

Digitale Holographie in Mikro-Opto-Fluidsystemen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur

(Dr.-Ing.)

vorgelegt der

Fakultät für Maschinenbau der
Technischen Universität Ilmenau

von Herrn

Dipl.-Ing. Nail Sabitov

geboren am 21.04.1981 in Moskau/Russland

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2015000424

Kurzfassung

Die In-line-digitale Holographie (In-line-DH) ist ein robustes und einfaches Verfahren zur Ermittlung der dreidimensionalen Lage oder Struktur von Mikroobjekten. Als Anwendungsgebiete können z. B. die Volumengeschwindigkeitsmessung (Velocimetry), die Charakterisierung von Partikelmaterialien und Partikelgrößen in Zweiphasen-Mischungen, die Beobachtung von lebendigen Einzellern und die Untersuchung von Fangfähigkeiten optischer Pinzetten genannt werden.

Diese Arbeit widmet sich besonders einigen speziellen Aspekten des Aufbaus, wie z. B. Blendendefinition für 3D-Objektvolumina und des Einflusses der Kamera auf die Bildqualität. Auch die Ermittlung der Genauigkeit des holographischen Verfahrens bei der Partikeldetektion ist ein Schwerpunkt dieser Dissertation. Die Partikeldetektion erfolgt an Merkmalen des rekonstruierten komplexen Feldes, wie Intensitätsminimum, Phasengradient und zweite Ableitung des Imaginärteils der komplexen Feldamplituden.

Die Schwerpunkte der Diskussion über Rekonstruktionsalgorithmen sind das Auffinden der am besten geeigneten Beugungs-Näherung für die Rekonstruktion der Hologramme und die Untersuchung des Einflusses des Abbildungssystems auf die Impulsantwortfunktion. Besondere Aufmerksamkeit wird dem neuen numerischen Rekonstruktionsverfahren durch die Anwendung einer speziellen asymmetrischen parametrisierten Impulsantwortfunktion gewidmet.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Konzept der Pinzettenoptik dargestellt, das eine logische Weiterentwicklung des in [S. Stobenau S.; Oeder, A.; and Sinzinger, S.: Optimized free-form optical trapping systems. In: Opt. Lett. 37(2) (2012). S. 274-276] präsentierten Verfahrens ist. Die Freiform-Optik erzeugt eine optimierte Fokusverteilung und ermöglicht gleichzeitig die holographische Beleuchtung des Arbeitsvolumens. In der Arbeit werden die wichtigsten Aspekte der Entwicklung und Fertigung der Fangoptik diskutiert und die holographische Beobachtung experimentell untersucht.

In der Diskussion über die Zwei-Schritt-phasenschiebende Interferometrie (Two-Step Phase Shifting Interferometry, PSI) wird eine Verallgemeinerung für den Fall variabler Amplituden der Referenzwellen dargestellt. Die erfolgreiche Rekonstruktion der komplexen Welle wird durch Simulationsrechnungen bestätigt.

Abstract

The In-line-digital Holography (In-line-DH) is a robust and simple method for the determination of the 3-D location or structure of micro-objects. It is commonly applied in velocimetry, determination of material of microparticles, investigation of unicellulars and estimating the holding force of optical tweezers.

This dissertation focuses on aspects like investigation of diaphragm function in the imaging system and the influence of the camera on the quality of recordings. Another aspect of the research work refers to the determination of the accuracy of the holographic method for particle detection. The goal of this study is to estimate the accuracy experimentally by comparing of methods like the detection of microparticles by intensity maximum, by phase gradient and by second derivative of imaginary part of the numerically reconstructed complex signal.

A further study addresses optimized numerical reconstruction methods. The most suitable diffraction approximation for the numerical reconstruction of the inline-holograms and influence of the imaging system on the impulse-response-function are discussed. Special attention is paid to the reconstruction by the parameterized asymmetrical impulse-response-function.

In the present dissertation a new configuration of optical-tweezers-optics is demonstrated, which represents an improvement of the concept presented in [S. Stoebenau, A. Oeder and S. Sinzinger. Optimized free-form optical trapping systems. *Opt. Lett.* 37(2), 274-276 (2012)]. The free-form optical part produces a highly focused donut-beam for optical manipulation while a central plane region is used for the holographic illumination. The development, simulation und fabrication as well as experiments for simultaneous optical trapping and in-line-holographic visualization are presented and discussed.

The generalization of the Two-Step Phase Shifting Interferometry method concerning the possibility of implementation of arbitrary reference waves in the magnitude and phase is discussed in this dissertation. The successful reconstruction of complex object waves is proved by the simulation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Digitale Holographie – Grundlagen und Stand der Technik	4
2.1	Licht und Wellenfront	4
2.2	Das Prinzip der Holographie	5
2.2.1	Beugung an Partikeln, Babinetsches Prinzip	8
2.2.2	Rekonstruktion des In-line-Hogramms	10
2.3	Streuung an Mikropartikeln	11
2.4	Nyquist-Kriterium	14
2.5	Einfluss der Kamera bei der Digitalisierung des Bildes	16
2.5.1	Auflösung der Kamera	17
2.5.2	Quantisierung	19
2.6	Numerische Verfahren in der digitalen Holographie – Rayleigh-Sommerfeld- Beugungsintegral	21
2.6.1	Beugungsapproximationen	24
2.6.2	Näherungen für die numerische Propagation	26
2.7	Stand der Technik	28
3	Optische Pinzetten – Grundlagen und Stand der Technik	33
4	Optimierte Methoden in der digitalen Holographie	38
4.1	Technisch-optisches Verständnis holographisch-optischer Aufbauten . .	38
4.1.1	Bestimmung der Tiefenlage des Objektes im Wasser	38
4.1.2	Blenden im holographischen Abbildungssystem	41
4.2	Optimierte numerische Verfahren in der digitalen In-line-Holographie .	48
4.2.1	Einschränkung der Impulsantwortfunktion und numerische Faltung	48
4.2.2	Parametrisierte Impulsantwortfunktion	49
4.3	Vermessung der Wellenfront – Erweiterung der zwei-Schritt-phasenschie- benden Interferometrie auf beliebige Referenzwellen	50
4.4	Zusammenfassung – Optimierte Methoden in der digitalen Holographie	55

5	Optimierte optische Aufbauten für optische Pinzetten	57
5.1	Holographische Beobachtung und optische Manipulation	57
5.2	Entwicklung und Fertigung des optischen Teils zur Formung des Pinzet- tenstrahls	60
5.3	Zusammenfassung – Optimierte optische Aufbauten für optische Pinzetten	64
6	Experimenteller Aufbau und optische Manipulation	67
6.1	Optischer Aufbau für digitale Holographie mit dem integrierten System für optische Manipulation	67
6.1.1	Beleuchtungssystem für digitale Holographie	67
6.1.2	Beleuchtung für die optische Pinzette	69
6.1.3	Abbildungssystem	69
6.1.4	Justage des Aufbaus	69
6.2	Experimentelle Ergebnisse der optischen Manipulation	72
6.2.1	Effizienz	73
6.2.2	Holographische Aufnahme und Rekonstruktion	75
6.3	Zusammenfassung – Experimenteller Aufbau und optische Manipulation	76
7	Digital-holographische Bestimmung der Partikeldetektion	78
7.1	Partikeldetektion mittels Phasendetektionsverfahrens anhand der kom- plexen Amplitude und Intensitätsverfahren	78
7.1.1	Phasendetektionsverfahren	79
7.1.2	Verfahren der Partikeldetektion anhand der komplexen Amplitude	82
7.1.3	Intensitätsverfahren	84
7.2	Durchführung des Experiments und Ergebnisse der Rekonstruktion . .	85
7.3	Zusammenfassung – Digital-holographische Bestimmung der Partikel- detektion	90
8	Zusammenfassung und Ausblick	92
	Literaturverzeichnis	95
	Abbildungsverzeichnis	105
	Tabellenverzeichnis	110
	Formelverzeichnis	111
	Zusemmenfassung wichtigsten Variablen und Abkürzungen	114

Anhang. Technische Daten des Abbildungssystems und Materialien	118
Publikationliste	120
Abschließende Erklärung	122

1 Einleitung

Die Mikroskopie ist die häufigste Anwendung der digitalen Holographie. Die wichtigste Eigenschaft der DH ist die Möglichkeit zur Aufnahme und Rekonstruktion der komplexwertigen Amplituden des optischen Wellenfeldes. Das bietet die Möglichkeit der Gewinnung zusätzlicher Informationen über das aufgenommene Objekt, z.B. seine dreidimensionale Struktur.

Das In-line-DH-Prinzip wird weiterhin für die Extraktion von Informationen über die dreidimensionale Position von Mikroobjekten aus der zweidimensional aufgenommenen Intensität, die als Hologramm bezeichnet wird, benutzt. Das Verfahren findet auf Gebieten wie der Partikelmikroskopie, der Velocimetry und der Zellbiologie Einsatz. Praktisch jedes Mikroskop kann umgebaut werden, eine 3D-Visualisierung zu ermöglichen. Das Verfahren ist sehr einfach und schnell. Nach der Literaturrecherche wurde deutlich, dass man bisher der detaillierten Untersuchung des holographischen In-line-Aufbaus wenig Aufmerksamkeit widmete. In der vorliegenden Arbeit werden Aspekte wie Blendendefinition für ein optimales 3D-Objektvolumen und der Einfluss der Kamera auf die Bildqualität erläutert.

Eines der wichtigsten Themen bei jedem Messverfahren ist die Genauigkeit. In der Literatur wird das Thema oft nicht ausführlich erläutert. Die analytischen Formeln für die Auflösung in z-Richtung betreffen eher den idealen Fall unter Näherungen, wie die Anwendung der Beugungsintegrale, die tatsächlich keine genauen Werte liefern können. Die Längsauflösung für die unterschiedlichen Partikel, Mikroobjektive und numerischen Detektionsverfahren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der experimentellen Ergebnisse ermittelt.

Für die Bewegung und die möglichst behutsame und berührunglose Fixierung von Mikroobjekten an einer Position wird in meisten Fällen eine optische Pinzette benutzt. Ein stark konvergierender Strahl bildet eine sogenannte optische Falle des Kraftpotenzials im Fokus. In zahlreichen Beiträgen berichtet man über die Leistungsfähigkeit des Verfahrens in der Zellbiologie, der Fluid-Optik, bei der Kraftmessung im Piconewton-Bereich und in der Mikrobearbeitung.

Die Möglichkeit der gleichzeitigen Mikromanipulation und der Beobachtung der Mikroobjekte in 3D ist sehr attraktiv auf den Gebieten der Zellbiologie, Partikelmikroskopie und Mikrofluidik. Es gibt nicht viele Beispiele in der Literatur über die Installation der Technik für die optische Pinzette im In-line-DH-Aufbau. In dieser Arbeit wird weiterhin eine einfache und effiziente Lösung des Problems vorgeschlagen. Es wird ein neues Prinzip für das gleichzeitige optische Fangen und die 3D Beobachtung

mittels In-line-DH präsentiert. Die Manipulationsfunktion wird mit Hilfe einer neuen Optik realisiert, die eine Weiterentwicklung des in [1] dargestellten Verfahrens ist. Die Grundidee besteht darin, dass eine optische Falle mit einem optischen Freiformbauteil erzeugt wird. Die besondere Konfiguration dieses Bauteils ermöglicht unter anderem eine holographische Beleuchtung des Volumens. Da die Fangoptik aus einem Stück Polymethylmethacrylat (PMMA) gefertigt wird, hat das präsentierte Verfahren ein großes Potenzial für die Massenfertigung. Experimentelle Ergebnisse zeigen eine hohe Effizienz des Aufbaus beim gleichzeitigen Fangen und Beobachten von Polystyrenemikropartikeln in dreidimensionalen Volumina.

Ein anderes Gebiet der DH ist die Visualisierung der Phasenänderung. Der Einsatz der DH in der Zellbiologie wird dadurch notwendig, weil die meisten Zellen durchsichtig sind und ihre inneren Strukturen oder Stärken nur in der Änderung der Wellenfrontform der Beleuchtung sichtbar sind. Der Vorteil der DH gegenüber anderen Phasenkontrastverfahren ist die Möglichkeit, die Phasenverzögerung quantitativ darzustellen. Die Funktionsweise des Verfahrens beruht auf der Rekonstruktion der komplexen Objektwelle anhand des Interferogramms. Die Auflösung ist dabei auf ein Viertel der Kamerapixelrate beschränkt. Um die Auflösung zu steigern, können auch andere interferometrische Verfahren zum Einsatz gebracht werden. Bei der phasenschiebenden Interferometrie kann die komplexe Objektwelle pixelgenau rekonstruiert werden. Aber wenn die Schrittzahl 3 übersteigt, ist die Verwendung des Verfahrens für dynamische Prozesse, wie die Untersuchung von lebendigen Objekten, erschwert, da das Objekt während des Aufnahmevorgangs unbeweglich bleiben muss. Bei der zwei-Schritt-phasenschiebenden Interferometrie (Two-Step Phase Shifting Interferometry, Two-Step PSI) existiert die Möglichkeit, beide Interferogramme gleichzeitig aufzunehmen, wenn z. B. beide Referenzwellen den gleichen Pfad mit unterschiedlichen Polarisationsrichtungen durchlaufen. Die existierenden zwei-Schritt-phasenschiebenden interferometrischen Verfahren beruhen auf Referenzwellen, die für beide Interferogramme eine gleiche Amplitude haben. Das führt zu Einschränkungen im Aufbau. Wenn beide Referenzwellen nicht die gleiche Amplitude haben, kommt es bei diesen Verfahren zu Fehlern bei der Rekonstruktion. In dieser Arbeit wird ein neues Verfahren vorgelegt, das eine Erweiterung der zwei-Schritt-phasenschiebenden Interferometrie auf die Anwendung von Referenzwellen mit beliebigen Amplituden zulässt.

Die Arbeit ist wie folgt gegliedert: Im Kapitel 2 nach der Einleitung werden die Grundlagen der Optik im Bereich der Holographie am Beispiel des einfachen Analoghologramms dargestellt. Es werden wichtigsten Aspekte der Aufnahme und Rekonstruktion in der In-line-DH werden besprochen. Unter anderem sind hier solche Punkte erläutert wie Nyquist-Kriterium, Quantisierung sowie Abtastung der Kamera. Das Kapitel wird es über numerische Verfahren in der In-line-DH diskutiert. Es wird begründet, dass das Sommerfeld-Integral die beste Beugungsnäherung für die Rekonstruktion der In-line-Hologramme ist. Das Kapitel schließt mit dem Stand der Technik.

Das dritte Kapitel befasst sich mit den Grundlagen für optische Manipulation. Der Leser wird kurz über die Geschichte auf dem Bereich informiert. Danach folgt die Beschreibung des physikalischen Prinzips für optische Manipulation und Stand der Technik.

Das Vierte Kapitel wird den wichtigsten Leistungen der vorliegenden Dissertation gewidmet. Unter anderem sind hier solche Punkte erläutert wie Untersuchung der Blendendefinition im optischen Aufbau, innovative Impulsantwortfunktion für vereinfachte Visualisierung der Tiefeninformation sowie optimierte numerische Verfahren.

Demnächst wird die Erweiterung des Verfahrens für die zwei-Schrittphasen schiebende Interferometrie auf beliebige Referenzwellen erklärt. Das wird mit Hilfe der graphischen Darstellung gemacht, die Funktionsweise mit der numerischen Simulation bestätigt. Am Ende des Kapitels folgt Zusammenfassung.

Entwicklung, Dimensionierung und Fertigung des optischen Teils für die optische Manipulation werden im fünften Kapitel geschildert. Das Konzept der Strahlformung für die optische Manipulation mit gleichzeitiger holographischer Beleuchtung besteht in der funktionalen Teilung der Apertur. Der äußere ringförmige Teil der Fokussieroptik dient der Formung des Strahls für die optische Manipulation, während die innere zentrale Region der Ebene den Beleuchtungsstrahl ungebrochen durch das Objektvolumen hindurchlässt. Entsprechende Simulationen und Berechnungen werden vorgestellt. Die Anpassung des entwickelten optischen Freiformteils an die Fertigung wird vorgestellt. Das Kapitel schließt mit Zusammenfassung.

In Kapitel 6 werden experimentelle Ergebnisse der gleichzeitigen optischen Manipulation und 3D-Beobachtung dargestellt. Es wird vor allem der Justage des Aufbaus Aufmerksamkeit gewidmet. Die gegen Verschiebungen und Verkippungen empfindlichste Stelle ist die Parallelität des kollimierten Fangstrahls und der Fokussieroptik. Der Rekonstruktionsalgorithmus ermöglicht die Rekonstruktion von Videoaufnahmen. Die im Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen die zuverlässige Funktionsweise des Fangens mittels der entwickelten Fokussieroptik und die gleichzeitige holographische Rekonstruktion in 3D.

Die axiale Auflösung der In-line-Holographie wird nicht durch den analytischen Ausdruck bestimmt, sondern gemessen. Das ist das Thema des siebten Kapitels. Dabei werden drei unterschiedliche Verfahren zur Detektion der Tiefenlage (z -Lage) des Partikels verglichen. Das Verfahren zur Ermittlung des Partikels nach dem Minimum der Intensität erweist sich als am wenigsten zuverlässig. Genauer sind die Verfahren des Phasengradienten und die zweite Ableitung des imaginären Teils der komplexen Feldamplitude. Variiert werden dabei die Partikelgröße und die numerische Apertur des Objektivs.

Das Thema des letzten Kapitels ist die Vermessung der Wellenfront mit der DH. Die Erweiterung des Verfahrens für die zwei-Schritt-Phasenschiebende Interferometrie wird mit Hilfe der graphischen Darstellung erklärt, die Funktionsweise mit der numerischen Simulation bestätigt.

2 Digitale Holographie – Grundlagen und Stand der Technik

2.1 Licht und Wellenfront

Licht ist der sichtbare Bereich aus dem Wellenlängenspektrum der elektromagnetischen Wellen. Weil das Licht eine Wellennatur aufweist, benutzt man oft den Begriff elektromagnetische Welle. Diese wird mathematisch durch ein komplexes skalares Feld analytisch beschrieben. Eine solche Darstellung ist für viele Anwendungen geeignet, obwohl sie die echte vektorielle Natur des Lichtes vernachlässigt. Für eine vollkommene Beschreibung der komplexen Welle müssen sowohl die Amplitude als auch die Phase bekannt sein.

Mit dem herkömmlichen Bildaufnahmesensor wie CCD und CMOS ist es möglich, nur die Intensität aufzunehmen. Die Phaseninformation geht bei der klassischen Abbildung verloren. In der Mikroskopie kann man auch mit zusätzlichen Verfahren den Phasenverlauf in Intensität und Farbe umsetzen und sichtbar machen (Abb. 2.1). Bei der Untersuchung von transparenten Objekten, die die Amplitude der Beleuchtung nur wenig beeinflussen können, ist dies besonders vorteilhaft. Viele Informationen über die Struktur des Zellgewebes und der einzelnen Zellen sind in der Anordnung der optischen Dichte enthalten, die nur durch die Visualisierung der Phase sichtbar werden.

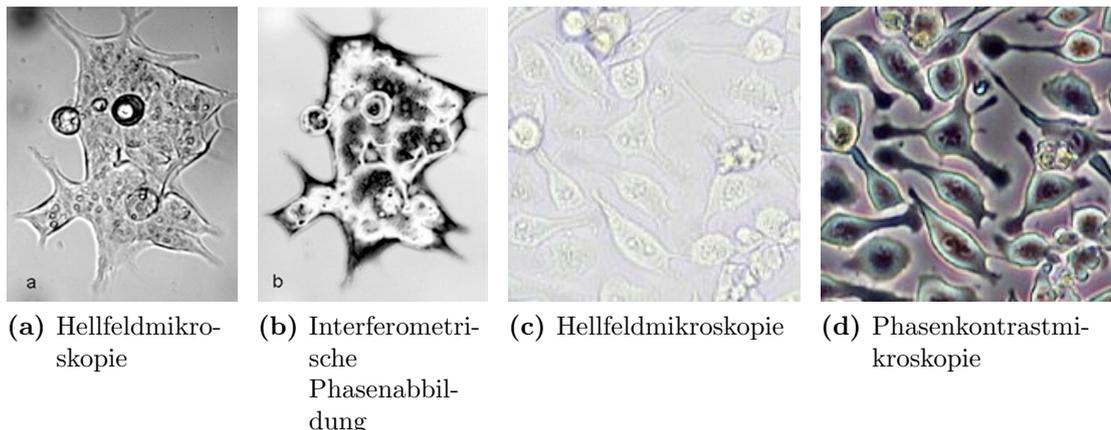


Abb. 2.1: a,b: [2], Abb. 1, (a,b), c,d: [3], Abb. 4 (a,b)

Die Speicherung der komplexen Information der aufgenommenen Welle ist in zahlreichen wissenschaftlichen Beiträgen untersucht worden. Die grundlegenden Konzepte der Wellenfrontrekonstruktion sind die Holographie, die Interferometrie, das Phase Retrieval, der Transport der Intensität und unterschiedliche Wellenfrontsensoren [4, 5]. Das Hauptprinzip der Interferometrie ist Aufnahme des Interferenzmusters, das bei der Überlagerung von Objekt- und Referenzwelle entsteht. Die Anordnung der Hell- und Dunkelstreifen hängt von der Phase beider Wellen ab. Bei der Phasenschiebenden Interferometrie nutzt man mehrere Hologramme, um die komplexe Welle eindeutig rekonstruieren zu können. Zwischen den Aufnahmen muss in der Regel eine bekannte Phasenverschiebung der Referenzwelle vorhanden sein. Ein Nachteil des Verfahrens ist die Notwendigkeit der Fixierung des Objektes während des kompletten Aufnahmevorgangs. Deswegen ist es günstig, die Anzahl der Aufnahmen zu minimieren. Im Abschnitt 4.3 wird ein Verfahren, in dem nur zwei Aufnahmen notwendig sind, um die Objektwelle zu rekonstruieren.

Die räumliche Auflösung ist eine bedeutende Größe der Interferometrie. Eine Rekonstruktion ermöglicht es, die Objektwelle pixelgenau entsprechend der Kameraaufnahmen zu ermitteln. Ein anderer Vorteil ist, dass die zweidimensionale Phasenordnung der Referenzwelle nicht bekannt sein muss. Wichtig ist die bekannte und konstante Phasenverschiebung der Referenzwelle während des Messvorgangs. Manche interferometrische Verfahren stellen dennoch keine strengen Anforderungen an die Phasenverschiebung, wenn die Anzahl von aufgenommenen Interferogrammen größer oder gleich vier ist.

Ein anderes Verfahren ist Holographie. Der wichtigste Vorteil ist die Möglichkeit, eine unbekannt komplexe Welle in einem mit der Digitalkamera aufgenommenen Bild zu registrieren. Der Preis dafür ist eine niedrigere Auflösung (nur ein Viertel der Pixelrate der Kameraaufnahmen) und die Notwendigkeit der Kenntnis der komplexen Referenzwelle. Die digitale Holographie ist der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Es wird im Folgenden auf die Details dieses Verfahrens eingegangen.

2.2 Das Prinzip der Holographie

Holographie ($\sigma\lambda\omicron\zeta$ – ganz und $\gamma\rho\alpha\varphi\epsilon\iota\omega$ – ich schreibe) ist eine Technik, die es ermöglicht, die ganze Information über das Objekt, seine Form und Abstand bis zum Objekt aufzunehmen. Dennis Gábor war der erste, der diese Technik im Jahr 1947 entwickelt und angewendet hatte, wofür er 1971 den Nobelpreis für Physik erhielt. Für seine Versuche benutzte er Unterdruckgasentladungslampen. Da es damals keine kohärenten Lichtquellen gab, waren die ersten Hologramme von geringer Qualität. Das war der Grund, weshalb dieses Verfahren zu der Zeit nicht weiterentwickelt wurde. Die rasante Verbreitung und Entwicklung der Holographie nahm erst mit der Erfindung des Lasers in den 60er Jahren. In demselben Jahr als Dennis Gábor mit dem No-

belpreis ausgezeichnet wurde, veröffentlichte Thomas Huang seinen wissenschaftlichen Artikel „Digitale Holographie“. Die Arbeit brachte einen Durchbruch auf diesem Gebiet, weil er erstmals ein Hologramm mittels der Anwendung digitaler Rechentechnik rekonstruierte. Eine rasante Entwicklung nahm die digitale Holographie erst ab den 90er Jahren, als genügend leistungsfähige Rechner und digitale Matrix-Lichtempfänger zur Verfügung standen. Die Gebiete, auf denen die digitale Holographie am häufigsten eingesetzt wird, sind die Mikroskopie, Partikelmessung und Oberflächenvermessung.

Die Grundlage des Verfahrens für die Holographie ist das weit bekannte Prinzip der Interferenz. Die Überlagerung mehrerer kohärenter elektromagnetischer Wellen verursacht ortsfeste Maxima und Minima der Intensität, die man als Interferenzbild siehe Gleichung (2.1) bezeichnet. Das Interferenzbild kann demnach mit einem lichtempfindlichen Medium aufgenommen werden. Das Objekt der Holographie, das Hologramm, ist nichts anderes als das Interferenzbild zweier Wellen. Eine davon bezeichnet man als Referenzwelle $\widetilde{A}_R = A_R \cdot \exp(i\varphi_R)$. Sie hängt nicht von Lage oder Form des Objektes ab. Die andere wird direkt vom Objekt gestreut und enthält die Information; deswegen wird sie als Objektwelle $\widetilde{A}_O = A_O \cdot \exp(i\varphi_O)$ bezeichnet. Das Interferenzbild zweier Wellen auf der Hologrammebene ist die Summe beider Wellen:

$$\begin{aligned} I &= |\widetilde{A}_O + \widetilde{A}_R|^2 = |\widetilde{A}_O|^2 + |\widetilde{A}_R|^2 + \widetilde{A}_O \widetilde{A}_R^* + \widetilde{A}_R \widetilde{A}_O^* \\ &= A_O^2 + A_R^2 + A_O A_R \exp(i(\varphi_R - \varphi_O)) + A_O A_R \exp(i(\varphi_O - \varphi_R)), \end{aligned} \quad (2.1)$$

wobei A_O , φ_O , A_R , und φ_R die Amplitudenbeträge und Phasen beider Wellen sind. Die Annahme eines dünnen analogen Hologramms lässt die analytischen Grundlagen der Rekonstruktion besser erklären. Unter dem Begriff „analoge Holographie“ versteht man, dass das Interferenzbild an der Fotoschicht registriert und entwickelt wird. Danach folgt die Rekonstruktion durch die Beleuchtung des Hologramms mit dem kohärenten Licht. Bei der Betrachtung als dünnes Hologramm wird die Dicke des lichtempfindlichen Mediums vernachlässigt. Dies ist möglich, wenn die feinsten Strukturen im Hologramm deutlich größer sind, als die Dicke des lichtempfindlichen Mediums.

In dieser Darstellung werden manche Effekte vernachlässigt, die bei der Verwendung der Fotoplatte auftreten können. Dazu gehören solche Erscheinungen wie ein verringerter Kontrast und die Nichtlinearität zwischen der Intensität und der Transparenz des entwickelten lichtempfindlichen Mediums [6]. Für eine vereinfachte Beschreibung kann angenommen werden, dass die Transparenz der normierten aufgenommenen Intensität gleich ist.

Die Rekonstruktion des Hologramms erfolgt durch seine Beleuchtung mit der Referenzwelle (2.2).

$$\begin{aligned}
 IA_R &= (A_O^2 + A_R^2) \cdot A_R \exp(i(\varphi_R)) \\
 &\quad + A_O A_R \exp(i(\varphi_R - \varphi_O)) \cdot A_R \exp(i(\varphi_R)) \\
 &\quad + A_O A_R \exp(i(\varphi_O - \varphi_R)) \cdot A_R \exp(i(\varphi_R)) \\
 &= (A_O^2 + A_R^2) \cdot A_R \exp(i(\varphi_R)) \\
 &\quad + A_O A_R^2 \exp(i(2\varphi_R - \varphi_O)) \\
 &\quad + A_O A_R^2 \exp(i(\varphi_O))
 \end{aligned} \tag{2.2}$$

Dieser Ausdruck ist von Bedeutung für die Holographie und beschreibt, wie die Referenzwelle \tilde{A}_R am Hologramm gebeugt wird. Dabei werden drei Komponenten (2.3, 2.4 und 2.5) erzeugt.

$$Z = (A_O^2 + A_R^2) \cdot A_R \exp(i(\varphi_R)) \tag{2.3}$$

$$T = A_O A_R^2 \exp(i(2\varphi_R - \varphi_O)) \tag{2.4}$$

$$O = A_O A_R^2 \exp(i(\varphi_O)) \tag{2.5}$$

Der erste Term Z entspricht der Referenzwelle, deren Amplitude der Summe der Intensitäten der Objekt- bzw. Referenzwelle proportional ist. Der Term enthält die Ausbreitungsrichtung der einfallenden Referenzwelle. Der Teil O der erzeugten Strahlung ist das Ziel der Hologrammrekonstruktion. Er ist der ursprünglichen Objektwelle ähnlich und kann unter bestimmten Voraussetzungen (Beobachtungswinkel, veränderter Kontrast) von dem Beobachter als eine direkt von dem Objekt gestreute Welle wahrgenommen werden. Man kann zeigen, dass die Argumente der exponentiellen Phasenfaktoren jedes Terms mit dem Wellenfrontgradienten der Hologrammebene verbunden sind. Das bedeutet, dass der Winkel zwischen den Normalen der Wellenfront der Z - und O -Komponente in jedem Punkt der Hologrammebene dem entsprechenden Winkel zwischen Z - und T -Komponente gleich ist. Dabei ist der Winkel zwischen den Normalen von O und T doppelt so groß. Anders gesagt, die T -Komponente breitet sich unter demselben Winkel zu Z wie O in unterschiedlicher Richtung aus. Man kann zeigen, dass sich die T - und O -Komponenten den 1-sten und -1 -sten Beugungsordnungen entsprechen. Diese Komponente entspricht der komplexkonjugierten Objektwellenfront und wird deswegen Zwillingsbild genannt. Die T -Welle war bei der Aufnahme des Interferenzmusters nicht vorhanden. In Abbildung 2.2 wird die Hologrammrekonstruktion grafisch dargestellt.

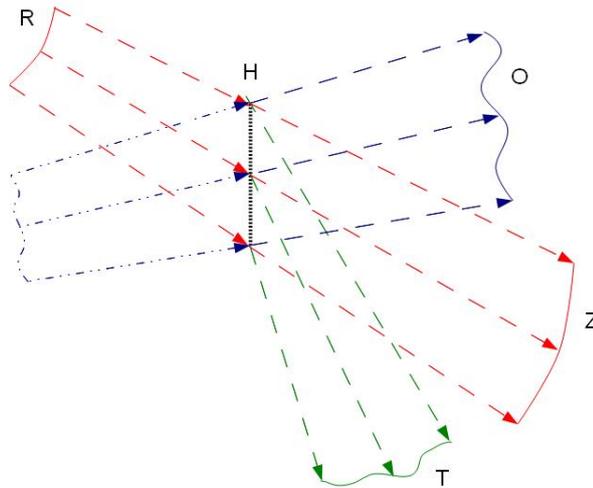


Abb. 2.2: Hologrammrekonstruktion. R – Referenzwelle; H – Hologramm; O – rekonstruierte Objektwelle; Z – durchgehender Anteil der einfallenden Objektwelle R ; T – Zwillingsbild

Den dargestellten Fall (Abbildung 2.2) bezeichnet man als Off-Axis-Hologramm, da sich alle drei Komponenten räumlich trennen lassen. Das ermöglicht es dem Beobachter, unter bestimmten Winkeln die rekonstruierte holographische Objektabbildung ohne andere vom Hologramm erzeugten Störkomponenten wahrzunehmen. In-line-Holographie unterscheidet sich durch Überlagerung von allen drei Komponenten [7].

2.2.1 Beugung an Partikeln, Babinetsches Prinzip

Es sei angenommen, dass eine ebene kohärente Welle ein adsorbierendes Objekt beleuchtet, das die Form einer runden Scheibe mit dem Durchmesser von d_{ob} hat. Im Weiteren wird die axiale Ausdehnung des Objektes vernachlässigt. In einem Abstand z_{ob} von der Objektebene OE befindet sich eine Hologrammebene HE, in der die Intensität des Beugungsbildes aufgenommen wird. Die Ebene mit dem Objekt wird als Objektebene OE bezeichnet (Abbildung 2.3).

Falls kein Objekt in der Objektebene vorhanden ist, entsteht eine elektromagnetische Welle \widetilde{A}_B in der Hologrammebene. Dies ist die Beleuchtungswelle, die ungestört die Beobachtungsebene HE erreicht. Als nächstes bezeichnen wir mit \widetilde{A}_O eine in der Hologrammebene entstehende Störung, wenn sich das Objekt in der Objektebene befindet. Das ist die Beleuchtungsstrahlung, die am Objekt gebeugt wurde. Wenn sich eine zum Objekt komplementäre Blende in der Objektebene befindet, erreicht die Welle \widetilde{A}_k die Hologrammebene. Das Babinetsche Prinzip besagt, dass die drei zweidimensionalen Funktionen \widetilde{A}_B , \widetilde{A}_O und \widetilde{A}_k über den folgenden Ausdruck (2.6) miteinander verbun-

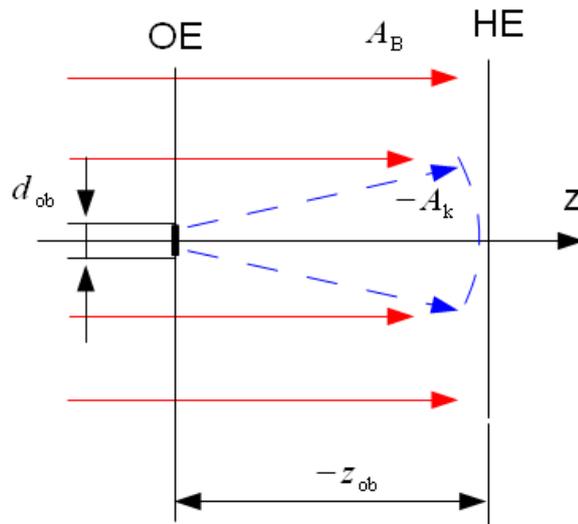


Abb. 2.3: In-line-holographisches Prinzip. OE - Objektebene, HE - Hologrammebene

den sind:

$$\widetilde{A}_B = \widetilde{A}_k + \widetilde{A}_O \quad (2.6)$$

Die komplexe Amplitude der am Objekt gebeugten Beleuchtungswelle kann mit (2.7) berechnet werden:

$$\widetilde{A}_O = \widetilde{A}_B - \widetilde{A}_k \quad (2.7)$$

Das negative Vorzeichen vor dem zweiten Term wird als Umkehrung der Phase der Störung \widetilde{A}_k hinter einer beleuchteten kreisförmigen Blende um 180 Grad interpretiert. Ansonsten ist der Ausdruck nichts anderes als die Summe oder Überlagerung zweier Wellen. Die Entstehung von \widetilde{A}_O aus der Überlagerung einer vom Objekt unabhängigen Beleuchtungs- bzw. Referenzwelle \widetilde{A}_B und $-\widetilde{A}_k$ erklärt den Begriff „In-line-Holographie“.

Im Weiteren geht es nur um die Intensitätsaufnahme der \widetilde{A}_O -Welle im Fernfeld in einem großen Abstand im Vergleich zur Objektgröße. Deswegen handelt es sich um die Beugung der Beleuchtungswelle \widetilde{A}_B an einem Objekt.

Abbildung 2.4 stellt die simulierte Modulation des Fraunhoferschen Beugungsbildes eines kleinen runden Objekts dar. Die Beugung an einer kreisförmigen, zum Objekt komplementären Öffnung bzw. Intensität der \widetilde{A}_k -Welle bildet das bekannte Airy-Scheibchen. \widetilde{A}_B oder die Beleuchtungswelle in der Hologrammebene haben in diesem

einfachen Fall eine gleichmäßige Intensität und werden nicht dargestellt. Die Intensität der \widetilde{A}_O -Welle hat typische Ringzonen, in denen die Beleuchtungsintensität moduliert wird. Die stärkste Modulation hat das Beugungsbild in der zentralen Region, in der die Intensität der \widetilde{A}_k -Welle ihr Maximum besitzt.

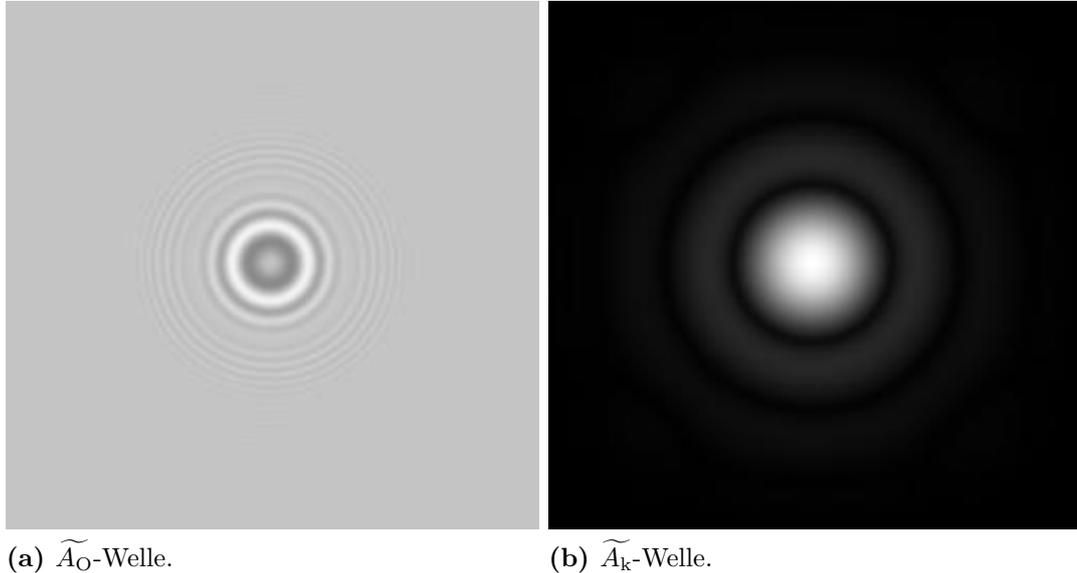


Abb. 2.4: Beugung an der absorbierenden Scheibe (a) und Öffnung (b) der gleichen Größe

Das Beugungsbild im Fernfeld an einem adsorbierenden Objekt kann als ein Hologramm oder In-line-Hologramm beschrieben werden. Das Hologramm kann mit bereits bekannten Verfahren rekonstruiert werden, wie im folgenden Kapitel dargestellt wird.

Zu beachten ist, dass die Energiemenge in beiden Ebenen OE und HE (siehe Abbildung 2.4) erhalten bleibt; lediglich die Energieverteilung ändert sich.

2.2.2 Rekonstruktion des In-line-Hologramms

Im Weiteren wird der schon bekannte Ausdruck für die In-line-Hologrammrekonstruktion (2.8) benutzt. Es sei I die aufgenommene Intensität der gebeugten \widetilde{A}_O -Welle.

$$\begin{aligned}
 I &= |\widetilde{A}_B + \widetilde{A}_k|^2 = |\widetilde{A}_B|^2 + |\widetilde{A}_k|^2 + \widetilde{A}_B \widetilde{A}_k^* + \widetilde{A}_k \widetilde{A}_B^* \\
 &\approx A_B^2 + A_B A_k \exp(i(\varphi_B - \varphi_k + \pi)) + A_B A_k \exp(i(\varphi_k - \varphi_B + \pi))
 \end{aligned}
 \tag{2.8}$$

Die gesamte Energie des $|\widetilde{A}_k|^2$ -Terms gelangt durch die kleinere Öffnung in der Objektebene hindurch. Wenn sie die Hologrammebene erreicht, wird sie aufgrund der

Beugung über eine größere Fläche in der Beobachtungsoberfläche (Abb. 2.4(b)) verteilt. Deswegen ist der Beitrag des $|\widetilde{A}_k|^2$ -Terms in jedem Punkt der Beobachtungsebene im Verhältnis zur Beleuchtungsintensität $|\widetilde{A}_B|^2$ sehr gering und kann vernachlässigt werden.

Der Rekonstruktionsvorgang kann wie folgt (2.9) dargestellt werden:

$$IA_B \exp(i\varphi_B) \approx |\widetilde{A}_B|^2 A_B \exp(i\varphi_B) + A_B^2 A_k \exp(i(2\varphi_B - \varphi_k + \pi)) + A_B^2 A_k \exp(i(\varphi_k + \pi)) \quad (2.9)$$

In 2.10 wird wie vorher jeder Term separat betrachtet:

$$\begin{aligned} Z &= |\widetilde{A}_B|^2 A_B \exp(i\varphi_B) \\ T &= A_B^2 A_k \exp(i(2\varphi_B - \varphi_k + \pi)) \\ O &= A_B^2 A_k \exp(i(\varphi_k + \pi)) \end{aligned} \quad (2.10)$$

Im Fall des dünnen In-line-Hologramms ist es egal, von welcher Seite es beleuchtet wird. Es erzeugt dieselben drei Wellenkomponenten bei der Rekonstruktion. Rein formal wird angenommen, dass die Beleuchtungswelle sich von der Seite ausbreitet, in der sich das Objekt während der Aufnahme befand. Wie vorher gezeigt wurde, behält der Z-Term die Phase der Beleuchtungswelle in jedem Punkt des Hologramms bei. Diese Komponente breitet sich weiter anstelle der Beleuchtungswelle hinter dem Hologramm aus. Bei der Hologrammaufnahme breitet sich die A_k -Welle in Richtung des Hologramms wie eine divergente Welle aus. Weil die rekonstruierte O-Komponente (Abb. 2.5 - blau) dieselbe Phase hat, pflanzt sie sich bei der Rekonstruktion wie eine divergierende Welle weiter fort. Sie erzeugt die virtuelle Abbildung des Objektes. Da die T-Komponente (Abb. 2.5 - grün) eine zu O konjugierte Phase besitzt, konvergiert sie und formt eine reelle Abbildung, die durch die numerische Rekonstruktion ermittelt werden soll. Die konvergierende O-Komponente verursacht die kreisförmigen Störungen um das reelle Bild des Objektes, die in der Fachliteratur unter dem Begriff Zwillingsbild bekannt sind.

2.3 Streuung an Mikropartikeln

Im vorigen Abschnitt ging es um Beugungsnäherung bei der In-line-Hologrammaufnahme. Sie hat eine gute Übereinstimmung mit dem realen Verhalten des Lichtes unter kleinen Winkeln und für Partikelgrößen von Vielfachen der Wellenlänge.

Mit der Kamera aufgenommene Hologramme werden numerisch mit der Beugungsapproximation rekonstruiert. Sie repräsentiert die Natur der Lichtausbreitung nur annäherungsweise. Die komplexe elektromagnetische Feldverteilung (Mie-Streuung) im Partikel bleibt außer Acht des Beugungsmodells.

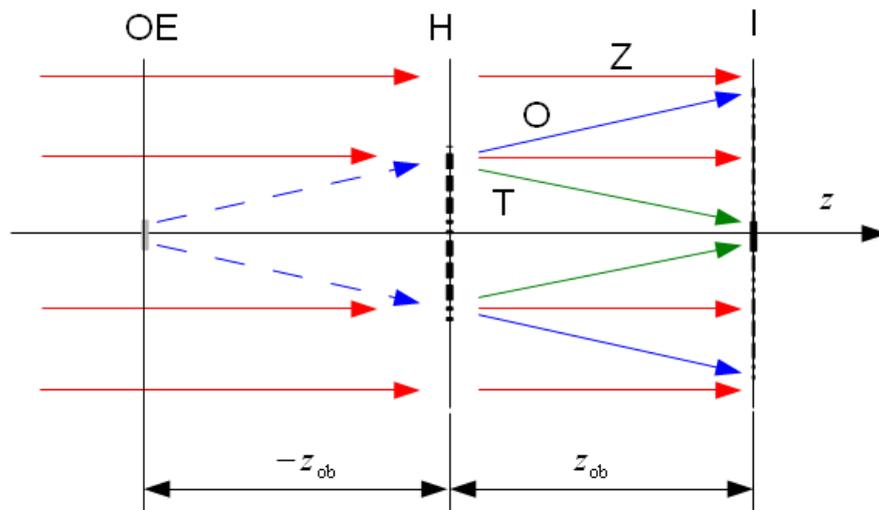


Abb. 2.5: Beugung der Beleuchtungswelle am Hologramm (H). O – Objektwelle, T – die das Zwillingsbild formende Welle, I – Ebene der scharfen Objektabbildung

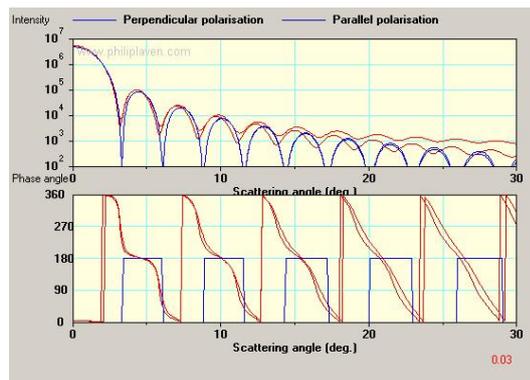


Abb. 2.6: Vergleich der Diffraction (blau) und Mie-Streuung (rot) an undurchsichtigen $10 \mu\text{m}$ -Mikropartikeln, Simulation im Programm "Mie-Plot".

Der Unterschied zwischen gestreuter Strahlung und Beugung führt zur Abweichung der rekonstruierten Intensität von einer reellen Intensitätsanordnung im Bereich des Partikels. Diese unerwünschten numerischen Verzerrungen bei der numerischen Rekonstruktion können lokale Intensitätsmaxima im Bereich der rekonstruierten Partikelabbildung auslösen, die die Partikeldetektion erschweren können.

In den vorgeführten Diagrammen 2.6 und 2.7 werden die Amplituden beziehungsweise Phasendiagramme abhängig von dem Streuwinkel verglichen. Als verglichene Berechnungsmodelle werden Mie-Streuung und Beugungsapproximation genommen. Die Mie-Streuung legt mit sehr hoher Genauigkeit das von dem durchsichtigen Partikel gestreu-

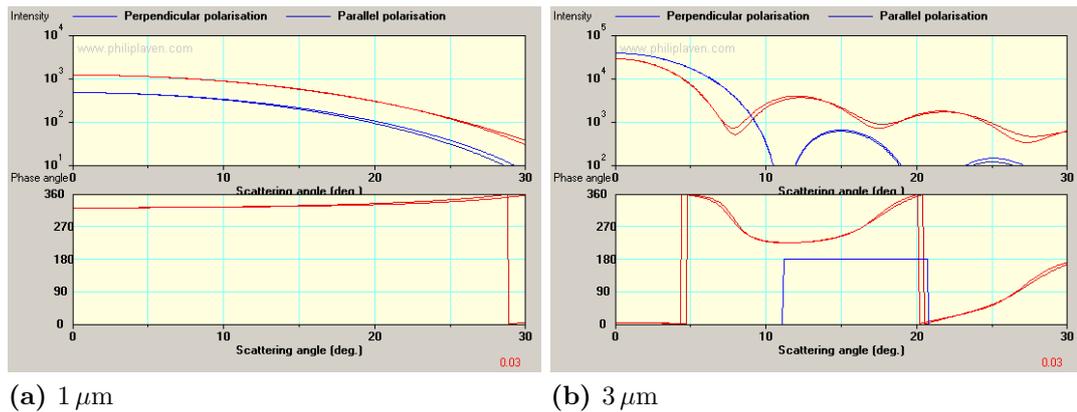


Abb. 2.7: Vergleich der Diffraction (blau) und Mie-Streuung (rot) an PPs-Mikropartikeln im Wasser $\lambda = 633nm$, Simulation im Programm "Mie-Plot".

te elektromagnetische Feld fest. Die Beugungsapproximation wird unter Annäherung gemacht, dass das Partikel vollkommen absorbierend ist. Wenn beide Kurven übereinstimmen, ist das ein Hinweis darauf, dass die rekonstruierte Abbildung möglicherweise mit der realen Intensitätsanordnung übereinstimmt.

Das Diagramm 2.6 macht ersichtlich, dass die Beugungsapproximation für 10 μm -Partikel der exakten Mie-Streuung nur im Bereich bis ca. von 10 bis 12 Grad ähnelt. Diese Simulation zeigt, dass die Beugungsapproximation bei der numerischen Rekonstruktion von Hologrammen für große Partikel erfolgreich benutzt werden kann [8, 9].

Bei kleineren durchsichtigen 3 μm -Partikeln treten wesentliche Unterschiede für beide Rechenmodelle auf (2.7). Bei diesen Größen wird oft die Rekonstruktion unter Verwendung der Mie-Streuung eingesetzt [10, 11].

Wenn der Partikeldurchmesser weiter minimiert wird, breitet sich das zentrale Maximum aus. Das führt dazu, dass Beugungsverfahren wieder bei der Rekonstruktion in der digitalen In-line-Holographie eingesetzt werden [12–14] können. Auf dem Diagramm 2.7 (a). sieht man, dass dies genau der Fall bei 1 μm -Partikel ist. Die Phase der gestreuten Welle weist eine fast konstante Differenz der Amplitude für beide Rechenverfahren auf. Das ist am nahezu konstanten Höhenunterschied beider Kurven ersichtlich (2.7 (a)), was in einer der linearen Skalen auf eine konstante Skalierung hinweist. Der Phasen-Unterschied hat das Phasenoffset bei der Rekonstruktion über alle Winkeln von 0 bis 20 Grad. Die komplexe Amplitude der Partikelabbildung, die durch das Beugungsverfahren bei der Rekonstruktion erhalten wird, müsste in diesem Fall einen entsprechenden Phasenversatz relativ zur Beleuchtungswelle haben. Wichtig ist, dass die erste Ableitung der beiden Phasenverteilungen bei der Berechnung mit der Mie-Streuung und Beugung gleich ist. Das bedeutet, dass das Beugungsverfahren bei Verwendung nur der Objektiven 1 und 2, deren Öffnungswinkel im Wasser 9° bzw. 15,2° beträgt (siehe Tabelle 4.1), relativ gute Ergebnisse liefern soll. Bei dem Objektiv

MO3 ($u = 29,1^\circ$) kann die Beugungsrekonstruktion eine zusätzliche Wellenaberration im Bereich von höheren Winkeln verursachen, was zur Bildverzerrung führt. Aber dieser Einfluss wäre wegen der geringeren Amplitude bei großen Winkeln ($\sim 30^\circ$) unwesentlich. Der Fall mit dem $3\ \mu\text{m}$ -Partikel ist komplizierter. Praktisch kann nur ein Teil der rekonstruierten Welle im Winkelbereich von 0 bis ca. 5° relativ genau mit dem Beugungsverfahren rekonstruiert werden. Dort stimmen die Intensitäten fast überein und die erste Ableitung der Phasenkurve der Mie-Streuung bleibt konstant. Trotzdem wird in dieser Arbeit untersucht, wie die unterschiedlichen Rekonstruktionsverfahren, die auf Beugung basieren, sich verhalten.

2.4 Nyquist-Kriterium

In der Holographie spielt die Auflösung des Sensors eine entscheidende Rolle. Eine höhere räumliche Auflösung ermöglicht die Aufnahme feinerer Strukturen des Interferenzmusters des Objekt- und Referenzstrahls, was bei der Rekonstruktion eine schärfere Reproduktion des Objektes mit hohem Kontrast auch bei kleinen Details zulässt. Die Größe der feinsten Interferenzstrukturen hängt mit dem Winkel σ_S zwischen Objekt- und Referenzwelle zusammen (Abb. 2.8). Die Größe der Pixel des Detektors bestimmt den Winkelbereich der Objektwelle, deren Wellenfront noch rekonstruiert werden kann. Wenn die Referenzwelle eben ist und senkrecht auf die Detektorebene trifft, ist der Winkel σ_S dem Streuwinkel des Mikroobjekts gleich.

Das Nyquist-Kriterium beschränkt die maximale räumliche Frequenz, die mit einem Matrixsensor wie CCD oder CMOS aufgenommen werden kann. Das besagt, dass die maximale Raumfrequenz des Beugungsmusters zweimal kleiner als die Abtastfrequenz des Sensors sein muss.

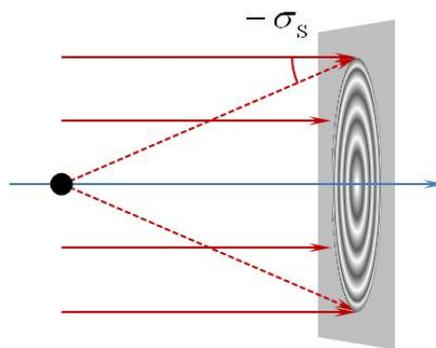


Abb. 2.8: Nyquist-Kriterium bei der in-line-holographischen Aufnahme

Wenn ein Abbildungssystem zum Einsatz kommt, muss auch berücksichtigt werden, wie es die Abbildung des Hologramms vergrößert und den Einfallswinkel entsprechend verringert. Im vorigen Abschnitt wurde das 3D-Volumen definiert, in dem

der Öffnungswinkel konstant bleibt. Im Weiteren wird ermittelt, ob die Auflösung des Sensors ausreicht, um den Winkelbereich des Öffnungswinkels u einzuschließen. Der Zusammenhang zwischen objekt- und bildseitigem Öffnungswinkel ergibt sich aus Sinusbedingung:

$$\frac{n \sin(u)}{n' \sin(u')} = \beta' = \frac{f'_{\text{TL}}}{f_{\text{MO}}} \quad (2.11)$$

mit u als objektseitigem Öffnungswinkel, u' , bildseitigem Öffnungswinkel, β' , Abbildungsmaßstab, f_{MO} , Brennweite des mikroskopischen Objektivs, f'_{TL} , Brennweite der Tubuslinse, n und n' , Brechungsindices der objekt- bzw. beidseitigen Medien. Da der Öffnungswinkel des gesamten Systems gleich dem Öffnungswinkel des Mikroobjektivs ist, lässt sich der bildseitige Öffnungswinkel aus 2.11 berechnen:

$$\sin(u') = \frac{f'_{\text{MO}} \sin(u)}{f'_{\text{TL}}} = \frac{f_{\text{MO}} \text{NA}_{\text{MO}}}{f'_{\text{TL}}}, \quad (2.12)$$

mit NA_{MO} als numerischer Apertur des mikroskopischen Objektivs. Für den Fall der Überlagerung einer senkrechten mit einer schräg einfallenden Welle berechnet sich die Periode der Interferenzstreifen zu:

$$d = \frac{\lambda}{|\sin(\sigma)|} \quad (2.13)$$

wobei σ der Einfallswinkel ist.

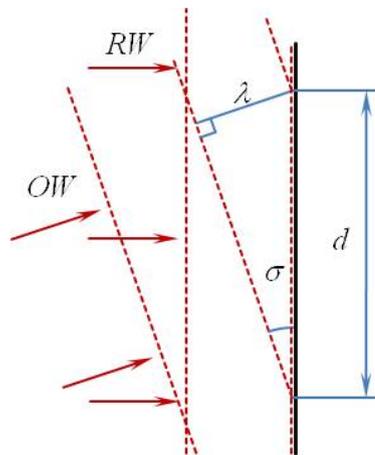


Abb. 2.9: Streifenperiode zweier interferierender Wellen in der In-line Holographie. OW - schräg einfallende Objektwelle, RW - senkrecht einfallende Referenzwelle.

Die Periode der Interferenzstreifen kann auch unter Vorgabe der Brennweiten f'_{MO} und f'_{TL} sowie der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs NA_{MO} nach Gleichung (2.14) bestimmt werden:

$$d = \frac{\lambda \cdot f'_{\text{TL}}}{f_{\text{MO}} \cdot \text{NA}_{\text{MO}}} \quad (2.14)$$

Damit das gesamte Beugungsbild aufgelöst wird, muss folgende Nyquist-Bedingung erfüllt sein:

$$2a_{\text{p}} \leq d = \frac{\lambda \cdot f'_{\text{TL}}}{f_{\text{MO}} \cdot \text{NA}_{\text{MO}}} \quad (2.15)$$

wobei $2a_{\text{p}}$ die Pixelgröße des Detektors ist. Für ein Abbildungssystem, das in der Arbeit verwendet wurde, gelten folgende Angaben: $f'_{\text{TL}} = 120\text{mm}$ und $2a_{\text{p}} = 5,2\mu\text{m}$. Es wurden die maximale Ortsfrequenzen, die noch aufzunehmen sind, nach 2.15 berechnet. Das Ergebnis wird in der Tab. 2.1 dargestellt.

Objektiv	Maximale Raumfrequenz	Periode
MO1: 10×0,21	$f_R = 64,4 \text{ lp/mm}$	$d = 15,5 \mu\text{m}$
MO2: 20×0,35	$f_R = 53,7 \text{ lp/mm}$	$d = 18,6 \mu\text{m}$
MO3: 40×0,65	$f_R = 44,8 \text{ lp/mm}$	$d = 22,2 \mu\text{m}$

Tab. 2.1: Höchste registrierbare Raumfrequenzen und entsprechende Perioden der Interferenzbildes für unterschiedliche Mikroobjektive.

Die Bedingung ist für alle in Tab. 2.1 angegebenen Mikroskopobjektive erfüllt. Die Größe der Pixel des Sensors ist geringfügig kleiner als die ermittelte Periode der Interferenzstreifen, so dass das Array von Pixeln bezüglich seiner Auflösung gut ausgenutzt wird.

2.5 Einfluss der Kamera bei der Digitalisierung des Bildes

Die am meisten gebräuchlichen Lichtsensoren basieren auf CCD- und CMOS-Technologien. Funktionsweise sowohl von CCD – (eng. Charge Coupled Device) als auch von CMOS – (Complementary Metal-oxide Semiconductor) Sensortypen beruht auf dem photoelektrischen Effekt, der Erzeugung von Fotoelektronen im Halbleiter unter Lichteinstrahlung [15]. Der Unterschied besteht im Zugriff auf jeden einzelnen Pixel der Matrix und dementsprechend in der Ausführung des Pixels. Im CCD-Chip werden die erzeugten Ladungen in der p-dotierten Siliziumschicht weitergeleitet. Dazu dient

ein kompliziertes System von Elektroden, die auf die durchsichtige Oxidschicht aufgebracht sind. Das Ablesen der Signalladungen ist grundsätzlich zeilenweise bzw. Pixel für Pixel der Reihe nach möglich. Diese Art von Sensoren besitzt die höchste Empfindlichkeit. Im Vergleich zu den CMOS-Sensoren verbrauchen sie jedoch mehr Strom. Die CMOS-Sensoren haben eine kompliziertere Ausführung jedes Pixels. Jedes Pixel besteht aus einer Fotodiode und Transistoren, die die Zeilen- bzw. Spaltenfreigabe und Reset realisieren. Es existieren auch noch komplexere Varianten, in denen Transistoren für gemeinsame Einzelbildschalter vorhanden sind. Der Hauptvorteil dieser Sensorart ist der freie arbeitsspeicherähnliche Zugang zu jedem Pixel. Das macht die Sensoren besonders attraktiv für die Messkameras, bei denen beliebige Bildbereiche ausgelesen werden können. Die wichtigsten Parameter der Bildsensoren sind: Auflösung, Pixelgröße, Auflösung des Analog-Digital-Wandlers (Quantisierungsstufen), Füllfaktor des Pixels, maximales Signal-Rausch-Verhältnis und Bildrate. In diesem Abschnitt werden der Einfluss von Auflösung, Füllfaktor des Pixels sowie Quantisierung untersucht.

2.5.1 Auflösung der Kamera

Die Auflösung des Sensors ist der wichtigste Parameter für die Anwendungen im Bereich der digitalen Holographie. Sie bestimmt, wie genau das Intensitätsmuster aufgenommen und digitalisiert werden kann. In der Signalverarbeitung lässt sich die Wirkung des Sensors analytisch als eine Faltung des Intensitätsmusters mit einer binären Funktion der lichtempfindlichen Fläche des Pixels [16] auffassen. Die Faltung stellt die Integration der Intensität über die lichtempfindliche Fläche des Pixels dar. Die zweidimensionale pixelweise Abtastung wird durch anschließende Multiplikation mit der Kamm-Funktion analytisch repräsentiert. Dadurch entsteht für die Raumfrequenzkomponenten der Intensitätsverteilung eine periodische Modulationskurve. Für den eindimensionalen Fall ergibt sie sich zu:

$$S_I(x) = \{I(x) \otimes P(x)\} \cdot \text{comb}(x/a_p) \quad (2.16)$$

und im Frequenzbereich zu:

$$\widetilde{S}_I(\nu) = \{\widetilde{I}(\nu) \cdot \widetilde{P}(\nu)\} \otimes \text{comb}(\nu/\nu_x) \quad (2.17)$$

Durch die Multiplikation von $\widetilde{I}(\nu)$ und $\widetilde{P}(\nu)$ entsteht die Modulation des Signalspektrums. Die Multiplikation des Signals im Ortsbereich mit der Kamm-Funktion erzeugt ein diskretes Spektrum. Im Spektralbereich bedeutet das eine Superposition von Spektrumrepliken. Die Periodizität des Spektrums von $\nu_x = 1/a_p$ oder umgekehrte Periode a_p des Pixelrasters. Das Spektrum des aufzunehmenden Signals darf die Bandbreite

$[-\nu_x/2; \nu_x/2]$ der Kamera nicht überschreiten. Ansonsten reichen hochfrequente Spektralanteile einer spektralen Replik in ihre benachbarte Replik hinein und verursachen Störungen, die als Aliasing bezeichnet werden. Da das Intensitätssignal immer reell ist, ist das Spektrum zentralsymmetrisch. Die maximale Raumfrequenz des Signals, die noch ohne Aliasing aufzunehmen ist, beträgt $\nu_x/2 = 1/2a_p$. Diese Bedingung ist als Nyquist-Kriterium bekannt. Im optischen System erfüllt das Abbildungssystem die Funktion des Raumfrequenz-Filters, da sie den Winkelbereich des Signals durch die endliche numerische Apertur einschränkt. Die Aperturfunktion des Pixels $P(x)$ ist bei den meisten Sensoren quadratisch. Es gibt auch andere Ausführungsmöglichkeiten.

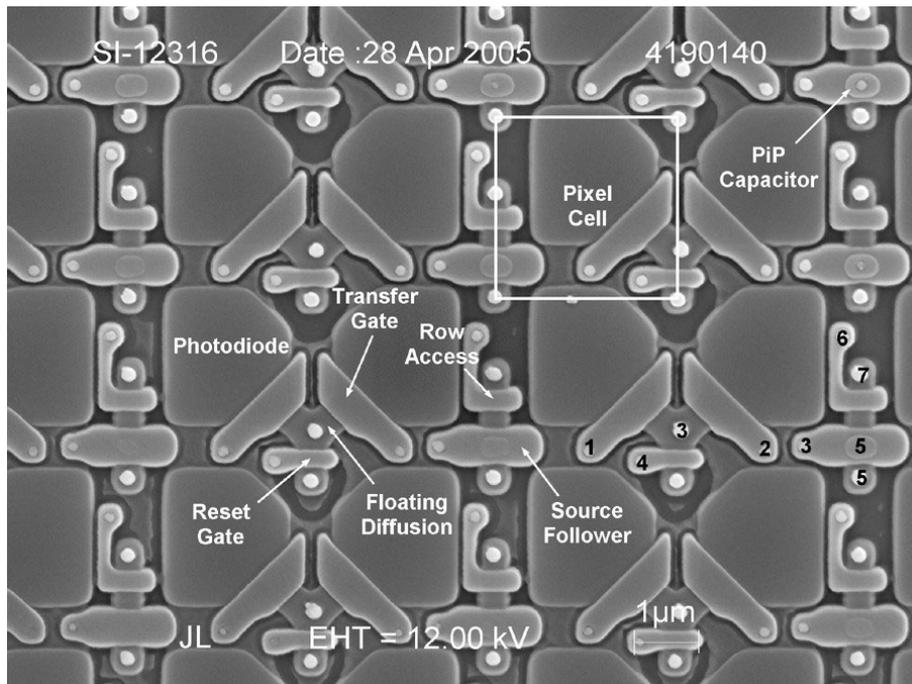


Abb. 2.10: CMOS-Pixel-Ausführung, <http://www.astrosurf.com/luxorion/photonumerique3.htm>

Wenn die Größe der Pixel $P_1(x)$ gleich der Pixelperiode a_p ist, wird das Spektrum $\tilde{I}(\nu)$ mit der sinc-Funktion moduliert, die ihre ersten Nullstellen an den Werten $-\nu_x$ und ν_x hat (Abb. 2.11). Die höheren Frequenzen werden um $2/\pi \approx 0.64$ gedämpft. Wenn der Füllfaktor kleiner ist ($P_2(x)$), verbreitet sich die $\tilde{P}_1(\nu)$ -Kurve nach dem Skalierungssatz der Fourier-Transformation. Die höheren Frequenzen des Spektrums $\tilde{I}(\nu)$ werden weniger gedämpft (s. Abb. 2.11): $-\nu_x/2$ und $\nu_x/2$.

Aus energetischen Gründen versucht man den Füllfaktor zu steigern. Dafür bringt man Mikrolinsenarrays auf den Sensor auf. In der verwendeten Kamera sind keine Mikrolinsen vorhanden. Die lichtempfindliche Fläche ist normalerweise kleiner als die Pixelgröße, deswegen kann man behaupten, dass höhere Raumfrequenzen nah zu den

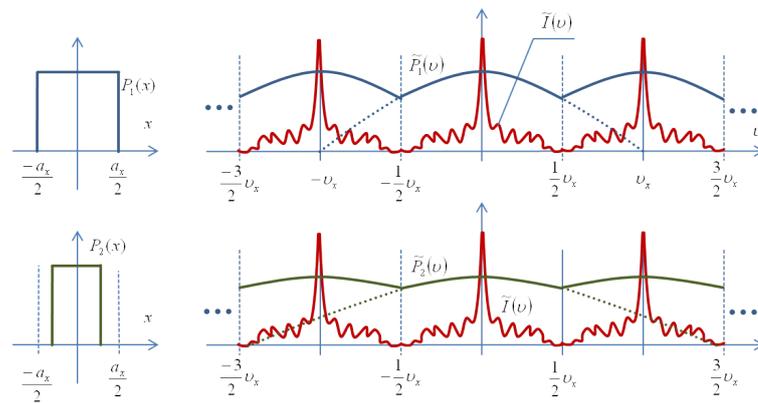


Abb. 2.11: Wirkung des Füllfaktors auf die Modulation des Signalspektrums $\tilde{I}(\nu)$ durch die Pixelübertragungsfunktion $\tilde{P}(\nu)$

Werten $-\nu_x/2$ und $\nu_x/2$ bei der Aufnahme mit der Kamera um weniger als 0,64 gedämpft werden als die niedrigen Raumfrequenzen.

2.5.2 Quantisierung

Bei der digitalen Darstellung des Signals wird die analoge Intensität, die von jedem Pixel aufgenommen wird, in diskrete Digitalwerte umgewandelt. Die Quantisierung verursacht Fehler. Je kleiner das Quantisierungsintervall ist, desto genauer entspricht die aufgenommene Zahlenfolge dem Verlauf des analogen Eingangssignals. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird zur Einschätzung des Quantisierungsfehlers verwendet.

Unter der Bedingung eines starken Signals, wenn die Signalamplitude viel größer als das Quantisierungsintervall ist, nimmt man vereinfacht an, dass der Fehler e_i im Quantisierungsintervall $-\Delta/2; \Delta/2$ stochastisch und gleich ist (Abb. 2.12). Solch ein Rauschen hat eine Leistung von $P(e^2) = \Delta^2/12$ [17]. Im Falle eines auf 1 normierten maximalen Signals beträgt das Quantisierungsintervall $\Delta = 1/2^N$, mit N als Anzahl der Bits.

Die Leistung eines Signals wird anhand eines Hologramms numerisch ermittelt. In Abbildung 2.13 sind die Häufigkeitsverteilung (Histogramm) eines Hologramms und ein Intensitätsprofil als Beispiel des Signals dargestellt. Das Histogramm verdeutlicht, dass die Intensität einen relativ starken konstanten Term hat, was typisch für die In-line-Hologramme ist. Das Histogramm ähnelt sehr einer Normalverteilung.

Die Leistung des Signals wird nach (2.18) bestimmt:

$$P_I(I^2) = \sum_{i=1}^{n_q} (I_i - I_d)^2 \cdot p(I_i), \quad (2.18)$$

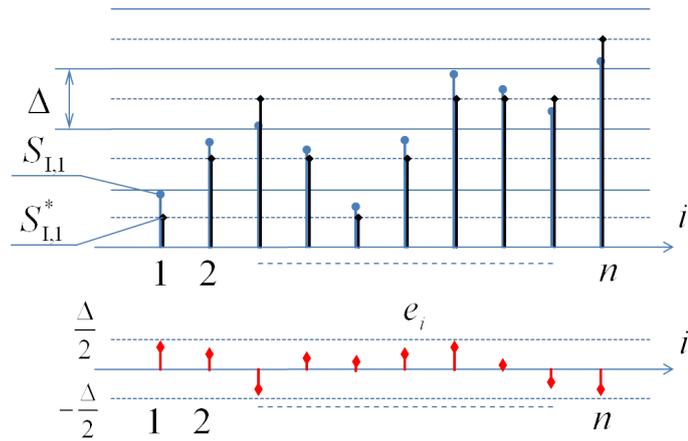


Abb. 2.12: Quantisierungsfehler

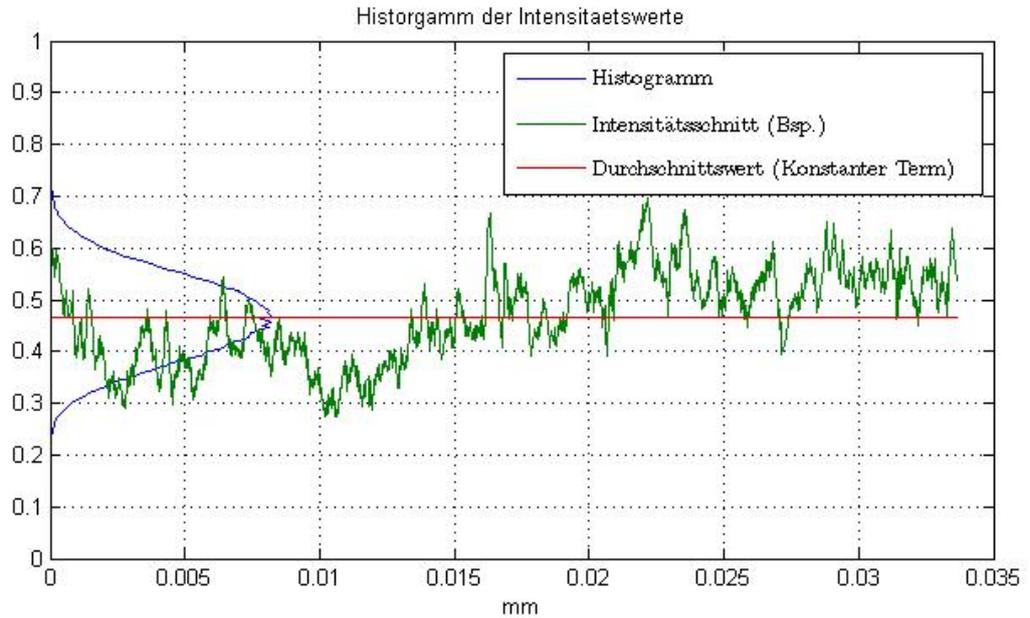


Abb. 2.13: Histogramm der Intensitätswerte eines Hologramms (blau). Intensitätswerte einer Pixelzeile der Hologrammaufnahme (grün); Mittelwert der Intensität über ganze Hologrammfläche (rot).

mit n_q Anzahl der Quantisierungsstufen, I_i mittlere Intensität der Quantisierungsstufe i , I_d mittlere Intensität der Hologrammaufnahme und $p(I_i)$ Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Intensität (Histogramm) sind.

$$\begin{aligned}
 \text{SNR} &= 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{P(I^2)}{P(e^2)} \right) = 10 \cdot \log_{10} (P(I^2) \cdot 2^{2N} \cdot 12) \\
 &= 10 \cdot \log_{10}(P(I^2)) + 20N \cdot \log_{10}(2) + 10 \cdot \log_{10}(12) \quad (2.19) \\
 &\approx 10 \cdot \log_{10}(P(I^2)) + N \cdot 6,02 + 10,8(\text{dB})
 \end{aligned}$$

Nach der Berechnung von $P(I^2)$ mit $N = 8$ bit erhält man ein Signal-Rausch-Verhältnis von $\text{SNR} \approx 61(\text{dB})$. Dieser hohe Wert zeigt, dass der Quantisierungsfehler so gering ist, dass er in den Messungen dieser Arbeit keinen merklichen Einfluss ausübt.

2.6 Numerische Verfahren in der digitalen Holographie – Rayleigh-Sommerfeld-Beugungsintegral

Der Begriff „Beugung“ (diffraction) wurde von Arnold Sommerfeld in seinen Vorlesungen zur Theoretischen Physik (Band IV) als eine Abweichung der Lichtausbreitung von einer geraden Linie hinter einem Hindernis definiert, die weder mit der Brechung noch mit der Spiegelung interpretiert werden kann.

Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Beugung hat schon der holländische Physiker Christian Huygens geleistet. 1678 stellte er in seiner Wellentheorie (Wave Theory), die er der Pariser Akademie der Wissenschaften vorlegte, die These auf, dass die Wellenfront in jedem Punkt, den sie erreicht, eine kugelförmige Welle anregt. Die Fortpflanzung der Lichtwelle ist die Einhüllende aller angeregten Kugelwellen, die aus jedem angeregten Punkt ausgeht. Der nächste wichtige Schritt war die Entdeckung der Interferenz von Thomas Young 1804. Er ergänzte die Wellentheorie mit dem grundlegenden Prinzip der Interferenz. 1818 schrieb Augustin Jean Fresnel einen Artikel, in dem er die Beugungserscheinungen ausführlich als Interferenz kugelförmiger Elementarwellen darstellte. Im darauf folgenden Jahr wurde er mit dem Preis der Pariser Akademie der Wissenschaften ausgezeichnet. 1882 bewies Alfred Kirchhoff analytisch anhand der Maxwellschen Gleichungen, dass die Ideen von Huygens und Fresnel über die Elementarwellen eine ganz logische Schlussfolgerung über die Natur des Lichtes waren. Obwohl Kirchhoffs Thesen ursprünglich für inkonsistent gehalten wurden, stimmen die Ergebnisse der Beugung an einer Apertur mit dem Experiment überraschenderweise sehr exakt überein. Arnold Sommerfeld hat 1894 die Theorie von Kirchhoff mit eigenen Grenzbedingungen modifiziert. Doch die Theorien von Kirchhoff und Sommerfeld sind nur unter wesentlichen Näherungen anzuwenden. Eine davon ist die Vernachlässigung

der vektoriellen Natur, d. h. die Polarisation des Lichtes. Die skalare Theorie liefert trotzdem ziemlich exakte Ergebnisse, wenn zwei Bedingungen erfüllt sind. Die Abmaße der Apertur müssen ein Vielfaches der Wellenlänge betragen und die gebeugte Strahlung darf nicht zu dicht am Aperturrand beobachtet werden. Aus den Maxwell'schen Gleichungen ergibt sich, dass

$$\nabla^2 u(P, t) - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 u(P, t)}{\partial t^2} = 0, \quad (2.20)$$

ist, wobei n der Brechungsindex des Mediums sowie c die Lichtgeschwindigkeit ist und P die Lage des untersuchten Punktes repräsentiert. Die Wellengleichung gilt nur im homogenen Medium. Sie hat dann die gleiche Form sowohl für elektrische \vec{E} als auch für magnetische \vec{H} Feldstärke. In der Skalarnäherung ist sie auch für die einzelnen räumlichen Komponenten der elektrischen und magnetischen Feldstärke gültig.

Durch einen Separationseinsatz kann die zeitliche Abhängigkeit von der räumlichen Verteilung separiert werden. So kommt man zur zeitunabhängigen Helmholtz-Gleichung, die für eine monochromatische Welle gilt:

$$(\nabla^2 + k^2)U = 0, \quad (2.21)$$

Durch die Anwendung des Greenschen Theorems und der Extraktion des Unstetigkeitspunktes P_0 der Greenschen Hilfsfunktion G aus dem Integrationsvolumen bekommt man für $G = e^{ikr_{01}}/r_{01}$ die Gleichung (2.22), die von Helmholtz und Kirchhoff als Integraltheorem bezeichnet wird. Dabei ist r_{01} der Vektor des Radius, der im Punkt P_{01} seinen Ursprung hat, bezüglich der S -Oberfläche, die diesen Punkt umschließt, k die Wellenzahl.

$$U(P_0) = \frac{1}{4\pi} \iint_S \left(G \frac{\partial U}{\partial n} - U \frac{\partial G}{\partial n} \right) ds \quad (2.22)$$

Die Gleichung ermöglicht es, die skalare Erregung im Punkt P_0 zu berechnen, wenn das Feld U auf der geschlossenen Oberfläche S bekannt ist. Durch eine geeignete Wahl von S kann man nur die von der Aperturfläche ausgehende Strahlung berücksichtigen. Die Strahlung des anderen Teils von S kann vernachlässigt werden (Sommerfeld'sche Strahlungsbedingung [18, 19]). Die Aperturfläche wird in zwei Teile unterteilt: die Öffnung und den Teil, der außerhalb dieser Öffnung liegt. Beim Einsetzen $U(P_1) = A \exp(ikr_{21})/r_{21}$ in (2.22) erhält man unter Berücksichtigung der Annahmen $k \gg 1/r_{21}$ und $k \gg 1/r_{01}$ die Gleichung 2.23. Sie wird als Kirchhoff-Fresnel'sches Beugungsintegral einer Punktquelle bezeichnet. Für eine punktförmige Quelle im Punkt P_2 lautet sie:

$$U(P_0) = \iint_{\Sigma} U'(P_1) \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}} ds, \quad (2.23)$$

mit

$$U'(P_1) = \frac{1}{i\lambda} \left[\frac{A \exp(ikr_{21})}{r_{21}} \right] \left[\frac{\cos(\vec{n}, r_{01}^{\vec{r}}) - \cos(\vec{n}, r_{21}^{\vec{r}})}{2} \right], \quad (2.24)$$

wobei Σ die Apertur ist, r_{01} und r_{02} die Abstände zwischen der Punktquelle P_1 , dem Flächenelement ds sowie dem Beobachtungspunkt P_0 und ds sind. Aus (2.23) ist ersichtlich, dass die Anregung in P_0 sich aus der Überlagerung von sphärischen Elementarwellen $\exp(ikr_{01})/r_{01}$ ergibt, die ihren Ursprung in der Öffnung Σ haben. Das bestätigt analytisch das Huygenssche Prinzip. In seiner Beugungstheorie fordert Kirchhoff auch, dass das Feld U als auch seine erste Ableitung $\partial U/\partial n$ außerhalb der Öffnung gleich Null sind. Diese von Kirchhoff streng vorausgesetzten Grenzbedingungen physikalisch nicht erfüllt werden können [20–23]. In [22] stellen die Autoren dar, dass die Kirchhoff-Theorie nur für den Fall gültig ist, dass die Apertur viel größer als die Wellenlänge ist. Arnold Sommerfeld stellt in seiner Theorie eine neue Rechenmethode vor, die auf dem Rayleigh-Integral basiert [24] und unter der Bezeichnung Rayleigh-Sommerfeld-Beugung bekannt ist. Der Unterschied zur Kirchhoffschen Theorie liegt in den Randbedingungen. Sie werden mit Einsatz von modifizierten Greenschen Funktionen 2.25 und 2.26 erfüllt. Jede der beiden Greenschen Funktionen beschreibt jeweils zwei Punktlichtquellen. Beide Punktlichtquellen sind auf der optischen Achse symmetrisch zur Aperturfläche angeordnet und haben entsprechend Koordinaten r_{01} und \tilde{r}_{01} . Diese Lage von Punktlichtquellen stellt sicher, dass die Aperturebene eine besondere Ebene für beide Funktionen ist. Dort ist das Feld der „Minus“-Funktion oder die Normalableitung von der zweiten Funktion gleich Null. Zwei Arten der Randbedingungen können formuliert werden, bei welcher entweder die Normalableitung $\partial U/\partial n$ oder das Feld U jeweils außerhalb der Apertur Σ gleich Null sind. Diese Randbedingungen erfüllen die Bedingungen der skalaren Beugungstheorie, der Homogenität des Skalarfeldes und auch der Sommerfeld'schen Ausstrahlungsbedingung [18]:

$$G_-(P_0) = \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}} - \frac{\exp(ik\tilde{r}_{01})}{\tilde{r}_{01}} \quad (2.25)$$

$$G_+(P_0) = \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}} + \frac{\exp(ik\tilde{r}_{01})}{\tilde{r}_{01}} \quad (2.26)$$

Beim Einsetzen beider Funktionen in 2.22 bekommt man die beiden folgenden Integrale:

$$U_{\text{I}}(P_0) = \frac{-1}{4\pi} \iint_{\Sigma} U \frac{\partial G_-}{\partial n} ds \quad (2.27)$$

$$U_{\text{II}}(P_0) = \frac{1}{4\pi} \iint_{\Sigma} \frac{\partial U}{\partial n} G_+ ds \quad (2.28)$$

Am besten verwendbar ist das erste Integral (2.27). Nach der Umstellung bekommt man folgenden Ausdruck:

$$U_{\text{I}}(P_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U(Q) \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}} \cos(\xi) ds, \quad (2.29)$$

wobei Q ein Punkt der Aperturfläche, ξ der Winkel zwischen der Normalen der Aperturfläche und von $\overline{QP_0}$ sowie $r_{01} = |\overline{QP_0}|$ sind.

2.6.1 Beugungsapproximationen

Weiterhin werden die beiden wichtigsten Approximationen eingeführt, die in der Optik von größter Bedeutung sind. Für $r_{01} \gg \lambda$ ist, dann kann $r_{01} = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2} + z^2$ auf die zwei ersten Terme der Taylor-Reihe reduziert werden, um die Wurzel aufzulösen:

$$r_{01} \approx z \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{x - x_0}{z} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{y - y_0}{z} \right)^2 \right] \quad (2.30)$$

mit $\cos(\xi) = \frac{z}{r_{01}}$

$$U(x, y) = \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \iint_{\Sigma} U(x_0, y_0) \exp \left\{ i \frac{k}{2z} [(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2] \right\} dx_0 dy_0 \quad (2.31)$$

Bei dieser Darstellung erkennt man das Huygens-Prinzip schon deutlicher. Der Term $\exp\{ik/2z[(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2]\}$ stellt den Faltungskern in Form der elementaren Welle dar, die eine parabolische Näherung ist. Dieses Integral bezeichnet man als Fresnel-Beugungsintegral. Die parabolische Form der Elementarwelle ist eine kritische Stelle, die die Grenzen der Anwendbarkeit bestimmt. Bei der Auflösung der Wurzels (2.30) wurden alle Terme aus der Taylor-Reihe außer den ersten zwei weggelassen. Der größte der vernachlässigten Terme ist der dritte $\frac{x^2}{8}$ -Term. Eine mögliche Methode zur

Bestimmung der Gültigkeitsgrenzen der Näherung ist die Abschätzung dieses Terms. Wenn dieser viel kleiner als der Radiant ist, dann ist das Integral gültig.

$$\begin{aligned} & \frac{kz}{8} \left(\frac{(x-x_0)^2}{z^2} + \frac{(y-y_0)^2}{z^2} \right)^2 \\ &= \frac{\pi}{4\lambda z^3} \left((x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 \right)^2 \ll 1 \end{aligned} \quad (2.32)$$

$\{x_0, y_0\}$ und $\{x, y\}$ sind die Koordinaten der jeweils am weitesten entfernten Punkte auf der Apertur- und Beobachtungsebene. Wenn diese Bedingung erfüllt wird, kann das komplexe Feld im Punkt $\{x, y\}$ der Beobachtungsebene noch mit ausreichender Genauigkeit unter Anwendung dieser Approximation bestimmt werden.

Nach einer anderen Abschätzung kann das Feld $U(x, y, z)$ mit guter Übereinstimmung im Punkt $P\{x, y, z\}$ in der Beobachtungsebene berechnet werden, für welche ein kreisförmiger Teil der Apertur mit einem Durchmesser von $4\sqrt{\lambda z}$ durch die Ränder nicht abgeschattet wird. In [18] wird gezeigt, dass dieser Teil der Apertur einen wesentlichen Beitrag in die Abplitude im Punkt $P\{x, y, z\}$ liefert. Um eine analytische Darstellung von speziellen Fällen zu ermöglichen, wird das Integral (2.31) weiter umgestellt:

$$\begin{aligned} U(x, y) &= \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)\right) \\ & \iint_{-\infty}^{\infty} \left\{ U(x_0, y_0) \exp\left(i\frac{k}{2z}[x_0^2 + y_0^2]\right) \right\} \exp\left(i\frac{2\pi}{z\lambda}[x_0x + y_0y]\right) dx_0 dy_0 \end{aligned} \quad (2.33)$$

In (2.33) ist der Integrationsbereich auf Unendlich unter der Voraussetzung geändert, dass (2.32) erfüllt wird. Dies ist eine allgemeine Darstellung des Integrals. Sie betrifft den Fall, dass das Signal $U(x_0, y_0)$ durch eine endliche Apertur räumlich begrenzt ist oder dass das Licht an unendlichen Beugungsstrukturen wie unendlichen Gittern unter kleinen Winkeln gebeugt wird. Der Faktor $\exp((ik/2z)[x_0^2 + y_0^2])$ in (2.33) strebt gegen 1 und kann vernachlässigt werden, wenn die Bedingung (2.34) für die äußersten Punkte $x_0; y_0$ der Apertur erfüllt wird.

$$\frac{k}{2z} [x_0^2 + y_0^2] \ll 1 \quad (2.34)$$

So gelangt man zur zweiten wichtigsten Approximation, die man als Fraunhofer-Beugung bezeichnet:

deleted 19.09.15 begin

$$U(x, y) = \frac{\exp(ikz)}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{k}{2z}(x^2 + y^2)\right) \iint_{-\infty}^{\infty} U(x_0, y_0) \exp\left(i\frac{2\pi}{z\lambda}[x_0x + y_0y]\right) dx_0 dy_0 \quad (2.35)$$

Durch Substitution von $f_x = x/(\lambda z)$ und $f_y = y/(\lambda z)$ bekommt man:

$$U((f_x\lambda z), (f_y\lambda z)) = \exp(ikz) \cdot \exp(i\pi\lambda z(f_x^2 + f_y^2)) \iint_{-\infty}^{\infty} U(x_0, y_0) \exp(2\pi i[f_x x_0 + f_y y_0]) dx_0 dy_0 \quad (2.36)$$

Die ist eine sehr attraktive analytische Darstellung der Beugung in Form der Fouriertransformation für das Feld $U(x_0, y_0)$, die oft als die Fernfeldbeugung (Far-field Diffraction) bezeichnet wird. Für die Abschätzung der Gültigkeit des Integrals verwendet man auch ein einfaches Kriterium:

$$\frac{2D^2}{\lambda z} < 1, \quad (2.37)$$

wobei D die Dimension der Apertur ist.

2.6.2 Näherungen für die numerische Propagation

Das Ziel dieses Abschnittes ist es, eine optimale Rechenmethode für die numerische Rekonstruktion zu finden. Die Rekonstruktion erfolgt durch die numerische Propagation der Strahlung, die am Hologramm gebeugt wird. Die Gültigkeitskriterien für die Fresnel- bzw. Fraunhofer-Näherung wurden im vorangegangenen Abschnitt dargestellt. Kritisch für die Fresnel-Approximation ist der Beugungswinkel. Bei höheren Ausbreitungswinkeln weicht die parabolische Wellenfront von der sphärischen wesentlich ab. Im Rahmen dieser Arbeit muss das Rechenverfahren eine gute Näherung im Winkelbereich bis zum Öffnungswinkel des Abbildungssystems haben. Es wird mittels 2.32 bestimmt, ob der Fehler der Fresnelschen Näherung für den Betrag im Punkt P , der vom Punkt Q in der Hologrammebene ausgeht, groß ist. Es wird angenommen, dass der Vektor r_{01} den Winkel ξ mit der optischen Achse bildet, der dem Öffnungswinkel des Abbildungssystems gleich ist. Für den Abstand $z = 300 \mu\text{m}$, der Wellenlänge $\lambda = 0.65 \mu\text{m}$ und der numerischen Apertur $\text{NA} = 0.21$ erhält man

$\rho = z \tan(\xi) = (z \cdot \text{NA}) / \sqrt{1 - \text{NA}^2} \approx 64 \mu\text{m}$ Das ergibt $(\pi\rho^4)/(4\lambda z^3) \approx 0.77$. Das Ergebnis weist darauf hin, dass die parabolische Näherung bei einem solch großen Winkel zu einem großen Fehler führt.

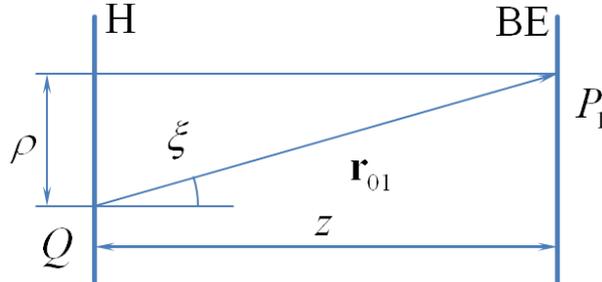


Abb. 2.14: Bestimmung der Gültigkeit der Fresnelschen Approximation. H - Hologrammebene, BE - Beobachtungsebene

Die Fraunhofersche Approximation erzielt gute Ergebnisse, wenn der Abstand viel größer als die Apertur des Hologramms ist. Da die Propagation in dieser Arbeit auf Distanzen ermittelt werden muss, die mit Dimensionen des Hologramms vergleichbar sind, passt diese Approximation nicht. Die günstigste Rechenmethode ist die Anwendung des Rayleigh-Sommerfeld-Integrals. (2.29) kann als Faltungsintegral dargestellt werden [25]:

$$\begin{aligned} U(x, y) &= \iint_A U(x_0, y_0) h(x - x_0, y - y_0, z) dx dy \\ &= U(x_0, y_0) \otimes h(x - x_0, y - y_0, z) \end{aligned} \quad (2.38)$$

mit

$$h(x - x_0, y - y_0, z) = \frac{\exp(ikr_{01})}{2\pi r_{01}} \frac{z}{r_{01}} \left(\frac{1}{r_{01}} + ik \right), \quad (2.39)$$

wobei $r_{01} = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + z^2}$ und A der Integrationsbereich ist. In [25] führt man Simulationen auch bei sehr kleinen Propagationsabständen durch, die mit der Wellenlänge vergleichbar sind. Deswegen verwenden die Autoren den Faltungskern nach (2.39). In der vorliegenden Arbeit beträgt die minimale Propagationsdistanz einige hundert Mikrometer. Deswegen kann $(1/r_{01} + ik)$ unter der Bedingung $r_{01} \gg \lambda$ auf ik reduziert werden [18, 26, 27]. Somit erhält man

$$\begin{aligned}
 U(x, y) &= \frac{1}{i\lambda} \iint_A U(x_0, y_0) h(x - x_0, y - y_0, z) dx_0 dy_0 \\
 &= U(x_0, y_0) \otimes h(x - x_0, y - y_0, z)
 \end{aligned}
 \tag{2.40}$$

mit

$$h(x - x_0, y - y_0, z) = \frac{z \exp(ikr_{01})}{r_{01}^2}.
 \tag{2.41}$$

Weil die Faltung durch das FFT-Verfahren (FFT – Fast Fourier Transform, schnelle Fourier-Transformation) realisiert wird, wird das Verfahren als FFT-direkt-Integration (FFT-DI-Verfahren) [25], [28] bezeichnet. Eine alternative Rechenmethode ist das Winkelspektrum-Verfahren (AS-Methode), [25]. Es ermöglicht, die Propagation direkt im Spektralbereich durchzuführen:

$$\tilde{U}\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, z\right) = \tilde{U}\left(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0\right) \cdot \exp(ikz\sqrt{1 - \alpha^2 - \beta^2}),
 \tag{2.42}$$

wobei $\tilde{U}(\alpha/\lambda, \beta/\lambda, z)$ das Spektrum des propagierten Signals, $\tilde{U}(\alpha/\lambda, \beta/\lambda, 0)$ das Spektrum des Signals auf der Aperturebene und α, β die Richtungskosinuse sind [25]. In der vorliegenden Arbeit wird Faltungsverfahren eingesetzt. Die Impulsantwortfunktion wird durch Apodisation im Raumbereich einschränkt.

2.7 Stand der Technik

Die Ermittlung der 3D-Lage von Mikropartikeln innerhalb eines Volumens ist z. B. bei der Untersuchung von Einzellern [7, 29, 30], der Verteilung von Partikelgrößen [31], der Untersuchung von Mikroobjekten [28], der Ermittlung der Fangkraft einer optischen Pinzette [32], der Fluidtechnik [12, 30, 33], der Vermessung von lokalen Viskositäten [34] oder der Untersuchung von Brown'schen Bewegungen [35] notwendig.

Das Prinzip der digitalen In-line-Holographie ist sehr robust und einfach. Die hohe Leistungsfähigkeit des Verfahrens der digitalen Holographie wird durch unterschiedliche Rekonstruktionsverfahren deutlich. Die klassische Beugungsrekonstruktion des Hologramms ist eine numerische Realisierung des Rekonstruktionsvorgangs eines Analoghologramms in Form numerisch durchgeführter Algorithmen. Die numerische Propagation des komplexen Feldes mittels des Rayleigh-Sommerfeld Integrals liefert nicht nur die Information über die Lage des Objektes [9, 12, 13, 35–37], sondern auch über seine Struktur [8, 29, 38–40]. In [41] demonstrieren die Autoren die Möglichkeit zur

Ermittlung des Partikelmediums mit Hilfe von nichtlinearen physikalischen Effekten. Die Ermittlung des Brechungsindex ist mit einem anderen Rekonstruktionsverfahren möglich, das auf der Mie-Streuung beruht [10, 11, 31, 33, 34]. Das von einem sphärischen Mikropartikel gestreute Licht kann analytisch exakt bestimmt werden, wenn sein Durchmesser und Brechungsindex bekannt sind. Das bietet die entgegengesetzte Möglichkeit, diese Parameter, neben den drei Koordinaten x , y und z des Hologramms, zu bestimmen. Hervorragende Ergebnisse wurden in der Genauigkeit des Verfahrens bei der gleichzeitigen Bestimmung von Partikelparametern und Koordinaten [11] erzielt. Die Aufgabe des Verfahrens ist es, die beste Übereinstimmung zwischen den numerisch berechneten und den vorhandenen Interferenzmustern zu finden. Die iterative Zusammenstellung ist sehr rechenintensiv, wodurch das Verfahren für Echtzeit-Anwendungen kaum geeignet ist, da die Rechenzeit direkt proportional zur Partikelzahl im Sichtfeld ist. Darüber hinaus muss das Partikel eine möglichst ideale sphärische Form haben [31, 34]. Die lebendigen Zellen haben keinen bestimmten Brechungsindex, da ihre innere Struktur nicht homogen ist. Deswegen treffen auf die Analyse lebendiger Zellen nicht alle Vorteile des Verfahrens zu.

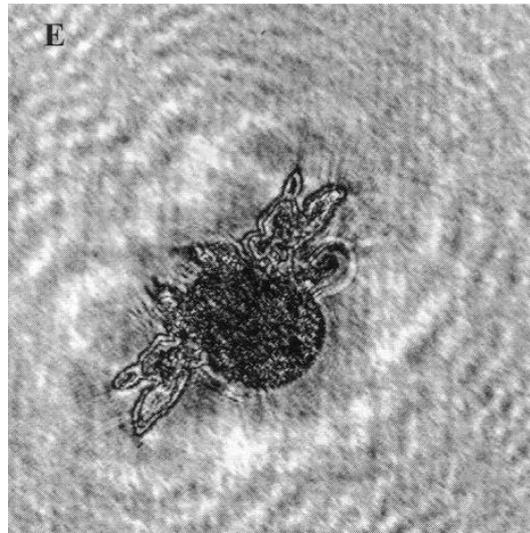


Abb. 2.15: Copepod nauplius. Größe ca. $100\ \mu\text{m}$. In-line-DH-Rekonstruktion [8, Abb. 8(E)].

Eine interessante Art iterativer Algorithmen ist in [42, 43] dargestellt. Die Verfahren ermöglichen zwillingsbildfreie Rekonstruktionen komplexer 3D-Strukturen. Obwohl die Verfahren ausgezeichnete Ergebnisse zeigen, besteht das Problem der langen Rechenzeit. Eine andere Eigenschaft ist die so genannte „sparsity approximation“. Unter dieser Annäherung versteht man, dass die dünnen oder punktförmigen Objekte sich weit genug voneinander entfernt befinden sollen, so dass Interferenzen zwischen den von Objekten gestreuten Wellen vernachlässigt werden können. Das führt zur Annahme, dass das Hologramm eine lineare Superposition einzelner Beugungsmuster ist. Ein

Wavelet-ähnliches iteratives Verfahren ist in [44] dargestellt und zeigt die Möglichkeit zur Bestimmung der Koordinaten und des Radius eines absorbierenden sphärischen Partikels.

Die Wavelet-Transformation ermöglicht es, die Stellen mit dem Beugungsmuster eines Mikropartikels zu detektieren. Dazu benutzt man eine sogenannte Mutter-Funktion, die dem Beugungsmuster des Partikels ähnlich sein muss. Da die Skalierung der Mutter-Funktion im Wavelet-Verfahren durch einen a -Parameter vorgesehen wird, ermöglicht das Verfahren die Bestimmung des Abstandes zum Partikel. Bei Verwendung der Wavelet-Transformation muss man die geeignetste Mutter-Funktion des Wavelets entwickeln, die den konkreten Eigenschaften des Beugungsmusters der Partikel in unterschiedlichen Distanzen entspricht. Die Wavelets in [36, 45] wurden unter der Annahme entwickelt, dass die Abmaße der Partikel vernachlässigbar klein sind.

Das Auftreten des Zwillingsbildes bei der Rekonstruktion ist eine Eigenschaft der In-line-Holographie. Es gibt in der In-line-Holografie unterschiedliche Verfahren für die Beseitigung des Zwillingsbildes. In [46] erläutern die Autoren das Verfahren der inhomogenen Specklebeleuchtung. Nach der Rekonstruktion und Überlagerung von mehreren Hologrammen wird das zufällige Zwillingsbild vernachlässigbar schwach. Das Verfahren zeigt gute Ergebnisse, trotzdem benötigt es für die statistische Mittelung eine große Anzahl von Hologrammen mit unabhängigen Specklemustern der Beleuchtung. Die Kenntnis über die Phase der Beleuchtung ist nicht notwendig. Die Funktionsweise eines anderen Verfahrens beruht ebenfalls auf der zufälligen kohärenten Specklebeleuchtung [39]. Da die zufällige Phase bekannt sein muss, braucht man nur eine Aufnahme. Das Zwillingsbild wird über eine wesentlich größere Fläche gestreut als bei der Rekonstruktion eines klassischen In-line-Hologramms. Außerdem wird die Schärfentiefe verbessert.

Ein geschicktes Verfahren wird in [47] vorgestellt: Bei der Aufnahme der Hologramme auf zwei unterschiedlichen axial versetzten Ebenen gibt es die Möglichkeit, das Zwillingsbild bei der Rekonstruktion zu eliminieren. Die Autoren zeigen analytisch, dass eine numerische Entfaltung erforderlich ist, um die Rekonstruktion durchzuführen. Die Entfaltung ist in der Praxis sehr empfindlich gegen das Rauschen und man braucht eine besondere Herangehensweise bei der numerischen Lösung.

Eine Art von Phase-shifting-Interferometrie ist in [48] realisiert. Dabei wird die Phase der kohärenten Beleuchtung relativ zu der von den Objekten gestreuten Strahlung verschoben. Das Zwillingsbild wird dadurch beseitigt. Das Verfahren ist allerdings technisch relativ kompliziert.

Die inhomogene Beleuchtung ist eine einfache Maßnahme zur Verbesserung der Auflösung, wie schon in [39] gezeigt wurde. Das kann so aufgefasst werden, dass das Objekt „von allen Seiten“ unter unterschiedlichen Winkeln beleuchtet wird, was zur Erfassung höherer Raumfrequenzen in der Aufnahmeebene führt. Von Bedeutung ist es, bei der Rekonstruktion die kohärente Beleuchtungswelle numerisch genau anzugeben, da sie als Referenzwelle benutzt wird. Die mit einem pin-hole-array erzeugte

inhomogene Beleuchtung ist dafür eine mögliche Variante [49].

Unter bestimmten Voraussetzungen kann das Zwillingsbild vernachlässigt werden [7, 29, 37]. Das ist eine Eigenschaft der punktförmigen Beleuchtung. In anderen Fällen [12, 36, 50] erfolgt eine nichtlineare Behandlung. Das beseitigt das schwache Rauschen im Hintergrund, das von dem Zwillingsbild verursacht wird.

Die gleichzeitige optische Manipulation und die dreidimensionale Erfassung der Position des Objektes ist durch viele unterschiedliche Verfahren möglich. Die Beobachtung der Partikel auf zwei senkrechten Ebenen wird in [51, 52] präsentiert. In vielen Beiträgen geht es um die Ermittlung von Partikelkoordinaten durch XY-Positions- und Intensitätsänderung der Partikelabbildung in Abhängigkeit der Tiefe [40, 53, 54]. Auch interferometrische off-axis Verfahren zur Zellenabbildung und -verfolgung sind im Einsatz [55, 56].

Die mit der In-line-DH verknüpfte optische Manipulation ist in [32–34] dargestellt. In den Beiträgen beschäftigen sich die Autoren mit der Ermittlung der Partikellage mit Hilfe der Mie-Streuung. In [13, 57] wird eine Faltungsholographie mit der optischen Pinzette gezeigt.

Ein Teil dieser Arbeit wird der axialen Auflösung bei der Rekonstruktion von in-line-digitalen Hologrammen gewidmet. Dabei geht es auch um die Thematik des Standes der Technik. Es gibt viele Angaben über die Genauigkeit von Mie-Hologrammen. Die Genauigkeit der Lagebestimmung kann 1 nm bis 10 nm in der Querauflösung und bis 10 nm in der axialen Auflösung [11, 14, 32, 58] betragen. Die Entfaltungsholographie zeigt vergleichbare Ergebnisse [35]. In diesem Verfahren rekonstruiert man nicht die Wellenfront, sondern ermittelt man die Stellen im Hologramm, wo ein bestimmtes Intensitätsmuster vorkommt. Das Muster soll einem Partikel in einer bestimmter Tiefenlage entsprechen. Die Genauigkeit der In-line-Holographie mit der Rekonstruktion anhand der Beugung ist geringer. In [36] führen die Autoren eine Simulation und ein Experiment zur Ermittlung der Genauigkeit durch. Sie hängt von vielen Parametern wie Abstand und Partikelkonzentration ab und nach dem Experiment mit 30 μm -Partikeln beträgt die Standardabweichung für die gefundene z-Koordinate 180 μm . Die Autoren von [9] berichten über die Ermittlung der Genauigkeitsgrenzen bei der In-line DH-Rekonstruktion durch eine Simulation und ein Experiment. Der Fehler bei der Koordinatenermittlung entlang der optischen Achse beträgt 1 mm für 320 μm -Partikel in Entfernung von 200 mm bis 300 mm. In [8] werden die Ergebnisse der Ermittlung der Form und Größe der 3D-holographischen Abbildung von Mikropartikeln bei Verwendung von unterschiedlichen Mikroobjektiven dargestellt. Die Länge und der Durchmesser der elliptischen gestreckten 3D-Partikelabbildung kann als Maß der Quer- bzw. Längsauflösung der Verfahren dienen. Die Autoren haben experimentell bestätigt, dass die axiale Auflösung durch Verwendung von Vergrößerungsoptiken verbessert wird. Die axiale Auflösung in diesem Fall steigt um eine Grössenordnung des Abbildungssystems im Vergleich zur klassischen linslosen In-line-DH. Die Genauigkeit der In-line Holographie mit Rekonstruktion anhand von Beugung ist geringer. Die axia-

le Auflösung 6 mal höher als Dimension des Partikels [9, 36] bei linsenlosen Systemen und kann durch die Anwendung von Abbildungssystemen verbessert werden [8].

Die Ermittlung der Partikellage durch Eigenschaften des rekonstruierten komplexen Feldes wie das Verhalten der Phase und des imaginären Teils der Partikelabbildung [59, 60] verbessern deutlich die axiale Genauigkeit der Partikeldetektion.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass manche Aspekte bezüglich des Aufbaus für In-line-DH noch besser untersucht werden müssen. Durch die Untersuchung des Blendeneinflusses im Abbildungssystem auf das Strahlbündel kann ein 3D-Objektvolumen bestimmt werden, in dem keine asymmetrische Abschattung des von Partikeln gestreuten Lichtes innerhalb des ganzen Volumens stattfindet. Durch die Wahl der optimalen partiell-kohärenten Beleuchtung kann das Hintergrundrauschen unterdrückt werden, wobei die wichtigsten hochfrequenten Komponenten des Beugungsmusters noch vorhanden sind. Eine Untersuchung der Genauigkeit bei der Rekonstruktion mit verschiedenen Verfahren für unterschiedliche Partikel und Variationen des Abbildungssystems könnte Stärken und Schwächen der verschiedenen Kombinationen des optischen Systems und des Rekonstruktionsverfahrens aufzeigen. Eine umfangreiche Studie wurde in den oben angegebenen Quellen nicht durchgeführt und erfolgt deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Es gibt nicht viele Beispiele für die Anwendung von optischen Pinzetten im Aufbau der In-line-digitalen Holographie. Dies trifft noch weniger für die klassische In-line-Holographie zu. In dieser Dissertation wird die Leistungsfähigkeit eines neuen optischen Manipulationsverfahrens geprüft, das ein neues freiformoptisches Element für die Fangstrahlformung enthält.

3 Optische Pinzetten – Grundlagen und Stand der Technik

Die Wirkung des Lichtes auf kleine Partikeln ist schon seit langem bekannt. 1870 berichtete John Tyndall über die Existenz eines staubfreien Raumes dicht an der Oberfläche glühender Körper. Diese Erscheinung hat den Namen Thermophoresis [61] und beruht auf der Entstehung einer Kraft bei einer räumlichen Temperaturdifferenz [62]. Anfang des 20. Jahrhunderts veröffentlichte der österreichische Physiker Felix Ehrenhaft die Ergebnisse seiner Studie von kleinen Mikropartikeln im Gasmedium. In seiner Arbeit schlug er den neuen Term Photophoresis vor. Er unterschied auch zwischen positiver und negativer Photophoresis in Abhängigkeit des Temperaturunterschiedes an der Partikeloberfläche. Ist das Partikel absorbierend, hat seine vordere Seite höhere Temperatur als die hintere und wird es in Richtung der Lichtausbreitung weggedrückt. Diese Erscheinung wird als positive Photophoresis bezeichnet. Falls das Partikel durchsichtig ist, wird die Strahlung teilweise auf der hinteren Seite fokussiert, was zu ihrer Aufheizung führt. Der umgekehrte Temperaturunterschied erzeugt eine Kraft entgegengesetzt der Richtung der Lichtausbreitung. Dieses Phänomen nennt man negative Photophoresis. Ein gutes Beispiel von der Anwendung der Photophorese wird in [63] dargestellt. Mit zwei konvergierenden, sich entgegengesetzt ausbreitenden Strahlen erzeugt man in einem gesamten fokalen Schnittpunkt ein Gebiet mit geringerer Intensitätsdichte im gemeinsamen Zentrum. In einem solchen optischen Käfig kann ein absorbiertes Partikel in der Luft festgehalten werden.

Als Beginn der bis heute andauernden rasanten Entwicklung auf dem Gebiet des optischen Fangens (Optical trapping) zählt die Veröffentlichung von Arthur Ashkin [64]. In diesem Artikel erläutert der Autor ein Modell der Entstehung der optischen Falle für durchsichtige Partikeln. Das Modell beruht auf dem Erhaltungssatz des Lichtimpulses (Abb. 3.1).

Das Grundprinzip des Modells lässt sich wie folgt erklären: Es sei eine ebene Welle, die unter einem Winkel auf die Grenzoberfläche s zwischen zwei Medien mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 trifft. Die Refraktion oder Änderung der Ausbreitungsrichtung des Lichtes erzeugt eine Kraft am Oberflächensegment. Auf dem Bild (Abb. 3.1) ist die auf dem Oberflächensegment ds erzeugte Kraft dF beim Lichtbrechen zu sehen. Integriert man alle Kraftbeiträge dF der Brechung und Spiegelung über die ganze Oberfläche des durchsichtigen Festkörpers (Partikels), bekommt man die gesamte Kraft, die auf den Körper wirkt. In der Literatur ist das Verfahren unter dem Namen

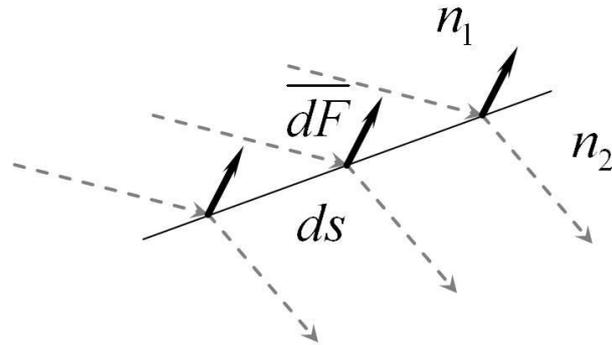


Abb. 3.1: Impulserhaltungssatz bei der Refraktion. Lichtausbreitung (grau), Kraft (schwarz)

Ray optic calculation [62] bekannt. Mit diesem Modell erklärte der Autor die Entstehung der Gleichgewichtskraft in der optischen Falle für stark konvergente oder sich in Gegenrichtungen ausbreitenden (Counterpropagating) Strahlen. In seinem Werk stellt Arthur Ashkin auch die Nachteile des Verfahrens vor. Für kleine Partikeln mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern vernachlässigt es vollkommen die Beugungerscheinungen. Doch für Partikeln größer als ca. $10 \mu\text{m}$ ist diese Abweichung gering [65]. Das Verfahren kann in diesem Fall für die Berechnung der Kräfte benutzt werden. Die gesamte Kraft \overline{F}_{Σ} kann immer als Superposition von zwei Kräften dargestellt werden. Die erste wirkt in Richtung der Lichtausbreitung und stimmt dementsprechend mit dem Poynting-Vektor \overline{S} oder mit der Normalen der Phasenfläche überein. Die Kraft bezeichnet man als Streukraft \overline{F}_{Σ} (Abb. 3.2). Die Kraft, die in Richtung des Intensitätsgradienten wirkt, nennt man Gradientenkraft (\overline{F}_G). Das dargestellte Kräftesystem erklärt das Verhalten einiger optischer Systeme für optische Manipulation. Die optische Falle kann im Fokuspunkt eines stark fokussierten Strahls erzeugt werden. Damit die axiale Gradientenkraft höher als die Streukraft ist, muss die Stelle des Fokus möglichst klein sein. Dadurch erhöht sich auch die Querkomponente der Gradientenkraft. Diese Systeme zeigen die maximale Steifigkeit der optischen Falle in allen Richtungen. Wenn die strahlformenden Optiken keine ausreichend hohe numerische Apertur besitzen, ist die optische Falle nicht klein genug. Dann sinkt der Intensitätsgradient im Bereich des Fokuspunktes. Die Streukraft in Richtung der Strahl- ausbreitung überwiegt in diesem Fall. Diese kann wiederum mit einem sich in Gegen- richtung ausbreitenden Strahl ausgeglichen werden. Solche Systeme mit gegenläufigen Strahlen heißen Counter-propating-beam-Systeme. Wegen ihrer niedrigeren Streukraft haben sie auch eine geringere Quersteifigkeit der optischen Falle. Die bekanntesten op- tischen Systeme für die Mikromanipulation arbeiten mit einem einseitigen, stark fokus- sierten Laserstrahl. Man bezeichnet das oft als single beam trap. Die numerische Aper- tur liegt normalerweise im Bereich von 1 bis 1,4 [64, 66–69]. In den meisten Fällen, wie

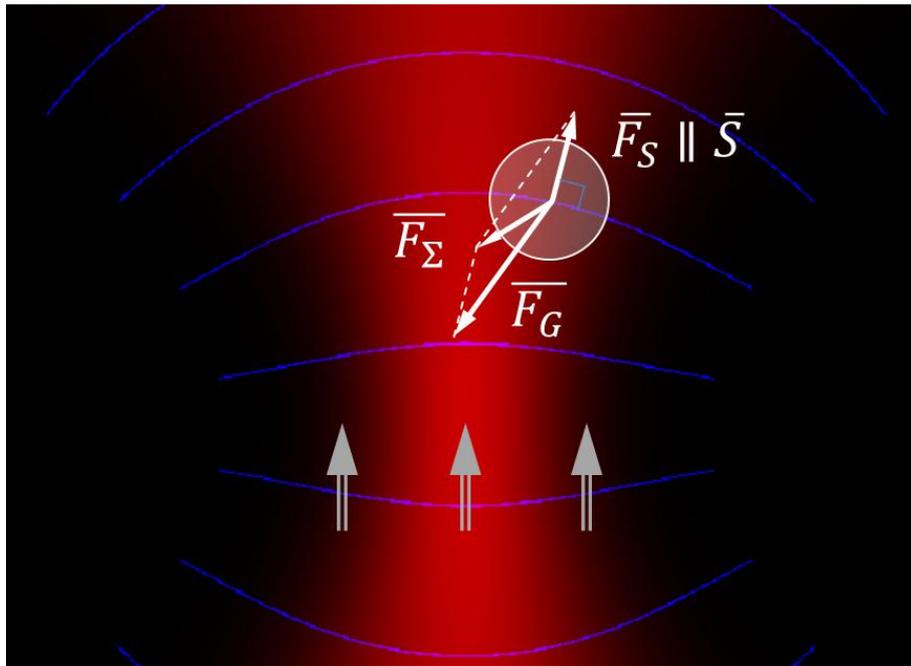


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der antreibenden Kräfte im Gaußstrahl. \vec{F}_Σ - gesamte Kraft wird zerlegt in zwei Komponenten \vec{F}_G - Gradientenkraft und \vec{F}_S - Streukraft. \vec{S} - Poynting-Vektor. Mit blauen Kurven sind Flächen der gleichen Phase bezeichnet.

z.B. den Multi-Photonen-Messungen [69] oder den Messungen im Piconewton-Bereich [67], möchte man nur eine Fixierung eines Partikels realisieren. Die Verwendung von SLM (Spatial Light Modulator) eröffnet breite Einsatzmöglichkeiten zur Manipulation von Mikropartikeln und lebendigen Zellen [57, 70–77]. Ihre Hauptanwendung ist es, mehrere Partikeln gleichzeitig zu halten [77] oder manipulieren [74, 76] zu können. Eine interessante Implementierung ist auch das Festhalten einer Zelle in allen möglichen Freiheitsgraden. Dieses ist notwendig beim Durchschlagen von winzigen Löchern in der Zellmembran mittels Laser. Die Erzeugung von vier Fokuspunkten innerhalb der Zelle verhindert ihre mögliche Rotation [75]. Der Aufbau solcher Geräte für stark fokussierte Strahlen ist einfach, da nur der einseitige Zugang zur Probe gewährleistet werden muss und die Einstellung relativ einfach erfolgt. Deswegen baut man oft solche Geräte für die Mikroskopie und optische Manipulation aus den schon auf dem Markt existierenden Mikroskopen [57, 66–69, 72, 74–76, 78] um. Als Nachteile können Eigenschaften wie der sehr kurze Arbeitsabstand (0,1–0,2 mm) und der kleine axiale Manipulationsbereich (einige 10 Mikrometer) genannt werden.

Eine Alternative zur optischen Einstrahlpinzette wären die optische Systeme mit zwei Strahlen (Counter-propagating-optical-trap), die bereits erwähnt wurden. Die

Grundidee des Verfahrens ist, die Numerische Apertur des Pinzettenstrahls zu senken [66, 79–85]. Die höhere Streukraft muss von einem symmetrischen Gegenstrahl ausgeglichen werden. Die wichtigsten Aspekte beider optischen Ein- beziehungsweise Zwei-Strahlen-Pinzettensysteme sind in [66, 80] dargestellt. Zu den Nachteilen gehört ein relativ hoher Justageaufwand, da die Brennpunkte mikrometergenau justiert werden müssen. Die Strahlformung mit einem SLM bei Counter-propagating Systemen ist auch möglich [79–81]. Die axiale Positionierung des Partikels wird durch das Leistungsverhältnis beider Strahlen bestimmt. Darüber hinaus muss der Abstand zwischen den Brennpunkten beider Strahlen für ein Erreichen der höchsten Effizienz der Manipulation an die Partikelgröße angepasst werden. Das Verfahren besitzt größere Manipulationsbereiche für alle drei Achsen. Das ergibt sich durch die geringere Vergrößerung und das dementsprechend größere Sehfeld mit Objektraum und die kleinere numerische Apertur beider Objektive. Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, dass die Mikroobjekte mit höherer axialer Haltekraft gefangen werden als beim Ein-Strahl-Verfahren. Dadurch kann die gesamte Strahlungsleistung minimiert werden. Da die Energie über einen größeren Fangbereich gestreut wird, sinkt auch die Energiedichte, was die Technik im Bereich der biologischen Implementationen sehr attraktiv macht. Eine interessante Verwendung wird in [81] dargestellt. Die Autoren manipulieren mit künstlich gefertigten Mikroobjekten, die mit mehreren Brennpunkten angetrieben werden und deswegen in allen möglichen Freiheitsgraden gesteuert werden können. Da das Zweistrahl-System kompliziert zu justieren ist, findet eine elegantere Lösung ihren Einsatz: In [78, 82, 84, 85] beschreibt man einen Aufbau mit einem Objektiv. Um einen sich in Gegenrichtung ausbreitenden Strahl zu erzeugen, benutzt man einen Planspiegel hinter der Probe. Das Objektiv formt zwei konvergierende Strahlen mit weit voneinander liegenden Brennpunkten. Ein Strahl wird von dem Spiegel zurück reflektiert, damit sie sich beide im gemeinsamen Fangbereich treffen. Der Aufbau verfügt über den räumlichen Lichtmodulator (SLM) zur Formung beider Strahlen.

Die Fasertechnik bietet weitere Verfahren zur optischen Manipulation an. Wenn die optische Faser keinen ausreichend hohen Intensitätsgradienten nahe der Stirnfläche des Strahls erzeugen kann, müssen einige zusätzliche Maßnahmen getroffen werden. In [65] stellen die Autoren ein optisches Faserwerkzeug mit einer linsenförmigen Stirnfläche dar. In einem Abstand von ca. von 10 bis 15 μm von der Faser können die Partikeln gehalten werden. Bei der entsprechenden Bearbeitung der Stirnfläche einer herkömmlichen [86] Ringfaser [87] erzielt man denselben Effekt. Interessant ist die Anwendung von Werkzeugen aus mehreren Fasern. In [87] beschreibt man eine Vierkern-Faser. Jeder Faserkern trägt an seinem Ende eine schräge Stirnfläche, so dass durch die innere Reflektion jeder Strahl in Richtung der Vierfaserachse umgelenkt wird. So wird eine optische Falle von vier Strahlen mit hohem Intensitätsgradienten im Abstand von ca. 40 μm vom Faserende gebildet. Ein zwei-Faser-optisches Werkzeug wird in [88] beschrieben. Ein Zweifasersystem wird mit einem Faser-Mach-Zehnder-Interferometer ausgestattet. In den Veröffentlichungen [89, 90] berichtet man über zweistrahlige Fa-

sersysteme. Das optische System in [90] besteht aus zwei auf einer Achse befindlichen, gegeneinander gerichteten Fasern, deren Abstand $125\ \mu\text{m}$ beträgt. Im Spalt bildet sich eine optische Falle, in der Partikel gefangen werden können. In [89] sind die Fasern unter einem Winkel angeordnet. Ungefähr im Kreuzpunkt der Strahlen entsteht eine Fangstelle. Im Artikel [89] werden Ergebnisse der Kraftsimulationen wie auch das simulierte Kraftfeld dargestellt. Die Fasersysteme sind relativ billig und einfach zu justieren. Ihr Nachteil ist der extra kleine Arbeitsabstand. Der Anwendungsbereich bei diesen Systemen ist dadurch beschränkt, dass der unmittelbare Zugang des Werkzeugs zu den Objekten gewährleistet werden muss. Der Einsatz bei den geschlossenen abgedichteten Mikrofluidsystemen wäre nicht möglich.

Eine Alternative wären die integrierten Mikro-DOEs [91, 92]. Die in [91, 92] beschriebenen Fresnellinsen haben eine hohe numerische Apertur bis 1,2 und sind sehr kompakt ($20 - 45\ \mu\text{m}$) im Durchmesser. In einigen Veröffentlichungen beschreibt man solche Strukturen, die direkt auf dem Objektträger gefertigt werden.

Eine interessante Idee wird in [85] vorgeschlagen. Eine Matrix von Mikrospiegeln wurde innerhalb des Mikrokanalbodens gefertigt. Bei der Beleuchtung des Mikrokanals mit einem kollimierten Strahl von oben entstehen mehrere Fangstellen, in denen die Strahlen von Einzelspiegeln fokussiert sind. Das Verfahren ist interessant für on-chip-Labors und mikrofluidische Systeme. Die Verwendung wird dadurch eingeschränkt, dass die Spiegel fest angeordnet sind und deswegen keine Manipulation ermöglichen.

Eine andere Technik für die optische Manipulation ist ein freiförmiges Bauteil [1]. Das ist im Prinzip ein optisches System für die Erzeugung einer Einstrahl-Fangstelle. Zu den Vorteilen gehören vor allem die Einfachheit und ein vergrößerter Arbeitsabstand. Im nächsten Kapitel 4 wird ein neues Verfahren vorgestellt. Es betrifft die optimierte Strahlformung für die optische Manipulation eines Teiles mit einer asphärischen strahlformenden Oberfläche. Das dargestellte Konzept ist eine Weiterentwicklung des in [1] dargestellten Verfahrens. Das Ziel der Weiterentwicklung ist die Kombination des Trappingsystems mit der Durchlichtbeleuchtung für die holographische Mikroskopie. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird die Funktionsweise eines einfachen und leistungsfähigen Systems für die digitale Holographie und optische Manipulation mit der Verwendung eines selbst entwickelten optischen Teils untersucht.

4 Optimierte Methoden in der digitalen Holographie

4.1 Technisch-optisches Verständnis holographisch-optischer Aufbauten

4.1.1 Bestimmung der Tiefenlage des Objektes im Wasser

In der sogenannten linsenlose Holographie [9, 36] benutzt man den Lichtsensor ohne Abbildungssystem (Abb. 4.1). In solchen Systemen platziert man den CCD-Chip nahe an dem Objektvolumen. Ein Abbildungssystem kann eingesetzt werden, um eine höhere Auflösung zu erreichen. Das Keplersche Fernrohr ist ein robustes und gut geeignetes Abbildungssystem für diesen Zweck [8]. Als afokales Abbildungssystem besitzt das Fernrohr den weiteren Vorteil der Unabhängigkeit des Tiefenmaßstabs von der Tiefenlage. Da es sich in dieser Arbeit um die Abbildung des dreidimensionalen Volumens handelt, ist diese Eigenschaft besonders bei der Verwendung eines Objektivs mit kurzer Brennweite wichtig.

Die Abbildung 4.2 verdeutlicht, dass der Lichtempfänger nicht die Abbildungen der Objekte (Partikeln) aufnimmt, sondern ihre Beugungsbilder. Deswegen wird auf dem Detektor nicht das Objektvolumen selbst, sondern eine Ebene, die sich außerhalb dieses Volumens befindet, abgebildet.

Bisher wurde die Abbildung eines Punktes untersucht, der sich in der Luft befindet. Im Vergleich dazu verschieben die Wasserschicht und das Deckglas die richtige Position des Objektes und ändern den tatsächlichen Öffnungswinkel (Abb. 4.3). Die Beugungssimulationen zeigen, dass eine notwendige Korrektur der Tiefenposition durchgeführt werden muss, um eine gute Übereinstimmung mit den Experimenten zu erreichen. Weiterhin ist die Tiefenkoordinate der Punktlichtquelle zu ermitteln.

Bei der z -Verschiebung des Mikroskopes um Δz_L vom scheinbaren Punkt P'_1 auf Punkt P'_2 muss man beachten, dass der tatsächliche Abstand zwischen zwei abbildenden Punktobjekten P_1 und P_2 im Wasser Δz_W größer ist. Diese Skalierung der Tiefenposition wird anhand der Position des Schnittpunktes des Randstrahls mit der optischen Achse bestimmt. Es wird nun angenommen, dass das Mikroobjektiv den Öffnungswinkel bzw. den Schnittwinkel dieses Strahls bestimmt. Bei dieser Annahme wird die sphärische Abbildungsverzeichnung vernachlässigt, die eine ebene Grenze

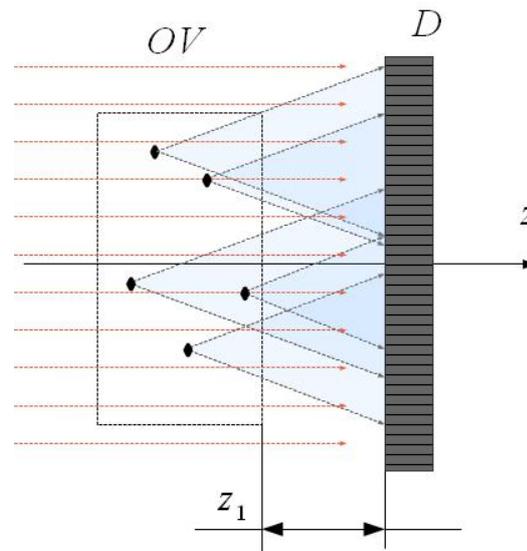


Abb. 4.1: Linsenlose Abbildung des In-line-Hologramms; *OV* - Objektvolumen; *D* - Detektor.

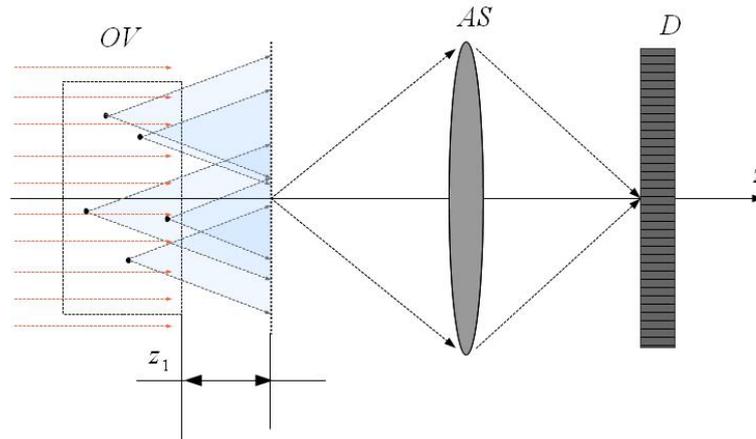


Abb. 4.2: Aufnahme des In-line-Hologramms mit dem abbildenden optischen System - *AS*; *OV* - Objektvolumen; *D* - Detektor.

zwischen zwei unterschiedlichen Medien im divergierten Strahlbündel verursacht. Diese Annahme ist gerechtfertigt, wenn das Objektiv mit einer kleinen numerischen Apertur eingesetzt wird. Das Experiment zeigt eine gute Übereinstimmung mit dieser Annahme. Angegeben werden die scheinbare Position der Punktlichtquelle z_L , die Stärke des Deckglases $z_{\Delta G}$ und der Öffnungswinkel in der Luft α_L (Abb. 4.4). Gesucht wird die Position der Punktlichtquelle im Wasser z_W Gleichung (4.1)

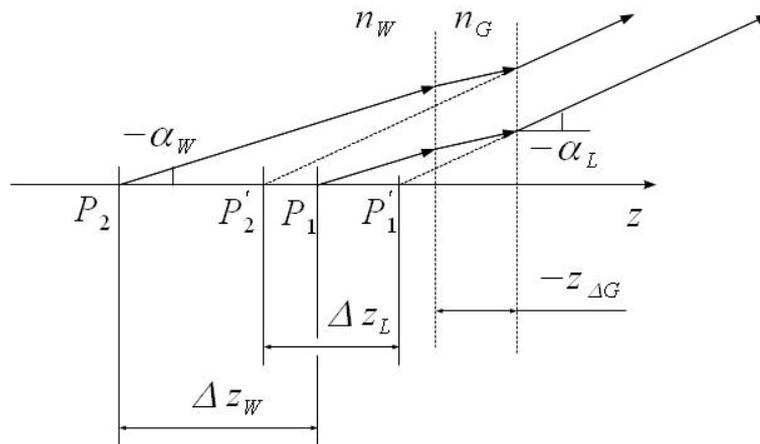


Abb. 4.3: Verschiebung der axialen Position beim Medienübergang; n_W - Brechungsindex im Wasser; n_G - Brechungsindex im Glas

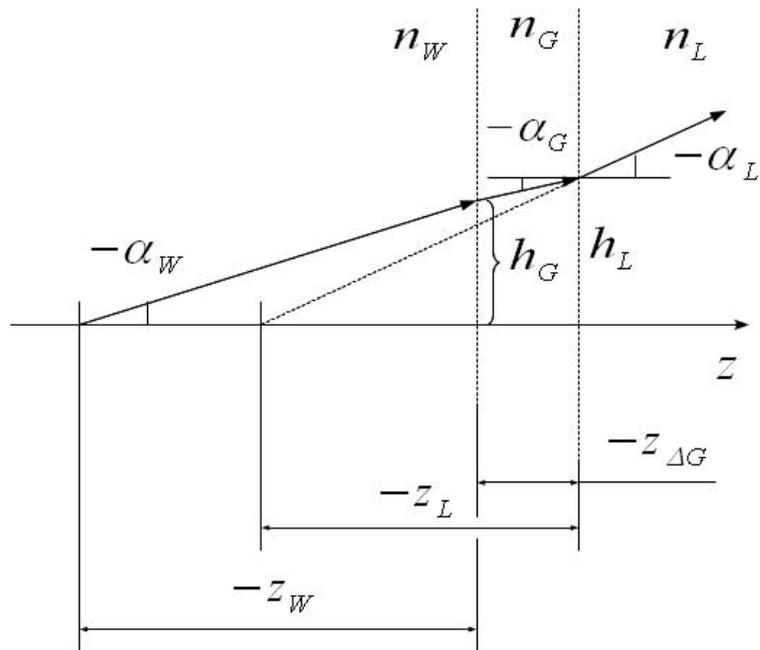


Abb. 4.4: Ermittlung der Tiefenposition einer Punktlichtquelle P nach dem Randstrahl

$$z_W = \frac{\sqrt{n_W^2 - \sin(\alpha_L)^2}}{\cos(\alpha_L)} z_L - \frac{\sqrt{n_W^2 - \sin(\alpha_L)^2}}{\sqrt{n_G^2 - \sin(\alpha_L)^2}} z_{\Delta G}, \quad (4.1)$$

mit $\alpha_L = \arcsin NA$, Einfallswinkel des Randstrahls, der dem Öffnungswinkel gleich ist, $n_W = 1.3337$, ($\lambda = 543 \text{ nm}$) Brechungsindex des Wassers, $n_G = 1.5256$ (Microcrown,

Schott, $\lambda = 543 \text{ nm}$, extrapoliert), Brechungsindex des Glases, $n_{\Delta G} = 0.17 \text{ mm}$, der Stärke des Deckglases.

Der erste Term stellt die Skalierung der z -Koordinate dar. Der zweite Term drückt die vom Deckglas verursachte z -Versetzung der scheinbaren Koordinate der Punktlichtquelle aus. Für weitere Simulationen ist der erste Term wichtig. Er steht für den richtigen Abstand der abbildenden Objektebenen im Wasser. Dann kann der Tiefenskalierungsfaktor $k_{\Delta z}$ wie folgt ausgedrückt werden (4.2):

$$k_{\Delta z} = \frac{\sqrt{n_{\text{W}}^2 - \sin(\alpha_{\text{L}})^2}}{\cos(\alpha_{\text{L}})} = \frac{\sqrt{n_{\text{W}}^2 - \text{NA}^2}}{\sqrt{1 - \text{NA}^2}} = 1,347, \quad (4.2)$$

wobei NA die numerische Apertur des Mikroskopobjektives, n_{W} der Brechungsindex des Wassers sind. So kann man die scheinbare z -Dimension des Objektvolumens bestimmen. Wenn z.B. das mit dem Wasser gefüllte Objektvolumen eine Tiefe von $200 \mu\text{m}$ hat, wird die axiale Ausdehnung der Abbildung des Volumens nur $200/k_{\Delta z} = 149 \mu\text{m}$ betragen.

4.1.2 Blenden im holographischen Abbildungssystem

Die Verwendung des Abbildungssystems führt zur Erhöhung der Auflösung. Der Einfluss des Abbildungssystems zeigt sich auch in der Einschränkung des Öffnungswinkels. Außerdem kann das Abbildungssystem Verzeichnungen verursachen, die in der folgenden Betrachtung vernachlässigt werden.

Die Funktion jeder Blende kann abhängig von der axialen Position wechseln. Die Stahlbündel, die von zwei in der unterschiedlichen z -Tiefe liegenden Punkten ausgehen, können von verschiedenen Blenden des Abbildungssystem abgeschattet werden. Im Unterschied zur klassischen Blendendefinition, wo man die Funktion jeder Blende für eine Objektebene untersucht, muss die Funktion für jede Tiefe bestimmt werden. Die Aufgabe besteht vor allem in der Bestimmung von Öffnungsblende und Öffnungswinkels.

Das Keplersche Fernrohr besteht aus zwei Linsen. Im gegebenen Fall sind das die Mikroobjektivlinse und Tubuslinse. Nach der vereinfachten Darstellung enthält das Objektiv eine verzeichnungsfreie Linse und zwei Blenden. Die erste Blende B_1 (Abb. 4.5) ist die Fassung der Linse. Sie begrenzt die Randstrahlen des äußersten Feldpunktes, während die zweite Blende B_2 sich in der bildseitigen Brennebene befindet und den Öffnungswinkel aller Punkte des Sichtfeldes bestimmt. Außerdem wird das Strahlbündel von der Fassung der Tubuslinse B_3 als auch von der Apertur des CCD Chips D begrenzt. Es ist anzumerken, dass das Abbildungssystem nicht in seiner klassischen Anwendung in diesem Fall eingesetzt wird, weil keine scharfe Abbildung der Mikroobjekte, sondern Beugungsbilder erforderlich sind.

Zunächst sind Durchmesser und Lage der objektseitigen Abbildungen jeder Blende

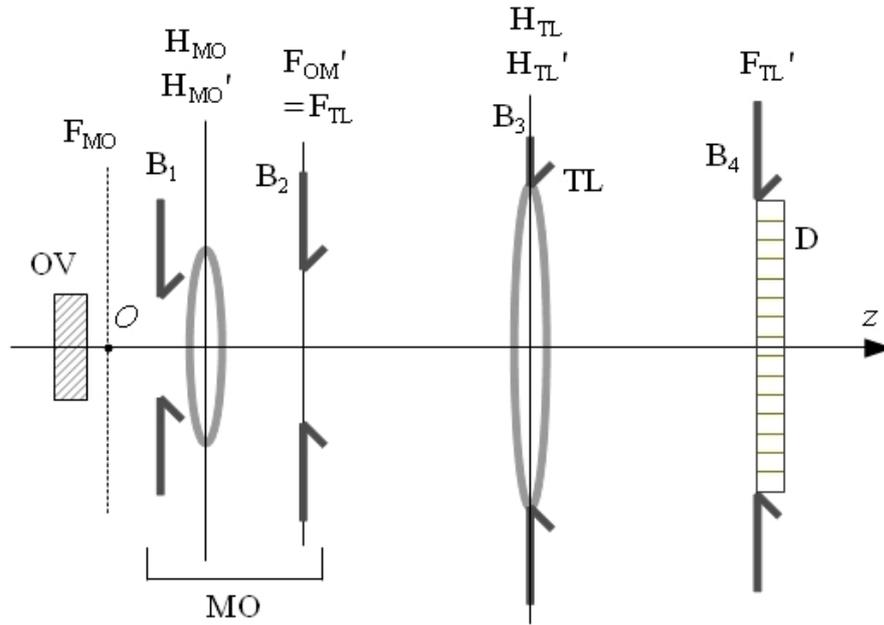


Abb. 4.5: Blendendefinition im Abbildungssystem. Blende B_1 - Fassung der Linse; Blende B_2 - Feldblende des Mikroobjektives; Blende B_3 - die Fassung der Tubuslinse; Blende B_4 , die Apertur des Lichtdetektors

zu definieren. Als Koordinatenursprung kann der axiale Punkt (O) der objektseitigen Brennebene des MO (Mikroobjektives) gewählt werden. Für die Blende B_2 gilt:

$$D_{B_2} = f_{MO}' \tan(\arcsin(\text{NA})). \quad (4.3)$$

Die Blende B_2 als Öffnungsblende des MO wird objektseitig nach Unendlich abgebildet. Deswegen besteht ihre Wirkung nur in der Beschränkung des maximalen Strahlwinkels für alle Punkte des objektseitigen Raums, der durch das MO durchgehen kann (4.4).

$$\sigma_{\max, B_2'} = \arcsin(\text{NA}_{MO}). \quad (4.4)$$

Die Blende B_1 (Fassung des Mikroskopobjektives) hat kein objektseitiges Bild. Die z -Koordinate der Blende ist bei vereinfachter Darstellung gleich der Brennweite des Objektivs (4.5):

$$z_{B_1'} = -f_{MO} = f_{MO}', \quad (4.5)$$

Ihr Durchmesser beträgt

$$D_{B'_1} = D_{B_2} + 2 \cdot y_{MO}, \quad (4.6)$$

wobei $2y_{MO}$ die Objektfeldgröße des MO ist.

Die Lage und der Durchmesser für die bildseitige Abbildung der Blende B_3 (Fassung der Tubuslinse) (4.7,4.8) lassen sich aus folgenden Formeln bestimmen:

$$z_{B'_3} = -\frac{f'_{MO}{}^2}{f'_L} \quad (4.7)$$

$$D_{B'_3} = -\frac{f'_L \cdot D_{B_3}}{f'_{MO}} \quad (4.8)$$

Die Vergrößerung des gesamten Abbildungssystems ist:

$$\beta'_{AS} = \frac{f'_{MO}}{f'_L} = -\frac{f'_{MO}}{f'_L}, \quad (4.9)$$

wobei f'_{MO} und f'_L die bildseitigen Brennweiten von MO und Tubuslinse sind, f'_L ist die objektseitige Brennweite der Tubuslinse. Die Lage und der Durchmesser der objektseitigen Abbildung der Blende B_4 (Apertur des Lichtempfängers) sind

$$z_{B'_4} = -\frac{z'_{B_4}}{\beta_{AS}^2} \quad (4.10)$$

$$D_{B'_4} = \frac{D_{B_4}}{\beta_{AS}}, \quad (4.11)$$

wobei z'_{B_4} die bildseitige Lage des Lichtdetektors ist. Nachdem alle Lagen und Durchmesser der bildseitigen Abbildungen bestimmt wurden, können auch der Öffnungswinkel bzw. die Feldblende für jeden axialen Punkt des Objektvolumens bestimmt werden.

Der Öffnungswinkel des Abbildungssystems für einen beliebigen axialen Punkt P kann durch (4.12) bestimmt werden:

$$u(P) = \min \{u_{B_1}(z_P), u_{B_2}(z_P), u_{B_3}(z_P), u_{B_4}(z_P)\}, \quad (4.12)$$

wobei $u_{B_k} = \arctan\left(\frac{D_{B_k}}{2(z_P - z_{B_k})}\right)$ ist.

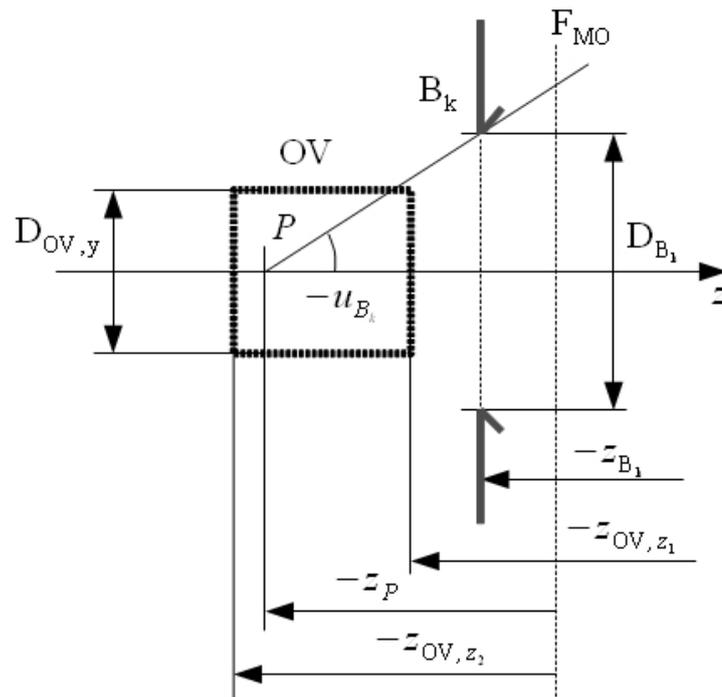


Abb. 4.6: Bestimmung des Öffnungswinkels für einen axialen Punkt P im Objektvolumen OV . B_k ist die objektseitige Abbildung einer von 4 Blenden (B_1 bis B_4). (Abb. 4.5)

Es wurde ein Programm in MatLab geschrieben, das es ermöglicht, den von jeder objektseitigen Blendenabbildung eingeschränkten Winkel mit der z -Koordinate z_P (4.6) zu ermitteln. Die Angaben des Abbildungssystem sind im Anhang 1 zu finden.

Das Diagramm Abb. 4.7 verdeutlicht, dass für alle axialen Punkte innerhalb des Objektvolumens die Öffnungsblende des MO B_2 als Öffnungsblende dient (in Abb. 4.7 grün). Dies ist die Öffnungsblende des Abbildungssystem für das gesamte Objektvolumen. Der Öffnungswinkel beträgt $u = \arcsin(\text{NA}_{\text{MO}})$. Da die Öffnungsblende sich in der Brennebene des Objektivs MO befindet, hängt der Öffnungs- bzw. Abschattwinkel nicht von der Position der Punktlichtquelle ab. Das bedeutet, dass für jeden Punkt, der sich in einem Bereich neben der optischen Achse befindet, die Öffnungsblende unter dem gleichen Öffnungswinkel erscheint.

Weiterhin ist die laterale Breite des dreidimensionalen Bereichs bestimmt, in dem die B_2 -Blende als Öffnungsblende wirkt und noch keine weitere Blende das Strahlbündel abschattet. Der Grenzfall wäre die außeraxiale Lage des Punktes P , bei der der Randstrahl über den Rand der Öffnungsblende und einer anderen Blende gleichzeitig hindurchgeht (Abb. 4.8).

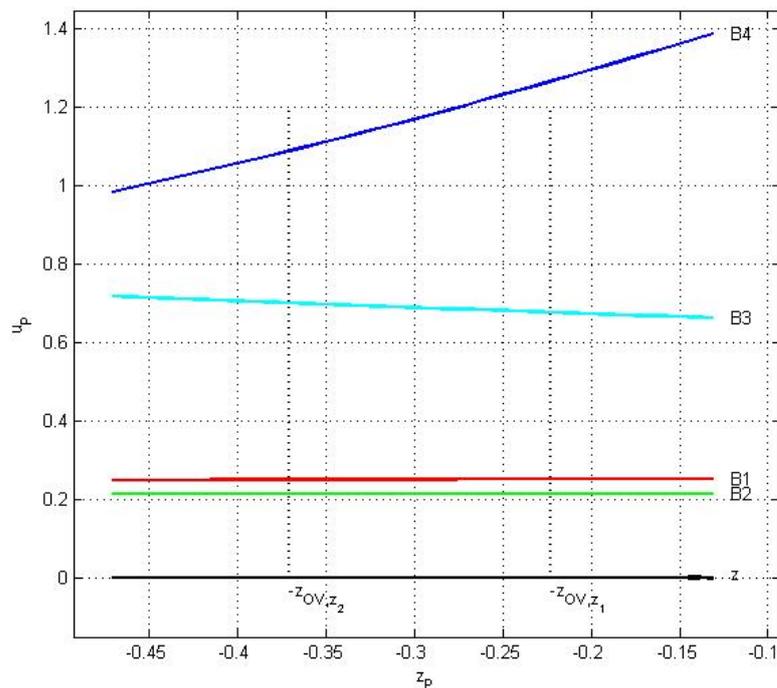


Abb. 4.7: Strahlbegrenzung im Abbildungssystem für ein Bündel, das von einem axialen Punkt des Objektvolumens ausgeht. Begrenzung durch Blende B_1 - Fassung des Mikroobjektives (hellblau); Begrenzung durch Blende B_2 - Öffnungsblende des Mikroobjektives (grün); Begrenzung durch Blende B_3 - Begrenzung Fassung der Linse (rot); durch Blende B_4 - Apertur des Lichtdetektors (blau). z_P - axiale Koordinate des Punktes P , u_P - der maximale Winkel des Strahls, der aus dem Punkt P der entsprechenden Blende bestimmt wird

Dieser Strahl lässt sich auch im Objektraum durch die Blendenabbildungen ermitteln (Abb. 4.8). Da die objektseitige Abbildung der Öffnungsblende nach Unendlich abgebildet wird, reicht es, den Strahl an den Rand jeder objektseitigen Blendenabbildung unter dem Öffnungswinkel durchzuziehen. Der Strahl bestimmt die Grenze der abschattfreien Abbildung für einen beliebigen Punkt P (Abb. 4.8) im Objektvolumen.

Wenn man diese Betrachtungen für alle Objektebenen innerhalb des Objektvolumens OV durchgeführt hat, entsteht ein dreidimensionales, kegelförmiges (für jede Blende) Volumen, in dem keine Abschattung stattfindet. Falls mehrere Blendenabbildungen vorhanden sind, hat das abschattfreie Volumen eine kompliziertere Form (Abb. 4.9).

Im günstigsten Fall hat das Objektvolumen eine Quader-Form. Das heißt, dass von

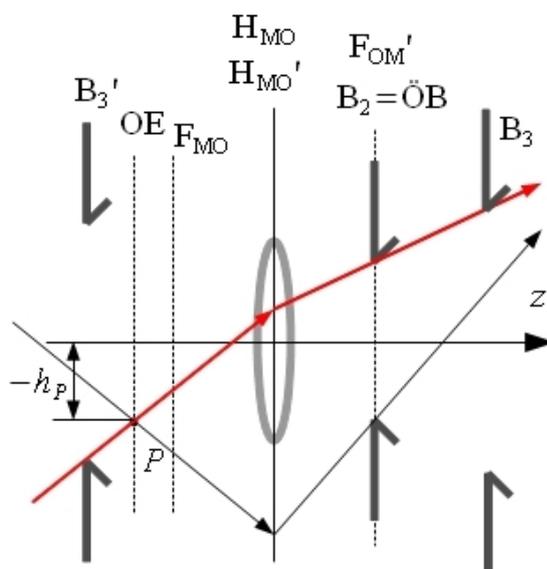


Abb. 4.8: Bestimmung der äußersten Lage für einen Punkt P im Raum, bei der noch keine Abschattung entsteht.

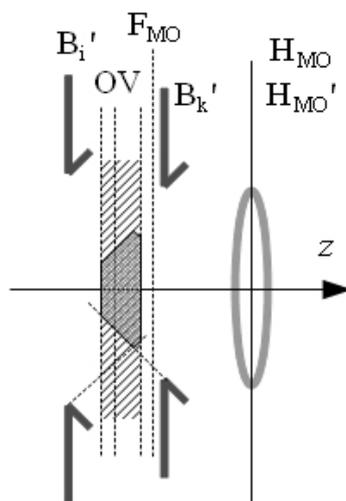


Abb. 4.9: Bestimmung des abschattfreien Raums durch die objektseitigen Abbildungen von zwei Blenden B'_i und B'_k

diesem ermittelten Objektvolumen nur ein Teil dieser Quader-Form benutzt werden muss. Abbildung 4.9 macht ersichtlich, dass axiale und laterale Abmaße miteinander verknüpft sind. Das heißt, das Objektvolumen kann entweder breiter und dünner oder

aber schmaler und dicker sein.

Wenn der Tiefenbereich $[-z_{OV,z2}; -z_{OV,z1}]$ angegeben wird, kann man die lateralen Abmaße der kegelstumpfen, abschattfreien Region (4.13) und (4.14) bestimmen, die von jeder Blende verursacht wird.

$$h_{S,Bk,z1} = \frac{|D_{Bk}|}{2} - |(z_{OV,z1} - z_{Bk'}) \cdot \tan(u)| \quad (4.13)$$

$$h_{S,Bk,z2} = \frac{|D_{Bk}|}{2} - |(z_{OV,z2} - z_{Bk'}) \cdot \tan(u)|, \quad (4.14)$$

wobei D_{Bk} der Durchmesser der Blende, $z_{Bk'}$ die Koordinate der Blendenabbildung, u der Öffnungswinkel sind. Das gesuchte minimale Quer-Abmaß $h_{OV,min}$ des dreidimensionalen, abschattfreien Bereichs erhält man aus (4.15).

$$h_{OV,min} = \min \{h_{S,B1,z1}, h_{S,B1,z2}, h_{S,B3,z1}, h_{S,B3,z2}, h_{S,B4,z1}, h_{S,B4,z2}\} \quad (4.15)$$

Die Detektorapertur hat eine Rechteckform. Die Charakterisierung der Blenden wird zweimal für zwei Abmaße des Sensors $D_{B4} = D_y$ und $D_{B4} = D_x$ durchgeführt, um die XY Abmaße des Objektvolumens zu bestimmen, wobei D_x und D_y die Abmaße des Detektors sind. Es muss auch gewährleistet werden, dass keine andere Blende das Beugungsmuster eines Partikels einschränkt, auch wenn das Beugungsmuster die Ecke des Sensors trifft.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Programm entwickelt, das es ermöglicht, Abmaße des Objektvolumens für unterschiedliche Objektive zu bestimmen (Tabelle 4.1).

Objektiv	ÖW	Vergr.	XY-Dimensionen	Tiefenbereich
MO1: 10×0,21	$u = 9^\circ$	$\beta'_{AS} = -6$	$949 \times 728 \mu\text{m}^2$	$[-0,5; -0,3] \text{mm}$
MO2: 20×0,35	$u = 15,2^\circ$	$\beta'_{AS} = -12$	$418 \times 307 \mu\text{m}^2$	$[-250; -50] \mu\text{m}$
MO3: 40×0,65	$u = 29,1^\circ$	$\beta'_{AS} = -26,6$	$121 \times 70 \mu\text{m}^2$	$[115; -50] \mu\text{m}$

Tab. 4.1: Dimensionen des Objektvolumens für die In-line-digitalen Holographie

4.2 Optimierte numerische Verfahren in der digitalen In-line-Holographie

4.2.1 Einschränkung der Impulsantwortfunktion und numerische Faltung

Dank des beschränkten Öffnungswinkels des optischen Systems hat das von dem Hologramm aufgenommene Signal eine beschränkte spektrale Bandbreite, d. h. die Impulsantwortfunktion des Systems (weiterhin als IAF bezeichnet) ist beschränkt. Bei der Rekonstruktion des Hologramms ist es sinnvoll, die IAF mit der gleichen Bandbreite zu benutzen.

Die Begrenzung IAF muss sowohl im Frequenzbereich als auch im Ortsbereich gewährleistet werden. Das bedeutet, dass sowohl die IAF als auch ihre Fourier-Transformierte außerhalb eines bestimmten Definitionsbereichs gleich Null sein müssen.

Die Modulation (Apodisation) der IAF ist nicht trivial [93]. Prinzipiell kann diese örtliche Einschränkung der IAF als Multiplikation der Chirp-Funktion mit der „circ“-Funktion dargestellt werden. Bei einer solchen „scharfen“ Modulation ist das Spektrum beschränkt, aber sehr verrauscht.

In der Arbeit wird die IAF im Ortsbereich berechnet. Diese wird durch die Funktion $y = \exp[-k_{ap} \cdot x^{10}]$ moduliert, wo $k_{ap} = \ln(2)/\rho_{IAF}^{10}$. Diese Super-Gauß-ähnliche Funktion hat den Wert 0,5 am Rand des Definitionsbereichs ρ_{IAF} der IAF.

Sie wird dort abrupt auf 0 gesetzt, wo sie kleiner als 0,01 ist. Das Spektrum der IAF sieht viel glatter aus. In der Mitte des Spektrums sind trotzdem schwache Schwankungen zu sehen, die im Bereich von ca 1% (Abb. 4.10) liegen.

Im Abschnitt 2.6.2 wurde angedeutet, dass die Propagation einer komplexen Welle mit der Faltung durchgeführt werden kann. Als Kernel der Faltung wird die Impulsantwort des freien Raums verwendet (2.41).

Bei der Faltung wird das Faltungstheorem angewendet. Nach dem Theorem wird die Faltung im Spektralbereich berechnet als Multiplikation der Spektren des Faltungskernels (Übertragungsfunktion des freien Raums) und des komplexen Signals. Das propagierte Signal ist die Rücktransformierte dieses Produktes. Weil das aufgenommene Signal durch die Apertur des Sensors räumlich begrenzt wird, ist das Spektrum diskret. Die Rücktransformation des diskreten Produktes des Signalspektrums mit der Übertragungsfunktion ist periodisch. Das führt zur Überlappung des Signals am Randbereich (Abb. 4.11).

Das Problem der Überlappung kann durch eine Erweiterung des Rechenfeldes umgangen werden. Das Hologramm wird mit Null-Werten am Rand auf die Breite der IAF ergänzt (Zerropadding). In der Arbeit wurde kein Zerropadding benutzt. Nach der Faltung wurde die Randregion mit den Störungen abgeschnitten. Die Breite der Region der Überlappung ist dem Radius ρ_{IAF} des IAF gleich (4.16).

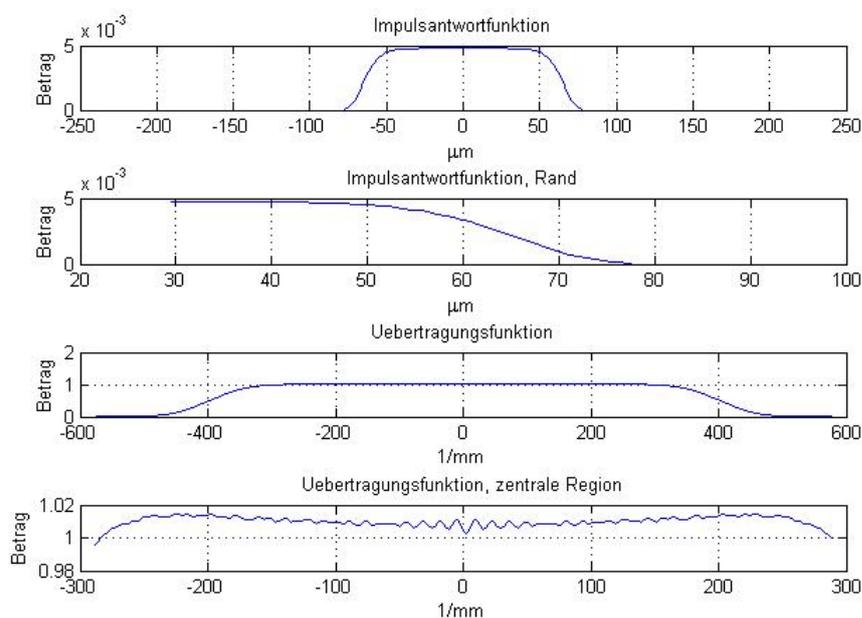


Abb. 4.10: Querschnitt der Impulsantwort der FFT-direkt-Integrations-Methode (FFT-DI-Impulsantwort) und ihre Fourier-Transformierte. Betrag im Bereich des ganzen Rechenfensters und am Randbereich sowie Betrag der Fourier-Transformierten im Bereich des ganzen Rechenfensters und in der zentralen Region

$$\rho_{\text{IAF}} = z \tan(\xi) = \frac{\text{NA}z}{\sqrt{1 - \text{NA}^2}} \quad (4.16)$$

4.2.2 Parametrisierte Impulsantwortfunktion

Die Rekonstruktion der Partikellage erfolgt in vielen Anwendungen und Verfahren in ähnlicher Weise. Das aufgenommene Hologramm wird mehrmals mit den unterschiedlichen Impulsantwortfunktionen [59, 60, 94] gefaltet oder es wird eine Wavelet-Korrelation [45] durchgeführt. Die Impulsantwortfunktionen oder Wavelets entsprechen einer Reihe von Werten der Tiefe z aus dem Bereich des untersuchten 3D-Volumens. Diese Methode ist oft rechenaufwendig, was die Anwendung des Faltungsverfahrens bei Rekonstruktionsvorgängen in Echtzeit sehr einschränkt.

Es gibt aber Beispiele für eine erfolgreiche Tiefenkodierung. Die Tiefeninformation des aufgenommenen Objektes wird durch die Farbe [95] oder das aufgenommene Muster [96] ermittelt. In [97] wird ein Verfahren dargestellt, das es ermöglicht, durch

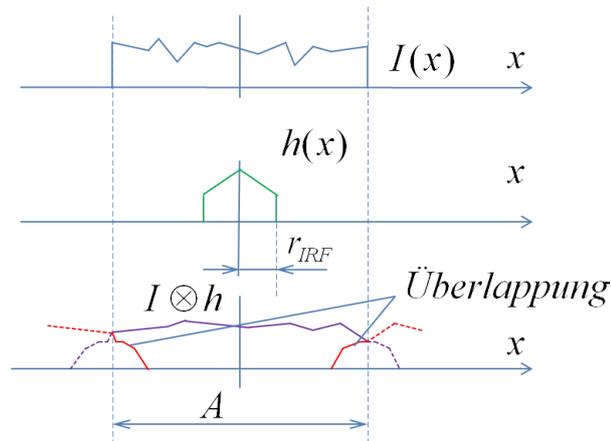


Abb. 4.11: Überlappung benachbarter Replika bei der numerischen Faltung von beschränkten Signalen. Schematische Darstellung eines eindimensionalen Falls. I – Hologramm; g – Impulsantwortfunktion

eine Faltung mit einer speziellen Impulsantwortfunktion die Tiefeninformation über Mikroobjekte aus dem Hologramm zu extrahieren und graphisch darzustellen. Der Kern des Verfahrens ist die Impulsantwortfunktion. Sie enthält Merkmale aller Impulsantwortfunktionen innerhalb eines vorbestimmten z-Tiefenbereichs. Sie wird gebildet, indem die Querschnitte unterschiedlicher Impulsantwortfunktionen, die unterschiedlichen Werten der Tiefe entsprechen, abhängig vom Winkel von 0 bis 90 Grad kodiert werden. Der Winkel des entsprechenden Schnittes wird als ein von der z-Koordinate abhängiger Parameter betrachtet (Abb. 4.12).

Nach der Faltung entstehen kreuzförmige Partikelabbildungen, die die Partikeltiefenlage näherungsweise abschätzen lassen. Die zwei extremsten Fälle des Kreuzes sind vertikale und horizontale Linien, die den minimalen und maximalen Tiefenwerten entsprechen. Die Kreuzmuster zwischen diesen Extremfällen geben Werte der Tiefe der Partikel im Bereich des maximalen und minimalen z-Abstands wieder (Abb. 4.13).

Dieses Verfahren ermöglicht eine visuelle und schnelle Abschätzung der Tiefenlage kugelförmiger Mikroobjekte.

4.3 Vermessung der Wellenfront – Erweiterung der zwei-Schritt-phasenschiebenden Interferometrie auf beliebige Referenzwellen

Das Prinzip der Interferometrie ist die Ermittlung der unbekannt komplexen Welle (weiterhin als Objektwelle bezeichnet) anhand der Interferogramme mit der bekannten Referenzwelle. Zwischen den Aufnahmen wird die Phasenverzögerung in dem Referenz-

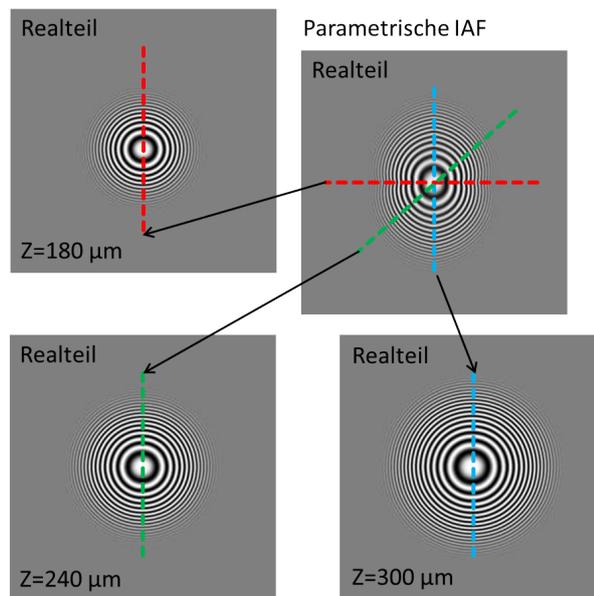


Abb. 4.12: Parametrisierte Impulsantwortfunktion, berechnet für einen Tiefenbereich von 180-300 μm .

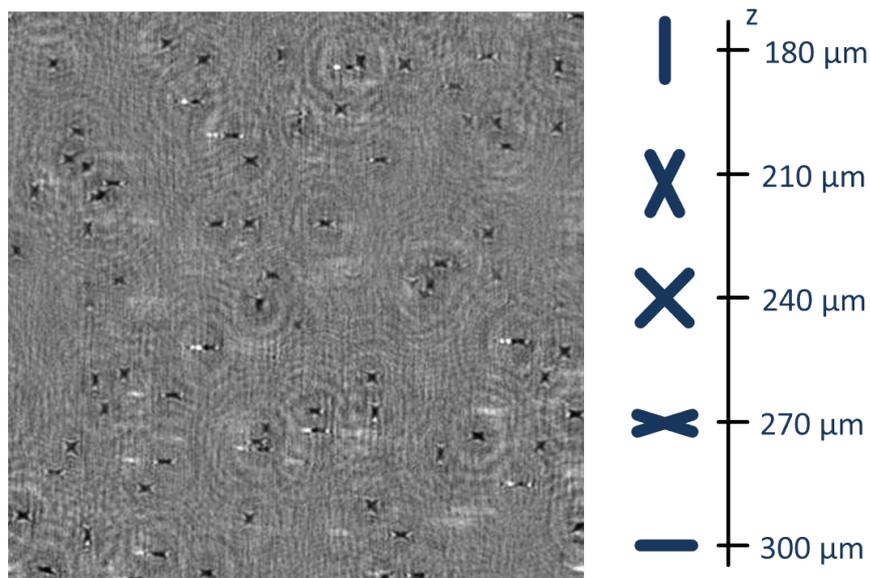


Abb. 4.13: 3 μm -Mikropartikel im Wasser. Feld: $440 \times 440 \mu\text{m}$. Rekonstruktion mittels der parametrisierten Impulsantwortfunktion (Abb. 4.12), (links) und Vergleichsmaß der Tiefenkodierung, (rechts)

pfad geändert, was auch eine Änderung des Interferenzmusters auslöst. Es werden in der Praxis von zwei bis vier Interferogrammen mit unterschiedlichen Referenzwellen aufgenommen. Die Referenzwellen für jedes Interferogramm unterscheiden sich durch Phaseschiebung relativ zur Objektwelle. Während des Aufnahmevorgangs muss die Objektwelle unverändert bleiben, was die Anwendung des Verfahrens für die Aufnahme der dynamischen Prozesse einschränkt. Aus dem Grund ist es sehr interessant, die Anzahl von Interferogrammen zu minimieren. In manchen Beiträgen berichtet man über „single shot“-Interferometrie. Im Prinzip ist es 2,3- oder 4-Phaseschiebung Interferometrie, wo unterschiedliche Phaseschiebung bzw. unterschiedliche Interferogramme durch eine Phasenplatte [98–100], die für Nachbarpixel eine unterschiedliche Phaseschiebung der einzigen Referenzwelle gewährleistet, zu einem Bild zusammengefügt werden. Aber solch eine Methode verringert die Auflösung der Aufnahme.

Die zwei-Schritt-phaseschiebende Interferometrie ist sehr attraktiv, weil beide Referenzwellen mit unterschiedlicher Verzögerung in einem Pfad mit Hilfe der Polarisationsoptik erzeugt werden können. Die gleichzeitige Aufnahme anhand von Polarisation getrennter Interferogramme bietet eine Möglichkeit zur Echtzeit-Rekonstruktion von Phasenobjekten. Ein Beispiel des Aufbaus ist in [101] dargestellt.

Es gibt unterschiedliche Algorithmen zur Rekonstruktion von Interferogrammen. Algorithmen wie in [102] benötigen vier Aufnahmen, zwei Interferogramme, die Intensität der Referenzwelle und die Intensität der Objektwelle. Die Referenzwelle kann unter bestimmten Voraussetzungen als konstant angenommen werden. Die Intensität der Objektwelle als auch zwei Interferogramme hängen vom Objekt ab. Die Aufnahme von drei Intensitäten gleichzeitig für die Untersuchung von dynamischen Prozessen ist technisch erschwert. Die Algorithmen [103, 104] benötigen keine Intensität der Objektwelle. Da werden nur zwei Interferogramme, die vom Objekt abhängen, benutzt. Der Mangel an Information über die Objektintensität führt zur Zweideutigkeit der gesuchten komplexen Objektwelle bei der Lösung der quadratischen Gleichung, wenn die Amplitude der Objektwelle einen bestimmten Wert übersteigt. Die Amplitude der Objektwelle muss kleiner als die Amplitude der Referenzwelle sein: $U_O \leq U_R$. Die Einschränkung in der Amplitude der Objektwelle A_O ist der Preis für Einfachheit des Verfahrens.

Im erwähnten Algorithmus wurde angenommen, dass beide Referenzwellen die gleiche Amplitude bei der Aufnahme von beiden Interferogrammen haben. Bei der Verallgemeinerung des Algorithmus für die Situation, dass die Referenzwellen eine beliebige Phase und Amplitude für jedes von beiden Interferogrammen haben können, entsteht eine quadratische Gleichung, die zwei Lösungen liefert, wobei eine von denen die gesuchte Objektwelle ist. Es bestehen Schwierigkeiten bei der analytischen Untersuchung der Lösungen, um festzustellen, welche der zwei die gesuchte Objektwelle ist. In diesem Abschnitt wird ein graphisches Verfahren dargestellt, das es ermöglicht, die Objektwelle zu finden.

Nach diesem Verfahren [105] werden alle komplexen Werte als Vektoren in der kom-

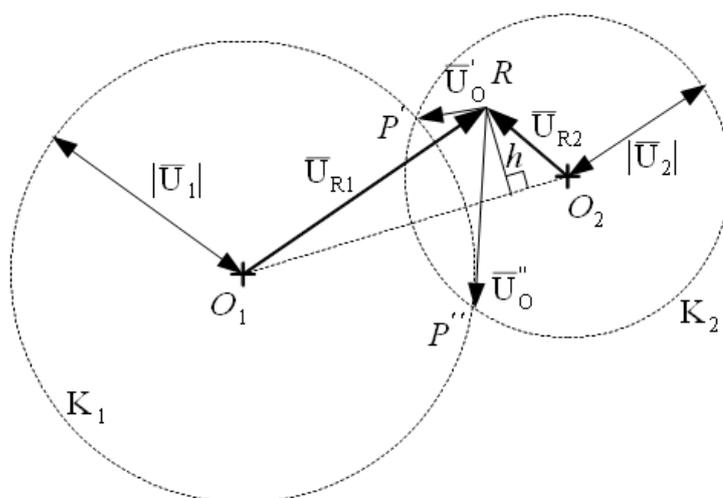


Abb. 4.14: Graphische Darstellung der Rekonstruktion für die 2-Schritt-PSI mit zwei Referenzwellen mit unterschiedlichen Amplituden und Phasen

plexen Ebene dargestellt. Es seien beide Referenzwellen in der Phase und Amplitude bekannt. Für jedes Interferogramm ist eine eigene Detektorebene vorgesehen. Auf jeder Detektor-Ebene interferieren Objekt- und Referenzwellen. Auf der komplexen Ebene kann das als Addition von zwei Vektoren dargestellt werden. Auf dem ersten Detektor gilt Addition von \bar{U}_{R1} (Abb. 4.14) und mit dem unbekanntem Vektor \bar{U}_O . Nach der Addition entsteht ein summarischer Vektor $\bar{U}_1 = \bar{U}_O + \bar{U}_{R1}$. Sein Ursprung, wie der Ursprung von \bar{U}_{R1} , befindet sich im Punkt O_1 . Da der Detektor nur den Intensitätswert messen kann, so hat man die Information über die Länge $|\bar{U}_1|$. Die Menge der Endpunkte von allen möglichen Vektoren \bar{U}_1 bilden den Kreis K_1 mit dem Radius $|\bar{U}_1|$. Wenn nur ein aufgenommenes Interferogramm vorhanden ist, kann der Objektvektor nicht eindeutig definiert werden. Jeder Vektor, der zwischen dem Punkt R (Endpunkt von \bar{U}_{R1}) und einem Punkt auf K_1 aufgespannt ist, könnte der gesuchte unbekanntete Objektvektor \bar{U}_O sein.

Bei zwei Interferogrammen wird die Anzahl aller möglichen \bar{U}_O viel geringer. In (4.14) wird der Rekonstruktionsvorgang graphisch dargestellt. Der Punkt R ist der Endpunkt beider Referenzvektoren \bar{U}_{R1} und \bar{U}_{R2} . \bar{U}'_O und \bar{U}''_O sind die Vektoren, die im Punkt R den Ursprung haben und in den Schnittpunkten von K_1 und K_2 enden. Das sind die zwei Werte, die analytisch durch Lösung der entsprechenden Quadratischen Gleichung gefunden werden können. Die \bar{U}_{R1} und \bar{U}_{R2} sind bekannt. Es ist nur zu entscheiden, welcher von \bar{U}'_O und \bar{U}''_O der richtige gesuchte Objektvektor ist. Wenn man im voraus technisch gewährleistet, dass die Amplitude der Objektwelle nicht den Wert $U_{O,max} = h$ übersteigt, der die Bedeutung des Abstandes zwischen R und O_1O_2 hat,

kann man die kleinste von zwei Lösungen nehmen. Das ist die gesuchte Objektwelle \overline{U}_O .

$$\begin{aligned}
 U_{O,\max} = h &= 2 \frac{|S_{\Delta O_1 R O_2}|}{|\overline{U}_{R1} - \overline{U}_{R2}|} = \frac{|\overline{U}_{R1} \times \overline{U}_{R2}|}{|\overline{U}_{R1} - \overline{U}_{R2}|} \\
 &= \frac{|\overline{U}_{R1}| |\overline{U}_{R2}| |\sin(\delta_R)|}{\sqrt{|\overline{U}_{R1}|^2 + |\overline{U}_{R2}|^2 - 2 |\overline{U}_{R1}| |\overline{U}_{R2}| \cos(\delta_R)}}
 \end{aligned}
 \tag{4.17}$$

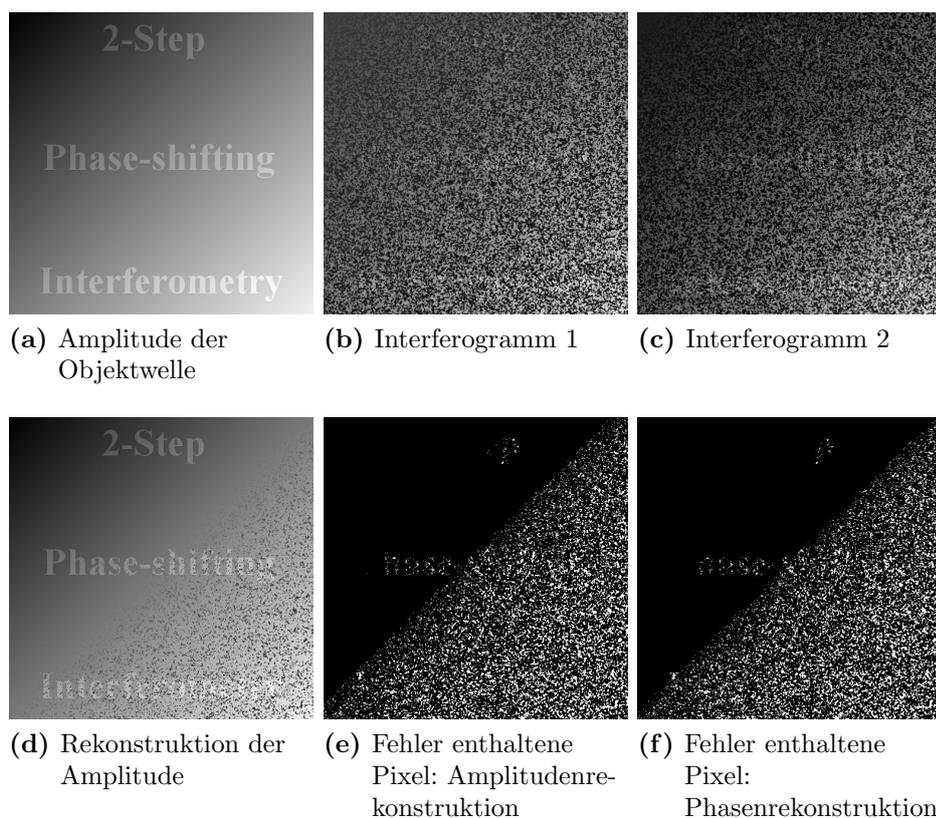


Abb. 4.15: Simulation der Rekonstruktion der Objektwelle für eine zwei-Schritt-phasenschiebende Interferometrie mit zwei in der Amplitude unterschiedenden Referenzwellen. Die Objektwelle hat das Amplitudenmuster a. und eine zufällige Phase.

Es wurde eine numerische Simulation durchgeführt, die dem Rekonstruktionsvorgang des Verfahrens entspricht. Als Objektwelle wurde eine komplexe Funktion erstellt, deren Amplitude die Gestalt von der Aufschrift "2-Step-Phase-shifting-Interferometrie" hat. Der Hintergrund hat einen konstanten Anstieg von 0 bis 1 in Richtung der

unteren rechten Ecke. Die Phase hat in jedem Pixel zufällige Werte von $-\pi$ bis π . Die Referenzwellen sind konstant in der Amplitudenanordnung und unterscheiden sich in der Amplitude um den Faktor 2 und haben eine Phasenschiebung von $\delta = \pi/2$ ($U_{R1} = 1, U_{R2} = 0, 5i$). Die Rekonstruktion ergibt zwei Werte der Objektwelle für jeden Pixel. Es wurde der kleinste, nach dem Betrag als rekonstruierte Amplitude (Abb. 4.15, d), genommen. Man erkennt die Fehler in dem Bereich, wo die Objektamplitude hoch ist. Die Anordnung der fehlerhaften Pixel lässt den maximalen Amplitudenwert $U_{O,max}$ der Objektwelle ermitteln, der ohne Fehler rekonstruiert werden kann. Man sieht das an dem Hintergrund der Objektwelle (4.15, a), dass die Region des Hintergrunds fehlerfrei ist, bis er einen maximalen Wert erreicht, der etwas kleiner als die Hälfte ist. Die Ermittlung von $U_{O,max}$ nach 4.17 ergibt $U_{O,max} = 0,45$, was mit der Simulation übereinstimmt.

4.4 Zusammenfassung – Optimierte Methoden in der digitalen Holographie

In Kapitel 4 wurden optimierte Methoden in der digitalen Holographie und Vermessung der Wellenfront in Bezug auf den optischen Aufbau und die numerische Rekonstruktion behandelt. Im ersten Abschnitt wurde die Untersuchung für Fehler bei der Tiefenbestimmung und Blendenfunktion im optischen Aufbau für die digitale Holographie durchgeführt. Die Untersuchung zeigt, dass ein dreidimensionales Volumen im Objektraum bestimmt werden kann, in dem der Öffnungswinkel nur durch die Öffnungsblende des Mikroobjektives bestimmt ist und keine Abschattung durch eine andere Blende stattfindet. Ein konstanter Öffnungswinkel im ganzen dreidimensionalen Objektvolumen ist wichtig bei der genauen Bestimmung der Partikellage bei der Rekonstruktion. Anschließend wurden Vorteile und Nachteile der polychromatischen LED und der Laserlichtquelle mit der rotierenden Streuscheibe untersucht. Durch richtige Einstellung der Laserlichtquelle mit der rotierenden Streuscheibe erreicht man die optimale Beseitigung des Speckle-Hintergrundrauschens, mit dem Beibehalten der hochfrequenten raumspektralen Anteile des aufgenommenen Hologramms. Der Abschnitt 4.2 wurde der optimierten numerischen Verfahren gewidmet. Für eine optimale numerische Rekonstruktion im Rahmen dieser Arbeit wurde eingeschränkte Impulsantwortfunktion verwendet. Eine optimale Modulation wird mit Hilfe der Gaussfunktion der höheren Ordnung erreicht. Im Abschnitt 4.2.2 wurde die parametrisierte Impulsantwortfunktion diskutiert. Die Rekonstruktion eines In-line-Hologramms mit dieser Funktion reduziert wesentlich die Rekonstruktionszeit und ermöglicht, die Tiefeninformation anhand der Musterkodierung der erhaltenen Partikelabbildungen zu entnehmen. Im letzten Abschnitt 4.3 wurde über ein neues Verfahren in der zwei-Schritt-phasenschiebenden Interferometrie berichtet. Das Verfahren ist eine Verallgemeinerung der existierenden

Verfahren für den Fall, dass die zwei Referenzwellen eine beliebige Amplitude und Phaseschiebung haben.

5 Optimierte optische Aufbauten für optische Pinzetten

5.1 Holographische Beobachtung und optische Manipulation

Gleichzeitige holographische Beleuchtung und optische Manipulation können durch ein einfaches Prinzip der Teilung der Apertur erzielt werden. Das Prinzip besteht in der Verwendung einer Linse mit hoher numerischer Apertur, die in der zentralen Region einen planparallelen Bereich hat. Dann kann die kollimierte Pinzettenstrahlung der Randregion fokussiert werden, während der Beleuchtungsstrahl ungebrochen durch die zentrale Region hindurch geht (Abb. 5.1).

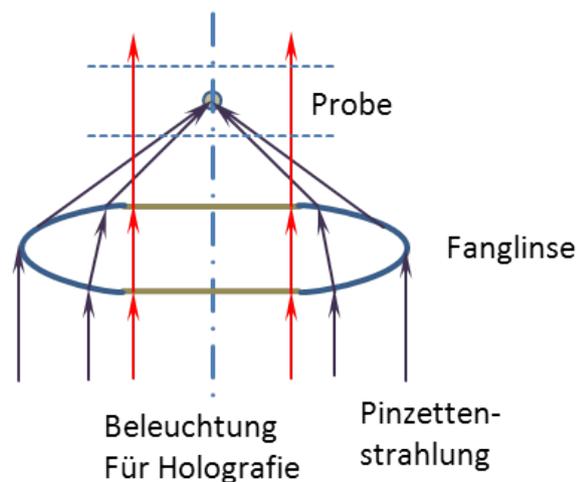


Abb. 5.1: Das Funktionsprinzip der Fanglinse

In [62] wird erklärt, dass die numerische Apertur für ein erfolgreiches Fangen ca. 1, 2 sein sollte. Für die weitere Entwicklung der Optik des Pinzettenstrahls wird angenommen, dass sie nur eine einzige asphärische Oberfläche haben soll, um den Herstellungsaufwand zu minimieren.

Der Öffnungswinkel des konvergierenden Pinzettenstrahls (der punktförmigen Abbildung des kollimierten Strahls) wird durch die Brechung des Randstrahls an der

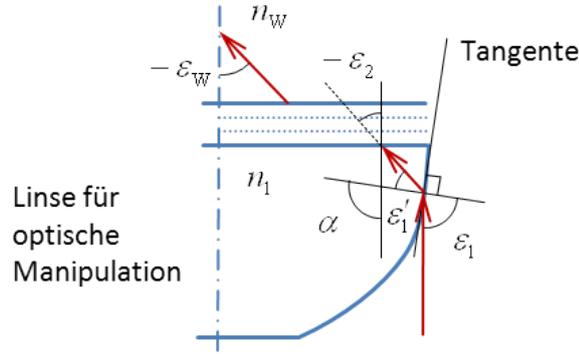


Abb. 5.2: Berechnung der maximalen NA für eine refraktive Fanglinse.

Oberfläche bestimmt. Es wird angenommen, dass der Randstrahl unter dem Einfallswinkel ε_1 auf die asphärische Oberfläche trifft (Abb. 5.2). Nach dem Brechungsgesetz wird der ε' aus $\sin(\varepsilon'_1) = \sin(\varepsilon_1)/n_1$ ermittelt. Dann wird der Strahl weiter an den Ebenen zwischen dem Linsenmedium, der Immersionsflüssigkeit, dem Deckglas und Wasser gebrochen. Die Brechungsindizes der Zwischenmedien spielen keine Rolle, da die Grenzebenen parallel sind. Wichtig sind nur die Brechungsindizes des ersten bzw. letzten Mediums, des Wassers. Der Einfallswinkel auf der ersten Ebene wird mit dem Ausdruck $-\varepsilon_2 = \pi - \alpha - \varepsilon'_1 = \pi - \pi + \varepsilon_1 + \varepsilon'_1 = \varepsilon_1 + \varepsilon'_1$ bestimmt.

$$\begin{aligned} \sin(\varepsilon_2) &= \sin(\varepsilon_1 - \varepsilon'_1) = \sin(\varepsilon_1) \cos(\varepsilon'_1) - \cos(\varepsilon_1) \sin(\varepsilon'_1) \\ &= \sin(\varepsilon_1) \sqrt{1 - \frac{\sin^2(\varepsilon_1)}{n_1^2}} - \cos(\varepsilon_1) \frac{\sin(\varepsilon_1)}{n_1} \end{aligned} \quad (5.1)$$

Die gesuchte numerische Apertur $NA = n_W \sin(-\varepsilon'_W)$ des Fangstrahls wird im Wasser mit (5.2) bestimmt:

$$\begin{aligned} n_W \sin(-\varepsilon'_W) &= n_1 \sin(-\varepsilon_2) = n_1 \left(\sin(\varepsilon_1) \sqrt{1 - \frac{\sin^2(\varepsilon_1)}{n_1^2}} - \cos(\varepsilon_1) \frac{\sin(\varepsilon_1)}{n_1} \right) \\ &= \sin(\varepsilon_1) \sqrt{n_1^2 - \sin^2(\varepsilon_1)} - \cos(\varepsilon_1) \sin(\varepsilon_1) \end{aligned} \quad (5.2)$$

Wenn im äußersten Fall der Einfallswinkel $\varepsilon_1 \rightarrow \frac{\pi}{2}$ ist, ergibt sich

$$NA = n_W \sin(-\varepsilon'_W) = \sqrt{n_1^2 - 1} \quad (5.3)$$

Die numerische Apertur wird für den Fall berechnet, dass der optische Falle im Wasser gebildet wird ($n_W = 1,3261$). Die Linse wird aus PMMA ($n_{\text{PMMA}} = 1,48$) gefertigt.

$$n_W \sin(-\varepsilon'_W) = \sqrt{1,48^2 - 1} = 1,09 \quad (5.4)$$

Der Öffnungswinkel des konvergierten Strahls im Wasser beträgt

$$-\varepsilon'_n = \arcsin\left(\frac{\sqrt{n_1^2 - 1}}{n_n}\right) = 55,6^\circ \quad (5.5)$$

Der Winkel ist für das Fangen eines Partikels zu klein. Das trifft für die Annahme des äußersten Falles zu, wenn die asphärische Oberfläche möglichst steil am Rand ist.

Die andere Variante der Strahlformung ist durch eine reflektierende Oberfläche möglich. Um die Fertigung zu vereinfachen und auf die Reflexionsbeschichtung zu verzichten, wird der Effekt der inneren Totalreflexion benutzt (Abb. 5.3). Auch wie im Fall mit der refraktiven Optik (Abb. 5.1) wird dieser optische Teil nur eine einzige asphärische Oberfläche haben.

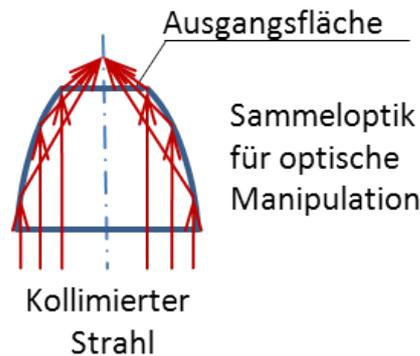


Abb. 5.3: Fangoptik mit reflektierender asphärische Oberfläche

Der maximale Winkel $-\varepsilon'_{n,max}$ des konvergierenden Fangstrahlbündels wird nach (Abb. 5.4) bestimmt. Der Winkel der inneren Totalreflexion beträgt $-\varepsilon'_{tr} = \arcsin(1/n_{\text{PMMA}}) = 42,5 < 45^\circ$, wobei n_{PMMA} der Brechungsindex für PMMA ist. Das bedeutet, dass der maximale Winkel mit der optischen Achse im optischen Teil $-\varepsilon_2$ (oder der maximale Einfallswinkel an der Ausgangsfläche) bis $\pi/2$ betragen kann. Da das Wasser einen niedrigeren Brechungsindex als das Medium des Bauteils besitzt, kann der Winkel $-\varepsilon'_{n,max}$ im Wasser einen beliebig hohen Wert bis $\pi/2$ annehmen.

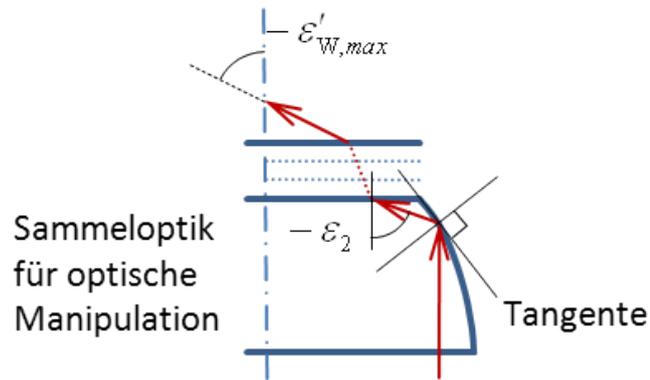


Abb. 5.4: Bestimmung des Öffnungswinkels des Fangbündels

5.2 Entwicklung und Fertigung des optischen Teils zur Formung des Pinzettenstrahls

Weiter wird der Teil mit einer asphärischen Oberfläche für die Formung des Pinzettenstrahls entwickelt. Als Ausgangsdaten für Entwicklung werden die Angaben der vorhandenen Fassungen, Deckgläser und Immersionsflüssigkeit genommen. Eine passende Fassung für das Teil, das die Montage an der xy-Justiereinheit für das Qioptiq-Mikrobanksystem ermöglicht, hat inneren einen Durchmesser von 16mm. Es wird angenommen, dass der Außendurchmesser der asphärischen Oberfläche 15mm beträgt. Die Dicken von Glas, die Immersionsflüssigkeit, Tiefe des Brennpunktes werden in der Tabelle 5.1 aufgelistet.

Stoff/Medium	Brechungsindex	Stärke
PMMA	$n_{\text{PMMA}} = 1,483$	-
Immersionsflüssigkeit	$n_{\text{FI}} = 1,506$	$z_2 = 0,2\text{mm}$
Deckglas	$n_{\text{GI}} = 1,496$	$z_3 = 0,145\text{mm}$
Wasser	$n_{\text{W}} = 1,3261$	$z_4 = 0,1\text{mm}$

Tab. 5.1: Optische Medien und Stoffen

Das Bauteil wurde mit dem Programm Zemax simuliert. In den zahlreichen Versuchen, die asphärische reflektierende Oberfläche zu optimieren, wurde festgestellt, dass man die besten Ergebnisse durch die Festlegung der Koordinate und Tangente des Punktes P_0 auf den inneren Rand des Profils bekommt (Abbildung 5.5).

Das Profil wird ab diesem festen Punkt P_0 durch die Optimierung bestimmt. Die Position des Punktes P_0 wurde durch den Durchmesser D_0 und die Tangente definiert. Der Durchmesser D_0 bestimmt die Größe der zentralen flachen Region. Der Wert $D_0 = 7\text{mm}$ resultiert aus der Bedingung, dass man auf die große flache Region einen

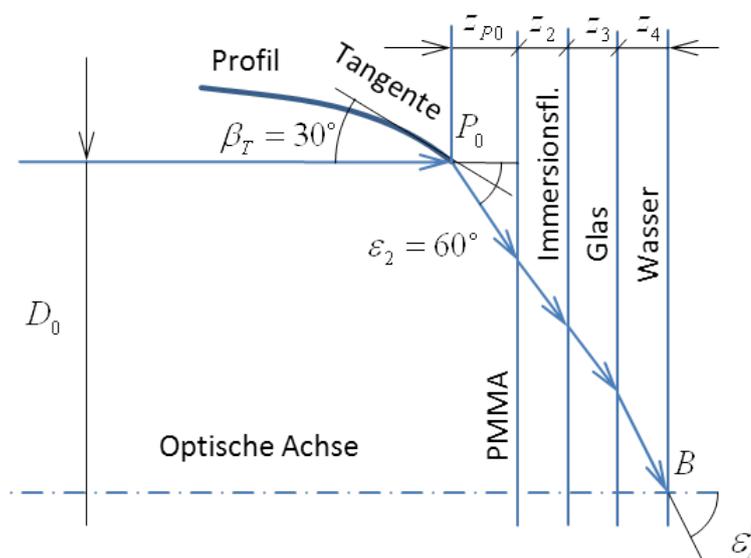


Abb. 5.5: Prinzip des Zemax-Modells. Die Koordinate des Punktes P_0 und die Tangente in dem Punkt sind vorgegeben.

ausreichend großen Tropfen der Immersionsflüssigkeit setzen kann. Dann muss bei der Verschiebung der Probe gewährleistet sein, dass die Immersionsflüssigkeit nicht auf die reflektierende asphärische Oberfläche gelangt. In diesem Fall wird die Strahlformung im optischen Teil verhindert, da die Strahlung nicht von der asphärischen Oberfläche, sondern von der Oberfläche der Immersionsflüssigkeit zurück reflektiert wird, was starke Aberrationen verursacht. Die Tangente hat einen Winkel von $\beta_T = 30^\circ$ zur optischen Achse. Das bedeutet, dass am Punkt P_0 der reflektierte Strahl unter dem Winkel $\varepsilon_2 = 60^\circ$ zur optischen Achse nach (5.5) gebrochen wird. Die numerische Apertur im Wasser wird durch (5.6) bestimmt:

$$NA = n_W \sin(\varepsilon'_4) = n_{\text{PMMA}} \sin(\varepsilon'_2) = 1,483 \cdot 0,866 = 1,28 \quad (5.6)$$

Der maximale Winkel ε'_4 des Traps im Wasser beträgt

$$\varepsilon'_4 = \arcsin\left(\frac{n_{\text{PMMA}}}{n_W} \sin \varepsilon_2\right) = 75,6^\circ \quad (5.7)$$

Der Winkel ist ausreichend für optisches Fangen nach [62]. Bei einem großen Winkel ε'_4 wird der konvergierte Pinzettenstrahl von den Kanalwänden abgeschattet oder es wird die Manipulation im Mikrokanal beschränkt. Der Durchmesser der nicht abgeschatteten Fläche des Kanalbodens muss betragen

$$D_W = 2z_4 \tan(\varepsilon'_4) = 2 \cdot 0,1 \cdot \tan(\varepsilon'_4) \approx 0,78 \text{ mm} \quad (5.8)$$

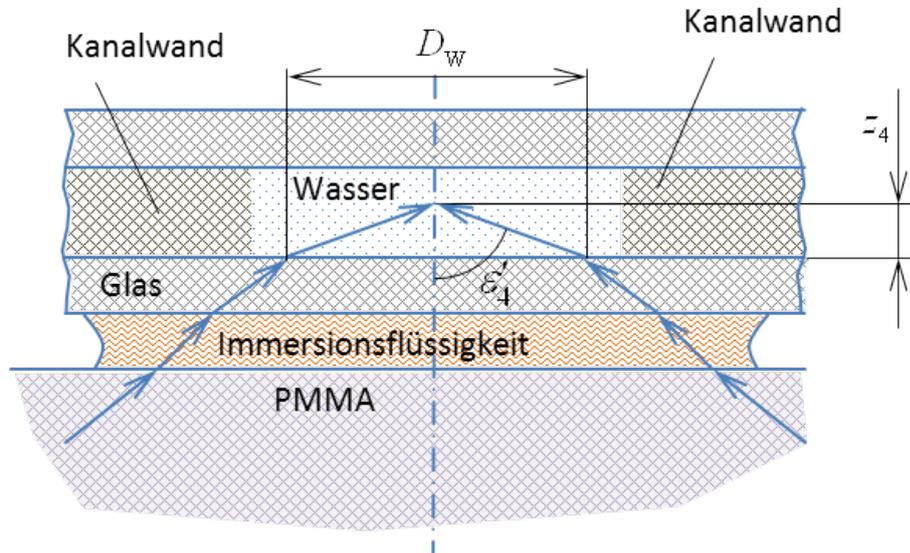


Abb. 5.6: Einschränkung des maximalen Öffnungswinkels des Traps durch die Kanalwände.

Die Optimierung ergibt den RMS-Wert von $0,603 \mu\text{m}$. Der Durchmesser des Spots bei aberrationsfreier Fokussierung des kollimierten Strahls bis zum ersten dunklen Ring kann nach 5.9 abgeschätzt werden zu.

$$d = \frac{1,22 \cdot \lambda}{\text{NA}} = \frac{1,22 \cdot 1,06}{1,28} \approx 1 \mu\text{m} \quad (5.9)$$

Die ringförmige Apertur muss ebenfalls genommens berücksichtigt werden, da der Strahl nur von der Randregion fokussiert wird. Der Durchmesser der punktförmigen Abbildung soll in diesem Fall grösser als $1 \mu\text{m}$ sein. Das System ist gut optimiert. Als Ergebnis der Optimierung wurden die Polynomkoeffizienten der asphärischen Oberfläche bestimmt (Tab. 5.2).

Das Polynom hat die Form

$$z(r) = \beta_1 r + \beta_2 r^2 + \beta_3 r^3 + \beta_4 r^4 + \beta_5 r^5 + \beta_6 r^6 + \beta_7 r^7 + \beta_8 r^8 - C \quad (5.10)$$

wobei C der Abstand (thickness) zwischen dem axialen Punkt des Profils und der nachfolgenden Fläche ist.

β_1	-29,893896	β_6	0,017121758
β_2	18,302021	β_7	$-8,3721557 \cdot 10^{-4}$
β_3	-6,5342479	β_8	$1,7778631 \cdot 10^{-5}$
β_4	1,4291369	C	-22,49578
β_5	-0,19860205		

Tab. 5.2: Polynomkoeffizienten

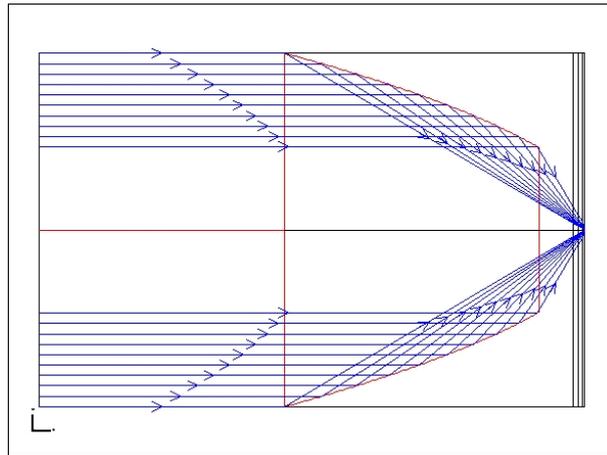


Abb. 5.7: Entwurf des entwickelten optischen Bauteils

Aus dem Polynom ermittelt man die z-Koordinate des Punktes P_0 des anfänglichen Bezugspunktes des Profils:

$$z_{P_0} = z(r_{P_0}) = z(3,5) = 1,450546 \text{ mm} \quad (5.11)$$

Für die Fertigung muss dieses Bauteil noch entsprechend vorbereitet werden. Es geht darum, dass der innere konkave Radius der gefertigten Oberfläche nur mit dem Radius $r_W = 0,5 \text{ mm}$ gefertigt werden kann, wobei r_W der Werkzeugradius ist. Das ist besonders kritisch an der oberen ringförmigen Region der asphärischen Oberfläche (Abb. 5.8 a), da dort die Strahlen mit dem größten Winkel erzeugt werden.

Der angepasste Durchmesser und die Höhe des zylindrischen Teils werden aus (5.12) und (5.13) ermittelt:

$$D'_0 = D_0 - 2(r_W - r_a) = D_0 - 2(r_W - r_W \cdot \cos(30^\circ)) = 6,866 \text{ mm} \quad (5.12)$$

$$z'_{P_0} = z_{P_0} - z'_W \sin(30^\circ) + z'_W \tan(15^\circ) = 1,3345 \text{ mm} \quad (5.13)$$

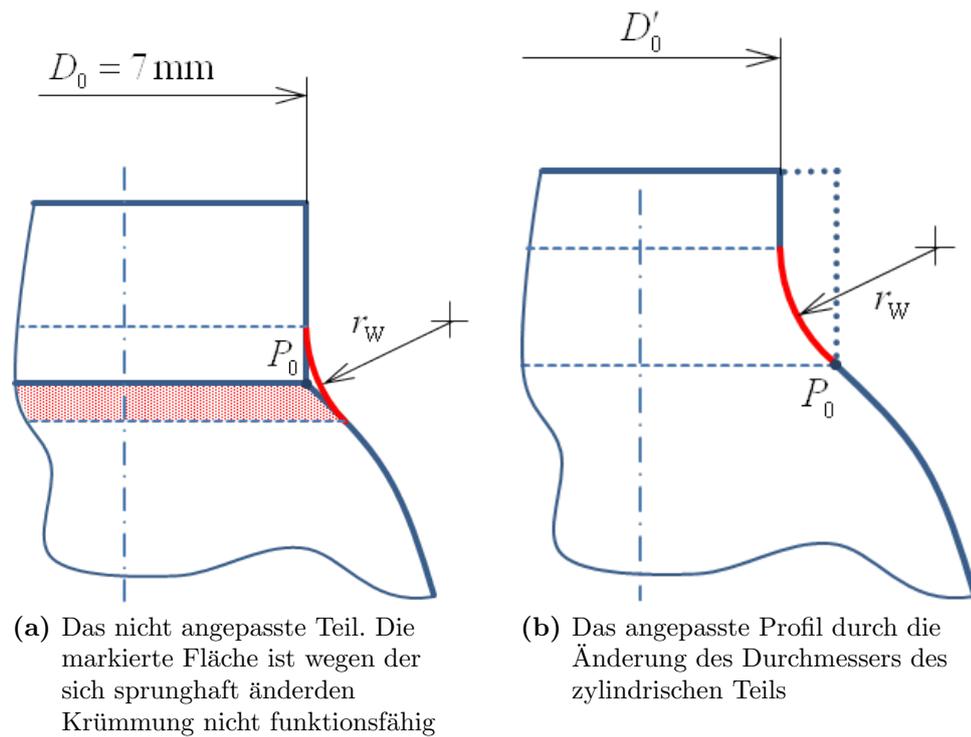


Abb. 5.8: Anpassung des Teils an die Fertigung.

Das entwickelte optische Teil wurde mit der Drehmaschine gefertigt. Dabei musste die optische Qualität der Oberflächen gewährleistet werden. Aber die obere Oberfläche hatte nur relativ eine niedrige Qualität (5.10). Die Bearbeitungsspuren waren dort ganz gut sichtbar. Wie die Versuche gezeigt haben, war das Teil trotzdem gut funktionsfähig. Das könnte damit verbunden sein, dass die Brechungsindizes des gefertigten Bauteils und der Immersionsflüssigkeit sich nicht stark unterscheiden. Außerdem wurde der untere zylindrische Sockel um 1,3 mm kürzer gefertigt, was akzeptabel ist, da das Bauteil mit kollimierten Strahlen beleuchtet wird.

5.3 Zusammenfassung – Optimierte optische Aufbauten für optische Pinzetten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herausforderung erfüllt, das optische System für die Mikromanipulation in den Aufbau für die digitale In-line-Holographie zu integrieren. Zu Beginn des Kapitels wurde kurz auf die Geschichte der optischen Pinzette eingegangen. Nach der Diskussion über die Natur der vom Licht erzeugten Kraft wur-

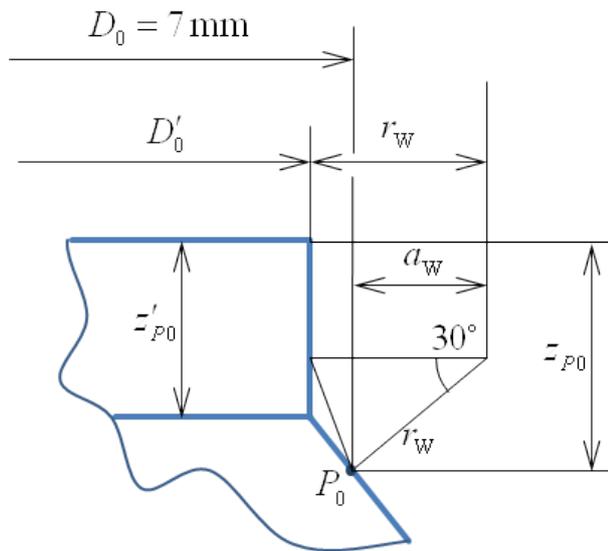


Abb. 5.9: Ermittlung des Durchmessers D'_0 und der Höhe z'_{P0} des zylindrischen Teils der Pinzettenstrahl formenden Optik



(a) Gefertigtes Bauteil

(b) Rauheit auf der oberen Oberfläche

Abb. 5.10: Realisiertes Bauteil

den grundlegende Konzepte der optischen Systeme für die Manipulation von Partikeln erörtert. Die am häufigsten verwendeten Systeme enthalten Mikroobjektive mit hoher numerischer Apertur (von $NA = 1$ bis $NA = 1,4$). Mikro-DOE und zahlreiche Fasern optischer Werkzeuge besitzen einen sehr kurzen Arbeitsabstand. Eine Möglichkeit ist

die Anwendung eines freiform-optischen Elements. Ein solches Element lässt sich aus einem Stück Kunststoff fertigen und könnte deswegen sehr billig in der Massenfertigung sein. Refraktionsoptik aus PMMA kann den maximalen Öffnungswinkel von $55,6^\circ$ im Wasser gewährleisten, was für die optische Manipulation nicht ausreichend ist. Eine Reflexionsoptik mit einer inneren Totalreflexion ist ebenfalls eine passende Variante. Das Bauelement muss eine holographische Beobachtung ermöglichen. Dazu wurde eine Gestalt mit einer planen, zentralen Region entwickelt. Der Parallelstrahl der holographischen Beleuchtung geht ungebrochen durch die plane Region hindurch, während der Pinzettenstrahl von der ringförmigen Reflexionsoberfläche fokussiert wird.

Das Bauelement wurde dimensioniert und mit dem Optik-Simulationsprogramm Zemax entwickelt. Es enthält eine asphärische Oberfläche und hat eine äußere numerische Apertur von $NA = 1,28$. Nach der Ermittlung von Polynomkoeffizienten der asphärischen Oberfläche wurde die zusätzliche Anpassung des Bauteiles an die Herstellung durchgeführt.

6 Experimenteller Aufbau und optische Manipulation

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zur Bestätigung und Untersuchung der Funktionsfähigkeit des Verfahrens ein Aufbau (Abbildung 6.1) für die integrierte digital-holographische Beobachtung in ein optische Pinzettensystem für digitale Holographie und optische Manipulation von Partikeln entwickelt, aufgebaut und justiert.

6.1 Optischer Aufbau für digitale Holographie mit dem integrierten System für optische Manipulation

6.1.1 Beleuchtungssystem für digitale Holographie

In der Abbildung 6.1 ist der experimentelle Aufbau für optische Manipulation mit digitaler holographischer Beobachtung schematisch dargestellt. Das Beleuchtungssystem besteht aus Laser, Fokussierlinse FL_1 , Streuscheibe S , Kollimationslinse KL_1 , Irisblende IB_1 . Als Lichtquelle wird ein Gaslaser (Spindler&Hoyer HeNe 633-7p 10 mW) benutzt. Durch zahlreiche Versuche wurde festgestellt, dass die Kohärenz des Lasers (Kohärenzlänge ca. 200 mm) zu erheblichen Hintergrundstörungen führen kann. Eine gute Qualität der Aufnahmen wurde mit Hilfe der rotierenden Streuscheibe S erreicht. Die Streuscheibe wird zwischen Fokussier- und Kollimationslinse (FL_1 und KL_1) montiert. Die Fokussierlinse FL_1 erzeugt einen Lichtfleck an der Streuscheibe S . Die Größe des Lichtflecks kann durch ihre Position eingestellt werden. Die gestreute Strahlung wird danach mit der Linse KL_1 kollimiert. Dabei gilt: Je kleiner der Lichtfleck, desto höher ist der Grad der räumlichen Kohärenz. Es ist anzumerken, dass eine rotierende Streuscheibe S auch ein zeitliches Zufallsrauschen verursacht. Das hängt vor allem von der Rotationsgeschwindigkeit der Streuscheibe und der Belichtungszeit der Kamera ab. Dieses zeitliche Rauschen nimmt bei Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit der Streuscheibe und der Belichtungszeit der Kamera ab. Wir nehmen im Folgenden immer an, dass die Rotationsgeschwindigkeit so wie auch die Belichtungszeit groß genug sind, um das Rauschen vernachlässigen zu können.

Die Kombination aus Fokussier- und Kollimationslinse (FL_1 und KL_1) hat auch die Funktion der Strahlaufweitung. Dadurch wird die notwendige gleichmäßige Beleuchtung des Objektvolumens gewährleistet. Nach dem Passieren der Kollimationslinse und

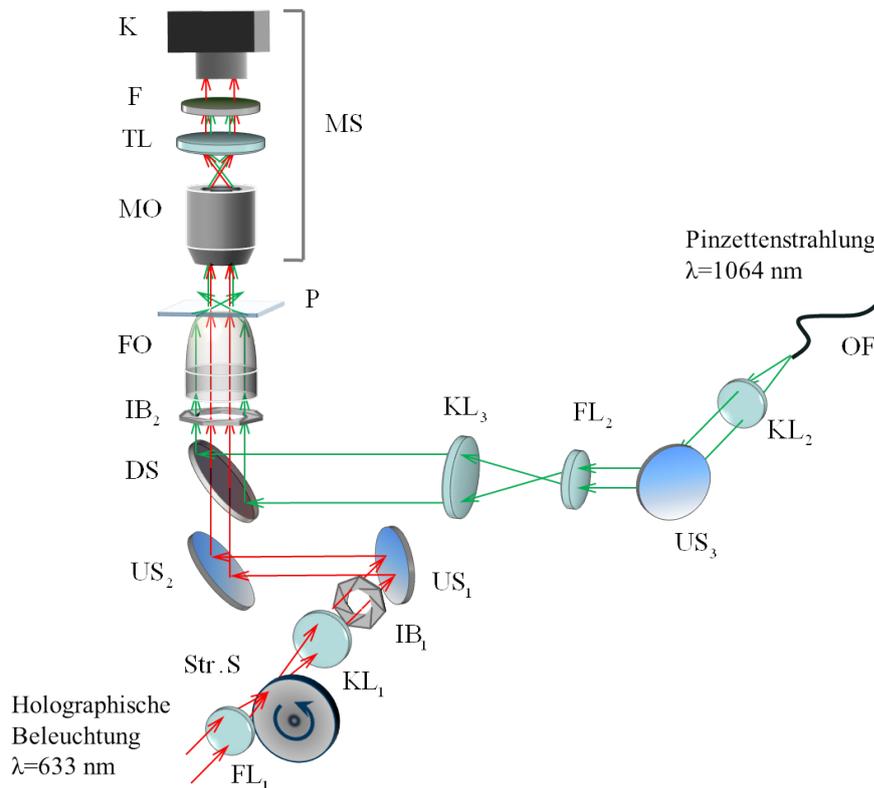


Abb. 6.1: Experimenteller Aufbau. FL_1 – Fokussierlinse im holographischen Beleuchtungssystem; S – rotierende Streuscheibe, KL_1 – Kollimationslinse im holographischen Beleuchtungssystem; IB_1 – Irisblende im holographischen Beleuchtungsarm; US_1 und US_2 – Umlenkspiegel, OF – optische Faser für IR-Strahlung; KL_1 – Kollimationslinse im IR-Arm; US_3 – Umlenkspiegel; FL_2 – Fokussierlinse im IR-Arm; KL_3 Kollimationslinse im IR-Arm, DS dichroitischer Spiegel, IB_2 – Irisblende für optische Pinzette; FO – Optischer Teil zur Formung des Pinzettenstrahls; P – Probe; MO – Mikroobjektiv; TL – Tubuslinse; F – IR-Filter; K – Kamera.

den Umlenkspiegeln US_1 und US_2 gelangt der Strahl durch den dichroitischen Spiegel DS zum Objektvolumen. Der Einfallswinkel des kollimierten Strahls spielt keine wesentliche Rolle für die in-line-holographische Beleuchtung der Probe. Wichtig ist, dass der holographische Beleuchtungsstrahl nicht die asphärische Oberfläche des optischen Bauteils für die optische Manipulation FO trifft und immer innerhalb der zentralen planen Region bleibt. Die zentrale flache Region des Teils ist ausreichend groß ($\sim 7\text{ mm}$). Trotzdem wird das Beleuchtungssystem mit einer zusätzlichen Iris-Blende IB_1 ausgestattet, um den Durchmesser des holographischen Beleuchtungsstrahls zu steuern.

6.1.2 Beleuchtung für die optische Pinzette

Ein wichtiger Teil der optischen Pinzette ist die Formung des kollimierten Strahls. Die Strahlaufweitung muss eine gute Qualität des parallelen Strahls gewährleisten, um die Aberrationen im Fokus der FO zu minimieren. Zur Strahlaufweitung wird ein Keplerisches Fernrohr FL_2 und KL_3 zur Vergrößerung ($f'_1 = 200\text{ mm}$, $f'_2 = 50\text{ mm}$) eingesetzt. Die kollimierte Strahlung kommt danach in die Strahlenkopplung, die aus zwei Spiegeln besteht. Ein dichroitischer Spiegel DS hat die Funktion des Umlenkspiegels für die Pinzetenstrahlung. Dieser lässt den holographischen Beleuchtungsstrahl durch.

6.1.3 Abbildungssystem

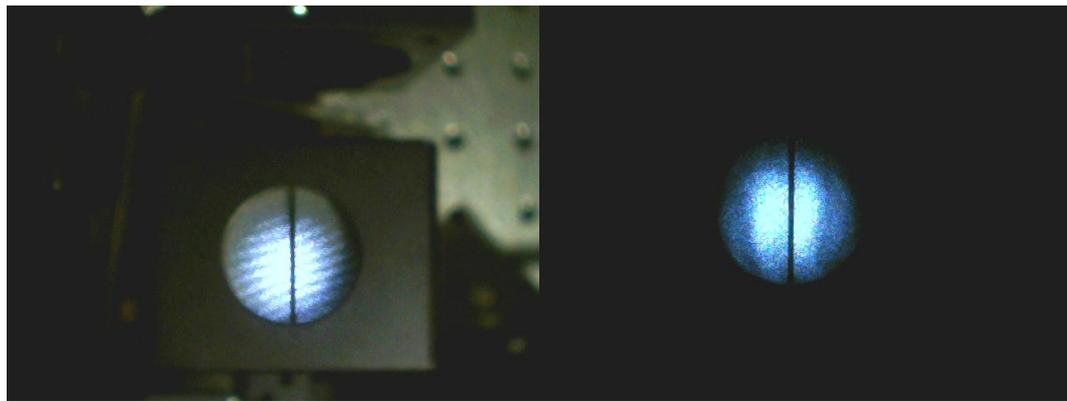
Die technischen Daten für das Abbildungssystem sind im Anhang 1 zu finden. Das Abbildungssystem besteht aus dem Mikroobjektiv MO, der Tubuslinse TL, dem Filter F und der Kamera K. Die Bauelemente werden auf einer getrennten Mikroskopschiene MS montiert, um die Schärfeeinstellung des gebauten Mikroskopes zu ermöglichen. Das Mikroobjektiv MO und die Tubuslinse TL bilden das Keplerische Fernrohr mit einer Vergrößerung ($\beta' = -6$). Die von den Partikeln gestreute und durch das Abbildungssystem hindurchgehende IR-Pinzetenstrahlung wird von zwei Filtern F, die zwischen Tubuslinse und Kamera eingesetzt sind, absorbiert.

6.1.4 Justage des Aufbaus

Die Justage beginnt mit dem Aufbau einer Aufweitung ohne Streuscheibe im holographischen Beleuchtungsarm. Die Aufweitung besteht nur aus der Fokussierlinse FL_1 und der Kollimationslinse KL_1 des späteren Beleuchtungssystems. Die Justage der Aufweitung erfolgt mit Hilfe der Shearing-Platte Melles Griot 09SPM001. Eine korrekt justierte Aufweitung erzeugt einen parallelen Strahl, der sich in der Shearing-Platte durch ein reguläres Streifenmuster kontrollieren lässt. Ein kollimierter Strahl ist für die Einstellung des Abbildungssystems nötig. Die Justage des Abbildungssystems beginnt man an der Tubuslinse TL. Der kollimierte und mit einem Polarisator abgeschwächte Laserstrahl erreicht die Tubuslinse und wird auf die Kamera K fokussiert. Schon mit den installierten IR-Filtern F findet man die richtige Position für die Kamera auf der Brennebene der Tubuslinse. In der nächsten Phase muss das Mikroobjektiv MO justiert werden. Mit Hilfe der Shearing-Platte wird die Position des Mikroobjektives gesucht, an der das Fernrohr (Mikroobjektiv MO und Tubuslinse TL) einen möglichst parallelen Strahl erzeugt. Da schon zwei aufeinander folgende Fernrohre (Aufweitung und Abbildungssystem) eingebaut sind, wird das Interferenzbild an der Shearing-Platte nicht mehr perfekt sein wegen der Aberrationen an den Einzellinsen. Nach dem Einsetzen der Kamera in die Fassung wird das Abbildungssystem justiert. Das Objektiv MO wird auf die x-y-Verstellung montiert. Darauf wird später noch einmal eingegangen.

Wie bereits erwähnt, ist das holographische Verfahren nicht besonders empfindlich gegen den Einfallswinkel des Beleuchtungsstrahls bei der Beleuchtung der Probe. Deswegen genügt es, ohne weitere Einstellungen die rotierende Streuscheibe zwischen Fokussier- bzw. Kollimationslinse zu installieren.

Für die richtige Einstellung der Pinzettenbeleuchtung muss zuerst der kollimierte IR-Strahl durch Verschiebung und Kippung des Umlenkspiegels US_3 parallel zur Achse der Aufweitung FL_2 und KL_3 ausgerichtet werden. Die Parallelität des Strahls der Schiene wird durch zwei Irisblenden kontrolliert. Danach müssen die Aufweitungslinsen FL_2 und KL_2 installiert und justiert werden. Eine genaue Justage wird anhand der Shearing-Platte ausgeführt. Da die IR-Pinzettenstrahlung nicht sichtbar ist, wird eine gewöhnliche Webkamera eingesetzt, die die besondere Eigenschaft hat, die IR-Strahlung aufzunehmen. Das aufgenommene Streifenmuster im IR-Bereich hat eine hellblaue Farbe (Abb. 6.2). Obwohl das Kameraobjektiv nicht für diese Strahlung entwickelt wurde, ist der Kontrast ausreichend, um eine genaue Justage durchzuführen. Nach Meinung des Autors ist die Qualität des Streifenmusters gut, wenn man berücksichtigt, dass die Aufweitung aus zwei einfachen Plankonvexlinsen besteht.



(a) Nicht justierter IR-Strahl

(b) Justierter paralleler Strahl. Nur zwei Streifen sind ersichtlich

Abb. 6.2: Einstellung der Aufweitung für Pinzettenstrahl mit Hilfe des Shearing-Plates und Web-Kamera.

Die letzte und gleichzeitig die aufwendigste Phase der Justage ist die Einstellung der Fangoptik für die optische Manipulation FO. Die Einstellparameter sind der Einfallswinkel des IR-Winkels und die Neigung der Probe. Der Pinzettenstrahl muss immer parallel zur optischen Achse des Bauteils laufen, wobei die Probe senkrecht zur optischen Achse positioniert werden muss. Die Simulation in Zemax zeigt eine erhebliche Empfindlichkeit des optischen Bauteils zu diesen Einstellungen. Die Justage der Fassung der Probe muss gewährleisten, dass die Probe korrekt positioniert ist. Da die

Probenfassung keine Kippeinstelleinheiten besitzt, müssen entsprechende Einstellungen „per Hand“, bei halbgelösten Schrauben gemacht werden. Der Winkel wird mit einem einfachen Verfahren kontrolliert. Man legt das Deckglas DG auf die Probenfassung F und fährt die Fassung F nach unten, bis das Deckglas komplett auf der zentralen Planregion des Bauteils für die optische Manipulation PL liegt (Abb. 6.3).

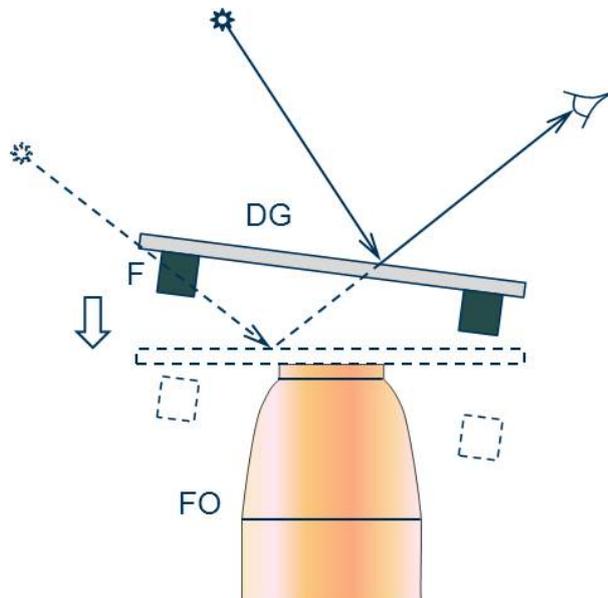
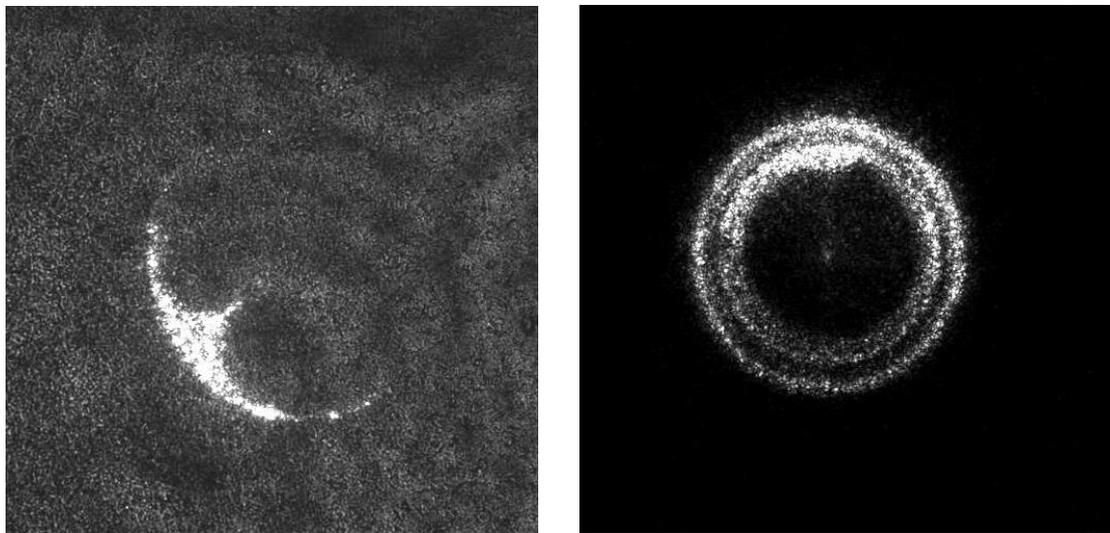


Abb. 6.3: Kippeinstellung der Probenfassung. DG, Deckglas, F, Probenfassung, FO, Fangoptik.

Bei dieser Verschiebung nach unten beobachtet man die Spiegelung eines entfernten Objektes in der Deckglasoberfläche. Wenn das Deckglas die Oberfläche des Bauteils berührt, bemerkt man bei nicht eingestellter Fassung die Verschiebung der Spiegelung an der Deckglasoberfläche. Das wird dadurch verursacht, dass die Fläche der Fassung nicht senkrecht zur optischen Achse des Bauteils für die Bildung des Pinzettestrahls ist. Das weist darauf hin, dass die Fassung gekippt zu dem Bauteil für die optische Manipulation ist. Bei dieser Einstellung versucht man die Verschiebung der Spiegelung zu verringern (Abb. 6.3).

Zur Einstellung der Parallelität des IR-Pinzettenstrahls der optischen Achse des Bauteils für die optische Manipulation beobachtet man direkt den Schnitt des Strahlprofils, der vom Bauteil selbst erzeugt wird. Das Strahlprofil lässt sich im dünnen Streumedium, das statt der Probe eingesetzt wird, beobachten. Es wurden unterschiedliche Streuprobe und Milchgläser ausprobiert. Bei den meisten war der Streuwinkel nicht ausreichend groß, um die gestreute Strahlung von dem hoch konvergierten Pinzettestrahl in ein Mikroobjektiv mit kleiner numerischer Apertur vollkommen einzufangen. Dadurch war das Strahlprofil einfach nicht sichtbar. Den deutlichsten Effekt hatte

die Probe mit der $1\ \mu\text{m}$ -Partikel-Lösung zwischen zwei Deckgläsern. Zur Vorbereitung der Teststreuprobe setzt man einen kleinen Tropfen in die Mitte des Probenglases und legt ein anderes darauf. Dann wird die Probe über das optischen Bauteil FO mit einem Immersionsflüssigkeitstropfen platziert. Das Profil sollte mit dem schon eingestellten Mikroskop zu sehen sein. Der benötigte Einfallswinkel kann durch das Kippen des dichroitischen Spiegels DS realisiert werden. Mit Hilfe des justierten Mikroskops erreicht man einen symmetrischen ringförmigen Querschnitt des Strahls in der Teststreuprobe (Abb. 6.4). Bei der Justage des Einfallswinkels des Pinzettenstrahls muss die Querposition der Fangoptik FO nachjustiert werden. Dafür verfügt die Fassung der Fangoptik FO über eine x-y-Verschiebung. Gleichzeitig muss die x-y-Position des Mikroskopobjektives mit der x-y-Verstellung nachjustiert werden, um den Fokuspunkt der Pinzette in der Mitte des Objektbereichs zu beobachten. Die endgültige x-y-Position des Bauteils bestimmt die optische Achse des gesamten holographischen bzw. Fangsystems.



(a) Der IR-Strahl ist der optischen Achse der Fangoptik nicht parallel.

(b) Justierter Strahl

Abb. 6.4: Einstellung der Parallelität des IR-Pinzettenstrahls der optischen Achse des Bauteils für die optische Manipulation.

6.2 Experimentelle Ergebnisse der optischen Manipulation

Die Probe für die Versuche zum optischen Fangen wird schematisch in Abbildung 6.5 dargestellt. Die Lösung aus Mikropartikeln füllt den Raum zwischen zwei Deckgläsern aus. Die Höhe des Objektraums wird mit dem doppelseitigen Klebeband fixiert, dessen

Stärke ca. 0,2 mm beträgt. Das Experiment erfolgt unmittelbar an im Anschluss die Probenvorbereitung, wenn die Partikeln noch schwebend in der Wasserschicht bleiben. Das ermöglicht, Partikeln in der passenden Höhe zu finden.

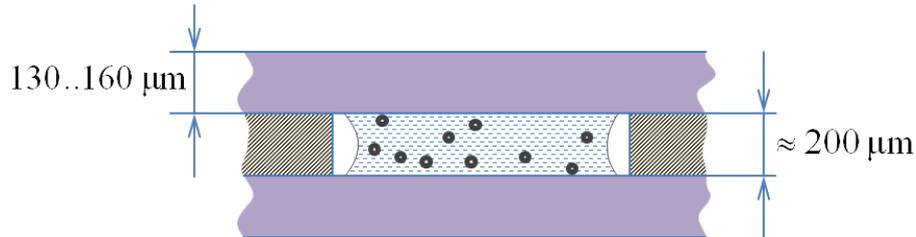


Abb. 6.5: Schematische Darstellung der Probe mit $3\mu\text{m}$ -Partikeln fürs optische Fangen

Im ersten Versuch wird das Mikroskop so eingestellt, dass die eingefangenen Partikel sich in der scharf abgebildeten Objektebene befinden. Wenn das Mikropartikel bei eingeschaltetem Fang-IR-Laser in den Fangfokus gerät, verbleibt es unbeweglich, auch wenn die Probe mit zwei XY-Verstellungen bewegt wird. Die vier Einzelbilder der Abbildung 6.6 zeigen den Vorgang der Bewegung der Probe in der positiven y-Richtung, während das Partikel im Fangpunkt fixiert ist.

Der Fangstrahl hat eine derartige Konfiguration, dass kein Teil von ihm wegen des hohen Konvergenzwinkels des Mikroobjektivs MO mit der kleinen numerischen Apertur hineingehen muss. Jedoch streut ein gefangenes Partikel, wenn das Partikel gefangen wird, die IR-Fangstrahlung in alle Richtungen, so dass ein Teil dieser Streustrahlung in das Mikroskopobjektiv MO gelangt. Da die Kamera diese IR-Strahlung registriert, erscheint im aufgenommenen Bild ein heller Fleck in der Umgebung des Partikels (Abb. 6.6). Dies ist eine unscharfe Abbildung des Partikels im IR-Spektralbereich. Um diese Störung zu unterdrücken, wurden in den folgenden Versuchen IR-Filter eingesetzt.

Eine Reihe von Versuchen hat gezeigt, dass die $3\mu\text{m}$ -Partikel zuverlässig gefangen werden können. Es gibt trotzdem eine Tendenz des Aufsteigens der Partikeln nach oben. Das zeigt sich dadurch, dass nur die Partikel in den Fangfokus hineingezogen werden, die sich unterhalb des Fokuspunktes oder in derselben Höhe befinden. Oberhalb liegende Partikeln steigen bei Fangversuchen weiter auf.

6.2.1 Effizienz

Bei der Verwendung der Fangoptik wird nicht die gesamte Energie der Fangstelle zugeführt. Um das System zu vereinfachen, wurde kein ringförmiger Strahl benutzt. Die Fangoptik wurde mit einem kollimierten einfachen Gauß-Strahl beleuchtet. Ein Teil der IR-Strahlung ging durch die plane zentrale Region hindurch.

Um den Strahlungsanteil, der in die Fangstelle fokussiert wird, zu berechnen, geht man davon aus, dass die Taille des Gauß-Strahls sich in der Nähe der Aufweitung KL_3 ,

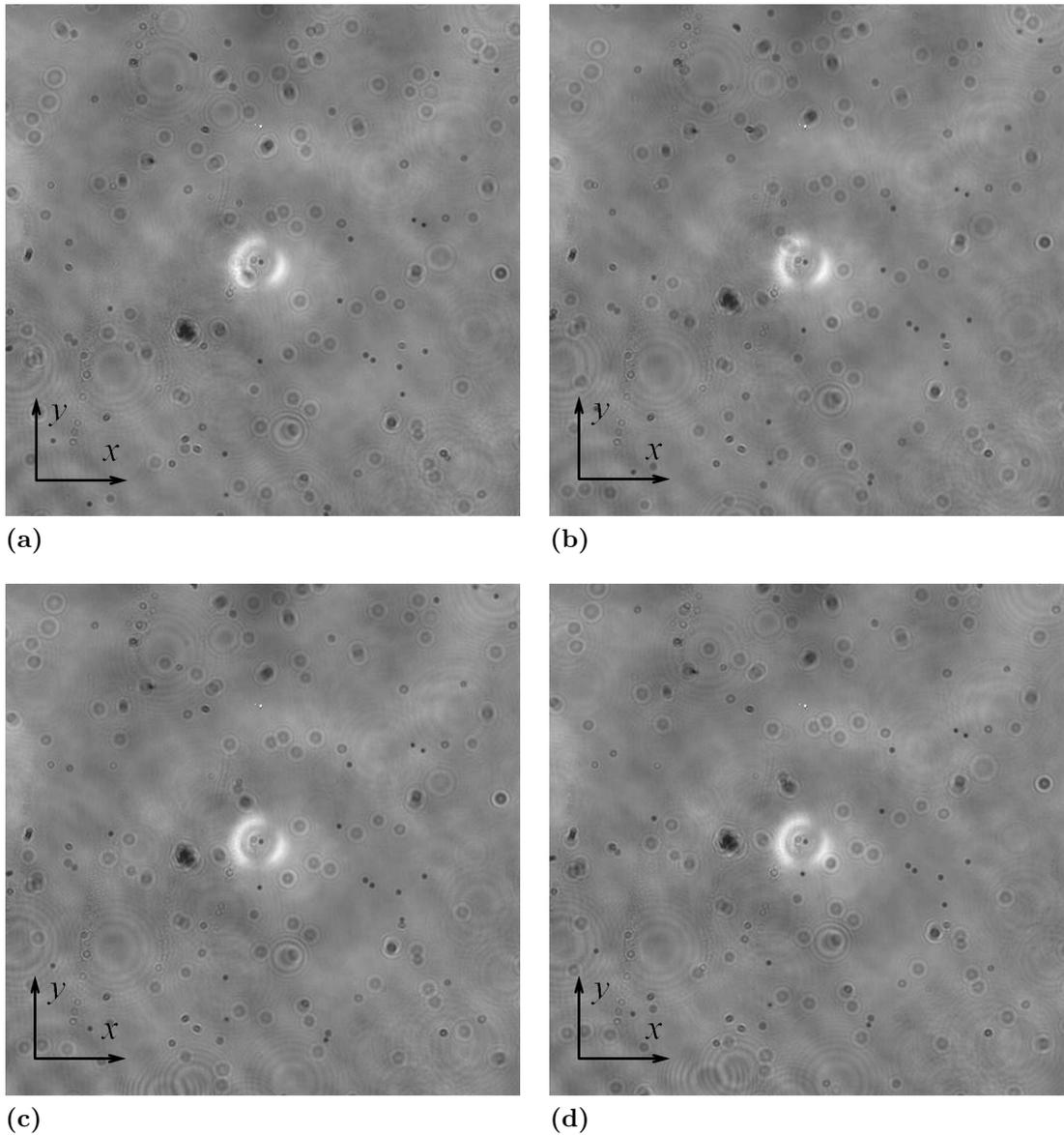


Abb. 6.6: Bewegung der Probe mit einem vor der optischen Pinzette festgehaltenen $3\mu\text{m}$ -Mikropartikel. Das abgebildete Feld $440 \times 440 \mu\text{m}^2$.

FL₂ (Abb. 6.1) befindet. Die Abbildung der Taille folgt nahe dem Fernrohr. Wegen der geringfügigen Divergenz des Strahls nach der Aufweitung wird angenommen, dass das Strahlprofil in der Eingangsapertur der Fangoptik das Profil der Taille hat. Die Taille des kollimierten Strahls vor der Aufweitung hat einen Durchmesser von 1,25 mm. Es wird angenommen, dass die Taille des aufgeweiteten Strahls 5 mm beträgt, da die Vergrößerung der Strahlaufweitung 4 ist. Im Aufbau wurde noch die zusätzliche Blende

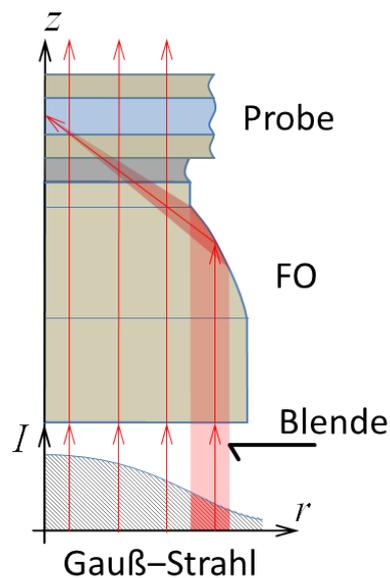


Abb. 6.7: Effizienz der Fangoptik. Nur ein Teil des Gauß-Strahls (rot) wird zur Fangstelle geleitet.

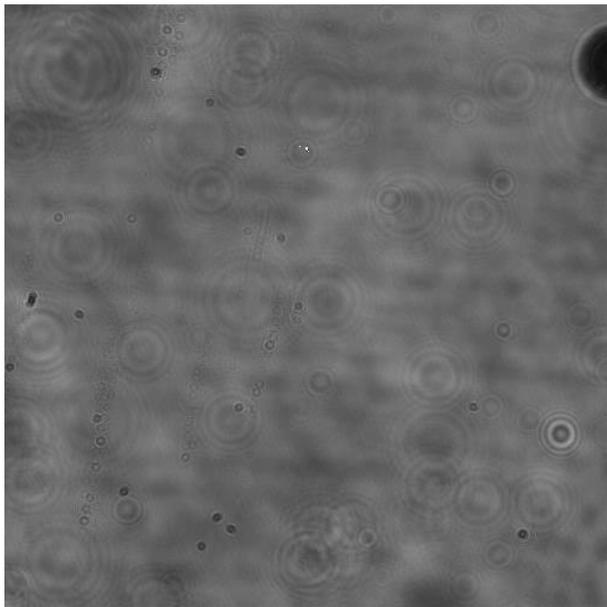
verwendet, die vor der Fangoptik eingesetzt wurde und deren Durchmesser 10 mm beträgt. Es wird, basierend auf diesen Angaben, die Energiemenge berechnet, die vom aufgeweiteten Gauß-Strahl ($w_0 = 5 \text{ mm}$) durch eine ringförmige Apertur durchgelassen wird. Die Apertur hat einen inneren Durchmesser von 7 mm und einen Außendurchmesser von 10 mm (Durchmesser der Blende).

Eine numerische Berechnung zeigt, dass der Teil des Gauß-Strahls, der durch eine solche Blende hindurchgeht, 0,18 ergibt. Bei der verwendeten Leistung von $0,5 \text{ W}$ werden ca. $0,09 \text{ W}$ (unter Vernachlässigung der Reflexionsverluste) zum Objekt geleitet. Dieser Energieanteil kann durch eine schlechte Oberflächenqualität der planen zentralen Region der Fangoptik verursacht werden. Dadurch wird nicht das gesamte Licht in die Fangstelle geleitet, was die Effizienz der Fangoptik reduziert. Eine weitere Berechnung zeigt, die Beleuchtungsstärke der nicht-fokussierten IR-Strahlung auf der optischen Achse $0,052 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ beträgt.

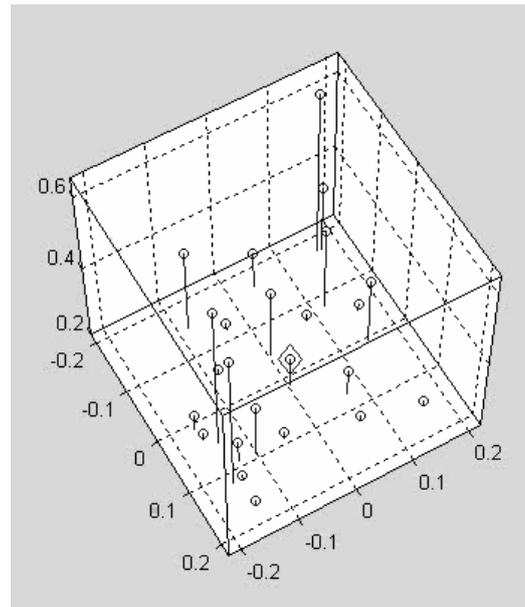
6.2.2 Holographische Aufnahme und Rekonstruktion

Das optische Fangen und die holographische Rekonstruktion wurden mit dem gleichen Aufbau durchgeführt. Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass sich die Objektebene der scharfen Abbildung ca. $200 \mu\text{m}$ außerhalb des Objektvolumens befand (Abb. 6.8).

Die optischen Filter wurden besser angepasst, so dass keine vom Partikel gestreute Strahlung um die Fangstelle herum erscheint, die die holographische Rekonstruktion



(a) Einzelbild der holographischen Videoaufnahme mit dem festgehaltenen Partikel in der Mitte.



(b) Einzelbild der Rekonstruktion. Die Raute-Marke zeigt die Lage der Fangstelle. Die Koordinaten sind in Millimetern angegeben.

Abb. 6.8: Optische Manipulation und holographische Beobachtung

stören könnte.

Der andere Effekt der Verwaschung des Hologramms durch die schnelle Bewegung der Probe während der Belichtungszeit führt dazu, dass Partikeln nicht immer erkannt werden können. Dieser Effekt zeigt sich durch Verschwinden mancher Partikeln im Rekonstruktionsvideo.

Die Partikeln wurden durch die Suche nach lokalen Intensitätsminima der Hologrammaufnahme detektiert. Dieses Verfahren ermöglicht eine gleichzeitige optische Manipulation und holographische Beobachtung in bester Weise.

6.3 Zusammenfassung – Experimenteller Aufbau und optische Manipulation

In Kapitel 6 wurden die experimentellen Ergebnisse der optischen Manipulation und die Ausführung des experimentellen Aufbaus sowie die Vorgehensweise seiner Justage beschrieben. Im Beleuchtungsarm für digitale Holographie wurde eine rotierende Streuscheibe zum Erreichen der partiellen räumlichen Kohärenz der Beleuchtungsstrahlung eingesetzt. Die Zusammenführung des Pinzettenstrahles und Beleuchtungsstrahles für

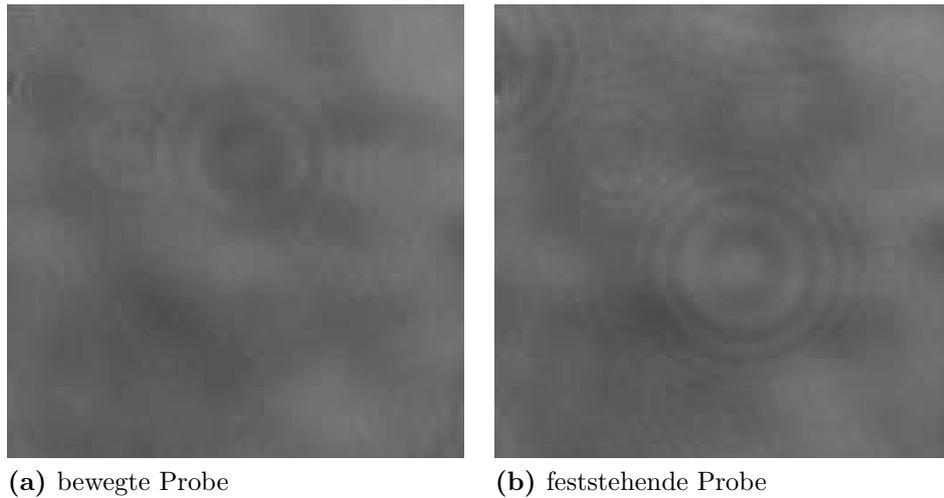


Abb. 6.9: Verwässerung des Hologramms des desselben Partikels bei der schnellen Bewegung der Probe

die digitale Holographie erfolgte mit einem dichroitischen Spiegel. Da der Aufbau relativ kompliziert ist und manche Justageparameter sehr kritisch für eine erfolgreiche Funktionsweise sind, wurde eine Teil des Kapitels der Justage gewidmet. Zu diesen Parametern, die präzise einzustellen sind, gehören vor allem der Einfallswinkel des Pinzettenstrahls, die Justage der Pinzettenaufweitung und die Neigung der Probe. Anschließend wurden die Ergebnisse von einer Reihe von Experimenten dargestellt. Als Fangobjekte wurden $3\ \mu\text{m}$ -Partikel benutzt. Der Aufbau zeigt eine zuverlässige Funktionsweise. Die Videoaufnahmen von Mikropartikeln im mikrofluidischen Kanal zeigen eine erfolgreiche Anwendung der Kombination aus gleichzeitiger holographischer Rekonstruktion und optischer Manipulation. Das geschriebene Programm für die Ermittlung der dreidimensionalen Lage der Partikeln ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der Partikelwolke als auch die numerische Darstellung von Partikelkoordinaten in Form eines Arrays.

7 Digital-holographische Bestimmung der Partikeldetektion

Das Thema der z-Auflösung in der digitalen In-line-Holographie ist von großem Interesse. Viele Einschätzungsformeln und Methoden zur Ermittlung von Schärfentiefe und z-Auflösung werden in wissenschaftlichen Beiträgen vorgeschlagen. In [30] wird der Ausdruck (7.1) angeführt, der es ermöglicht, den minimalen Abstand zwischen zwei Intensitätsmaxima von zwei Partikeln bei der Rekonstruktion zu ermitteln, falls sie auf einer Linie der z-Achse entlang angeordnet sind:

$$|r_2 - r_1| = \frac{\lambda}{2\text{NA}^2} \quad (7.1)$$

Ähnliche Ausdrücke sind in anderen Quellen [39, 94] für die Einschätzung des Rayleigh-Kriteriums (7.2) und der Schärfentiefe (7.3) vorgebracht:

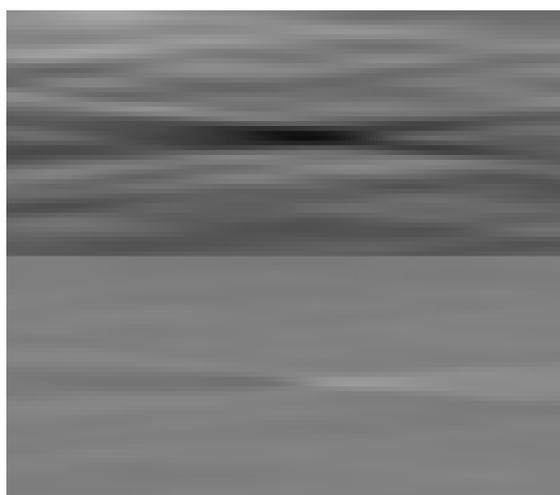
$$d = \frac{4\lambda}{\text{NA}^2} \quad (7.2)$$

$$\text{DOF} = 1.77 \frac{\lambda}{\text{NA}^2} \quad (7.3)$$

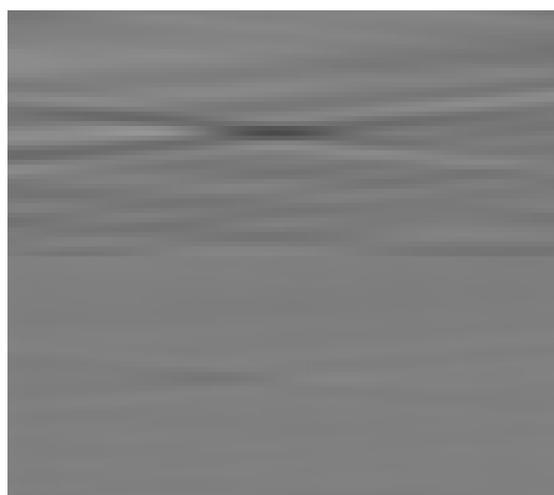
Im folgenden Kapitel wird die Genauigkeit der z-Koordinate des Partikels nicht analytisch, sondern experimentell ermittelt. Dabei werden drei unterschiedliche Verfahren verglichen.

7.1 Partikeldetektion mittels Phasendetektionsverfahrens anhand der komplexen Amplitude und Intensitätsverfahren

In den Abbildungen 7.1 bis 7.3 werden Beispiele der Rekonstruktionen gezeigt. Die Rekonstruktion wird mit schrittweise veränderter z-Koordinate unter Verwendung der oben erwähnten Rekonstruktionsalgorithmen (2.40) und (2.41) durchgeführt.

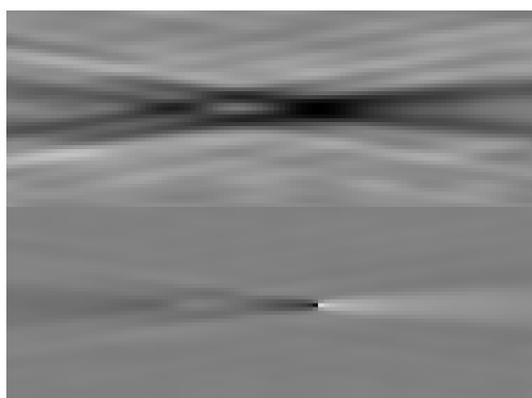


(a) MO1; 3 μm -Partikel ; Feld $100 \times 44,5 \mu\text{m}^2$

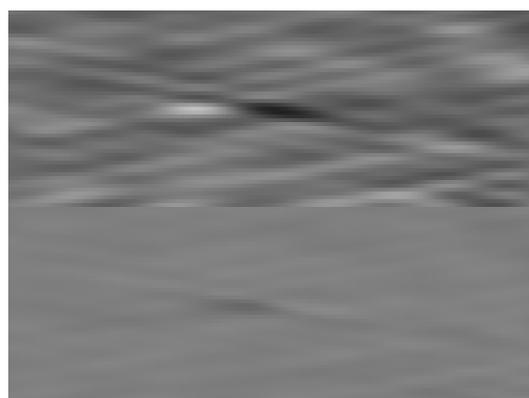


(b) MO1; 1 μm -Partikel ; Feld $100 \times 44,5 \mu\text{m}^2$

Abb. 7.1: Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektiv: MO1: Nikon, AC, $10 \times /0,21$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$



(a) MO2; 3 μm -Partikel ; Feld $60 \times 22,5 \mu\text{m}^2$

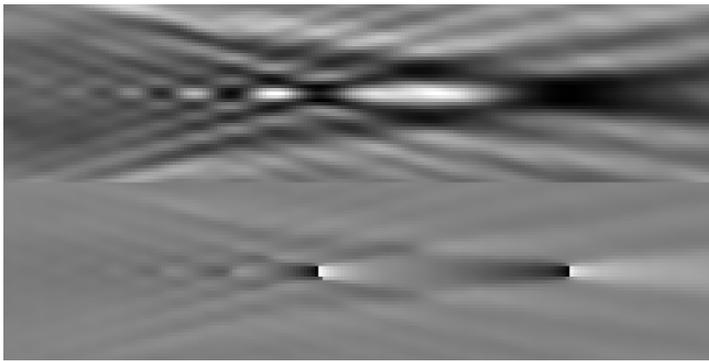


(b) MO2; 1 μm -Partikel ; Feld $60 \times 22,5 \mu\text{m}^2$

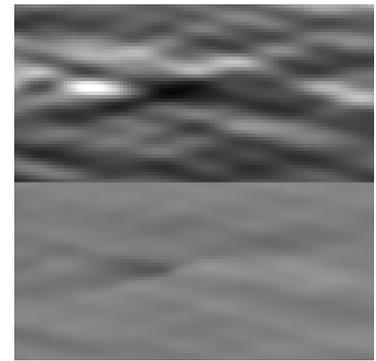
Abb. 7.2: Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektiv: MO2: Nikon, AC, $20 \times /0,35$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$

7.1.1 Phasendetektionsverfahren

Es ist aus den Abbildungen von 7.1 bis 7.3 zu entnehmen, dass das Partikel sich nicht nur durch Intensität, sondern auch durch Phasenänderung zeigt. An der Stelle, wo sich das Partikel befinden muss, sieht man einen starken Phasenanstieg (7.1 a, unten) bis zum 2π -Phasensprung (7.2 a, unten). Das Verfahren in [60] beruht auf Detektion der stärksten Phasenänderung des rekonstruierten Feldes komplexer Amplituden. Die



(a) MO3; 3 μm -Partikel ; Feld $40 \times 10, 1 \mu\text{m}^2$



(b) MO3; 1 μm -Partikel ; Feld $20 \times 10, 1 \mu\text{m}^2$

Abb. 7.3: Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektiv: MO3: NewPort, AC, $40 \times /0, 65$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$

theoretische Grundlage des Verfahrens kann wie folgt dargelegt werden. Das komplexe Feld wurde rekonstruiert in der Tiefe der schärfsten Partikelabbildung. Obwohl das Partikel durchsichtig ist, wird die scharfe Abbildung dunkler als der Hintergrund, wegen der Verluste an Streuung der Referenzstrahlung bei der Hologrammaufnahme. Die dunkle Partikelabbildung kann analytisch als Substraktion der adsorbierten Amplitude aus der Referenzwelle dargestellt werden: Nach der Rekonstruktion des Feldes auf der Ebene der scharfen Partikelabbildung, kann es annäherungsweise als Substraktion des „aktiven“ Partikels mit der normierten Amplitude $\tau_p(x, y)$ aus der Amplitude von der Beleuchtungswelle beschrieben werden (Gl. 7.4).

$$E(x, y, z = z_0) \approx 1 - \tau_p(x, y) \quad (7.4)$$

$$\begin{cases} \tau_p = 1; r \leq r_0 \\ \tau_p = 0; r > r_0, \end{cases}$$

mit τ_p Funktion der Transparenz des Partikels, r_0 Radius des Partikels.

Das Feld in der Umgebung des Partikels näher und weiter von dem Hologramm kann annäherungsweise durch Faltung des τ_p -Terms mit der Impulsantwortfunktion $h(z) = 1/(i\lambda z) \cdot \exp(ikr^2/2(z - z_0))$ dargestellt werden. Das Faltungsintegral in den Zylinderkoordinaten für den axialen Punkt sieht wie folgt aus:

$$\begin{aligned}
 E(x, y, z) &\approx 1 - \frac{1}{i\lambda(z - z_0)} \int_0^{r_0} \int_0^{2\pi} r \cdot \exp\left(\frac{ikr^2}{2(z - z_0)}\right) d\theta dr \\
 &= 1 - \frac{2\pi}{i\lambda(z - z_0)} \int_0^{r_0} r \cdot \exp\left(\frac{ikr^2}{2(z - z_0)}\right) dr \\
 &\approx \exp\frac{ikr_0^2}{2(z - z_0)}
 \end{aligned} \tag{7.5}$$

Aus dem Ausdruck (7.5) entnimmt man, dass die Phase auf der optischen Achse oder in der Mitte der Partikelabbildung sich sprunghaft verändert bei Änderung der z -Koordinate. Detektion dieses Phasensprunges ist die Hauptidee des Verfahrens für Partikeldetektion. Stetige Intensitätsprofile können ungenau sein bei der Detektion des Maximums oder maximalen Anstieges von Intensität oder Phase. Der Phasennunstätigkeit kann dagegen exakt die Partikellage aufweisen, da die Lage des Phasensprunges sehr genau bestimmt werden kann. In [60] erläutern die Autoren, dass dieser Phasenaufstieg erst unter der Bedingung der Sättigung der Phasenfunktion entstehen kann. Das bedeutet, dass die Auflösung des Abbildungssystems zweimal besser als der Partikeldurchmesser sein muss. Die Einschätzung der Auflösung des Abbildungssystems wird mit dem Abbe-Kriterium jedes Mikroobjektives gemacht (siehe Anhang). Zum Beispiel beträgt nach dem Abbe-Kriterium die Auflösung des MO1 Objektivs $d_{\text{MO}_1} = 1,83 \mu\text{m}$. Für $3 \mu\text{m}$ -Partikeln ist das nicht ausreichend, um den Phasensprung zu beobachten, weil $2d_{\text{MO}_1} > 3 \mu\text{m}$ (Abb. 7.1 (a)). Die Bedingung der Sättigung der Phase erfüllen nur die Fälle 7.2 (a) und 7.3 (a). Da ist ein scharfer Phasenaufstieg deutlich zu sehen. Der Fall mit der Aufnahme von $3 \mu\text{m}$ -Partikeln vom MO₃-Objektiv weist mehrere Phasenaufstiege und Intensitätsmaxima im axialen Profil 7.3 (a). Das Profil ähnelt dem Bessel-Strahl. Der Grund dafür ist die sphärische Verzeichnung bei den Übergängen Wasser-Glas-Luft bei der Ausbreitung der vom Partikel gestreuten Strahlung. Der Effekt wird durch die große numerische Apertur Objektivs MO3 verstärkt. Bei der Rekonstruktion des Phasenprofils des $3 \mu\text{m}$ -Partikels, das mit demselben Objektiv in der Luft aufgenommen wurde (Abb. 7.4), ist nur eine einzige Unstetigkeitsstelle der Phase zu sehen. Das Fehlen der sphärischen Verzeichnung führt zur korrekten Rekonstruktion des Partikels. Alle Energie der realen in-line-holographischen Abbildung wird dann während der numerischen Propagation zu einer Stelle geführt.

Obwohl nicht alle Partikelrekonstruktionen (Abbildungen 7.1, 7.2 und 7.3) einen scharfen Phasenanstieg zeigen, wird das Phasendetektionsverfahren für alle Kombinationen der Partikeln und Objektive verwendet, weil die z -Lage des Partikels trotzdem durch den positiven Phasenanstieg ermittelt werden kann. Die numerische Implementierung wird in Abbildungen 7.1, 7.2 und 7.3 dargestellt. Man geht davon aus, dass es immer zwei Punkte z_1 und z_2 (Abb. 7.5) gibt, die auch nicht unbedingt ganz dicht aneinander sein müssen, wo die Phasendifferenz ϕ_{max} ihr Maximum hat. Die Parti-

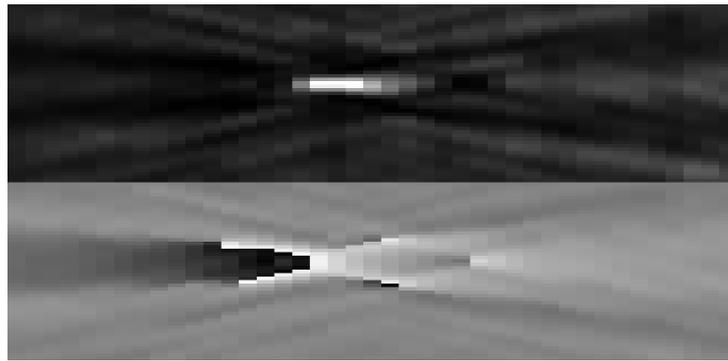


Abb. 7.4: Axiales Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. Intensität (oben) und Phase (unten), Partikel $3\ \mu\text{m}$; Feld $40 \times 10,1\ \mu\text{m}^2$. NewPort, AC, $40 \times /0,65$. Medium: Luft. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543\ \text{nm}$

kelkoordinate z_p wird in diesem Fall als Mitte zwischen zwei Punkten definiert. Ein entscheidender Parameter ist der Abstand Δz . In den nachfolgenden Rekonstruktionsvorgängen, bei denen axiale Partikellage ermittelt wird, wird auch dieser Parameter variiert.

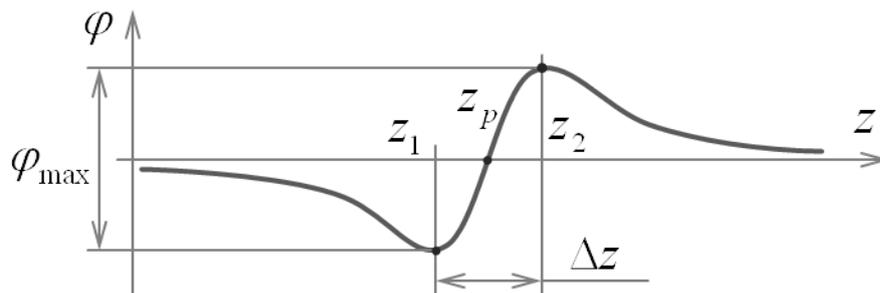


Abb. 7.5: Ermittlung der z -Partikellage beim Phasenverfahren.

7.1.2 Verfahren der Partikeldetektion anhand der komplexen Amplitude

Im Paper [59] wird ein anderes Verfahren zur Ermittlung der z -Koordinate dargestellt, das die Autoren als PECA (Particle Extraction using Complex Amplitude) bezeichnen. Die Hauptidee besteht darin, dass die Transparenz eines absorbierenden Partikels als eine reelle Funktion $A(x, y)$ dargestellt werden kann. Das bedeutet, dass das Partikel keine Auswirkung auf die Phase der Belichtung haben muss. Sie beeinflusst nur die Amplitude und stellt die Absorbtionseigenschaften des Partikels dar. Nach der Hologrammrekonstruktion entstehen vier Terme (2.3, 2.4 und 2.5). Die Abbildung des Par-

tikels ist der propagierte reelle Term O . Auf der Ebene der scharfen Partikelabbildung muss das reelle Feld $A(x, y)$ numerisch rekonstruiert werden. Das bedeutet, das im Bereich der Partikelabbildung der imaginäre Teil des rekonstruierten komplexen Feldes gegen 0 streben muss. Die Autoren untersuchen die statistischen Eigenschaften des rekonstruierten Signals im Bereich der scharfen Partikelabbildung, um die Störungen dieses rekonstruierten Feldes zu beseitigen, die von nicht fokussierten reellen und imaginären Abbildungen erzeugt wurden.

In [59] wird das Hologramm eines durchsichtigen $10\ \mu\text{m}$ -Partikels in der Luft ohne Abbildungsoptik aufgenommen und untersucht. Die Mie-Streuungs-Simulation zeigt, dass die Winkeldimension des Hauptstreumaximums für die Partikeln fast dem Öffnungswinkel entspricht, in dem alle Raumfrequenzen nach dem Nyquist-Kriterium von dem Detektor noch aufzunehmen sind. Wenn das Partikel durchsichtig ist, kann seine Transparenz nicht nur reell sein, sondern auch einen Phaseneinfluss aufweisen. In diesem Fall hat die $A(x, y)$ -Funktion der Transparenz nicht nur einen reellen, sondern auch einen imaginären Teil. Bei der Rekonstruktion wird das rekonstruierte Signal im Bereich der scharfen Partikelabbildung nicht reell, sondern komplex. Im erwähnten Paper wird trotzdem annäherungsweise angenommen, dass die Partikel als absorbierende wirken. Die Aufnahme mit dem Objektiv mit kleiner numerischer Apertur ist für die Annahme, dass viel gestreutes Licht an der Apertur des Objektivs vorbeigeht. Dieses Licht erreicht die Hologrammebene nicht und das Partikel kann als absorbierend dargestellt werden. In der Abbildung 7.6 (a) die mikroskopische Abbildung von $3\ \mu\text{m}$ -Partikeln dargestellt. Bei der Aufnahme mit dem Mikroobjektiv mit kleinen NA erscheinen die Partikeln als absorbierende Objekte. Obwohl das Verfahren eher fürs Objektiv mit kleinerer numerischer Apertur geeignet ist, werden Detektionseigenschaften des Verfahrens auch für andere Abbildungssysteme mit stärkeren Objektiven (MO_2 und MO_3) untersucht.

In der vorliegenden Dissertation wird das PECA-Verfahren weiterentwickelt. Man geht davon aus, dass sich nah an der Partikelabbildungsstelle der Imaginärteil stark ändert. Man untersucht, wie genau die Partikellage anhand der zweiten Ableitung des Imaginärteils ermittelt werden kann. Allgemein kann man feststellen, dass dort, wo die zweite Ableitung ihr Maximum hat, sich das Partikel befinden muss. Die numerische Realisierung des Verfahrens sieht folgendermaßen aus: Die Rekonstruktion der komplexen Amplitude A wird in den drei Ebenen z_1, z_p, z_2 durchgeführt. Es wird der Wert $D = \text{Im}(A(z_1)) + \text{Im}(A(z_2)) - 2\text{Im}(A(z_p))$ berechnet, der der zweiten Ableitung des Imaginärteils annähernd gleich ist (Abb. 7.7). Es wird nach dem Maximum des Wertes D in einem dreidimensionalen Volumen gesucht, wo sich das Partikel befinden muss, wie es im ersten Verfahren gemacht wurde.

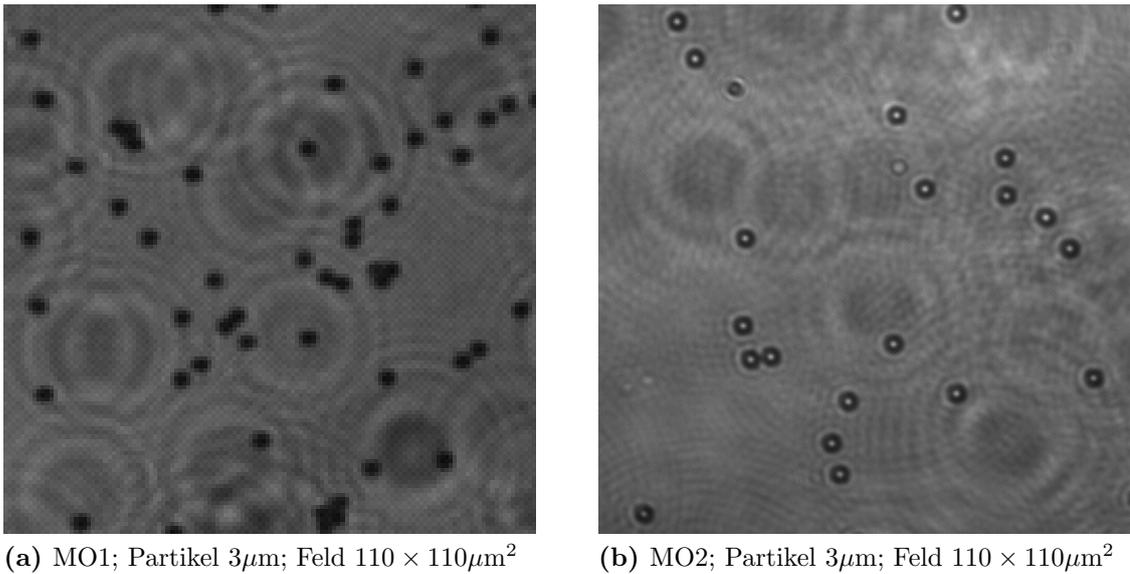


Abb. 7.6: Mikroskopische Abbildung. Verwendete Objektive: MO₁: Nikon, AC, $10 \times 0,21$; MO₂: Nikon, AC, $20 \times 0,35$; Medium: Wasser, Deckglas $0,17\text{ mm}$. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543\text{ nm}$

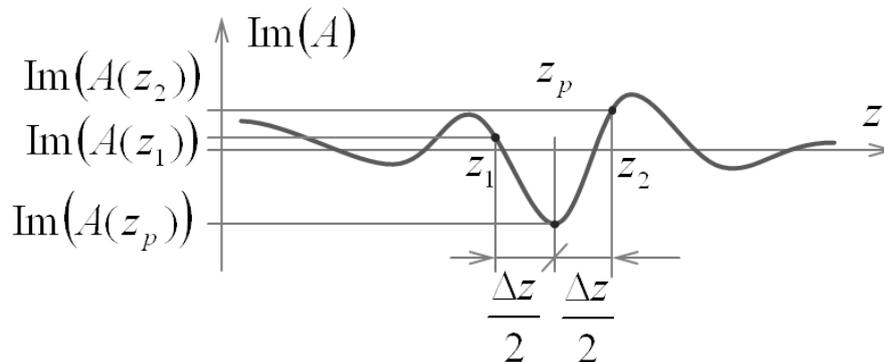


Abb. 7.7: Ermittlung der z-Partikellage beim Verfahren der komplexen Amplitude.

7.1.3 Intensitätsverfahren

Das letzte Verfahren, das in der experimentellen Arbeit verwendet wurde, ist die Ermittlung der axialen Partikelkoordinate nach dem Intensitätsminimum. Wie es schon besprochen wurde, verursacht die Lichtstreuung am Partikel Leistungsverluste. Deswegen muss die Partikelabbildung die Stellen mit niedriger Intensität bei der Rekonstruktion aufweisen. Nach diesem Verfahren werden die Koordinaten an der dunkelsten Stelle ermittelt.

7.2 Durchführung des Experiments und Ergebnisse der Rekonstruktion

Für die statistische Ermittlung der Leistungsfähigkeit der drei oben dargestellten Verfahren braucht man eine Referenz oder Kenntnis der genauen Position des Partikels während der Hologrammaufnahme. Als Referenz der Partikellage wird das Deckglas benutzt. Die am Deckglas angehefteten Partikeln haben die gleiche z-Koordinate. Das Prinzip wurde auch in [59] erklärt. Die einfache Ebene mit Mikropartikeln wurde wie im Paper durch eine kompliziertere Probe ersetzt, die einen Mikrokanal nachbildet.

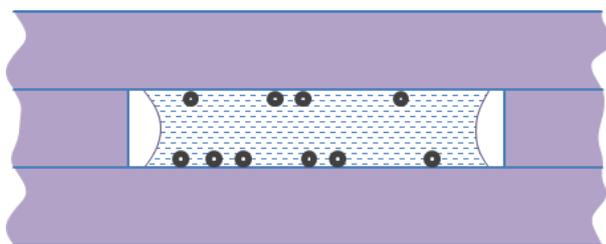


Abb. 7.8: Probe mit zwei Schichten von an Deckgläser angehefteten Mikropartikeln.

Zur Erzeugung einer solchen Probe wurden zwei Deckgläser genommen (Abb. 7.8). Man hat auf jedes Deckglas einen kleinen Tropfen von Mikropartikellösung gesetzt. Nach einiger Zeit, zu der alle Partikeln absanken und an jedem der zwei Deckgläser durch die Adhäsionskraft angeheftet waren, wurden zwei Gläser zusammengesetzt, dass die Lösungstropfen zusammenfließen. So entsteht ein Medium mit zwei parallelen Ebenen, die von Partikeln besetzt werden. Der Abstand zwischen zwei Deckgläsern wird von zwei kleinen Deckgläsern bestimmt, die zwischen sie gelegt wurden. So wird eine mehrschichtige, dreidimensionale Füllung des Objektvolumens mit Mikropartikeln initiiert, die trotzdem eine bekannte z-Position haben. Jede rekonstruierte Abbildungsebene hat immer unscharfe Abbildungen von in der anderen Ebene liegenden Partikeln am Hintergrund, was den realen Rekonstruktionverhältnissen entspricht. Die Stärke der Deckgläser liegt nach den Angaben des Herstellers im Bereich von 130 bis 160 μm . Die spielt keine wesentliche Rolle und wird nicht bestimmt. In manchen Fällen, besonders beim Aufnehmen von 1 μm -Partikeln, war es nicht möglich, alle Partikeln an den Deckglasoberflächen anhaften zu lassen. Kleinere 1 μm -Partikel bleiben wegen der Brownschen Bewegung sehr lange im Wassertropfen schwebend, ohne auf die Deckglasoberfläche zu sinken. Deswegen wird eine andere Form der Probe benutzt. (Abb. 7.9).

Die Partikeln auf jeder Ebene werden zwischen zwei Deckgläser mit möglichst wenig Wasser geklemmt. So versucht man zu erreichen, dass die Deckgläser wirklich auf den Partikeln liegen. Die Rekonstruktion wird für zwei Partikelgrößen 1 μm und 3 μm durchgeführt. Dabei werden drei Abbildungssysteme mit verschiedenen Mikroobjektiven ver-

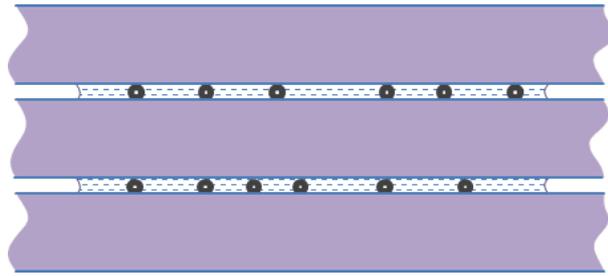


Abb. 7.9: Probe mit zwei Schichten von an Deckgläser angehafteten Mikropartikeln.

wendet. Proben mit zwei Gläsern und Wasser (Abb. 7.8) werden weiter als "gwg" gekennzeichnet. Proben mit drei Deckgläsern (Abb. 7.9) werden als "ggg" gekennzeichnet.

Für jeden z -Wert wird die komplexe Amplitude in drei Ebenen numerisch ermittelt; für die Koordinate $z_p = z$ als auch für z_1 vor und z_2 hinter der Rekonstruktionsebene z_p . Der Abstand zwischen z_1 und z_2 beträgt Δz , so dass $z_1 = z_p - \Delta z/2$ und $z_2 = z_p + \Delta z/2$. Für das Phasenverfahren hat Δz die Bedeutung der Steigerung des Argumentes bei Ermittlung der ersten Ableitung. Beim Verfahren der komplexen Amplitude beträgt die Steigung zwischen drei Nachbarpunkten $\Delta z/2$. Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens für die komplexe Amplitude, abhängig vom Δz -Parameter wird untersucht.

Eine charakteristische Phase von vielen in-line-holographischen Algorithmen ist die grobe Partikeldetektion [32, 106], bei der die XY-Partikellage grob ermittelt wird. Im nächsten Schritt kommt die Präzisierung der X-, Y- und Z-Koordinate. Im Rahmen der Untersuchung hat man auf den ersten Schritt verzichtet, weil nicht alle Partikeln gleichartig waren. Weil zusammengeklebte Partikeln ein ganz anderes Profil der rekonstruierten komplexen Welle haben, sind sie auch nicht erwünscht bei der Untersuchung, weil sie die Statistik der z -Lage beeinflussen können. Also kann man sagen, dass sich die Untersuchung nur auf einzelne, homogene Partikeln in der Probe bezog. Ein Programm erleichterte die Bearbeitung der zahlreichen Hologramme um ein „area of Interest“, für Partikeldetektion zu bestimmen.

Es wurden insgesamt mehr als 580 Rekonstruktionen für insgesamt 16 Hologramme durchgeführt, von denen jedes zwei Schichten von Mikropartikeln hatte. Der kleinste Rekonstruktionsabstand war $25\mu\text{m}$, der größte $300\mu\text{m}$. Bei der Rekonstruktion bestehen zwei Alternativen. Entweder muss die numerische Propagation in der Luft durchgeführt werden, dort, wo sich die Aufnahmeebene während der Aufnahme befand. Eine andere Variante wäre die Rekonstruktion im Wasser, wo eine gestreute Strahlung von Partikeln erzeugt wurde und wo die Strahlung sich ein Teil der Strecke in Richtung der Aufnahmeebene ausbreitete. Der Unterschied liegt in der Wellenlänge der Strahlung bei der numerischen Propagation. Eine Reihe von Versuchen zeigte den Vorteil der Rekonstruktion in der Luft. Das heißt, dass die Wellenlänge λ bei der numerischen

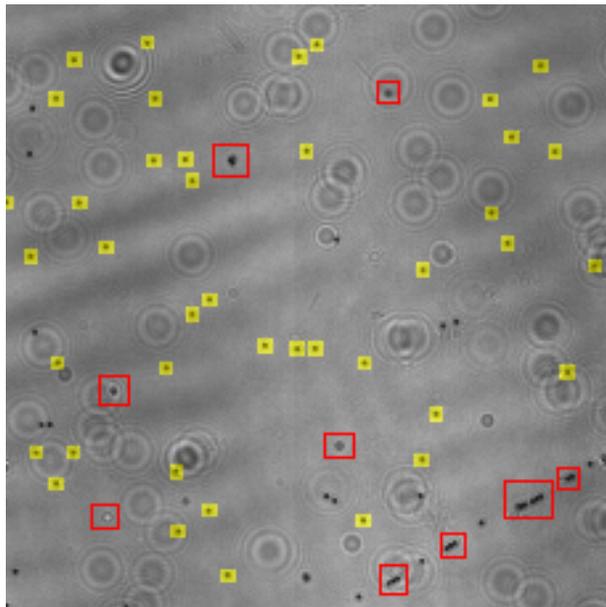


Abb. 7.10: Markierung „Area of Interest“ in der mikroskopischen Abbildung der $3\ \mu\text{m}$ -Partikeln. Die Daten mit Koordinaten von markierten Partikeln (gelb) werden gespeichert und bei der Untersuchung der z-Genauigkeit benutzt. Die z-Lagen nur von gleichartigen und einzelnen Partikel muss bestimmt werden. Die nicht erwünschten Einschlüsse und zusammengeklebten Partikeln (rot) müssen die Statistik der Untersuchung nicht beeinflussen.

Rekonstruktion $633\ \text{nm}$ betragen hat.

Das Ergebnis einer Rekonstruktion sieht folgendermaßen aus:

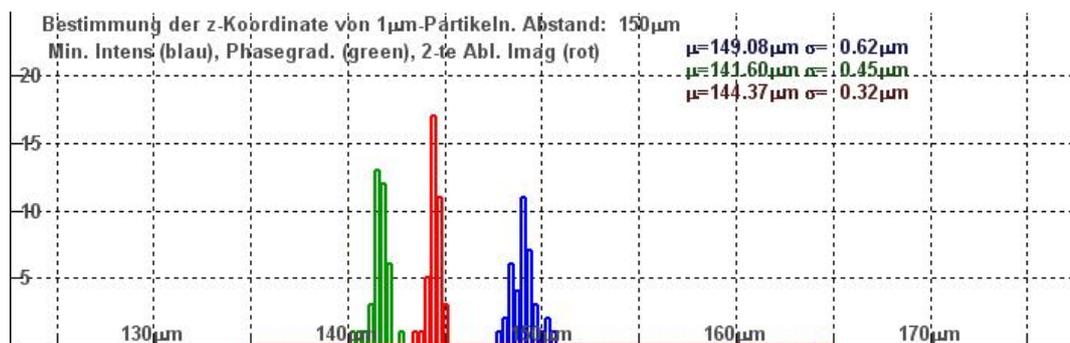


Abb. 7.11: Ermittlung der z-Lage von 38 $3\ \mu\text{m}$ -Partikel im z-Bereich von 135 bis $165\ \mu\text{m}$ mit drei unterschiedlichen Verfahren: Minimum der Intensität (blau), Phasenverfahren (grün), Verfahren der komplexen Amplitude (rot). Histogrammdarstellung.

In der Abbildung 7.11 wird eine Rekonstruktion der Bodenebene eines Hologramms

Partikelgröße und Objektiv	Verfahren/	Streuung/	Δz	Abstände
$1\mu\text{m}$, MO_2	k. Amp. V.	$\sigma=1,67$	$\Delta z = 5\mu\text{m}$	25,150 μm
$1\mu\text{m}$, MO_3	Phs. V.	$\sigma=1.72$	$\Delta z = 1\mu\text{m}$	50,100 μm
$3\mu\text{m}$, MO_1	k. Amp. V.	$\sigma=1.8$	$\Delta z = 1\mu\text{m}$	80,180,200 μm
$3\mu\text{m}$, MO_2	Int. V.	$\sigma=0.81$	————	50,150,200,300 μm
	k. Amp. V.	$\sigma=1.02$	$\Delta z = 5\mu\text{m}$	50,150,200,300 μm
	k. Amp. V.	$\sigma=0.84$	$\Delta z = 10\mu\text{m}$	50,150,200,300 μm
$3\mu\text{m}$, MO_3	k. Amp. V.	$\sigma=1.83$	$\Delta z = 5\mu\text{m}$	80,200 μm

Tab. 7.1: Genauigkeit bei der Ermittlung der z-Partikellage mit unterschiedlichen Verfahren: Int. V. – Intensitätsverfahren; Phs. V. – Phasenverfahren; k. Amp. V. – Verfahren der komplexen Amplitude

dargestellt. Es wurde die z-Lage von 38 $3\mu\text{m}$ -Partikeln mit drei dargestellten Verfahren ermittelt. Δz beträgt $5\mu\text{m}$, der Aufnahmeabstand $150\mu\text{m}$. Die Aufnahme wurde gemacht mit dem Mikroobjektiv Nikon, AC, $20\times/0,35$. Die Farbkodierung ist folgende: blau Intensitätsminimum; grün- Maximum der ersten Ableitung; rot- zweite Ableitung des imaginären Teils. Das Ziel ist, das Verfahren mit minimaler Streuung zu ermitteln. Nicht alle Verfahren funktionieren gleich gut bei der Rekonstruktion. Bei der Einschätzung der Verfahren zur Ermittlung der z-Partikellage wurde die Streuung betrachtet. In der Tabelle 7.1 wird maximale Streuung für alle angezeigte Abstände dargestellt abhängig vom Objektiv und Partikelgröße.

Man kann aus der Tabelle entnehmen, dass fast bei allen Fällen die Streuung der numerisch ermittelten Partikellage Σ ca. 1 bis $2\mu\text{m}$ beträgt. Bei $NA = 0,21$ (MO_1) ist das Ergebnis nur gut für das Verfahren für eine komplexe Amplitude (Tabelle 7.1 Zeile 3). Die Autoren von [59] haben auch gezeigt, dass es sogar bei niedrigerer numerischer Apertur von ca. $NA = 0,1$ möglich ist, axiale Auflösung zu erzielen, die mit dem Partikeldurchmesser vergleichbar ist. Beachtlich ist auch, dass die größere numerische Apertur ($NA = 0,35$) vorteilhafter ist. (Tabelle 7.1 Zeilen 5,6) beim gleichen Verfahren für die komplexe Amplitude. Eine weitere Erhöhung der numerischen Apertur bietet fast keinen Vorteil (Zeile 7) im Vergleich mit dem MO_1 ($NA = 0,21$), (Zeile 3). Das kann durch ein Vorhandensein der im Abschnitt 7.1.1 erwähnten spärlichen Verzeichnungen erklärt werden. Bei numerischen Apertur gleich $0,65$ entstehen stärkere sphärische Verzeichnungen, die die Fokussierung der numerisch rekonstruierten Objektwelle auf der Ebene der scharfen Abbildung hindern. Die Strahlung, die in einem Punkt der Partikelabbildung gesammelt werden muss, wird über mehrere Maxima verteilt (Abb. 7.3, a). Nach der Rekonstruktion in diesen Fällen entstehen mehrere Intensitätsmaxima und Phasensprünge, die mehrmals in unterschiedlichen Abständen auftreten (Abb. 7.12). Ein optimierter Rekonstruktionsalgorithmus, der das Schichtsystem berücksichtigt, könnte hier Abhilfe schaffen.

Für Verfahren für die komplexe Amplitude in Bezug auf $3\ \mu\text{m}$ -Partikel liefert die Verwendung des Objektivs MO_2 ($\text{NA} = 0,35$) bei dem Abstand $\Delta z = 10\ \mu\text{m}$ die kleinste Streuung (siehe Tabelle 7.1 Zeile 6). Das Verfahren für das Intensitätsminimum zeigt ein vergleichbares Ergebnis (Zeile 4). Bei den $1\ \mu\text{m}$ -Partikeln erwies sich das Verfahren für das Intensitätsminimum als nicht zuverlässig. (Zeile 1,2).

Das Intensitätsverfahren bleibt außerhalb der Auflistung, da es sich im Verhältnis zu anderen als kein zuverlässiges Verfahren erwiesen hat. Wie man sieht, gibt es keinen Vorteil bei den Objektiven mit höherer numerischer Apertur. Das kann durch das Vorhandensein von sphärischen Aberrationen erklärt werden. Die sphärischen Aberrationen werden durch den Durchgang des Lichtes über die Mediengrenzen (Wasser-Glas-Luft) ausgelöst und steigen mit zunehmendem Erhöhen des Öffnungswinkels des optischen Systems. Nach der Rekonstruktion entstehen mehrere Intensitätsmaxima und Phasensprünge (Abb. 7.1 a, 7.2 a, 7.3 a.), die mehrmals in unterschiedlichen Abständen auftreten (Abb. 7.12).

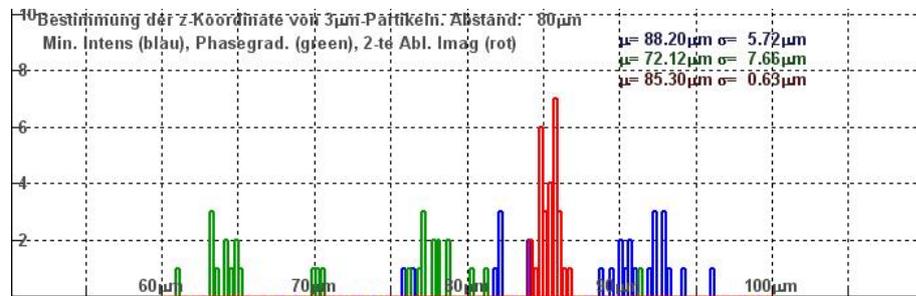


Abb. 7.12: Ermittlung der z -Lage von 28 $3\ \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 2\ \mu\text{m}$. Histogramm. Mikroobjektiv: MO_3 (NewPort, AC, $40\times\text{NA}0,65$). Phasenverfahren (grün) zeigt mehrmalige Phasenänderungen bei Ermittlung der Lage von Partikeln

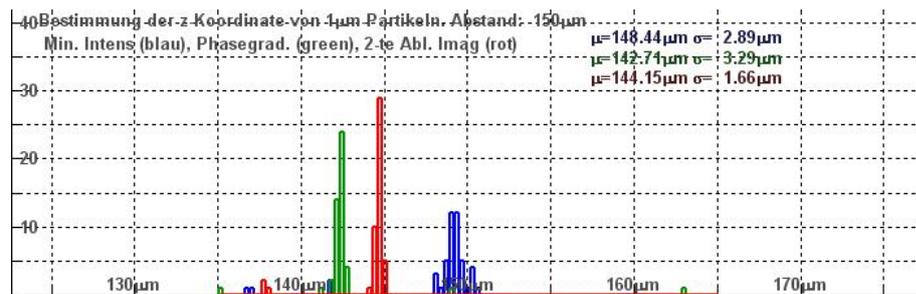


Abb. 7.13: Ermittlung der z -Lage von 48 $1\ \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 25\ \mu\text{m}$, Histogramm. Mikroobjektiv: MO_2 (Nikon, AC, $20\times\text{NA}0,35$). Das Effekt von Einzelausnahmen, die das gesamte Ergebnis der Partikellageermittlung verschlechtern.

Einzelne Ausnahmen verschlechtern ebenfalls die Zuverlässigkeit des Verfahrens. In der Abbildung 7.13 wird ein Beispiel gezeigt, in dem die Maxima des Histogramms für

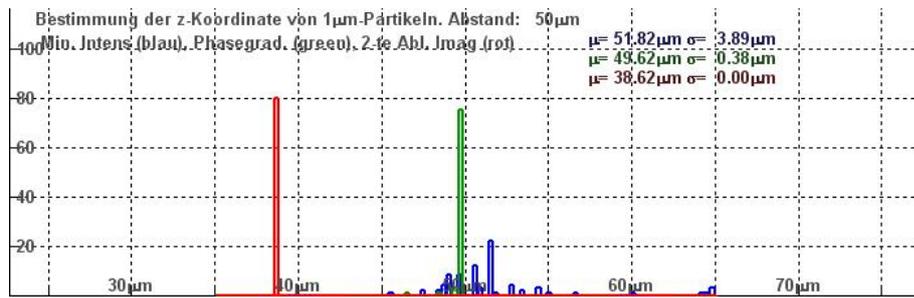


Abb. 7.14: Ermittlung der z-Lage von 80 $1 \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 6 \mu\text{m}$. Histogramm. Mikroobjektiv: MO_1 (Nikon, AC, $10 \times NA0, 21$). Das hervorragende Ergebnis zeigt sich nur in einem Rekonstruktionsabstand von $z = 50 \mu\text{m}$ bei der Rekonstruktion von $1 \mu\text{m}$ -Partikeln mit dem Verfahren der komplexen Amplitude (rot).

jedes Verfahren gut ausgeprägt sind. Aber durch einzelne gestreute Ereignisse bei der Ermittlung der Partikellage wird die Streuung höher, was die Qualität des Verfahrens verringert.

Ein hervorragendes Ergebnis ist in der Abbildung 7.14. dargestellt. In einem kurzen Rekonstruktionsabstand von $50 \mu\text{m}$ stimmt die z-Koordinate von allen 80 $1 \mu\text{m}$ -Partikeln überein. Man kann behaupten, dass der Zuverlässigkeitsbereich vergleichbar mit Δz ist, der eine Hälfte der Wellenlänge betrifft. Das Ergebnis ist zweimal bei der Rekonstruktion von zwei unterschiedlichen Hologrammen erschienen. Das gleiche Ergebnis $\sigma = 0$ für das Verfahren der komplexen Amplitude sieht man bei der Rekonstruktion von zwei unterschiedlichen Hologrammen mit $3 \mu\text{m}$ -Partikeln im Abstand von $300 \mu\text{m}$ bei Verwendung von MO_1 Objektiv ($10 \times 0, 21$). Bei anderen Abständen für dieselben Partikeln und Mikroobjektive treten größere Werte der Streuungen auf, weswegen diese nicht in der Tabelle 7.1 aufgelistet wurden.

7.3 Zusammenfassung – Digital-holographische Bestimmung der Partikeldetektion

Das vorausgehende Kapitel wurde der Genauigkeit des Partikeldetektion gewidmet. In der dargestellten Untersuchung wurden mehrere Rekonstruktionsverfahren bezüglich unterschiedlicher Partikeln und mit verschiedenen Mikroobjektiven geprüft. Eines der Verfahren ist die Ermittlung der Partikellage anhand der ersten Ableitung der Phase von dem rekonstruierten komplexen Feld. Es wurde auch die klassische Ermittlung des Partikels durch das Intensitätsminimum untersucht. Die dritte Möglichkeit wäre die Suche nach dem Minimum der zweiten Ableitung des imaginären Teils (Methode der komplexen Amplitude). Die untersuchten Partikeln hatten den Durchmesser von 1 und $3 \mu\text{m}$. Die verwendeten Objektive haben Vergrößerungen von $10 \times$, $20 \times$ und $40 \times$. Man

geht davon aus, dass alle Partikeln, die sich auf einer Deckglasoberfläche befinden, nach der Justage des Aufbaus die gleiche z -Koordinate haben. Jedes Rekonstruktionsverfahren weist eine Abweichung aus. Die Einschätzung der Genauigkeit wird anhand der gefundenen Streuung der z -Lage von rekonstruierten Partikeln gemacht. Das in meisten Fällen zuverlässigste Verfahren für die Partikeldetektion nach der gemachten Untersuchung ist das Verfahren der Ermittlung von Maxima der zweiten Ableitung des imaginären Teils.

Dabei bringt eine höhere numerische Apertur fast keinen Vorteil. Sphärische Verzerrungen, die bei der erhöhten NA noch stärker auftreten, verursachen vielfach Intensitätsmaxima im axialen Profil der rekonstruierten komplexen Welle. Es gibt auch merkwürdige Einzelfälle, so wie bei der Rekonstruktion von 80 $1\mu\text{m}$ -Partikeln im $50\mu\text{m}$ -Abstand mit der Methode der komplexen Amplitude.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Digitale In-line-Holographie ist eine einfache und robuste Technik zur Ermittlung der dreidimensionalen Lage von Mikroobjekten und Partikeln. Sie findet ihre Anwendung auf solchen Gebieten wie der Untersuchung von Einzellern und Mikroobjekten, der Vermessung von Verteilungen der Partikelgrößen und Mediumeneigenschaften, wie auch bei Kräften der optischen Pinzette. In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Aspekte bezüglich der numerischen Rekonstruktion, des optischen Aufbaus und der Genauigkeit der Lageermittlung von Mikropartikeln in der digitalen In-line Holographie betrachtet.

Die Erweiterung des Verfahrens mit der optischen Manipulation bietet noch mehr Vorteile und einen noch breiteren Anwendungsspektrum. Viele Arten von Optiken zur optische Manipulation sind kompliziert, teuer und aufwendig bei der Justage oder haben gewisse Einschränkungen bei der Anwendung. Ein neues Konzept wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Freiform-optische Elemente scheinen ein großes Potenzial bei der Erzeugung des Fangstrahls für optische Manipulation zu haben.

Das vierte Kapitel wurde den neuen Verfahren in der digitalen Holographie gewidmet. Für eine ausreichende Qualität der rekonstruierten Abbildungen von Mikroobjekten und für die genaue Bestimmung von Mikropartikeln während der Hologrammrekonstruktion muss gewährleistet werden, dass der Öffnungswinkel innerhalb des ganzen Objektvolumen konstant ist. Einer der wichtigsten Teile des Kapitels ist die Bestimmung der Blendenfunktion im optischen System für digitale Holographie für ein dreidimensionales Objektvolumen. Anhand der Angaben für das optische System und eines entwickelten Programms wurde das dreidimensionale Volumen, in dem keine Abschattung stattfindet und nur die Öffnungsblende des Mikroobjektives den Strahlbündel einschränkt, definiert. Das wurde für die drei unterschiedliche Objektive (10X, 20X und 40X) durchgeführt.

Für optimale Rekonstruktion braucht man eine räumliche und spektrale Einschränkung der Impulsantwortfunktion. Im Anschluß wurde ein Vorteil der Modulation von IRF mit der Gaussfunktion der höheren Ordnungen erörtert. Anschließend wurde über neuartige IRF diskutiert. Diese IRF ermöglicht es, alle Tiefeninformationen der aufgenommenen Mikropartikel durch eine einzige Faltung zu erhalten. Die Tiefeninformation ist in Form der Musterkodierung der rekonstruierten Partikellabbildungen darstellbar. Ein weiteres Thema des Kapitels war die zwei-Schritt-phasenschiebende Interferometrie. Ein neues Verfahren für die Rekonstruktion des komplexen Signals anhand von nur zwei Interferogrammen wurde präsentiert. Die Neuigkeit besteht in der Verallgemei-

nerung der schon existierenden Verfahren auf den Fall mit der Referenzwelle, die bei der Aufnahme jedes Interferogramms eine beliebige sowohl Phase wie auch Amplitude hat.

Einer der wichtigsten Schwerpunkte dieser Arbeit war die Entwicklung und Untersuchung des neuen optischen Systems für die optische Manipulation. Die Fertigung des Hauptteils aus einem Teil des Kunststoffs reduziert wesentlich die Kosten für Herstellung. Eine Herausforderung ist dabei, digitale Holographie und optische Manipulation in einem Aufbau zu vereinigen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das optische Teil nicht in das Abbildungssystem gehört. Es ist nicht erforderlich, ein Mikroobjektiv mit höherer numerischer Apertur zu verwenden, wie es in zahlreichen optischen Systemen ist. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit, der der Entwicklung gewidmet war, wurden die über unterschiedlichen Varianten der Fokussieroptik wie die refraktive und reflektierende diskutiert. Die reflektierende Optik ist geeignet für die Formung des Pinzettenstrahls. Nach der Dimensionierung folgt die Entwicklung des Teils in Zemax und die Optimierung der Fertigung. Der optische Teil erzeugt einen Pinzettenstrahl mit der numerischen Apertur von 1,28. Die mittlere Region lässt den kollimierten Strahl der holographischen Beleuchtung zu der Probe durch. Reflexion in der Optik erfolgt durch die totale innere Reflexion im optischen Teil.

Im darauffolgenden Abschnitt wurden die experimentellen Ergebnisse der optischen Manipulation und gleichzeitigen holographischen Visualisierung dargestellt. Da manche Justageparameter des Aufbaus sehr kritisch sind, wurde auch die Justage des Aufbaus problematisiert. Das Verfahren wurde für $3\mu\text{m}$ -Partikel getestet und zeigte ein stabiles Fangen von Mikropartikeln. Das entwickelte Programm für die Rekonstruktion der holographischen Videoaufnahmen lieferte eine dreidimensionale Darstellung von rekonstruierten Partikeln im Objektvolumen.

Die z-Auflösung ist eines der wichtigsten Themen in der digitalen In-line-Holographie. Dem Thema wurde der nächste Abschnitt der Dissertation gewidmet. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf dem Vergleich von unterschiedlichen Rekonstruktionsverfahren für verschiedene Partikelgrößen und mit verschiedenen Mikroobjektiven. Drei Verfahren wurden bewertet: die Auffindung des Partikels durch ein Minimum an Intensität, durch ein Maximum des Phasengradientes und durch ein Maximum der zweiten Ableitung von dem imaginären Teil des rekonstruierten komplexen Signals. Das letzte Verfahren erwies sich als das zuverlässigste bei meisten Fällen.

Als weiterführende zukünftige Arbeiten und Untersuchungen sollen die folgenden aufgezählt werden: Eine weitere Prüfung von parametrisierten Impulsantwortfunktionen kann deren Funktionsweise verbessern. Außer Änderung der Formen von der Funktion, die die Tiefenauflösung des Verfahrens erhöhen können, kann parametrisierte Impulsantwortfunktion auch für die Ermittlung von anderen Partikelparametern benutzt werden. In zahlreichen Quellen berichtet man über die Anwendung von Mie-Streuung zur in-line-holographischen Ermittlung von unterschiedlichen Partikelparametern wie Partikelgröße und Brechungsindex. Solange die Partikeln kreisförmige, zentralsymme-

trische in-line-holographische Strukturen aufweisen, können diese Parameter in unterschiedlichen Schnitten der parametrisierten Impulsantwortfunktion kodiert werden.

Nach der Fertigung des Teils für die optische Pinzette zeigte sich, dass eine wichtige optische Oberfläche wesentliche Rauheiten hatte. Trotzdem funktionierte das Verfahren zuverlässig. Eine Verbesserung der Qualität der Oberfläche durch nach einer Nachbearbeitung könnte die Fangfähigkeit der optischen Pinzette steigern. Eine experimentelle Einschätzung des Kräftepotenzials der erzeugten Fangstelle wäre einer der wichtigsten weiteren Schritte. Dies kann mit solchen Verfahren wie der Vermessung der Stockschen Reibungskraft, durchgeführt werden. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die Pinzettenoptik für die Erzeugung der Fangstelle in Höhe von $100\mu\text{m}$ von dem unteren Deckglass optimiert wurde. Die Vermessung der Fangkraft in anderen Tiefen muss untersucht werden.

Um Aufbau und Justage zu vereinfachen, wurde in den durchgeführten Experimenten für optische Manipulation ein Gausstrahl für die optische Pinzette benutzt. Dabei wurde nur die Randregion des Strahls fokussiert und zur Fangstelle geführt. Die ganze Effizienz des Verfahrens könnte durch eine optimierte ringförmige Pinzettenbeleuchtung erhöht werden, indem man einen Ringstrahl für die Beleuchtung des optischen Teils mit einem Doppellaxikonsystem erzeugt.

Das entwickelte optische Teil für die optische Manipulation erzeugt nur eine einzige Fangstelle. Für zahlreiche Anwendungen ist das ausreichend. Die Funktionsfähigkeit des Verfahrens kann aber durch Erzeugung von mehreren Fangstellen erweitert werden. Prinzipiell könnte dies funktionieren, indem man mit mehreren Strahlen die Fokussieroptik beleuchtet. Die einzige Freiformfläche ist aber durch starke Verzeichnungen bei der Kippung des Beleuchtungsstrahls gekennzeichnet. Eine Aberrationskorrektur durch die Anwendung von SLM zur Erzeugung mehrerer optimierter Beleuchtungsstrahlen ist möglich.

[2, 49, 91, 97]

Literaturverzeichnis

- [1] OEDER, A.; STOE BENAU, S.; SINZINGER, S.: Optimized free-form optical trapping systems. In: *Opt. Lett.* 37 (2012), Nr. 2, S. 274–276
- [2] REED, J.; TEITELL, M.; SCHMIDT, J.: Interference microscopy offers new applications for biomedical research. In: *SPIE Newsroom 02/2013*, 2013
- [3] DAVIDSON, M. W.; OLDFIELD, R.; SCHWARTZ, S.; DAVIDSON, M. W.: *Introduction to Phase Contrast Microscopy*. <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>.
Version: 10 2015
- [4] KARP, J. H.; CHAN, T. K.; FORD, J. E.: Integrated diffractive shearing interferometry for adaptive wavefront sensing. In: *Appl. Opt.* 47 (2008), Nr. 35, S. 6666–6674
- [5] BON; MAUCORT, G.; WATTELLIER, B.; MONNERET, S.: Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells. In: *Opt. Express* 17 (2009), Nr. 15, S. 13080–13094
- [6] BORN, M.; WOLF, E.: *Principles of Optics*. Pergamon Press, 1993. – ISBN: 0080264824
- [7] XU, W.; JERICHO, M. H.; KREUZER, H. J.: Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. In: *Opt. Lett.* 28 (2003), Nr. 3, S. 164–166
- [8] SHENG, J.; MALKIEL, E.; KATZ, J.: Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), Nr. 16, S. 3893–3901
- [9] MURATA, S.; YASUDA, N.: Potential of digital holography in particle measurement. In: *Optics and Laser Technology* 32 (2000), Nr. 7-8, S. 567–574
- [10] DIXON, L.; CHEONG, F. C.; GRIER, D. G.: Holographic particle-streak velocimetry. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 5, S. 4393–4398
- [11] LEE, S. H.; ROICHMAN, Y.; YI, G. R.; KIM, S. H.; YANG, S. M.; BLAADEREN, A. v.; OOSTRUM, P. van; GRIER, D. G.: Characterizing and tracking single colloidal

- particles with video holographic microscopy. In: *Opt. Express* 15 (2007), Nr. 26, S. 18275–18282
- [12] CAVALLINI, L.; BOLOGNESI, G.; LEONARDO, R. D.: Real-time digital holographic microscopy of multiple and arbitrarily oriented planes. In: *Opt. Lett.* 36 (2011), Nr. 17, S. 3491–3493
- [13] RUFFNER, D. B.; GRIER, D. G.: Optical Conveyors: A Class of Active Tractor Beams. In: *Phys. Rev. Lett.* 09 (2012), Nr. 16, S. 163903
- [14] CHEONG, F. C.; KRISHNATREYA, B. J.; GRIER, D. G.: Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy. In: *Opt. Express* 18 (2010), Nr. 13, S. 13563–13573
- [15] GEVATTER, Hans-Juergen ; GRUENHAUPT, Ulrich (Hrsg.): *Handbuch der Mess- und Automatisierungstechnik in der Produktion*. Springer, 2006. – ISBN: 9783540348238
- [16] KELLY, D. P.; HEALY, J. J.; HENNELLY, B. M.; SHERIDAN, J. T.: Quantifying the 2.5D imaging performance of digital holographic systems. In: *JEOS rapid publication* 6 (2011), S. 11034
- [17] GERSHO, Allen; GRAY, Robert M.: *Vector Quantization and Signal Compression*. Boston: Kluwer Academic Publ., 1992. – ISBN: 9781461366126
- [18] GOODMAN, Joseph W.: *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill, 1996. – ISBN: 0974707724
- [19] STOLPER, Mirjam: *Schnelle Randelementmethoden fuer die Helmholtz-Gleichung*, Universitaet des Saarlandes, Diss., 2004
- [20] GANCI, S.: Equivalence between two consistent formulations of Kirchhoff’s diffraction theory. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 5 (1988), Nr. 10, S. 1626–1628
- [21] BOXEM, R. V.; PARTOENS, B.; VERBEECK, J.: *Dirac Kirchhoff diffraction theory*. <http://arxiv.org/abs/1303.0954v1>. Version: Mar 2013
- [22] MARCHAND, E. W.; WOLF, E.: Consistent Formulation of Kirchhoff’s Diffraction Theory. In: *J. Opt Soc. Am.* 56 (1966), Nr. 12, S. 1712–1722
- [23] SAATSI, J.; VICKERS, P.: *Miraculous Success? Inconsistency and Untruth in Kirchhoff’s Diffraction Theory*. <http://philsci-archive.pitt.edu/>. Version: Apr 2010

- [24] LUCKE, R. L.: *Rayleigh-Sommerfeld Diffraction vs Fresnel-Kirchhoff, Fourier Propagation, and Poissons Spot*. <http://www.dtic.mil/docs/citations/ADA429355>. Version: December 2004
- [25] SHEN, F.; WANG, A.: Fast-Fourier-transform based numerical integration method for the Rayleigh-Sommerfeld diffraction formula. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), Nr. 6, S. 1102–1110
- [26] RASANEN, J.; ABEDIN, K. M.; KAWAZOE, M.; TENJIMBAYASHI, K.; EIJU, T.; MATSUDA, K.; PEIPONEN, K.: Computer simulation of the scatter plate interferometer by scalar diffraction theory. In: *Appl. Opt.* 36 (1997), Nr. 22, S. 5335–5339
- [27] LIU, J.-P.: Controlling the aliasing by zero-padding in the digital calculation of the scalar diffraction. In: *J. Opt. Soc. Am.* 29 (2012), Nr. 9, S. 1956–1964
- [28] BISHARA, W.; SU, T. W.; COSKUN, A. F.; OZCAN, A.: Lensfree on-chip microscopy over a wide fieldofview using pixel super-resolution. In: *Opt. Express* 18 (2010), Nr. 11, S. 11181–11191
- [29] JERICHO, S. K.; GARCIA-SUCERQUIA, J.; XU, Wenbo; JERICHO, M. H.; KREUZER, H. J.: Submersible digital in-line holographic microscope. In: *Rev. Sci. Instrum.* 77 (2006), S. 043706
- [30] GARCIA-SUCERQUIA, J.; XU, W.; JERICHO, S. K.; KLAGES, P.; JERICHO, M. H.; KREUZER, H. J.: Digital in-line holographic microscopy. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), Nr. 5, S. 836–850
- [31] DAVIES, E. J.; NIMMO-SMITH, W. A. M.; AGRAWAL, Y. C.; SOUZA, A. o J.: Scattering signatures of suspended particles: an integrated system for combining digital holography and laser diffraction. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 25, S. 25488–25499
- [32] HIGUCHI, T.; PHAM, Q. D.; HASEGAWA, S.; HAYASAKI, Y.: Three-dimensional positioning of optically trapped nanoparticles. In: *Appl. Opt.* 50 (2011), Nr. 34, S. H183–H188
- [33] XIAO, K.; GRIER, D. G.: Multidimensional optical fractionation of colloidal particles with holographic verification. In: *Phys. Rev. Lett.* 104 (2010), S. 028302
- [34] BOLOGNESI, G.; BIANCHI, S.; LEONARDO, R. D.: Digital holographic tracking of microprobes for multipoint viscosity measurements. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 20, S. 19245–19254

- [35] DIXON, L.; CHEONG, F. C.; GRIER, D. G.: Holographic deconvolution microscopy for high-resolution particle tracking. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 17, S. 16410–16417
- [36] MALEK, M.; ALLANO, D.; COETMELLE, S.; LEBRUN, D.: Digital in-line holography: influence of the shadow density on particle field extraction. In: *Opt. Express* 12 (2004), Nr. 10, S. 2270–2279
- [37] XU, W.; JERICHO, M. H.; MEINERTZHAGEN, I. A.; KREUZER, H. J.: Digital in-line holography of microspheres. In: *Appl. Opt.* 41 (2002), Nr. 25, S. 5367–5375
- [38] JAVIDI, B.; MOON, I.; YEOM, S.; CARAPEZZA, E.: Three-dimensional imaging and recognition of microorganism using single-exposure on-line (SEOL) digital holography. In: *Opt. Express* 13 (2005), Nr. 12, S. 4492–4506
- [39] BERNET, S.; HARM, W.; JESACHER, A.; RITSCH-MARTE, M.: Lensless digital holography with diffuse illumination through a pseudo-random phase mask. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 25, S. 25113–25124
- [40] SATO, A.; PHAM, Q. D.; HASEGAWA, S.; HAYASAKI, Y.: Three-dimensional subpixel estimation in holographic position measurement of an optically trapped nanoparticle. In: *Appl. Opt.* 52 (2013), Nr. 1, S. A216–A222
- [41] XU, Q.; SHI, K.; LI, H.; CHOI, K.; HORISAKI, R.; BRADY, D.; PSALTIS, D.; LIU, Z.: Inline holographic coherent anti-Stokes Raman microscopy. In: *Opt. Express* 18 (2010), Nr. 8, S. 8213–8219
- [42] DENIS, L.; LORENZ, D.; THIEBAUT, E.; FOURNIER, C.; TREDE, D.: Inline hologram reconstruction with sparsity constraints. In: *Opt. Lett.* 34 (2009), Nr. 22, S. 3475–3477
- [43] BRADY, D. J.; CHOI, K.; MARKS, D. L.; HORISAKI, R.; LIM, S.: Compressive Holography. In: *Opt. Express* 17 (2009), Nr. 15, S. 13040–13049
- [44] GIRE, J.; DENIS, L.; FOURNIER, C.; THIEBAUT, E.; SOULEZ, F.; DUCOTTET, C.: Digital holography of particles: benefits of the „inverse problem“ approach. In: *Meas. Sci. Technol.* 19 (2008), Nr. 074005
- [45] BURAGA-LEFEBVRE, C.; COETMELLE, S.; LEBRUN, D.; OZKUL, C.: Application of wavelet transform to hologram analysis: three-dimensional location of particles. In: *Opt. Lasers Eng.* 33 (2000), S. 409–421
- [46] MONAGHAN, D. S.; KELLY, D. P.; PANDEY, N.; HENNELLY, B. M.: Twin removal in digital holography using diffuse illumination. In: *Opt. Lett.* 34 (2009), Nr. 23, S. 3610–3612

- [47] SITU, G.; RYLE, J. P.; GOPINATHAN, U.; SHERIDAN, J. T.: Generalized in-line digital holographic technique based on intensity measurements at two different planes. In: *Appl. Opt.* 47 (2008), Nr. 5, S. 711–717
- [48] MICO, V.; GARCIA, J.; ZALEVSKY, Z.; JAVIDI, B.: Phase-shifting Gabor holography. In: *Opt. Lett.* 34 (2009), Nr. 10, S. 1492–1494
- [49] RIESENBERG, R.; KANKA, M.; BERGMANN, J.: Coherent light microscopy with a multi-spot source. In: *Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics OSA Bd. Confocal, Multiphoton, and Nonlinear Microscopic Imaging III SPIE 6630*, 2007
- [50] PALERMO, C. J.; LEITH, E. N.; HARGER, R. O.; LOUCKA, W. A.: Suppression of the Holographic Twin Image by Nonlinear Techniques. In: *Appl. Opt.* 9 (1970), Nr. 12, S. 2813–2814
- [51] LINDBALLE, T. B.; KRISTENSEN, M. V.; KYLLING, A. P.; PALIMA, D. Z.; GLUECKSTAD, J.; KEIDING, S. R.; STAPELFELDT, H.: Three-dimensional imaging and force characterization of multiple trapped particles in low NA counter-propagating optical traps. In: *J. Eur. Opt. Soc., Rapid Publ.* 6 (2011), S. 11057
- [52] SELVAGGI, L.; FERRARI, E.; MORADI, A.; SANTUCCI, S. C.; BEUZER, P.; COJOC, D.: Optimized multi-view imaging improves the observation of optically manipulated non-spherical particles. In: *J. Opt.* 12 (2010), S. 035303
- [53] BOWMAN, R. W.; PADGETT, M. J.: Optical trapping and binding. In: *Rep. Prog. Phys.* 76 (2013), S. 026401
- [54] ROICHMAN, Y.; GRIER, D. G.: Holographic assembly of quasicrystalline photonic heterostructures. In: *Opt. Express* 13 (2005), Nr. 14, S. 5434–5439
- [55] LANGEHANENBERG, P.; IVANOVA, L.; BERNHARDT, I.; KETELHUT, S.; VOLLMER, A.; DIRKSEN, D.; GEORGIEV, G.; BALLY, G. v.; KEMPER, B.: Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy. In: *J. Biomed. Opt.* 14 (2009), Nr. 1, S. 014018
- [56] KEMPER, B.; LANGEHANENBERG, P.; HOEINK, A.; BALLY, G. v.; F. WOTTOWAH, S. S.; GUCK, J.; KAES, J.; BREDEBUSCH, I.; SCHNEKENBURGER, J.; SCHUETZE, K.: Monitoring of laser micromanipulated optically trapped cells by digital holographic microscopy. In: *J. Biophoton.* 3 (2010), Nr. 7, S. 425–431
- [57] LEE, S.; GRIER, D. G.: Holographic microscopy of holographically trapped three-dimensional structures. In: *Opt. Express* 15 (2007), S. 1505–1512

- [58] MOYSES, H. W.; KRISHNATREYA, B. J.; GRIER, D. G.: Robustness of Lorenz-Mie microscopy against defects in illumination. In: *Opt. Express* 21 (2013), Nr. 5, S. 5968–5973
- [59] PAN, G.; MENG, H.: Digital holography of particle fields: reconstruction by use of complex amplitude. In: *Appl. Opt.* 42 (2003), Nr. 5, S. 827–833
- [60] YANG, W.; KOSTINSKI, A. B.; SHAW, R. A.: Phase signature for particle detection with digital in-line holography. In: *Opt. Lett.* 31 (2006), Nr. 10, S. 1399–1401
- [61] *Kapitel* Thermophoresis of particles. In: TYNDALL, John: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. 2. Taylor & Francis, 2006, S. 6274–6275
- [62] ASHKIN, A.: *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. World Scientific, 2006. – 10.1 S. – 978-9810240578
- [63] PAN, Y.; HILL, S. C.; COLEMAN, M.: Photophoretic trapping of absorbing particles in air and measurement of their single-particle Raman spectra. In: *Opt. Express* 20 (2012), Nr. 5, S. 5325–5334
- [64] ASHKIN, A.: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. In: *Phys. Rev.* 24 (1970), Nr. 4, S. 156–158
- [65] LIU, Z.; GUO, C.; YANG, J.; YUAN, L.: Tapered fiber optical tweezers for microscopic particle trapping: fabrication and application. In: *Opt. Express* 14 (2006), Nr. 25, S. 12510–12516
- [66] KRAIKIVSKI, P.; POULIGNY, B.; DIMOVA, R.: Implementing both short- and long-working-distance optical trappings into a commercial microscope. In: *Rev. Sci. Instrum.* 77 (2006), S. 113703
- [67] LANG, M. J.; ASBURY, C. L.; SHAEVITZ, J. W.; BLOCK, S. M.: An Automated Two-Dimensional Optical Force Clamp for Single Molecule Studies. In: *Biophys. J.* 83 (2002), S. 491–501
- [68] LIU, Q.; ASAVEI, T.; LEE, T.; RUBINSZTEIN-DUNLOP, H.; HE, S.; ; SMALYUKH, I. I.: Measurement of viscosity of lyotropic liquid crystals by means of rotating laser-trapped microparticles. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 25, S. 25134–25143
- [69] GOKSOER, M.; ENGER, J.; HANSTORP, D.: Optical manipulation in combination with multiphoton microscopy for single-cell studies. In: *Appl. Opt.* 43 (2004), S. 4831–4837

- [70] JESACHER, A.; FUERHAPTER, S.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M.: Diffractive optical tweezers in the Fresnel regime. In: *Opt. Express* 12 (2004), Nr. 10, S. 2243–2250
- [71] LAFONG, A.; HOSSACK, W. J.; ARLT, J.; NOWAKOWSKI, T. J.; READ, N. D.: Time-Multiplexed Laguerre-Gaussian holographic optical tweezers for biological applications. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 3065–3072
- [72] TORRES-MAPA, M. L.; ANTKOWIAK, M.; CIZMAROVA, H.; FERRIER, D. E. K.; DHOLAKIA, K.; GUNN-MOORE, F. J.: Integrated holographic system for all-optical manipulation of developing embryos. In: *Opt. Express* 6 (2011), Nr. 2, S. 1564–1575
- [73] DARIA, V. R.; PALIMA, D. Z.; GLUCKSTAD, J.: Optical twists in phase and amplitude. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 2, S. 476–481
- [74] EMILIANI, V.; COJOC, D.; FERRARI, E.; GARBIN, V.; DURIEUX, C.; COPPEY-MOISAN, M.; FABRIZIO, EN. D.: Wave front engineering for microscopy of living cells. In: *Opt. Express* 13 (2005), S. 1395–1405
- [75] SOLER, M.; PETROV, D. V.: Raman imaging of floating cells. In: *Opt. Express* 13 (2005), S. 6105–6110
- [76] G., Grier D.; Y., Roichman: Holographic optical trapping. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), S. 880–887
- [77] BURNHAM, D. R.; MCGLOIN, D.: Holographic optical trapping of aerosol droplets. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 4175–418
- [78] ZWICK, S.; HAIST, T.; MIYAMOTO, Y.; HE, L.; M. WARBER; HERMERSCHMIDT, A.; OSTEN, W.: Holographic twin traps. In: *J. Opt. A* 11 (2009), Nr. 3, S. 034011
- [79] PERCH-NIELSEN, I. R.; RODRIGO, P. J.; GLUCKSTAD, J.: Real-time interactive 3D manipulation of particles viewed in two orthogonal observation planes. In: *Opt. Express* 13 (2005), Nr. 8, S. 2852–2857
- [80] PERCH-NIELSEN, I. R.; RODRIGO, P. J.; ALONZO, C. A.; GLUCKSTAD, J.: Autonomous and 3D real-time multibeam manipulation in a microfluidic environment. In: *Opt. Express* 14 (2006), S. 12199–12205
- [81] RODRIGO, P. J.; DARIA, V. R.; GLUCKSTAD, J.: Four-dimensional optical manipulation of colloidal particles. In: *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005), S. 074103

- [82] BOWMAN, R.; JESACHER, A.; THALHAMMER, G.; GIBSON, G.; MARTE, M. R.; PADGETT, M.: Position clamping in a holographic counterpropagating optical trap. In: *Opt. Express* 19 (2011), S. 9908–9914
- [83] CARRUTHERS, A. E.; REID, J. P.; ORR-EWING, A. J.: Longitudinal optical trapping and sizing of aerosol droplets. In: *Opt. Express* 18 (2010), S. 14238–14244
- [84] PITZEK, M.; STEIGER, R.; THALHAMMER, G.; BERNET, S.; RITSCH-MARTE, M.: Optical mirror trap with a large field of view. In: *Opt. Express* 17 (2009), Nr. 22, S. 19414–19423
- [85] MERENDA, F.; ROHNER, J.; FOURNEIR, J. M.; SALATHE, R.-P.: Miniaturized high-NA focusing-mirror multiple optical tweezers. In: *Opt. Express* 15 (2007), Nr. 10, S. 6075–6086
- [86] TAYLOR, R. S.; HNATOVSKY, C.: Particle trapping in 3-D using a single fiber probe with an annular light distribution. In: *Opt. Express* 11(21) (2003), Nr. 21, S. 2775–2782
- [87] LIBERALE, C.; MINZIONI, P.; BRAGHERI, F.; ANGELIS, F. D.; FABRIZIO, E. D.; CRISTIANI, I: Miniaturized allfiber probe for three-dimensional optical trapping and manipulation. In: *Nat. Photonics* 1 (2007), S. 723
- [88] YUAN, L.; LIU, Z.; YANG, J.; GUAN, C.: Twin-core fiber optical tweezers. In: *Opt. Express* 16 (2008), S. 4551
- [89] LIU, Y.; YU, M.: Investigation of inclined dual-fiber optical tweezers for 3D manipulation and force sensing. In: *Opt. Express* 17 (2009), Nr. 16, S. 13624–13638
- [90] WEI, M. T.; YANG, K. T.; KARMENYAN, A.; CHIOU, A.: Three-dimensional optical force field on a Chinese hamster ovary cell in a fiber-optical dual-beam trap. In: *Opt. Express* 14 (2006), Nr. 7, S. 3056–3064
- [91] SCHONBRUN, E.; YE, W. N.; CROZIER, K. B.: Optical trapping and fluorescence collection using a dual wavelength diffractive optic. In: *Conference on Lasers and Electro-Optics/International Quantum Electronics Conference OSA*, 2009
- [92] SCHONBRUN, E.; CROZIER, K. B.: Spring constant modulation in a zone plate tweezer using linear polarization. In: *Opt. Lett.* 33 (2008), Nr. 17, S. 2017–2019
- [93] PARKER, K. J.: Apodization and Windowing Functions. In: *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60 (2013.), S. 1263–1271

- [94] OOMS, T. A.; LINDKEN, R.; WESTERWEEL, J.: Digital holographic microscopy applied to measurement of a flow in a T-shaped micromixer. In: *Exp. Fluids* 47 (2009), S. 941–955
- [95] DAM, J. S.; NIELSEN, I. P.; PALIMA, D.; GUECKSTAD, J. G.: Multi-particle three-dimensional coordinate estimation in real-time optical manipulation. In: *J. Eur. Opt. Soc., Rapid Publ.* 4 (2009), S. 09045
- [96] CONKEY, D. B.; TRIVEDI, R. P.; PAVANI, S. R. P.; SMALYUKH, I. I.; PIESTUN, R.: Three-dimensional parallel particle manipulation and tracking by integrating holographic optical tweezers and engineered point spread functions. In: *Opt. Express* 19 (2011), Nr. 5, S. 3835–3842
- [97] SABITOV, N.; MEINECKE, T.; SINZINGER, S.: Optimized Image Reconstruction in Digital Holography. In: *DGaO Proceedings*, 2009. – ISSN: 1614-8436
- [98] AWATSUJI, Y.; FUJII, A.; KUBOTA, T.; MATOBA, O.: Parallel three-step phase-shifting digital holography. In: *Appl. Opt.* 45 (2006), Nr. 13, S. 2995–3002
- [99] IMBE, M.; NOMURA, T.: Study of reference waves in single-exposure generalized phase-shifting digital holography. In: *Appt. Opt.* 52 (2013), Nr. 18, S. 4097–4102
- [100] AWATSUJI, Y.; TAHARA, T.; KANEKO, A.; KOYAMA, T.; NISHIO, K.; URA, S.; KUBOTA, T.; MATOBA, O.: Parallel two-step phase-shifting digital holography. In: *Appl. Opt.* 47 (2008), Nr. 19, S. D183–D189
- [101] SHAKED, N. T.; RINEHART, M. T.; WAX, A.: Dual-interference-channel quantitative-phase microscopy of live cell dynamics. In: *Opt. Lett.* 34 (2009), Nr. 6, S. 767–769
- [102] GUO, C.-S.; ZHANG, L.: Phase-shifting error and its elimination in phase-shifting digital holography. In: *Opt. Lett.* 27 (2002), Nr. 19, S. 1687–1689
- [103] LIU, J. P.; POON, T. C.: Two-step-only quadrature phase-shifting digital holography. In: *Opt. Lett.* 34 (2009), Nr. 3, S. 250–252
- [104] MENG, X. F.; CAI, L. Z.; XU, X. F.; YANG, X. L.; SHEN, X. X.; DONG, G. Y.; WANG, Y. R.: Two-step phase-shifting interferometry and its application in image encryption. In: *Opt. Lett.* 31 (2006), Nr. 10, S. 1414–1416
- [105] SABITOV, N.; MEINECKE, T.; KELLY, Damien-P.; SINZINGER, S.: Two-step phase-shift interferometry with known but arbitrary reference waves: a graphical interpretation. In: *Appl. Opt.* 51 (2012), Nr. 28, S. 6831–6838

- [106] CHEONG, F. C.; SUN, B.; DREYFUS, R.; AMATO-GRILL, J.; XIAO, K.; DIXON, L.; GRIER, D. G.: Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy. In: *Opt. Express* 17 (2009), S. 13071

Abbildungsverzeichnis

2.1	Beispiele der Hellfeldmikroskopie, interferometrischer Phasenabbildung und Phasenkontrastmikroskopie	4
2.2	Hologrammrekonstruktion. R – Referenzwelle; H – Hologramm; O – rekonstruierte Objektwelle; Z – durchgehender Anteil der einfallenden Objektwelle R ; T – Zwillingsbild	8
2.3	In-line-holographisches Prinzip. OE - Objektebene, HE - Hologrammebene	9
2.4	Beugung an der absorbierenden Scheibe (a) und Öffnung (b) der gleichen Größe	10
2.5	Beugung der Beleuchtungswelle am Hologramm (H). O – Objektwelle, T – die das Zwillingsbild formende Welle, I – Ebene der scharfen Objektabbildung	12
2.6	Vergleich der Diffraktion (blau) und Mie-Streuung (rot) an undurchsichtigen $10\ \mu\text{m}$ -Mikropartikeln, Simulation im Programm "Mie-Plot".	12
2.7	Vergleich der Diffraktion (blau) und Mie-Streuung (rot) an PPs-Mikropartikeln im Wasser $\lambda = 633\text{nm}$, Simulation im Programm "Mie-Plot".	13
2.8	Nyquist-Kriterium bei der in-line-holographischen Aufnahme	14
2.9	Streifenperiode zweier interferierender Wellen in der In-line Holographie. OW - schräg einfallende Objektwelle, RW - senkrecht einfallende Referenzwelle.	15
2.10	CMOS-Pixel-Ausführung, http://www.astrosurf.com/luxorion/photomerique3.htm	18
2.11	Wirkung des Füllfaktors auf die Modulation des Signalspektrums $\tilde{I}(\nu)$ durch die Pixelübertragungsfunktion $\tilde{P}(\nu)$	19
2.12	Quantisierungsfehler	20
2.13	Histogramm der Intensitätswerte eines Hologramms (blau). Intensitätswerte einer Pixelzeile der Hologrammaufnahme (grün); Mittelwert der Intensität über ganze Hologrammfläche (rot).	20
2.14	Bestimmung der Gültigkeit der Fresnelschen Approximation. H - Hologrammebene, BE - Beobachtungsebene	27
2.15	Copepod nauplius. Größe ca. $100\ \mu\text{m}$. In-line-DH-Rekonstruktion [8, Abb. 8(E)].	29

3.1	Impulserhaltungssatz bei der Refraktion. Lichtausbreitung (grau), Kraft (schwarz)	34
3.2	Schematische Darstellung der antreibenden Kräfte im Gaußstrahl. \overline{F}_Σ - gesamte Kraft wird zerlegt in zwei Komponenten \overline{F}_G - Gradientenkraft und \overline{F}_S - Streukraft. \overline{S} - Poynting-Vektor. Mit blauen Kurven sind Flächen der gleichen Phase bezeichnet.	35
4.1	Linsenlose Abbildung des In-line-Hologramms; OV - Objektvolumen; D - Detektor.	39
4.2	Aufnahme des In-line-Hologramms mit dem abbildenden optischen System - AS ; OV - Objektvolumen; D - Detektor.	39
4.3	Verschiebung der axialen Position beim Medienübergang; n_W - Brechungsindex im Wasser; n_G - Brechungsindex im Glas	40
4.4	Ermittlung der Tiefenposition einer Punktlichtquelle P nach dem Randstrahl	40
4.5	Blendendefinition im Abbildungssystem. Blende B_1 - Fassung der Linse; Blende B_2 - Feldblende des Mikroobjektivs; Blende B_3 - die Fassung der Tubuslinse; Blende B_4 , die Apertur des Lichtdetektors	42
4.6	Bestimmung des Öffnungswinkels für einen axialen Punkt P im Objektvolumen OV . B_k ist die objektseitige Abbildung einer von 4 Blenden (B_1 bis B_4). (Abb. 4.5)	44
4.7	Strahlbegrenzung im Abbildungssystem für ein Bündel, das von einem axialen Punkt des Objektvolumens ausgeht. Begrenzung durch Blende B_1 - Fassung des Mikroobjektives (hellblau); Begrenzung durch Blende B_2 - Öffnungsblende des Mikroobjektives (grün); Begrenzung durch Blende B_3 - Begrenzung Fassung der Linse (rot); durch Blende B_4 - Apertur des Lichtdetektors (blau). z_P - axiale Koordinate des Punktes P , u_P - der maximale Winkel des Strahls, der aus dem Punkt P der entsprechenden Blende bestimmt wird	45
4.8	Bestimmung der äußersten Lage für einen Punkt P im Raum, bei der noch keine Abschattung entsteht.	46
4.9	Bestimmung des abschattungsfreien Raums durch die objektseitigen Abbildungen von zwei Blenden B'_1 und B'_k	46
4.10	Querschnitt der Impulsantwort der FFT-direkt-Integrations-Methode (FFT-DI-Impulsantwort) und ihre Fourier-Transformierte. Betrag im Bereich des ganzen Rechenfensters und am Randbereich sowie Betrag der Fourier-Transformierten im Bereich des ganzen Rechenfensters und in der zentralen Region	49
4.11	Überlappung benachbarter Replika bei der numerischen Faltung von beschränkten Signalen. Schematische Darstellung eines eindimensionalen Falls. I - Hologramm; g - Impulsantwortfunktion	50

4.12	Parametrisierte Impulsantwortfunktion, berechnet für einen Tiefenbereich von 180-300 μm	51
4.13	3 μm -Mikropartikel im Wasser. Feld: $440 \times 440 \mu\text{m}$. Rekonstruktion mittels der parametrisierten Impulsantwortfunktion (Abb. 4.12), (links) und Vergleichsmaß der Tiefenkodierung, (rechts)	51
4.14	Graphische Darstellung der Rekonstruktion für die 2-Schritt-PSI mit zwei Referenzwellen mit unterschiedlichen Amplituden und Phasen . . .	53
4.15	Simulation der Rekonstruktion der Objektwelle für eine zwei-Schrittphasenschiebende Interferometrie mit zwei in der Amplitude unterschiedenden Referenzwellen. Die Objektwelle hat das Amplitudenmuster a. und eine zufällige Phase.	54
5.1	Das Funktionsprinzip der Fanglinse	57
5.2	Berechnung der maximalen NA für eine refraktive Fanglinse.	58
5.3	Fangoptik mit reflektierender asphärische Oberfläche	59
5.4	Bestimmung des Öffnungswinkels des Fangbündels	60
5.5	Prinzip des Zemax-Modells. Die Koordinate des Punktes P_0 und die Tangente in dem Punkt sind vorgegeben.	61
5.6	Einschränkung des maximalen Öffnungswinkels des Traps durch die Kanalwände.	62
5.7	Entwurf des entwickelten optischen Bauteils	63
5.8	Anpassung des Teils an die Fertigung.	64
5.9	Ermittlung des Durchmessers D'_0 und der Höhe z'_{p0} des zylindrischen Teils der Pinzettenstrahl formenden Optik	65
5.10	Realisiertes Bauteil	65
6.1	Experimenteller Aufbau. FL ₁ – Fokussierlinse im holographischen Beleuchtungssystem; S – rotierende Streuscheibe, KL ₁ – Kollimationslinse im holographischen Beleuchtungssystem; IB ₁ – Irisblende im holographischen Beleuchtungsarm; US ₁ und US ₂ – Umlenkspiegel, OF – optische Faser für IR-Strahlung; KL ₁ – Kollimationslinse im IR-Arm; US ₃ – Umlenkspiegel; FL ₂ – Fokussierlinse im IR-Arm; KL ₃ Kollimationslinse im IR-Arm, DS dichroitischer Spiegel, IB ₂ – Irisblende für optische Pinzette; FO – Optischer Teil zur Formung des Pinzettenstrahls; P – Probe; MO – Mikroobjektiv; TL – Tubuslinse; F – IR-Filter; K – Kamera. . .	68
6.2	Einstellung der Aufweitung für Pinzettenstrahl mit Hilfe des Shearing-Plates und Web-Kamera.	70
6.3	Kippeinstellung der Probenfassung. DG, Deckglas, F, Probenfassung, FO, Fangoptik.	71
6.4	Einstellung der Parallelität des IR-Pinzettenstrahls der optischen Achse des Bauteils für die optische Manipulation.	72

6.5	Schematische Darstellung der Probe mit $3\mu\text{m}$ -Partikeln fürs optische Fangen	73
6.6	Bewegung der Probe mit einem vor der optischen Pinzette festgehaltenen $3\mu\text{m}$ -Mikropartikel. Das abgebildetes Feld $440 \times 440 \mu\text{m}^2$	74
6.7	Effizienz der Fangoptik. Nur ein Teil des Gauß-Strahls (rot) wird zur Fangstelle geleitet.	75
6.8	Optische Manipulation und holographische Beobachtung	76
6.9	Verwässerung des Hologramms des desselben Partikels bei der schnellen Bewegung der Probe	77
7.1	Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektive: MO1: Nikon, AC, $10 \times /0, 21$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm . Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$	79
7.2	Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektiv: MO2: Nikon, AC, $20 \times /0, 35$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm . Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$	79
7.3	Das axiale Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. (a) und (b) Intensität (oben) und Phase (unten). Das verwendete Mikroobjektiv: MO3: Newport, AC, $40 \times /0, 65$. Medium: Wasser, Deckglas 0.17mm . Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$	80
7.4	Axiales Profil des rekonstruierten 3D-Feldes. Intensität (oben) und Phase (unten), Partikel $3 \mu\text{m}$; Feld $40 \times 10, 1 \mu\text{m}^2$. Newport, AC, $40 \times /0, 65$. Medium: Luft. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$	82
7.5	Ermittlung der z-Partikellage beim Phasenverfahren.	82
7.6	Mikroskopische Abbildung. Verwendete Objektive: MO ₁ : Nikon, AC, $10 \times 0, 21$; MO ₂ : Nikon, AC, $20 \times 0, 35$; Medium: Wasser, Deckglas $0, 17 \text{ mm}$. Beleuchtung: Laser, $\lambda = 543 \text{ nm}$	84
7.7	Ermittlung der z-Partikellage beim Verfahren der komplexen Amplitude.	84
7.8	Probe mit zwei Schichten von an Deckgläser angehefteten Mikropartikeln.	85
7.9	Probe mit zwei Schichten von an Deckgläser angehefteten Mikropartikeln.	86

7.10	Markierung „Area of Interest“ in der mikroskopischen Abbildung der $3\ \mu\text{m}$ -Partikeln. Die Daten mit Koordinaten von markierten Partikeln (gelb) werden gespeichert und bei der Untersuchung der z-Genauigkeit benutzt. Die z-Lagen nur von gleichartigen und einzelnen Partikel muss bestimmt werden. Die nicht erwünschten Einschlüsse und zusammengeklebten Partikeln (rot) müssen die Statistik der Untersuchung nicht beeinflussen.	87
7.11	Ermittlung der z-Lage von 38 $3\ \mu\text{m}$ -Partikel im z-Bereich von 135 bis $165\ \mu\text{m}$ mit drei unterschiedlichen Verfahren: Minimum der Intensität (blau), Phasenverfahren (grün), Verfahren der komplexen Amplitude (rot). Historgammdarstellung.	87
7.12	Ermittlung der z-Lage von 28 $3\ \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 2\ \mu\text{m}$. Histogramm. Mikroobjektiv: MO_3 (NewPort, AC, $40 \times \text{NA}0,65$). Phasenverfahren (grün) zeigt mehrmalige Phasenänderungen bei Ermittlung der Lage von Partikeln	89
7.13	Ermittlung der z-Lage von 48 $1\ \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 25\ \mu\text{m}$, Histogramm. Mikroobjektiv: MO_2 (Nikon, AC, $20 \times \text{NA}0,35$). Das Effekt von Einzelausnahmen, die das gesamte Ergebnis der Partikellageermittlung verschlechtern.	89
7.14	Ermittlung der z-Lage von 80 $1\ \mu\text{m}$ -Partikel, $\Delta z = 6\ \mu\text{m}$. Histogramm. Mikroobjektiv: MO_1 (Nikon, AC, $10 \times \text{NA}0,21$). Das hervorragende Ergebnis zeigt sich nur in einem Rekonstruktionsabstand von $z = 50\ \mu\text{m}$ bei der Rekonstruktion von $1\ \mu\text{m}$ -Partikeln mit dem Verfahren der komplexen Amplitude (rot).	90

Tabellenverzeichnis

2.1	Höchste registrierbare Raumfrequenzen und entsprechende Perioden der Interferenzbildes für unterschiedliche Mikroobjektive.	16
4.1	Dimensionen des Objektvolumens für die In-line-digitalen Holographie .	47
5.1	Optische Medien und Stoffen	60
5.2	Polynomkoeffizienten	63
7.1	Genauigkeit bei der Ermittlung der z-Partikellage mit unterschiedlichen Verfahren: Int. V. – Intensitätsverfahren; Phs. V. – Phasenverfahren; k. Amp. V. – Verfahren der komplexen Amplitude	88

Formelverzeichnis

Formel 2.1	Die aufgenommene Intensität eines dünnen Hologramms	6
Formel 2.2	Rekonstruktion eines dünnen Hologramms	7
Formel 2.3	Der Anteil der durch das Hologramm durchgehenden Referenzwelle	7
Formel 2.4	Das Zwillingsbild bei der Rekonstruktion	7
Formel 2.5	Rekonstruierte Objektwelle	7
Formel 2.6	Das Babinetsches Prinzip	9
Formel 2.7	Am Objekt gebeugte Beleuchtungswelle	9
Formel 2.8	Aufgenommene Intensität eines In-line-Hologramms	10
Formel 2.9	Rekonstruktion eines In-line-Hologramms	11
Formel 2.10	Erzeuge Wellen bei der Rekonstruktion eines In-line-Hologramms .	11
Formel 2.11	Inverse Vergrößerung	15
Formel 2.12	Bildseitiger Öffnungswinkel	15
Formel 2.13	Streifenperiode	15
Formel 2.14	Streifenperiode ausgedrückt durch numerische Apertur	16
Formel 2.15	Vergleich von Streifenperiode und Pixeldimension	16
Formel 2.16	Umwandlung des Signals von der Kamera	17
Formel 2.17	Umwandlung des Signals von der Kamera (Spektralbereich) . . .	17
Formel 2.18	Leistung des Signals	19
Formel 2.19	Signal-Rausch-Verhältnis	21
Formel 2.20	Die homogene Wellengleichung	22
Formel 2.21	Helmholtz-Gleichung	22
Formel 2.22	Skalare Elektromagnetische Erregung im Punkt P_0 . Integrations- theorem	22
Formel 2.23	Kirchhoff-Fresnelsches Beugungsintegral	23
Formel 2.24	Skalare Elektromagnetische Erregung im Punkt P_1	23
Formel 2.25	Greensche „Plus“-Funktion der Sommerfeldschen Theorie	23
Formel 2.26	Greensche „Minus“-Funktion der Sommerfeldschen Theorie	23
Formel 2.27	Erste Rayleigh-Sommerfeld Lösung	24
Formel 2.28	Zweite Rayleigh-Sommerfeld Lösung	24
Formel 2.29	Beugungsintegral nach der zweiten Rayleigh-Sommerfeldschen Lö- sung	24
Formel 2.30	Die parabolische Annäherung	24
Formel 2.31	Fresnel-Beugungsintegral	24

Formel 2.32 Bedingung der parabolischen Annäherung	25
Formel 2.33 Fresnel-Beugungsintegral. Umstellung	25
Formel 2.34 Bedingung der Fraunhoferschen Beugungsapproximation	25
Formel 2.35 Fraunhofer-Beugungsintegral	26
Formel 2.36 Beugungsintegral in Form von Fouriertransformation	26
Formel 2.37 Gültigkeitskriterium des Beugungsintegrals in Form von Fourier- transformation	26
Formel 2.38 Beugungsintegral in Form eines Faltungsintegrals abgeleitet nach der ersten Rayleigh-Sommerfeldschen Lösung	27
Formel 2.39 Faltungskern der ersten Rayleigh-Sommerfeldschen Lösung	27
Formel 2.40 Rayleigh-Sommerfeld-Beugungsintegral	28
Formel 2.41 Faltungskern des Rayleigh-Sommerfeld-Beugungsintegrals	28
Formel 2.42 Kernel des Winkelspektrum-Verfahrens im Spektralbereich	28
Formel 4.1 Position der Punktlichtquelle im Wasser	40
Formel 4.2 Tiefenskalierungsfaktor	41
Formel 4.3 Durchmesser der Blende B_2	42
Formel 4.4 Der durch die Blende B_2 objektseitig beschränkter maximaler Strahlwinkel	42
Formel 4.5 Position der objektseitigen Abbildung von der Blende B_1	42
Formel 4.6 Durchmesser der objektseitiger Abbildung von der Blende B_1	43
Formel 4.7 Position der objektseitigen Abbildung von der Blende B_3	43
Formel 4.8 Durchmesser der objektseitigen Abbildung von der Blende B_3	43
Formel 4.9 Vergrößerung des Abbildungssystems	43
Formel 4.10 Position der objektseitigen Abbildung von der Blende B_4	43
Formel 4.11 Durchmesser der objektseitigen Abbildung von der Blende B_4	43
Formel 4.12 Öffnungswinkel des Abbildungssystems	43
Formel 4.13 Abmaß der abschattfreien von der Blende B_k bestimmten Region im Abstand z_1	47
Formel 4.14 Abmaß der abschattfreien von der Blende B_k bestimmten Region im Abstand z_2	47
Formel 4.15 Querabmass des abschattfreien dreidimensionalen Objektvolumens	47
Formel 4.16 Durchmesser der eingeschränkter Impulsantwortfunktion	49
Formel 4.17 Maximale Amplitude des komplexen Objektsignals	54
Formel 5.1 Winkel des gebrochenen Strahls an der Planfläche der Fangoptik	58
Formel 5.2 Numerische Apertur der refraktiven Fangoptik	58
Formel 5.3 Maximale numerische Apertur der refraktiven Fangoptik	58
Formel 5.4 Ermittlung der maximalen numerischen Apertur der refraktiven Fangoptik	59
Formel 5.5 Konvergenzwinkel des Fangstrahls der refraktiven Fangoptik	59

Formel 5.6	Numerische Apertur der reflektiven Fangoptik	61
Formel 5.7	Konvergenzwinkel des Fangstrahls der reflektiven Fangoptik . . .	61
Formel 5.8	Bestimmung des Schnittdurchmessers vom Fangstrahls am Kanal- boden	62
Formel 5.9	Durchmesser des Beugungsbegrenzten Flecks	62
Formel 5.10	Polynom der asphärischen Oberfläche	62
Formel 5.11	Position des Referenzpunktes	63
Formel 5.12	Korregierter Durchmesser der planen zentralen Region	63
Formel 5.13	Korregierte Position des Referenzpunktes	64
Formel 7.1	Axiale Auflösung	78
Formel 7.2	Rayleigh-Kriterium für die axiale Auflösung	78
Formel 7.3	Schärfentiefe	78
Formel 7.4	Transparenzfuntion eines Partikels	80
Formel 7.5	Rekonstruierte Komplexe Amplitude in der Nähe der Partikelab- bildung	81

Zusammenfassung wichtiger Variablen und Abkürzungen

\widetilde{A}_B	Komplexe Beleuchtungswelle in der Hologrammebene
AC	Achromat
\widetilde{A}_k	Komplexes Feld in der Hologrammebene mit der zum Objekt komplementäre Blende
A_O	Amplitudenbeitrag der Objektwelle
\widetilde{A}_O	Komplexes Feld in der Hologrammebene mit dem Objekt
A_R	Amplitudenbeitrag der Referenzwelle
a_p	Pixelgrösse
α, β	Richtungscosine
β'	Abbildungsmaßstab
β_{AS}	Abbildungsmaßstab des Abbildungssystems
β_k	Polynomkoeffizient
β_T	Winkel der Tangente des Freiformprofils
CCD	Charge-Coupled-Device
CMOS	Complementary Metall-Oxid-Semiconductor
comb	Kammfunktion
D	Aperturdimension
d	Streifenperiode
D_{B_k}	Durchmesser der Blende B_k
dF	Elementare Kraft
DG	Deckglas
D_0	Der innere Durchmesser der Freiformoberfläche
D'_0	Der an die Fertigung angepasste innere Durchmesser der Freiformoberfläche
d_{MO}	Auflösung des Mikroobjektives
d_{Ob}	Durchmesser des undurchsichtigen Objektes
DOF	Depth of field
D_s	Lichtfleckdurchmesser an der Streuscheibe
ds	Elementare Fläche
D_Q	Durchmesser der Blende
D_W	Durchmesser des konvergierenden Pinzettenstrahls

Δ	Quantisierungsintervall
Δz_L	Der scheinbare axiale Abstand zwischen zwei Punkten in der Luft
δ_R	Phasenschiebung der Referenzwellen
Δz_W	Der scheinbare axiale Abstand zwischen zwei Punkten im Wasser
\overline{E}	elektrische Feldstärke
e	Quantisierungsfehler
ε_k	Einfallswinkel an der Mediengrenze
F	IR-Filter
FFT	Fast Fourier Transform
FFT-DI	Fast Fourier Transform direct Integration
$\overline{F_G}$	Gradientenkraft
FL _k	Fokussierlinse k
f'_{MO}	Brennweite des mikroskopischen Objektivs
FO	Optischer Teil zur Formung des Pinzettenstrahls
f_R	Raumfrequenz
$\overline{F_S}$	Streukraft
$\overline{F_\Sigma}$	Gesamtkraft
f'_{TL}	Brennweite der Tubuslinse
φ_O	Phase der Objektwelle
φ_R	Phase der Referenzwelle
$\gamma_{P_{1,2}}$	Die Funktion des komplexen Kohärenzgrades
\overline{H}	magnetische Feldstärke
HE	Hologrammebene
I	Interferenzbild
IAF	Impulse Response Funktion
IB _k	Irisblende k
$I(x)$	Intensität (vereinfacht eindimensional)
K	Kamera
k	Wellenzahl
KL _k	Kollimationslinse k
$k_{\Delta z}$	Tiefenskalierungsfaktor
λ	Wellenlänge
λ_0	Mittenwellenlänge
MO1	Mikroobjektiv 1 (siehe Anhang)
MO2	Mikroobjektiv 2 (siehe Anhang)
MO3	Mikroobjektiv 3 (siehe Anhang)
$\mu_{1,2}$	Wechselseitige Kohärenzfunktion
N	Anzahl von Bit
NA _{MO}	numerische Apertur des mikroskopischen Objektivs
n_k	Brechungsindex des Mediums k

n_q	Anzahl von Quantisierungsstufen
ν	Variable für Raumfrequenz
ν_x	Raumfrequenz des Pixelrasters von der Kamera
O	Rekonstruierte Objektwelle
OE	Objektebene
OF	Optische Faser
OV	Objektvolumen
OW	Objektwelle
P	Probe
p	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
P_0	Punkt der Polynomfunktion
P_1, P_2	Zwei punktförmige Lichtquellen
PIAF	Parametrisierte IRF
PMMA	Polymethylmethacrylat
$P(x)$	Binäre Funktion der lichtempfindlicher Fläche des Pixels (vereinfacht eindimensional)
RW	Referenzwelle
r_0	Radius des Partikels
r_W	Krümmungsradius des Werkzeuges
ρ	Radius des zentralen Maximums der Kohärenzfunktion
S	geschlossene Oberfläche um den Unstetigkeitspunkt P_0
SNR	Signal-Rauschverhältnis
σ_S	Einfallswinkel der Objektwelle
T	Zwillingsbild
τ_p	Funktion der Transparenz des Partikels
u	objektseitiger Öffnungswinkel
u	skalares Feld
u'	bildseitiger Öffnungswinkel
\overline{U}_1	Summe von Referenzwelle 1 und Objektwelle
\overline{U}_2	Summe von Referenzwelle 2 und Objektwelle
\overline{U}_O	Komplexe Objektwelle
$\overline{U}'_O, \overline{U}''_O$	Lösungen für die Objektwelle
$\overline{U}_{R1}, \overline{U}_{R2}$	Komplexe Referenzwellen 1 und 2
US_k	Umlenkspiegel k
x_0, y_0	Koordinaten eines Punktes in der Aperturebene
x, y	Koordinaten eines Punktes in der Beobachtungsebene
Z	Konstantterm der an einem Hologramm gebeugten Strahlung
z	Abstand
z_1, z_2	z -Position der xy -Hilfsebenen für Partikeldetektion
z'_{B_k}	Die axiale Position der Blende B_k

z_{OV,z_1}, z_{OV,z_2}	Axiale Koordinaten der Grenzebenen des Objektvolumens
z_p	z-Position der xy-Ebene für Partikeldetektion
z_{P_0}	Position des Punktes P_0
z_W	z-Koordinate im Wasser

Anhang. Technische Daten des Abbildungssystems und Materialien

MO1	CF IC EPI Plan SLWD	
	Vergrößerung	10x
	Brennweite	$f'_{MO1} = 20mm$
	Numerische Apertur	$NA = 0,21$
	Arbeitsabstand	$a' = -20,3mm$
MO2	CF IC EPI Plan SLWD	
	Vergrößerung	20x
	Brennweite	$f'_{MO2} = 10mm$
	Numerische Apertur	$NA = 0,35$
	Arbeitsabstand	$a' = -20,5mm$
MO3	M-40X	
	Vergrößerung	40x
	Brennweite	$f'_{MO3} = 4,5mm$
	Numerische Apertur	$NA = 0,65$
	Arbeitsabstand	$a' = -0,6mm$
Tubuslinse Linos (Achromat)		
	Brennweite	$f'_{TL} = 120mm$
	Durchmesser der Fassung	$D_{TL} = 30mm$
Kamera uEye UI-1540-M		
	Sensortyp	CMOS
	Chip	MT9M001STM
	Auflösung	1280 x 1024
	Farbtiefe	8bit (10bit ADC)
	Pixelgröße	$a_x = a_y = 5,2\mu m$
	Optische Fläche	6,656 x 5,325 mm

Mikropartikel $1\mu m/3\mu m$ Kisker (Polystyrene)	$n_{1060.0}$	1.5716
Pinzettenoptik (PMMA)	$n_{1060.0}$	1.4811

Publikationsliste

Referierte Journale

1. SABITOV, N.; MEINECKE, T.; KELLY, D.-P.; SINZINGER, S. : Two-step phase-shift interferometry with known but arbitrary reference waves: a graphical interpretation. In: *Appl. Optics* 51 (2012), S. 6831-6838
2. MEINECKE, T.; SABITOV, N.; SINZINGER, S. : Information extraction from digital holograms for particle flow analysis. In: *Appl. Optics* 49 (2010), S. 2446-2455

Tagungsbeiträge

Vorträge

- MEINECKE, T.; SABITOV, N.; SINZINGER, S. : Verbundhologramme in der digitalholografischen Mikroskopie. In: *DGaO Jahrestagung*. Wezlar, 2010.
- KELLY, D. P.; MEINECKE, T.; SABITOV, N.; SINZINGER, S.; SHERIDAN, J. T. : Digital holography and phase retrieval: a theoretical investigation. In: *Holography: advances and modern trends II* : 18 - 20, SPIE optics + optoelectronics, 80740C. Prague, 2011.
- SABITOV, N.; GREWE, A.; SINZINGER, S. : Simultaneous trapping and observation optics for micro-opto-fluidic systems. In: *EOS annual meeting (EOSAM 2012)*. Aberdeen, 2012.
- KELLY, D. P.; SABITOV, N.; MEINECKE, T.; SINZINGER, S. : Some considerations when numerically calculating diffraction patterns. In: *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH)*. Tokio, 2011. - ISBN: 978-1-55752-912-1
- SABITOV, N.; GREWE, A.; SINZINGER, S. : Optimized Image Reconstruction in Digital Holography. In: *DGaO Jahrestagung*. Brescia, 2009.

Poster

- BICHRA, M.; SABITOV, N.; SINZINGER, S. : Vorrichtung und Verfahren zur Vermessung zumindest teilweise reflektierender Oberflächen In: *DGaO Jahrestagung*. Karlsruhe, 2014.
- MEINECKE, T.; KELLY, DAMIEN P.; SABITOV, N.; SINZINGER, S.: Numerical propagation algorithms and phase retrieval techniques In: *DGaO Jahrestagung*. Ilmenau, 2011.
- SABITOV, N.; MEINECKE, T.; SINZINGER, S.: Bestimmung der Genauigkeit beim holographischen Messverfahren in Mikrofluidsystemen. In: *DGaO Jahrestagung*. Wetzlar, 2010.
- MEINECKE, T.; SABITOV, N.; SINZINGER, S.: Particle Detection in Microfluidic Systems. In: *DGaO Jahrestagung*. Brescia, 2009.
- MEINECKE, T.; SABITOV, N.; OEDER, A.; SINZINGER, S.: Digitale Holographie zur dreidimensionalen Beobachtung in mikro-opto-fluidischen Systemen. In: *DGaO Jahrestagung*. Esslingen, 2008.

Patente

- BICHRA, M.; SBITOV, N.; SINZINGER, S.: Vorrichtung und Verfahren zur Vermessung zumindest teilweise reflektierender Oberflächen. Deutsches Patentamt: 10 2013 018 569.6 Anmeldedatum: 30. Oktober 2013.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Mitarbeiter der Firma Fresnel Optics GmbH bei der Fertigung des optischen Teils für die optische Pinzette.
2. Jun.-Prof. Dr. Eng. Damien-Peter Kelly beim Fachgespräch bezüglich der unterschiedlichen Alternativen in der Wellenfrontermittlung.
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Stefan Sinzinger beim Fachgespräch bezüglich der inkohärenten Beleuchtung.
4. M. Sc. Ronald Kampmann beim Fachgespräch bezüglich der Mie-Streuung von Mikropartikeln.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch bewertet wird und gemäß § 7 Abs. 10 der Promotionsordnung den Abbruch des Promotionsverfahrens zur Folge hat.