer, Nicolas Pavillon, and Christian Depeursinge. Sub-Rayleigh resolution by phase imaging. *Opt. Lett.*, 35(13):2176–2178, 2010.
- [76] Christian Graulich. *Experimentelle Untersuchungen zu Grenzen der linsenlosen Mikroskopie*, 2007.
- [77] Matteo Frigo and Steven G. Johnson. The Design and Implementation of FFTW3. In *Proc. IEEE*, volume 93, pages 216–231, 2005.
- [78] H. J. Kreuzer. *Holographic microscope and method of hologram reconstruction*, 2002.
- [79] R. Riesenber, P. Petruck, and M. Kanka. Structured illumination and holographic microscopy. In *4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques Conference 2009*, pages 88–89, 2009.
- [80] R. Riesenber, M. Kanka, and C. Graulich. Synthetic aperture microscopy. In *Focus on Microscopy 2008, Osaka-Awaji, Japan*, 2008.

- [81] Mario Kanka and Rainer Riesenber. Wide field holographic microscopy with pinhole arrays. In *Proc. OPTO Sensor+Test*, number 2.4, pages 69–72, 2006.
- [82] Mario Kanka and Rainer Riesenber. Advanced coherent 3D micro-imaging. In C. Depeursinge, editor, *Proc. SPIE*, volume 6631, page 66311K, 2007.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Bildgebung mit der Inline-Holografie.	3
2.1	Skizze einer inline-holografischen Anordnung.	12
2.2	Schema zur digitalen inline-holografischen Mikroskopie.	15
2.3	Skizze zur Wellenfrontausbreitung.	19
2.4	Skizze zur Wellenfrontausbreitung in sphärischer Näherung.	26
3.1	Numerische Dämpfung des Zero-Order-Images.	33
3.2	Skizze zum Astigmatismus der k-Vektor-Transformation.	37
3.3	Simulation der auf k-Vektor Transformation basierenden Rekonstruktion von Hologrammen.	38
3.4	Prinzip der Kachel-Superposition.	41
3.5	Simulation der auf Kachel-Superposition basierenden Rekonstruktion von Hologrammen.	45
3.6	Prinzip der Kachel-Superposition mit Fourier-Interpolation.	52
3.7	Entstehung von Interpolationsartefakten.	55
3.8	Vermeidung von Interpolationsartefakten.	56
3.9	Simulation der Vorfilterung zur Detailrekonstruktion.	59
4.1	Dimensionierung einer inline-holografischen Anordnung.	64
4.2	Beleuchtungskegel bei der Inline-Holografie mit Pinholes.	66
4.3	Vergleich verschiedener Auflösungskriterien.	69
4.4	Optische Auflösung bei der Inline-Holografie mit Pinholes.	71

4.5	Zum Bildfeld der Inline-Holografie mit Pinholes.	74
4.6	Aufbau für die linsenlose inline-holografische Mikroskopie.	77
4.7	Doppelreflexion zwischen Glasträger und Pinhole-Chip.	78
4.8	Schematische Darstellung eines Pinhole-Chips.	79
4.9	Experimenteller Aufbau und Mikroskop-Aufnahmen ab- zubildender Objekte.	81
4.10	Objektivlose inline-holografische Mikroskopie mit ver- schiedenem Rekonstruktionstechniken.	83
4.11	Objektivlose inline-holografische Mikroskopie bei verschie- denen numerischen Aperturen.	85
4.12	SFT-Rekonstruktion einer flachen ausgedehnten Szene. .	86
4.13	FTSPx4-Rekonstruktion einer flachen ausgedehnten Szene.	87
4.14	Rekonstruktion eines Bildausschnitts.	90
4.15	Diagramm der Rechenzeiten für die Rekonstruktion. . .	92

Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht vorgestellter Rekonstruktionstechniken.	82
4.2	Zusammenfassung realisierter Abstände und numerischer Aperturen.	89
4.3	Übersicht der Rechenzeiten für die Rekonstruktion.	91

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Photonische Technologien (IPHT) in Jena durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich nun bei all jenen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Betreuern Dr. Rainer Riesenberg und Prof. Dr. Stefan Sinzinger danke ich für ihre Geduld, die wohlwollende Begleitung der Promotion, den mir dabei überlassenen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas, für die vielen hilfreichen Diskussionen zu Inhalt und Darstellung der Arbeit sowie für die Erstellung der Gutachten.

Herrn Prof. Dr. Hans Jürgen Kreuzer danke ich für die hilfreichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Software *DIHM* für einen Vergleich der Rekonstruktionsmethoden und für die Erstellung des Gutachtens.

Besonders danke ich meiner lieben Frau Doreen für ihr Verständnis und ihre Geduld während der Promotion. Sie hat mir stets den Rücken freigehalten und dabei den überwiegenden Teil der im Familienalltag anfallenden Aufgaben übernommen.

Meinen Kollegen Dr. Andreas Wuttig, Christian Graulig, Dr. Alexej Grjasnow, Paul Petruck und Ilse Schumann danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen sowie für das stets angenehme Arbeitsklima. Dr. Andreas Wuttig danke ich auch für seine stete Hilfs-

bereitschaft bei der Programmierung mit der UTL-Klassenbibliothek. Bei Christian Graulig und Ilse Schumann möchte ich mich zudem für die gute Zusammenarbeit bei den durchgeführten Experimenten bedanken.

Für die gewissenhafte Anfertigung der Pinhole-Chips, ohne die der experimentelle Teil der Arbeit nicht möglich gewesen wäre, danke ich Herrn Dr. Günter Mayer, Frau Margitta Sossna sowie allen weiteren daran beteiligten Mitarbeitern der Mikrostrukturierung des IPHT.

Herrn Dr. Armin Kießling und Herrn Dr. Joachim Bergmann danke ich für das Korrekturlesen und die hilfreichen Diskussionen zum Inhalt der Arbeit.

