

Beleuchtung und Mikro-Kohärenz für die Mikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Phys. Paul Petruck
geboren am 24.12.1982 in Jena

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Richard Kowarschik, FSU Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Cornelia Denz, WWU Münster
3. o. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Monika Ritsch-Marte, MU Innsbruck

Tag der Disputation: 28.05.2013

Beleuchtung und Mikro-Kohärenz für die Mikroskopie

vorgelegt von Dipl.-Phys. Paul Petruck

In der Arbeit werden ausgewählte interferenzoptische Beleuchtungsverfahren der Mikroskopie diskutiert. In der digitalen in-line holografischen Mikroskopie führen Interferenzen wie Speckle zu störenden Bildfehlern. Die Mikro-Kohärenz verbessert die Bildqualität, wenn sie messbar und passend eingestellt ist. Lichtquellen wie die Lumineszenzdiode (LED) müssen charakterisiert werden. Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung bietet eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze des Objektivs, ist aber in der Größe des Bildfelds begrenzt. Eine alternative Beleuchtungsmethode kann eine laterale Auflösung unabhängig von der numerischen Apertur des Detektionsobjektivs erreichen und ist auch für nicht-fluoreszierende Proben einsetzbar.

▷ Räumliche Mikro-Kohärenz: Messung mit Array-Interferometern

- Der bekannte Youngsche Doppelspalt wird durch ein Apertur-Array erweitert. Bei der Beleuchtung eines Arrays mit 125×125 *nano holes* (Durchmesser je 530 nm, Periode 4 μm) entstehen Vielstrahl-Interferenzen.
- Verglichen mit dem Signal-Rausch-Verhältnis des Interferenzkontrasts eines äquivalenten Doppel-Pinholes wird eine Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses bis zu 31 dB (Faktor 1300) erreicht.
- Der räumliche Kohärenzdurchmesser wird im Mikrometerbereich von 5 μm bis 100 μm für Lichtquellen wie Halogenlampen und LED gemessen.

▷ Partiiell-kohärente Lichtquellen: LED, Halogen- und Quecksilberdampfampe

- Die mikro-kohärente Beleuchtung wird durch spektrale Filterung (Interferenzfilter) und durch Raumfrequenzfilterung (Blenden und Pinholes) von Lichtquellen wie LED, Halogen- und Quecksilberdampflampen erzeugt. Die zeitliche sowie die räumliche Kohärenzlänge werden im Mikrometerbereich von 5 μm bis 100 μm eingestellt.
- Die Bestrahlungsstärke der mikro-kohärenten Beleuchtung liegt im Bereich von 10^{-2} W/m^2 bis 10^2 W/m^2 . Mit einem kommerziellen Bildsensor und einem kommerziellen Mikroskopaufbau werden Signal-Rausch-Verhältnisse für die Beleuchtung in der Objektebene bis 30 dB erreicht (Belichtungszeiten zwischen 2 ms und 20 s).

▷ Digitale in-line holografische Mikroskopie mit mikro-kohärenter Beleuchtung

- Die mikro-kohärente Beleuchtung wird für die digitale in-line holografische Mikroskopie genutzt. Speckle sowie störende Interferenzen aus Mehrfachreflexionen werden vermieden. Die Bildqualität wird verbessert.
- Mit angepasster Kohärenz (zeitliche Kohärenzlänge $\approx 8 \mu\text{m}$, räumliche Kohärenzlänge $\approx 30 \mu\text{m}$) werden Hologramme von $1 \mu\text{m}$ großen Objekten aufgenommen und störungsfreie Bilder generiert (Objekt-Hologramm-Abstand von $50 \mu\text{m}$).
- Die nutzbare Intensität ist ausreichend, um eine Bildwiederholrate von 25 Bildern pro Sekunde (Video) mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 8 dB zu erreichen.

▷ Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung durch separate Vielstrahl-Interferenz

- Abweichend von den bekannten Verfahren der strukturierten Beleuchtung wird mit einem neuen Konzept die Beleuchtungsapertur von der Detektionsapertur getrennt. Für die Beleuchtung wird eine planare Chip-Anordnung im Durchlicht verwendet. Die strukturierte Beleuchtung wird durch Vielstrahl-Interferenzen erzeugt. Ein kommerzielles Mikroskop kann durch einen kompakten Aufbau modular ergänzt werden.
- Für die Chip-Anordnung wird ein Array-Interferometer mit 80×80 *nano holes* (Durchmesser je 530 nm , Periode $6 \mu\text{m}$) genutzt. Eine Probe wird von kleinen Interferenz-Spots (Durchmesser bis $\frac{\lambda}{2}$) linsenlos beleuchtet und abgetastet.
- Die vom Detektionsobjektiv entkoppelte Chip-Beleuchtung ermöglicht eine hohe Auflösung ($\text{NA}_{\text{illum}} \geq 0,7$) unabhängig von der numerischen Apertur des Objektivs (z.B. $0,2$). Das Gesichtsfeld ist durch das Objektiv gegeben (z.B. Durchmesser $2,5 \text{ mm}$).
- Eine numerische Rekonstruktion der strukturierten Beleuchtung führt zu einer 3-fach besseren lateralen Auflösung gegenüber dem Auflösungsvermögen des verwendeten Objektivs. Damit ist das „Abbe-Limit“ des Objektivs bei gleichzeitig großem, objektivgegebenen Gesichtsfeld unterschritten.
- Das neue Verfahren ermöglicht eine Weitfeld-Bildgebung von fluoreszierenden sowie nicht-fluoreszierenden Proben.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Räumliche Mikro-Kohärenz: Messung mit Array-Interferometern | 3 |
| 2.1 | Grundlagen zu Kohärenz und Interferenz | 3 |
| 2.2 | Young-Interferometer | 10 |
| 2.3 | Array-Interferometer | 13 |
| 2.3.1 | Vielstrahl-Interferenz und der Talbot-Effekt | 13 |
| 2.3.2 | Experimentelle Realisierung und Ergebnisse | 15 |
| 3 | Partiell-kohärente Lichtquellen: LED, Halogen- und Quecksilberdampflampe | 25 |
| 3.1 | Partiell-kohärente Lichtquellen | 25 |
| 3.2 | Messung von zeitlicher und räumlicher Kohärenz | 28 |
| 3.3 | Kohärenzvolumen und spektrale Strahlungsstromdichte | 32 |
| 3.4 | Kohärenzvolumen und Signal-Rausch-Verhältnis | 33 |
| 4 | Digitale in-line holografische Mikroskopie mit mikro-kohärenter Beleuchtung | 35 |
| 4.1 | Grundlagen zur digitalen in-line holografischen Mikroskopie | 35 |
| 4.2 | Bildqualität und Auflösungskriterium | 39 |
| 4.3 | Signal-Rausch-Analyse und Bildaufnahmen mit Videorate | 53 |
| 5 | Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung durch separierte Vielstrahl-Interferenz | 59 |
| 5.1 | Moderne Verfahren der hochauflösenden Weitfeldmikroskopie | 59 |
| 5.2 | Strukturierte Beleuchtung durch planare Array-Chips | 62 |
| 5.3 | Ergebnisse mit erhöhter Auflösung und großem Gesichtsfeld | 71 |
| 5.3.1 | Nicht-fluoreszierende Proben | 71 |
| 5.3.2 | Fluoreszierende Proben | 75 |
| 5.4 | Diskussion und Ausblick | 78 |
| 6 | Zusammenfassung | 81 |
| | Literaturverzeichnis | 85 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Schematischer Aufbau des Michelson-Interferometers | 8 |
| 2 | Schematischer Aufbau des Youngschen Doppelspalt-Interferometers | 10 |
| 3 | Schematische Darstellung zur Entstehung des Talbot-Effekts | 14 |
| 4 | Schematischer Aufbau des verwendeten Mikroskops Zeiss Axioskop 2 | 16 |
| 5 | Prinzip der Messung räumlicher Kohärenz: Doppel-Pinhole-Interferometer und Vielstrahl-Interferometer | 17 |
| 6 | Detektorrauschen der verwendeten Kamera AxioCam MRm | 18 |
| 7 | REM-Aufnahmen der verwendeten <i>nano hole</i> Array Maske | 19 |
| 8 | Interferenzmuster eines 125×125 Arrays mit $4 \mu\text{m}$ Periode | 21 |
| 9 | Diagramm: Durchmesser der Interferenz-Spots in Abhängigkeit vom Durchmesser der Leuchtfeldblende | 22 |
| 10 | Diagramm: Durchmesser der Kohärenzfläche in Abhängigkeit vom Durchmesser der Leuchtfeldblende | 23 |
| 11 | Sekundäre Kohärenzeffekte bei einem diodengepumpten Festkörperlaser | 31 |
| 12 | Diagramm: Bestrahlungsstärke in Abhängigkeit vom Kohärenzvolumen, Vergleich verschiedener Lichtquellen | 32 |
| 13 | Diagramm: Bestrahlungsstärke einer LED in Abhängigkeit vom Kohärenzvolumen und vom Vergrößerungsfaktor | 33 |
| 14 | Schematischer Aufbau für eine mikro-kohärente Beleuchtung und Anwendung in der digitalen in-line holografischen Mikroskopie | 39 |
| 15 | Holografische, mikroskopische Bildgebung von $1,06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln mit unterschiedlich kohärenter Beleuchtung | 41 |
| 16 | Geometrie der Strahlengänge im verwendeten Aufbau für digitale in-line holografische Mikroskopie | 43 |
| 17 | Simulation von in-line holografisch mikroskopischer Bildgebung mit <i>zeitlich</i> partiell-kohärenter Beleuchtung | 46 |
| 18 | Simulation von in-line holografisch mikroskopischer Bildgebung mit <i>räumlich</i> partiell-kohärenter Beleuchtung | 47 |
| 19 | Experimente zur in-line holografischen Mikroskopie mit variabler, <i>zeitlich</i> partiell-kohärenter Beleuchtung | 49 |
| 20 | Experimente zur in-line holografischen Mikroskopie mit variabler, <i>räumlich</i> partiell-kohärenter Beleuchtung | 50 |

| | |
|---|----|
| 21 Diagramm zur Auflösbarkeit: Vergleich zwischen den experimentellen Ergebnissen und den theoretischen Kurven für zeitlich und räumlich partiell-kohärente Beleuchtung | 51 |
| 22 Diagramm: Experimentell erreichtes Signal-Rausch-Verhältnis von Quelle und Detektor | 55 |
| 23 Diagramm: Experimentell erreichtes Signal-Rausch-Verhältnis im Hologramm und in der Rekonstruktion | 56 |
| 24 Beispiele für Rekonstruktionen mit verschiedenen Belichtungszeiten und Signal-Rausch-Verhältnissen | 56 |
| 25 Einzelbildausschnitte aus holografisch mikroskopischen Videosequenzen | 58 |
| 26 Schema des Aufbaus für eine Durchlicht-Mikroskopie mit chip-basierter, strukturierter Beleuchtung | 63 |
| 27 Die Beleuchtungsapertur in Abhängigkeit vom Pinhole-Durchmesser und der geometrischen Anordnung | 64 |
| 28 Beugungsbegrenzte Abbildung eines durch Vielstrahl-Interferenz erzeugten Spot-Musters | 66 |
| 29 Schema des Rekonstruktionsalgorithmus für hochaufgelöste Mikroskopbilder mit großem Gesichtsfeld | 70 |
| 30 Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung und großem Gesichtsfeld: Beispiel Auflösungstestchart | 72 |
| 31 Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung und großem Gesichtsfeld: Bestimmung der Auflösungsgrenze | 74 |
| 32 Mikroskopie mit separater strukturierter Beleuchtung und großem Gesichtsfeld für fluoreszierende Proben | 78 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Räumliche Kohärenz von verschiedenen Lichtquellen | 29 |
| 2 Zeitliche Kohärenz von verschiedenen Lichtquellen | 30 |
| 3 Parameter des genutzten 80×80 Array-Chips und der damit erzeugten Beleuchtung. | 65 |
| 4 Objektiv-Vergleich: Auflösungsvermögen, Gesichtsfeld und Arbeitsabstand. | 67 |

1 Einleitung

In der Arbeit wird ein Teilgebiet der optisch-mikroskopischen Bildgebung behandelt. Im Fokus steht die Beleuchtung für ausgewählte interferenzoptische Verfahren. Eine stets aktuelle Aufgabe ist es, bestehende Verfahren wie die digitale in-line holografische Mikroskopie oder die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung zu verbessern. Dies könnte mithilfe moderner Lichtquellen wie der Lumineszenzdiode (engl. *light-emitting diode*, LED) oder angepasster Array-Interferometer realisiert werden. Ein Schwerpunkt ist die Charakterisierung von Lichtquellen und ihrer zeitlichen und räumlichen Kohärenz sowie ihrer Interferenzfähigkeit im Mikrometerbereich.

Die digitale in-line holografische Mikroskopie ermöglicht eine linsenlose, mikroskopische Bildgebung bei gleichzeitigem Zugang zu Phasen- sowie 3D-Informationen mit nur einer einzigen Aufnahme des Hologramms. Im Gegensatz zur makroskopischen Holografie liegen die hier zu untersuchenden Volumina im Mikrometerbereich. Der übliche Einsatz kohärenter Lichtquellen (z.B. Laser) mit Kohärenzlängen weit über dem Mikrometerbereich ist bekannterweise mit der Entstehung von Speckle verbunden. Eine partiell-kohärente Beleuchtung kann solche Störungen minimieren und somit die Bildqualität verbessern. Allerdings fehlen für die Anwendung einer Kohärenz im Mikrometerbereich (*Mikro-Kohärenz*) in der interferenzoptischen Mikrobildgebung systematische Untersuchungen.

Folgende Fragen müssen beantwortet werden: Welchen qualitativen *und* quantitativen Einfluss hat eine zeitlich oder eine räumlich mikro-kohärente Beleuchtung auf die laterale Auflösung? Welche Rolle spielt die Dimensionierung des gesamten optischen Aufbaus? Welche Anforderungen an die Lichtquelle ergeben sich und was leisten Lichtquellen wie beispielsweise die LED?

Um Kohärenz und Interferenz im Mikrometerbereich quantitativ bewerten zu können, müssen sowohl die zeitliche als auch die räumliche Kohärenz in diesem Bereich messbar sein. Während die zeitliche Kohärenzlänge mit einem Michelson-Interferometer gut bestimmbar ist, ist die Messung räumlicher Kohärenz und des Kohärenzdurchmessers mithilfe des Young-Interferometers begrenzt. Durch die zwingend notwendige Verkleinerung von Aperturabstand und -größe des Youngschen Doppelspaltes auf wenige Mikrometer verringert sich der Lichtdurchsatz und damit das Signal-Rausch-Verhältnis des Interferometers derart, dass eine Messung lichtschwacher Quellen im Mikrometerbereich nicht mehr möglich ist. Eine Aufgabe besteht somit darin, ein auf einem Vielstrahl-Interferometer basierendes Verfahren zu entwickeln, welches die sensitive Messung räumlicher Mikro-Kohärenz ermöglicht.

Der Einsatz einer mikro-kohärenten Beleuchtung in der digitalen in-line holografischen Mikroskopie muss quantitativ untersucht werden. Das Ziel ist es, moderne Lichtquellen wie die LED für die interferenzoptische Mikroskopie zugänglich zu machen und gleichzeitig bestehende Grenzen wie Bildstörungen aufgrund kohärenter Beleuchtung zu verstehen und zu überwinden.

Es stellen sich weitere Fragen: Welche Kohärenzlängen und Kohärenzdurchmesser lassen sich durch Filterung einstellen und messen? Welche Lichtmenge steht mit einer gefilterten Quelle zur Verfügung? Welche Anforderungen an den Detektor und welche Messzeiten ergeben sich? Welche modernen Lichtquellen sind für eine mikro-kohärente Beleuchtung geeignet?

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung. Aktuelle Verfahren der „Super-Resolution“ Mikroskopie (STED, PALM/STORM und SIM) beschäftigen sich mit der Verbesserung der Auflösung bis weit unter die klassische Beugungsgrenze („Abbe-Limit“). Die dafür notwendigen Mikroskopaufbauten sind aufwendig, kostenintensiv und in ihrer Anwendbarkeit noch begrenzt. So bieten diese Verfahren eine sehr hohe Auflösung, nutzen aber gleichzeitig ein stark begrenztes Gesichtsfeld. Kurze Arbeitsabstände erschweren oft die Probenzugänglichkeit. Zudem sind alle modernen Methoden auf spezialisierte Fluoreszenzmarker angewiesen, wobei für biologische Anwendungen fluoreszenzmarkerfreie Verfahren wünschenswert sind.

Eine Aufgabe der Arbeit ist es, ein Beleuchtungsverfahren zu entwickeln, welches eine Trennung der strukturierten Beleuchtung und ihrer Detektion ermöglicht. Durch den Einsatz von Objektiven mit geringer numerischer Apertur sind große Gesichtsfelder und große Arbeitsabstände gegeben. Eine Entkopplung von Beleuchtung und Detektion würde somit eine hohe Auflösung bei gleichzeitig großem Gesichtsfeld ermöglichen. Eine strukturierte Beleuchtung lässt sich wiederum durch Vielstrahl-Interferenzen erzeugen. Es ist zu untersuchen, ob ein alternatives Beleuchtungskonzept mithilfe eines chip-basierten Array-Interferometers die bisherige Kompromisslösung vereinfachen und verbessern kann. Die Analyse von nicht-fluoreszierenden Objekten ist ebenfalls von Interesse.

Die Arbeit ist in die folgenden Kapitel gegliedert: In Kapitel 2 werden Grundlagen zu Kohärenz und Interferenz erläutert. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf der Messung räumlicher Kohärenz mit Array-Interferometern, welche das Prinzip der Vielstrahl-Interferenz nutzen. In Kapitel 3 werden partiell-kohärente Lichtquellen vorgestellt und deren Kohärenzparameter vermessen. Kapitel 4 handelt von der digitalen in-line holografischen Mikroskopie und der Anwendung einer mikro-kohärenten Beleuchtung. In Kapitel 5 wird eine strukturierte Beleuchtung vorgestellt, welche durch Vielstrahl-Interferenzen erzeugt wird und eine Mikroskopie mit erhöhter Auflösung und großem Gesichtsfeld ermöglicht. Abschließend werden in Kapitel 6 die Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst.

2 Räumliche Mikro-Kohärenz: Messung mit Array-Interferometern

2.1 Grundlagen zu Kohärenz und Interferenz

Der Kohärenzbegriff

Kohärenz (von lat. *cohaerere*, „zusammenhängen“) beschreibt im physikalisch-optischen Sprachgebrauch die Eigenschaft von Lichtwellen, miteinander zu interferieren. Die *Interferenz* ist eine zeitlich sowie örtlich stationäre Erscheinung, bei welcher sich die komplexwertigen Amplituden zweier oder mehrerer optischer Felder nach dem Superpositionsprinzip überlagern. Der Kohärenzbegriff ermöglicht die genauere Beschreibung der Interferenz und aller dazugehörigen physikalischen Größen.

In der Quantentheorie geht man von kohärent superponierbaren Zuständen aus. Ein Zustand wird dabei als Ensemble von Wahrscheinlichkeitsdichten interpretiert. Der Messprozess, welcher ein Eingriff in das betrachtete, quantenmechanische System darstellt, führt zur Dekorrelation eines kohärenten Überlagerungszustands, weshalb hier der Begriff der *Dekohärenz* [1] eingeführt wurde. Dekohärenz ist ein wesentlicher Bestandteil beim Übergang zu makroskopischen Systemen, wobei der Überlagerungszustand in eine statistische (klassische) Verteilung von unkorrelierten Einzelzuständen übergeht.

Klassisch beschreibt die Kohärenz die Fähigkeit von Lichtwellen, sich konstruktiv und destruktiv zu überlagern. Hierfür wird eine Korrelationsfunktion Γ definiert [2, 3]. Diese wechselseitige Kohärenzfunktion Γ beschreibt die Kreuzkorrelation eines stationären Wellenfelds w an zwei verschiedenen Punkten im Raum (r_1 und r_2) und zu verschiedenen Zeiten (t_1 und $t_2 = t_1 + \tau$):

$$\Gamma(r_1, r_2, \tau) = \Gamma_{12}(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T w^*(r_1, t) w(r_2, t + \tau) dt . \quad (2.1)$$

Dabei wird die Korrelation als Erwartungswert des Wellenfelds w beschrieben. Durch Normierung lässt sich der komplexwertige Kohärenzgrad γ definieren als

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_{11}(0) \Gamma_{22}(0)}} = |\gamma_{12}(\tau)| e^{i\Phi_{12}(\tau)} , \quad (2.2)$$

wobei $\Gamma_{ii}(0) = I_i$ die Intensität ergibt und $\Phi_{12}(\tau)$ den Phasenwinkel zwischen beiden

Wellenfeldern darstellt.

In der Praxis werden die Interferenzeigenschaften zweier Lichtbündel untersucht, indem diese überlagert werden und der Interferenzkontrast gemessen wird. Analytisch lässt sich diese Zwei-Strahl-Interferenz anhand der Überlagerung zweier stationärer Wellenfelder u_1 und u_2 folgendermaßen formulieren:

$$\begin{aligned}
 u_{\text{sum}} &= u_1 + u_2 \\
 I_{\text{sum}} &= \langle u_{\text{sum}} u_{\text{sum}}^* \rangle \\
 &= I_1 + I_2 + 2 \operatorname{Re} \{ \Gamma_{12}(\tau) \} \\
 &= I_1 + I_2 + 2 \sqrt{I_1 I_2} |\gamma_{12}(\tau)| \cos \Phi_{12}(\tau) .
 \end{aligned} \tag{2.3}$$

Der Interferenzkontrast K ergibt sich aus den lokalen Extrema:

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} = \frac{2 \sqrt{I_1 I_2}}{I_1 + I_2} |\gamma_{12}(\tau)| . \tag{2.4}$$

Dabei lässt sich folgende Fallunterscheidung vornehmen:

$$\begin{aligned}
 |\gamma_{12}(\tau)| &\equiv 1 \dots \text{(vollständige) Kohärenz,} \\
 0 < |\gamma_{12}(\tau)| &< 1 \dots \text{partielle Kohärenz und} \\
 |\gamma_{12}(\tau)| &\equiv 0 \dots \text{(vollständige) Inkohärenz.}
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

In der physikalischen Realität existieren weder vollständig kohärente, noch vollständig inkohärente Lichtquellen, denn dazu müsste das Spektrum einer kohärenten Quelle streng monochromatisch und die Quelle selbst punktförmig, d.h. ohne jegliche Ausdehnung, sein. Inkohärente Quellen hingegen müssten ein unendlich ausgedehntes Spektrum haben und auf einer unendlich ausgedehnten Fläche emittieren. Beide Extremfälle werden in der Realität nicht erreicht, so dass alle natürlichen und künstlichen Lichtquellen partiell-kohärent sind. Thermische Lichtquellen und Lumineszenzstrahler werden dabei als schwach (partiell) kohärent eingeordnet ($|\gamma_{12}(\tau)| \rightarrow 0$), während Laser als stark (partiell) kohärent charakterisiert werden ($|\gamma_{12}(\tau)| \rightarrow 1$).

Die Kohärenzfunktion lässt sich im speziellen Fall in einen zeitlichen (longitudinalen) Anteil und einen räumlichen (transversalen) Anteil separieren.

Zeitliche Kohärenz

Zeitliche Kohärenz beschreibt die Korrelation zweier Wellenfelder an ein und demselben Ort, dabei gilt $r_1 = r_2$. Daraus folgend wird lediglich die (Auto-)Korrelation zu unterschiedlichen Zeiten τ betrachtet:

$$\Gamma(r_1, r_2, \tau) \longrightarrow \Gamma(r_1, r_1, \tau) = \Gamma_{11}(\tau) = \Gamma(\tau) . \tag{2.6}$$

Jedes Wellenfeld besitzt ein charakteristisches Leistungsspektrum $W(\nu)$, dem sich eine mittlere Frequenz $\bar{\nu}$ sowie eine spektrale Frequenzbandbreite $\Delta\nu$ zuordnen lassen. Ein exakter Zusammenhang zwischen dem Leistungsspektrum $W(\nu)$ des Wellenfelds und dem zeitlichen Anteil der Kohärenzfunktion $\Gamma(\tau)$ ist durch das Wiener-Khintchine-Theorem [4, 5] gegeben. Demnach sind beide mittels Fouriertransformation ineinander überführbar [2]:

$$\Gamma(\tau) \cong \int_0^\infty W(\nu) \exp(-i 2\pi \nu \tau) d\nu . \quad (2.7)$$

Die spektrale Breite $\Delta\nu$ kann dabei auch als reziproke Kohärenzzeit $1/\tau_{\text{coh}} = \Delta\nu$ interpretiert werden. Diese gibt an, in welchem Zeitintervall das beobachtete Wellenfeld kohärent, d.h. mit korrelierten Phasen, beobachtet werden kann. Diese Interpretation stellt eine Vereinfachung des Kohärenzgrads nach Fallunterscheidung (2.5) dar, bei der ein frei wählbarer Wert als Grenze zwischen $|\gamma_{12}(\tau)| = 0$ und $|\gamma_{12}(\tau)| = 1$ angenommen wird, ohne den Bereich der partiellen Kohärenz direkt einzubeziehen. Die Kohärenzzeit τ_{coh} lässt sich in eine charakteristische Kohärenzlänge $L_{\text{coh}} = c \tau_{\text{coh}}$ umformen, wobei c die Ausbreitungsgeschwindigkeit im Medium beschreibt. Ein in der Praxis oft verwendeter Ansatz zur Berechnung der Kohärenzlänge ist mit folgender Approximation [6, Seite 268] gegeben:

$$L_{\text{coh}} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \approx 0,44 \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} , \quad (2.8)$$

wobei ein gaußförmiges Spektrum sowie dessen Halbwertsbreite (FWHM) als spektrale Bandbreite $\Delta\lambda$ und $\lambda = c/\nu$ als Wellenlänge angenommen werden. Als Grenzwert der Kohärenzfunktion wird ein in der Praxis gängiger Kohärenzgrad von $|\gamma(\tau)| = 0,5$ angenommen. Im Beispiel für eine zentrale Wellenlänge von $\lambda = 500 \text{ nm}$ würde bei einer spektralen Breite von $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$ die Kohärenzlänge bei $L_{\text{coh}} = 11 \mu\text{m}$ liegen, bei einer Bandbreite von $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$ hingegen bei $L_{\text{coh}} = 110 \mu\text{m}$. Das bedeutet, dass gute zeitliche Kohärenz nur von quasi-monochromatischen Lichtquellen realisiert werden kann.

Räumliche Kohärenz

Licht aus einer punktförmigen Quelle kann stets interferieren, da es räumlich kohärent ist. Analog zu Spezialfall (2.6) lässt sich eine Korrelation zweier Wellenfelder an verschiedenen Orten innerhalb einer zur Ausbreitungsrichtung senkrechten Ebene und zu einer festen Zeit $\tau = 0$ betrachten:

$$\Gamma(r_1, r_2, \tau) \longrightarrow \Gamma(r_1, r_2, 0) = \Gamma_{12}(0) = \Gamma_{12} . \quad (2.9)$$

Anstelle des Leistungsspektrums $W(\nu)$ lässt sich mithilfe des Ortsfrequenzspektrums ein Zusammenhang zum räumlichen Anteil der Kohärenzfunktion Γ_{12} herstellen. Das Theorem nach van Cittert und Zernike [7, 8] besagt, dass die Kohärenzfunktion in einer zur Quellenebene parallelen Ebene der Fouriertransformierten der Intensitätsverteilung $I(\xi, \eta)$ in der

Quellebene entspricht [2]:

$$\begin{aligned}\Gamma_{12} &\cong \exp(i\psi) \iint_{-\infty}^{\infty} I(\xi, \eta) \exp\left(\frac{-i 2\pi}{\lambda} \left(\frac{X_1 - X_2}{R} \xi + \frac{Y_1 - Y_2}{R} \eta\right)\right) d\xi d\eta \quad \text{mit} \\ \psi &= \frac{2\pi}{\lambda} \frac{((X_1^2 + Y_1^2) - (X_2^2 + Y_2^2))}{2R} .\end{aligned}\quad (2.10)$$

Dabei sind $r_i = (X_i, Y_i, Z_i)$ die Koordinaten der beiden Punkte im Raum, welche zudem in ein und derselben Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Wellenfelds ($Z_1 = Z_2 = Z$) liegen. $R (\equiv Z)$ beschreibt den Abstand dieser Ebene von der Quellebene und ψ ist ein Phasenvorfaktor. Dabei wird angenommen, dass $R \gg X_i$ sowie $R \gg Y_i$ (Fraunhofer-Näherung) sind und die Quellverteilung $I(\xi, \eta)$ unkorreliert und damit inkohärent ist.

Um einen geometrischen Parameter zur Charakterisierung der räumlichen Kohärenz vergleichbar zur (zeitlichen) Kohärenzlänge nach Formel (2.8) zu erhalten, wird ein frei wählbarer Grenzwert für die Kohärenzfunktion festgelegt und man erhält eine charakteristische Kohärenzfläche A_{coh} . Falls eine radialsymmetrische, homogene Quellverteilung vorliegt, folgt nach Formel (2.10) eine Kohärenzfunktion mit Airy-scheibchenförmigem Verlauf. Die dann kreisförmige Kohärenzfläche A_{coh} lässt sich vereinfacht durch einen Kohärenzdurchmesser D_{coh} beschreiben:

$$D_{\text{coh}} = 2 m \lambda \frac{R}{\rho} . \quad (2.11)$$

Hierbei bezeichnet ρ den Durchmesser der kreisförmigen Quellverteilung. Der Kohärenzdurchmesser D_{coh} kann auch als laterale (räumliche) Kohärenzlänge bezeichnet werden. Für manche Betrachtungen kann ein Raumwinkel $\theta \approx \frac{\rho}{R}$ eingeführt werden, der beschreibt, unter welchem Winkel die Quelle in der entsprechenden Ebene gesehen wird. Die Wahl des Parameters m richtet sich meist nach der Anwendung, bei welcher beschränkte, partielle Kohärenz zum Einsatz kommt. So lassen sich beispielsweise die folgenden Werte für m wählen

$$m = \begin{cases} 0,16 & \text{mit } |\gamma_{12}| \approx 0,88 \quad \dots \text{ „gute“ Kohärenz [9, Seite 562],} \\ 0,35 & \text{mit } |\gamma_{12}| \approx 0,5 \quad \dots \text{ analog zur Halbwertsbreite, vgl. (2.8),} \\ 0,50 & \text{mit } |\gamma_{12}| \approx 0,15 \quad \dots \text{ Kohärenzbedingung nach E. Verdet,} \\ 0,61 & \text{mit } |\gamma_{12}| \approx 0 \quad \dots \text{ erste Nullstelle der Kohärenzfunktion.} \end{cases}$$

Typische Werte der Beleuchtung in der Mikroskopie liegen bei $R \approx 10$ cm und für ρ im Bereich von < 1 mm bis 10 mm, woraus sich für $\lambda = 500$ nm Kohärenzdurchmesser im Bereich von $5 \mu\text{m}$ bis über $50 \mu\text{m}$ ergeben. Hierbei ist $\theta < 6^\circ$. Eine Ausnahme bildet die Beleuchtung mit einem Kondensor. Dabei wird der Beleuchtungswinkel und damit die numerische Apertur der Beleuchtung vergrößert, woraus eine Verkleinerung des Kohärenzdurchmessers folgt.

Kohärenzvolumen

Nach Definition sowie Separation der allgemeinen wechselseitigen Kohärenzfunktion steht die zeitliche Kohärenzlänge L_{coh} orthogonal zur Kohärenzfläche A_{coh} . Aus beiden Parametern lässt sich ein Kohärenzvolumen V_{coh} konstruieren:

$$V_{\text{coh}} = A_{\text{coh}} L_{\text{coh}} = \frac{\pi}{4} D_{\text{coh}}^2 L_{\text{coh}} . \quad (2.12)$$

Das Kohärenzvolumen stellt somit einen approximierten, geometrischen Parameter anstelle der exakten Kohärenzfunktion zur Verfügung und erlaubt damit die vollständige Charakterisierung eines partiell-kohärenten Wellenfelds im Ortsraum anhand eines festgelegten Grenzwerts bezüglich des Kohärenzgrads $|\gamma_{12}(\tau)|$. Da die allgemeine Kohärenzfunktion $\Gamma_{12}(\tau)$ von den Ortsraumkoordinaten r_i abhängig ist, verhält sich auch das Kohärenzvolumen V_{coh} bei einer Ausbreitung des Wellenfelds nicht konstant, sondern hängt nach Formel (2.11) von R ab.

Kohärenzmessmethoden

Heutige Detektoren sind in der Lage, den Energiefluss pro Fläche und über eine bestimmte Integrationszeit zu messen und somit die Bestrahlungsstärke zu bestimmen. Mit solchen Detektoren lässt sich die Kohärenzfunktion nicht direkt messen. Da der Kohärenzbegriff aus einer Modelldefinition folgt, um (stationäre) Interferenzerscheinungen beschreiben zu können, werden Interferometer verwendet, mit denen die Kohärenzfunktion anhand (stationärer) Intensitäten indirekt vermessen werden kann. Bei den meisten Messmethoden wird auf approximierende Modelle zurückgegriffen und nach zeitlichem und räumlichem Anteil separiert. Die Messung räumlicher Kohärenz wird in den Kapiteln 2.2 und 2.3 behandelt.

Zeitliche Kohärenz kann durch die Kohärenzzeit τ_{coh} ausgedrückt werden. Es wird auf die Kohärenzlänge L_{coh} als Messgröße zurückgegriffen. Zur Bestimmung dieser wird Licht aus ein und demselben Quellpunkt über verschiedene optische Weglängen ausgebreitet und anschließend wieder überlagert. Diese Vorgehensweise wird mit einem Michelson-Interferometer realisiert [3] (siehe Abb. 1). Um räumliche Kohärenz zu gewährleisten, wird eine kleine Aperturblende hinter der Quelle eingesetzt. Ein Strahlteiler dient zur Aufspaltung des Ausgangsbündels in zwei getrennte Interferometerstrecken S_1 und $S_2 = S_1 + \Delta S$. Während eine dieser beiden Strecken konstant gehalten wird, kann die andere in ihrer Länge variiert werden. Diese Längenvariation ΔS entspricht einer Variation der Korrelationszeit τ . Somit lässt sich nach anschließender Überlagerung beider optischer Teilwege ein Interferenzbild erzeugen, welches die (punktuelle) Autokorrelation des Ausgangswellenfelds beinhaltet. Der am Detektor gemessene Interferenzkontrast stellt nach Formel (2.4) den Betrag des zeitlichen Kohärenzgrads dar.

Eine weitere indirekte Methode zur Bestimmung der zeitlichen Kohärenzfunktion ist die Messung des Spektrums des Wellenfelds mit einer anschließenden Fouriertransformation

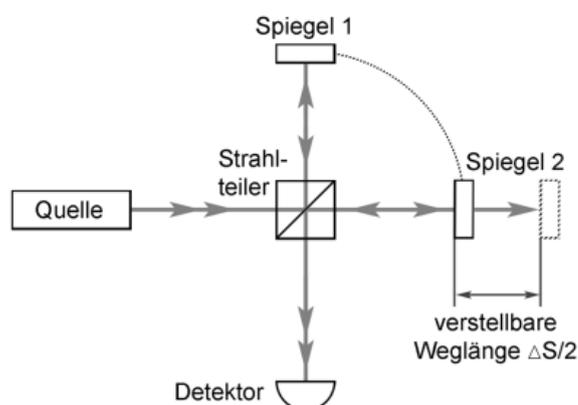


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Michelson-Interferometers: Das Licht einer Punktquelle wird in zwei Teilbündel aufgespalten, welche jeweils verschiedene Strecken durchlaufen und anschließend wieder überlagert werden. Anhand der Längendifferenz ΔS und des am Detektor gemessenen Interferenzkontrasts lässt sich die Kohärenzlänge der Quelle bestimmen.

nach Formel (2.7). Die Umkehrung dieses Prinzips findet in der Fourier-Spektroskopie Anwendung. Eine Approximation der Kohärenzlänge ist beispielsweise durch Formel (2.8) gegeben.

Bei einem einfachen, unstabilisierten Helium-Neon-Laser liegt die Kohärenzlänge im Bereich der Resonatorlänge, typischerweise bei etwa 25 cm [9]. Die Halbwertsbreiten von Spektrallinien einer Entladungslampe führen hingegen zu vergleichsweise kurzen Kohärenzlängen im Bereich von nur wenigen Mikrometern.

Variation der Kohärenzfunktion

Da die Kohärenzfunktion $\Gamma_{12}(\tau)$ eine örtliche Abhängigkeit besitzt, kann Kohärenz nicht als alleinige Eigenschaft der verwendeten Lichtquelle verstanden werden, sondern ist auch von der Ausbreitung des betrachteten Wellenfelds abhängig. Dabei kann gezielt in den Ausbreitungsprozess eingegriffen und somit die Kohärenz des Wellenfelds manipuliert werden. Eine dafür typische Vorgehensweise ist die Verwendung von optischen Filtern.

Um die zeitliche Kohärenz eines Wellenfelds zu ändern, werden Farb- oder Interferenzfilter genutzt, welche das Spektrum der verwendeten Quelle gezielt einschränken. Es verringert sich die effektive Bandbreite, wenn, ausgehend von einem breiteren Quellspektrum, kleine Bereiche des Spektrums herausgefiltert werden. Dadurch erhöht sich nach Formel (2.8) die Kohärenzlänge. Eine andere Möglichkeit, zeitliche Kohärenz gezielt zu beeinflussen, ist die Verwendung von zeitlich gepulsten Wellenfeldern. Hierfür werden typischerweise Ultrakurzpulslaser verwendet. Dabei ist die resultierende Kohärenzlänge identisch mit der Pulslänge des verwendeten Laserpulses.

Der räumliche Kohärenzgrad, und damit verbunden die Größe der Kohärenzfläche, lässt sich ebenfalls durch Filter beeinflussen. Ausschlaggebend ist dabei der Raumwinkel θ , unter dem die Quelle gesehen wird. Dieser kann einerseits durch eine (in einer abgebildeten,

sekundären Quellebene) zusätzlich eingebrachte Aperturblende beeinflusst werden. Dabei wird die Größe der Quellebene künstlich reduziert und dadurch die Kohärenzfläche vergrößert. Andererseits besteht die Möglichkeit, den Abstand zwischen Quell- und Beobachtungsebene zu verändern. Dabei können auch Linsen zum Einsatz kommen, welche die Quellebene beispielsweise ins Unendliche abbilden. An einem optischen Mikroskop sind diese beiden Filtertypen einerseits durch die Leuchtfeldblende und andererseits durch den Kondensator gegeben. Letzterer ist bei der „Köhlerschen Beleuchtung“ für eine Ausleuchtung der Objektebene mit sehr geringer räumlicher Kohärenz verantwortlich und fördert dadurch das Auflösungsvermögen des Mikroskops. Idealerweise liegt der Kohärenzdurchmesser dann unterhalb der Auflösungsgrenze des verwendeten Objektivs und somit meist auch unterhalb der verwendeten Wellenlänge.

Für den Fall, dass in einem räumlich quasi-kohärenten Wellenfeld der Kohärenzgrad verringert werden soll, können aktive Diffusoren (wie eine rotierende Streuscheibe oder ein flüssigkeitskristall-basierter räumlicher Phasenmodulator) genutzt werden. Dabei wird die zuvor korrelierte Phasenbeziehung im Wellenfeld (in einem Zeitraum unterhalb der Detektionszeit) statistisch variiert und somit dekorreliert.

Bei der Manipulation der Kohärenzfunktion durch Filterung, insbesondere wenn es sich um eine Erhöhung des Kohärenzgrads handelt, besteht eine unvermeidbare Folge darin, dass von der ursprünglichen Strahlungsleistung der Quelle lediglich ein Bruchteil für den weiteren Abbildungs- und den anschließenden Detektionprozess genutzt werden kann. Die Empfindlichkeit des Detektors sowie das Rauschverhalten von Quelle und Detektor begrenzen die Messbarkeit von Interferenzen. Die relevanten Größen, welche die Strahlungsleistung und die Kohärenzeigenschaften miteinander verknüpfen, sind bezüglich der Quelle die spezifische spektrale Ausstrahlung (auch spektrale Ausstrahlungsstromdichte, engl. *spectral emittance*, genannt) und bezüglich des Detektors die spektrale Bestrahlungsstärke (auch spektrale Strahlungsstromdichte, engl. *spectral irradiance*, genannt). Beide Größen werden in Watt pro Quadratmeter (bezogen auf die Fläche) und pro Nanometer (bezogen auf das Spektrum) angegeben.

2.2 Young-Interferometer

Grundlagen

Monochromatisches Licht aus einer nahezu punktförmigen Quelle ist interferenzfähig. Die Interferenzfähigkeit hängt von der realen Größe der Quelle ab und wird durch die räumliche Kohärenz beschrieben. Räumliche Kohärenz ist dabei durch die Kreuzkorrelation eines Wellenfelds zwischen zwei verschiedenen Ortspunkten und zu einem festen Zeitpunkt definiert. Dieses Modell wird experimentell mithilfe eines Doppelspalts überprüft. Das Doppelspalt-Interferometer wurde erstmals von T. Young zu Beginn des 19. Jahrhunderts realisiert [2, 10]. Anstelle der Spalte werden häufig auch kleine, kreisrunde Aperturbleden (engl. *pinholes*) verwendet [3, 11]. Den schematischen Aufbau zeigt Abbildung 2.

Die beiden Aperturen liegen in der Ebene, in welcher der räumliche Kohärenzgrad gemessen werden soll. Das Doppel-Pinhole wird dabei von einer Lichtquelle beleuchtet. Um die räumliche Kohärenz vermessen zu können, darf die zeitliche Kohärenz nicht einschränkend wirken. Es wird quasi-monochromatisches Licht verwendet. In Abhängigkeit von der Größe der Quelle, des Abstands von Quelle und Doppelspalt sowie des Abstands der Spaltaperturen voneinander kommt es hinter dem Doppelspalt zur Interferenz. Der Kontrast der entstehenden Interferenzstreifen ist (bei identischen Aperturgrößen) als räumlicher Kohärenzgrad definiert (siehe auch Formel (2.4)). Anhand eines einzigen Werts für den Kohärenz-

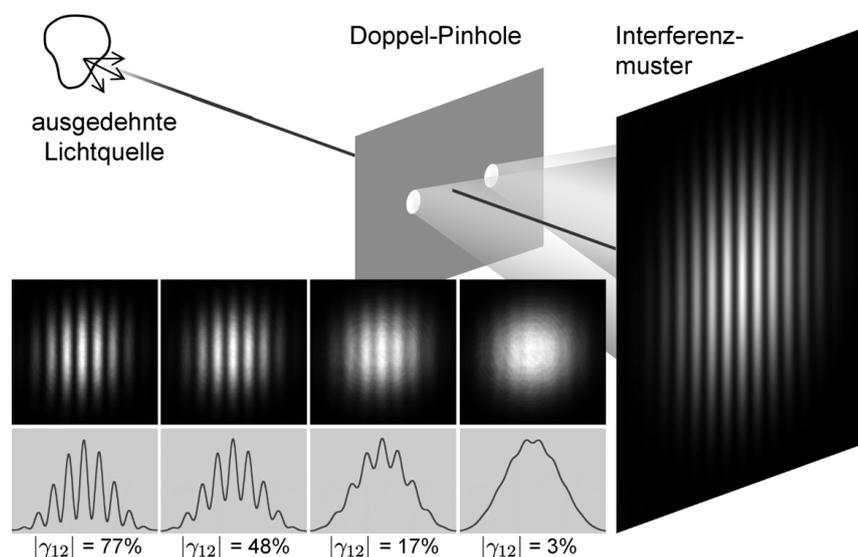


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Youngschen Doppelspalt-Interferometers: Eine ausgedehnte, monochromatische Lichtquelle beleuchtet eine Apertur in Form eines Doppel-Pinholes. Beide Pinholes erzeugen zwei aperturabhängige Beugungskegel, welche sich anschließend überlagern und interferieren. Der Kontrast der dabei entstehenden Interferenzstreifen korreliert mit dem räumlichen Kohärenzgrad $|\gamma_{12}|$ in der Spaltebene und erhöht sich mit einer Vergrößerung des Quellabstands oder einer Verkleinerung der Quellgröße sowie einer Verkleinerung des Spaltabstands. Hier sind experimentelle Aufnahmen für die Kontrastmodulation mit Werten zwischen $|\gamma_{12}| = 3\%$ und 77% gezeigt [12].

grad lässt sich der Verlauf der räumlichen Kohärenzfunktion allerdings noch nicht ableiten. Nur durch eine Variation des Abstands beider Pinholes kann dieser Verlauf bestimmt werden. Falls eine exakte Quellverteilung bekannt ist, kann die Kohärenzfunktion auch direkt nach (2.10) berechnet werden. Eine Approximation für die Größe der Kohärenzfläche für homogene, kreisrunde Quellen ist durch Gleichung (2.11) gegeben. Der Kohärenzgrad ergibt sich dann aus der Fouriertransformierten der Verteilungsfunktion der kreisförmigen Quelle und wird durch einen Airy-scheibchenförmigen Verlauf beschrieben [2]:

$$|\gamma_{12}| = \frac{2 J_1(\xi)}{\xi} \quad \text{mit} \quad \xi = \pi \frac{\rho d}{\lambda R}. \quad (2.13)$$

Dabei ist J_1 die Besselfunktion erster Gattung und erster Ordnung. ρ beschreibt den Durchmesser der Quelle, d ist der Abstand beider Pinholes und R ist der Abstand von der (sekundären) Quellebene bis zur Pinhole-Ebene. Der Durchmesser der Kohärenzfläche berechnet sich nach Formel (2.11).

Messbarkeit im Mikrometerbereich

Für die Vermessung partieller Kohärenz mit lateralen Kohärenzlängen im Mikrometerbereich sollten beim Young-Interferometer die Aperturabstände des Doppel-Pinholes ebenfalls im Mikrometerbereich liegen. Die Verkürzung des Spalt- oder des Pinhole-Abstands fordert eine gleichzeitige Verkleinerung der Spaltgröße auf wenige Mikrometer. Bei einem geeigneten Verhältnis von Lochabstand und -größe können die Lochgrößen bereits im Bereich der Wellenlänge von sichtbarem Licht liegen. Die detektierte Intensität nach einem Pinhole nimmt dabei quadratisch mit dem Pinhole-Durchmesser ab. Lichtschwache Quellen wie thermische Strahler oder LED verfügen über eine begrenzte spektrale Ausstrahlungsstromdichte. Filterprozesse, welche die Kohärenz der Beleuchtung erhöhen, reduzieren die nutzbare Intensität ebenfalls. Die Detektion des Interferenzmusters ist je nach Detektor durch dessen Empfindlichkeit und Rauschverhalten bei geringer Intensität limitiert. Zwar kann man mit Detektoren wie *Photomultipliern*, *Avalanche-Dioden* oder *electron multiplying charge-coupled devices* (EM-CCD) einzelne Photonen nachweisen, doch der Interferenzkontrast lässt sich naturgemäß nur aus einem Ensemble von Photonen bestimmen, so dass sich die Messzeit verlängert. Moderne digitale Bildsensoren wie Peltier-gekühlte CCDs, *back side illuminated* CCDs (BSI-CCD) oder *back side illuminated complementary metal oxide semiconductors* (BSI-CMOS) sind trotz Rauschpegeln unterhalb der Grenze des Photonenrauschens und Quanteneffizienzen bis nahezu 100 % in der Regel nicht in der Lage, mit Messzeiten im Millisekunden- bis Sekundenbereich derart geringe Intensitäten mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis zu detektieren.

Weitere Messmethoden

Neben dem klassischen Doppelspalt-Experiment gibt es weitere Möglichkeiten zur Messung räumlicher Kohärenz. Es werden zwei weitere Systeme unterschieden: Bild-invertierende Interferometer und Vielstrahl-Interferometer. Beide Systeme haben im Vergleich mit dem einfachen Doppel-Pinhole-Interferometer aufgrund ihres physikalischen Prinzips einen gesteigerten Lichtdurchsatz.

Bild-invertierende Verfahren implementieren den folgenden Ansatz: Die Kreuzkorrelation zweier Punkte wird erreicht, indem die Bildebene, in welcher die Kohärenz gemessen werden soll, um eine oder zwei Achsen gespiegelt wird und sich anschließend mit der ursprünglichen (ungespiegelten) Bildebene überlagert [13–16]. Im Bereich der optischen Achse interferieren dann, je nach Größe der Kohärenzfläche, gegenüberliegende Bildpunkte miteinander. Durch Anwendung eines bild-invertierenden Interferometers zur Vermessung der Kohärenzfläche eines *broad-area vertical-cavity surface-emitting lasers* (BA-VCSEL) wurde der Messbereich bis auf einen Mikrometer erweitert [17]. Ein solches Interferometer lässt sich aufgrund der benötigten Strahlteiler und bild-invertierenden Elemente wie Prismen jedoch schwer in Mikroskope oder kompakte, bildgebende Chipssysteme integrieren. Zudem erfordert die erhöhte Komplexität des Aufbaus eine aufwendige Justierung.

Vielstrahl-Interferometer nutzen anstatt zweier Spalte oder Pinholes eine größere Anzahl an Aperturen. Die Idee dabei ist, die beim Doppel-Pinhole-Interferometer nötige mehrfache Messung mit verschiedenen Pinhole-Abständen zu parallelisieren und gleichzeitig den Durchsatz des Interferometers zu erhöhen. Die Parallelisierung ermöglicht es, die Kohärenzfläche mit nur einer einzigen Messung bestimmen zu können [18]. Eine weiterführende Unterteilung dieses Interferometertyps kann nach der Anordnung der Aperturen vorgenommen werden. So gibt es redundante (periodische) Anordnungen [19,20], nicht-redundante Anordnungen [18,21] sowie statistische Anordnungen mit einer Auswertung von Speckle-Mustern [22,23]. Nicht-redundante Arrays haben gegenüber redundanten Arrays den Vorteil, auch nicht invariante Kohärenzfunktionen vermessen zu können. Die Auswertung der komplexen Interferogramme erfolgt in der Regel über eine Analyse des Fourierspektrums.

Mejía und González [18] verwendeten für ihr Experiment mit einer nicht-redundanten Anordnung Lochgrößen von $500\ \mu\text{m}$ und Abstände von mindestens $4\ \text{mm}$, was eine Messung der räumlichen Kohärenz im Bereich von etwa $1\ \text{mm}$ bis $10\ \text{mm}$ ermöglichte. Barreiro und Ojeda-Castañeda [19] experimentierten mit einem einfachen periodischen Gitter mit $127\ \mu\text{m}$ Periode. Castañeda und Jaroszewicz [20] rechneten in ihrer Simulation mit Spalten mit $6\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$ Größe und einer Periode von $48\ \mu\text{m}$. Mit den beiden letzteren Anordnungen lassen sich Kohärenzdurchmesser im Bereich um $100\ \mu\text{m}$ bestimmen.

Die in der interferenzoptischen Mikroskopie verwendeten Kohärenzdurchmesser liegen in der Regel unter $100\ \mu\text{m}$. Eine kompakte, planare Chip-Anordnung muss deswegen eine Messung der räumlichen Kohärenz im Bereich von $5\ \mu\text{m}$ bis $100\ \mu\text{m}$ ermöglichen.

2.3 Array-Interferometer

2.3.1 Vielstrahl-Interferenz und der Talbot-Effekt

Eine Erweiterung des Youngschen Doppel-Pinhole-Interferometers wurde durch den Einsatz von Vielstrahl-Interferenzen realisiert [18–21]. Vielstrahl-Interferenzen treten beispielsweise bei optischen Gittern (aufgrund transversaler Kohärenz) oder bei Mehrfachreflexionen in optischen Schichtsystemen (aufgrund longitudinaler Kohärenz) auf. Die konstruktive Überlagerung von vielen Strahlenbündeln kann durch Interferenz zu einem lokalen Intensitätsmaximum führen, welches die mittlere Gesamtintensität um Größenordnungen übersteigt. Eine analytische Darstellung von Interferenzerscheinungen, die auf der (partiell-)kohärenten Überlagerung von mehr als zwei Strahlen beruht, lässt sich anhand von Formel (2.3) und auf der Grundlage des Superpositionsprinzips auf den Fall mit N Strahlen erweitern [12, 24]:

$$\begin{aligned} u_{\text{sum}} &= \sum_{p=1}^N u_p \\ I_{\text{sum}} &= \sum_{p=1}^N I_p + 2 \sum_{p=2}^N \sum_{q=1}^{p-1} \sqrt{I_p I_q} |\gamma_{pq}(\tau)| \cos \Phi_{pq}(\tau) . \end{aligned} \quad (2.14)$$

Dabei werden in der Doppelsumme alle $N(N-1)/2$ Kombinationen von Strahlenpaaren mit dem jeweils zugeordneten, wechselseitigen Kohärenzgrad $\gamma_{pq}(\tau)$ beachtet. Im Vergleich zum Doppel-Pinhole-Interferometer und der dabei auftretenden Zwei-Strahl-Interferenz kann die Maximalintensität bei Vielstrahl-Interferenz um den Faktor $N^2/4$ erhöht sein, falls sich alle Teilstrahlen vollständig kohärent überlagern und alle wechselseitigen Phasendifferenzen $(\Phi_{pq}(\tau) \bmod 2\pi) \equiv 0$ sind.

Der Talbot-Effekt

Die Grundlage für identische Phasendifferenzen kann nur durch eine spezielle Form der Vielstrahl-Interferenz, jene mit periodischer Feldverteilung, realisiert werden. Diese kann beispielsweise durch periodische Gitteranordnungen erzeugt werden. Die Interferenzfigur einer derart periodischen Quell- beziehungsweise Intensitätsverteilung wird durch den *Talbot-Effekt* [25–28] beschrieben. Charakteristisch für diese Vielstrahl-Interferenzen sind die immer wiederkehrenden Interferenzmuster in periodisch auftretenden Ebenen entlang der optischen Achse. In diesen Ebenen, den *Talbot-Ebenen*, ähnelt die Interferenzfigur der periodischen Quellverteilung. Man spricht deshalb auch vom Selbstabbildungseffekt [27–30]. Die Lage z_T dieser Ebenen (Abstand zur periodischen Apertur) ist definiert mit:

$$z_T = 2T \frac{\Lambda^2}{\lambda} . \quad (2.15)$$

Dabei ist T eine beliebige natürliche Zahl und Λ die Periode der Feldverteilung. In erweiterter Form kann T auch eine positive rationale Zahl sein, wodurch die dortigen Ebenen durch den fraktionalen Talbot-Effekt [26,28] gekennzeichnet sind.

Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Entwicklung eines solchen Talbot-Interferenzmusters im zweidimensionalen Fall. Ein periodisches Amplitudengitter wird mit einer ebenen, monochromatischen Welle beleuchtet. Die einzelnen Gitteraperturen beugen das Licht zu kegelartigen Beugungsfiguren, welche sich anschließend kohärent überlagern. Deutlich erkennbar sind die dabei entstehenden, immer wiederkehrenden Interferenzebenen.

Neben der Lage der Talbot-Ebene kann der lokale Interferenzkontrast [12], aber auch die Größe der Interferenz-Spots [24] bestimmt werden. Mit Verkleinerung der Kohärenzfläche nimmt der Kohärenzkontrast ab, während die Spot-Größe zunimmt. Bei der Zwei-Strahl-Interferenz entspricht der Interferenzkontrast dem räumlichen Kohärenzgrad. Dieser Zusammenhang ist bei Vielstrahl-Interferenz nicht mehr gegeben. Durch die Aufsummierung von verschiedenen räumlichen Kohärenzgraden $|\gamma_{pq}(\tau)|$ bei Vielstrahl-Interferenzen (vgl. Formel (2.14)) lässt sich anhand des Interferenzmusters keine direkte Messung eines einzelnen Kohärenzgrads realisieren. Deshalb ist auch eine Auswertung des Interferenzkontrasts nur mit zusätzlichem Aufwand beispielsweise durch Fouriertransformation [19] oder Faltung [20] möglich. Eine einfache Messung des Kohärenzdurchmessers kann erfolgen, indem die Größe der Interferenz-Spots ausgewertet wird [24].

Die Größe der Interferenz-Spots hängt von verschiedenen Parametern ab, welche sich alle anhand einer numerischen Apertur abschätzen lassen. Letztendlich bestimmt die kleinste aller numerischen Aperturen im System die Größe der Interferenz-Spots. Es gilt nach Abbes

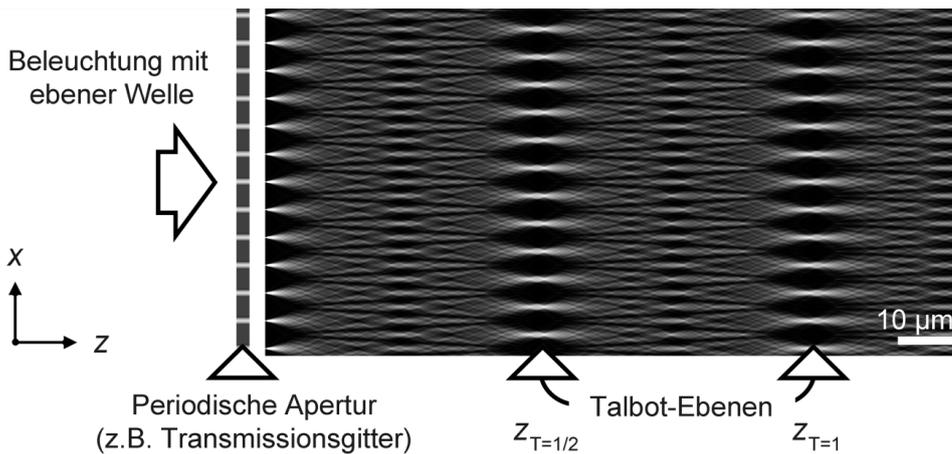


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Entstehung des Talbot-Effekts mit den charakteristischen Talbot-Ebenen: Eine mit einer ebenen Welle beleuchtete, periodische Apertur erzeugt ein periodisches Beugungs- und Interferenzmuster. Nach festen Längen z_T entstehen Talbot-Ebenen: planare Flächen mit sehr kontrastreichen Interferenzen. Die Abbildung zeigt eine Simulation im zweidimensionalen Raum. Folgende Parameter wurden verwendet: Kohärenzgrad $|\gamma_{pq}(\tau)| = 1$, Gitterperiode $\Lambda = 5 \mu\text{m}$, Aperturöffnungen von jeweils $1,5 \mu\text{m}$ und Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$.

Auflösungskriterium [31–33] für kohärente, schräge Beleuchtung:

$$d_{\text{Spot}} = \frac{\lambda}{2 \text{NA}_{\text{min}}} . \quad (2.16)$$

Hier kann die kleinste numerische Apertur auch mit $\text{NA}_{\text{min}} = \sin \varphi$ über den Halbwinkel φ beschrieben werden. Die Aperturgröße der beugenden Pinholes definiert eine Beleuchtungsapertur $\text{NA}_{\text{pinhole}} \approx 1,22 \frac{\lambda}{a}$, wobei a den Durchmesser der Pinholes beschreibt. Diese numerische Apertur wird $\text{NA}_{\text{pinhole}} \equiv 1$, falls die Aperturgröße $a \leq 1,22 \lambda$ ist. Dann erzeugen die Pinholes nahezu sphärische Wellen mit einem Beleuchtungswinkel von 180° .

Die Größe der Kohärenzfläche hat ebenfalls Einfluss auf die Spot-Größe, denn nur die Beugungskegel der Pinholes innerhalb der Kohärenzfläche interferieren. Somit ergeben der Radius der Kohärenzfläche und der Abstand der Talbot-Ebene einen Halbwinkel, welcher auch als Aperturwinkel (kohärenter Beleuchtung) für die Erzeugung der Interferenz-Spots betrachtet werden kann. Falls die Kohärenzfläche der begrenzende Parameter der Spot-Größe ist, lässt sich aus (2.11) sowie (2.16) für den Kohärenzdurchmesser D_{coh} ableiten [24]:

$$D_{\text{coh}} \approx 2 m \lambda \frac{z_T}{d_{\text{Spot}}} . \quad (2.17)$$

Die Approximation gilt dabei streng genommen nur für kleine Winkel φ oder $D_{\text{coh}} \ll z_T$ beziehungsweise $R \gg \rho$ in (2.11). Zuletzt kann auch die Beobachtungsapertur NA_{lens} eines zur vergrößerten Abbildung verwendeten Objektivs zu einer Verbreiterung der Spot-Größe führen.

2.3.2 Experimentelle Realisierung und Ergebnisse

Verwendetes Mikroskop

Es wird ein aufrechtes Mikroskop (Zeiss Axioskop 2 MAT mot, siehe Abbildung 4) als Plattform für die Untersuchungen verwendet. Die Stabilität und Flexibilität der Plattform gewährleistet eine sehr gute Reproduzierbarkeit aller Parameter. Das verwendete Mikroskop bietet durch seinen modularen Aufbau die Möglichkeit, ohne zusätzlichen Justage-Aufwand verschiedene Lichtquellen, Filter und Objektive sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht zu nutzen. Des Weiteren verfügt es über einen motorisierten Tisch, welcher eine automatisierte, mikrometeregenaue Positionierung der Probenebene zulässt. Das Mikroskop selbst ist auf einem Tisch mit aktiver Dämpfung (Newport Workstation LW3030B-OPT) platziert, um mechanische Störeinflüsse wie Vibrationen zu minimieren.

In Abbildung 4 ist ein schematischer Aufbau des verwendeten Mikroskops dargestellt. Als Lichtquelle ist eine Halogenlampe gezeigt. Es werden aber auch andere Lampentypen wie eine Quecksilberdampflampe oder eine LED-Lichtquelle untersucht. Laser-Lichtquellen werden mithilfe einer Monomode-Faser und einer zusätzlichen Halterung unterhalb der Objektebene eingekoppelt. Der Diffusor sorgt für eine homogene Lichtverteilung innerhalb

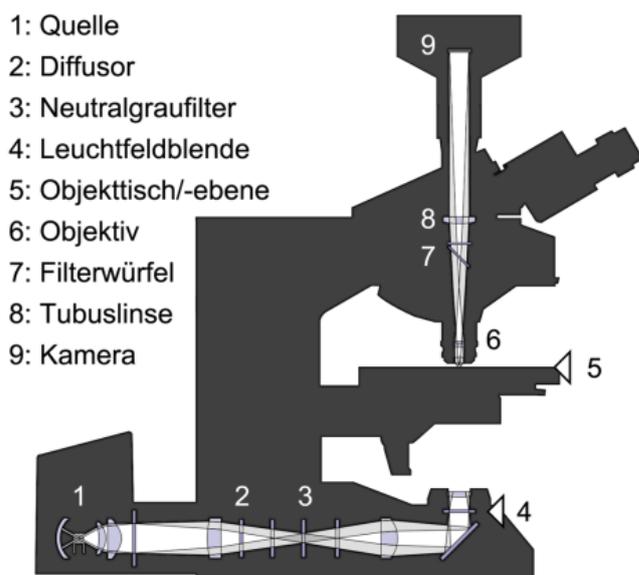


Abb. 4: Schematischer Aufbau des verwendeten Mikroskops (Zeiss Axioskop 2) nach [34]. Es sind der Durchlichtstrahlengang sowie die Position der wichtigsten Komponenten dargestellt.

der Leuchtfeldblendenebene. Die Neutralgraufilter werden bei Bedarf zur Anpassung der Lichtmenge verwendet. Die Ebene der Leuchtfeldblende wird dabei als sekundäre Quelleebene angenommen, denn in dieser Ebene ist eine näherungsweise homogene, ausgedehnte und inkohärente Lichtverteilung gegeben. Durch Modifikation des Durchmessers der Leuchtfeldblende wird der effektive Durchmesser dieser sekundären Lichtquelle verändert. Dadurch lassen sich sowohl die Gesamtlichtmenge als auch der Grad der räumlichen Kohärenz innerhalb der Objektebene beeinflussen. Der Durchmesser der Leuchtfeldblende lässt sich zwischen 0,8 mm und 20,0 mm variieren. Der Abstand von dieser sekundären Quellebene bis zur Objektebene misst 125 mm. Nach Formel (2.11) lässt sich damit theoretisch ein Kohärenzdurchmesser von $3 \mu\text{m}$ bis $78 \mu\text{m}$ für das Kohärenzkriterium $m = 0,5$ und für eine mittlere Wellenlänge von 500 nm einstellen.

Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau des Array-Interferometers im Vergleich zum Youngschen Doppelspalt-Interferometer. Der Objektisch lässt sich mit einer Genauigkeit unter $1 \mu\text{m}$ in seiner Höhe verstellen und wird zur Positionierung und Halterung von Objektproben genutzt. Das Objektiv bildet die Objektebene zunächst ins Unendliche ab. Die Tubuslinse fokussiert anschließend den Objektstrahlengang zu einem vergrößerten Bild in die Kameraebene. Die optionalen Filterwürfel werden für den Auflichtstrahlengang oder Fluoreszenzanwendungen verwendet. Zur Detektion der Bilder kommen Kameras vom Typ Zeiss AxioCam MRm sowie Zeiss AxioCam HRm zum Einsatz.

Charakterisierung der Kameradetektoren

Beide Kamerasensoren (Zeiss AxioCam MRm und AxioCam HRm) nutzen jeweils einen monochromen CCD-Chip (Sony ICX 285) mit 1388×1040 Pixeln und $6,45 \times 6,45 \mu\text{m}^2$ Pixelgröße. Beide werden zusätzlich durch ein einfaches Peltier-Element gekühlt. Die Sensoren verfügen über eine lineare Kennlinie, einen Dynamikumfang von 12 bit sowie eine optionale

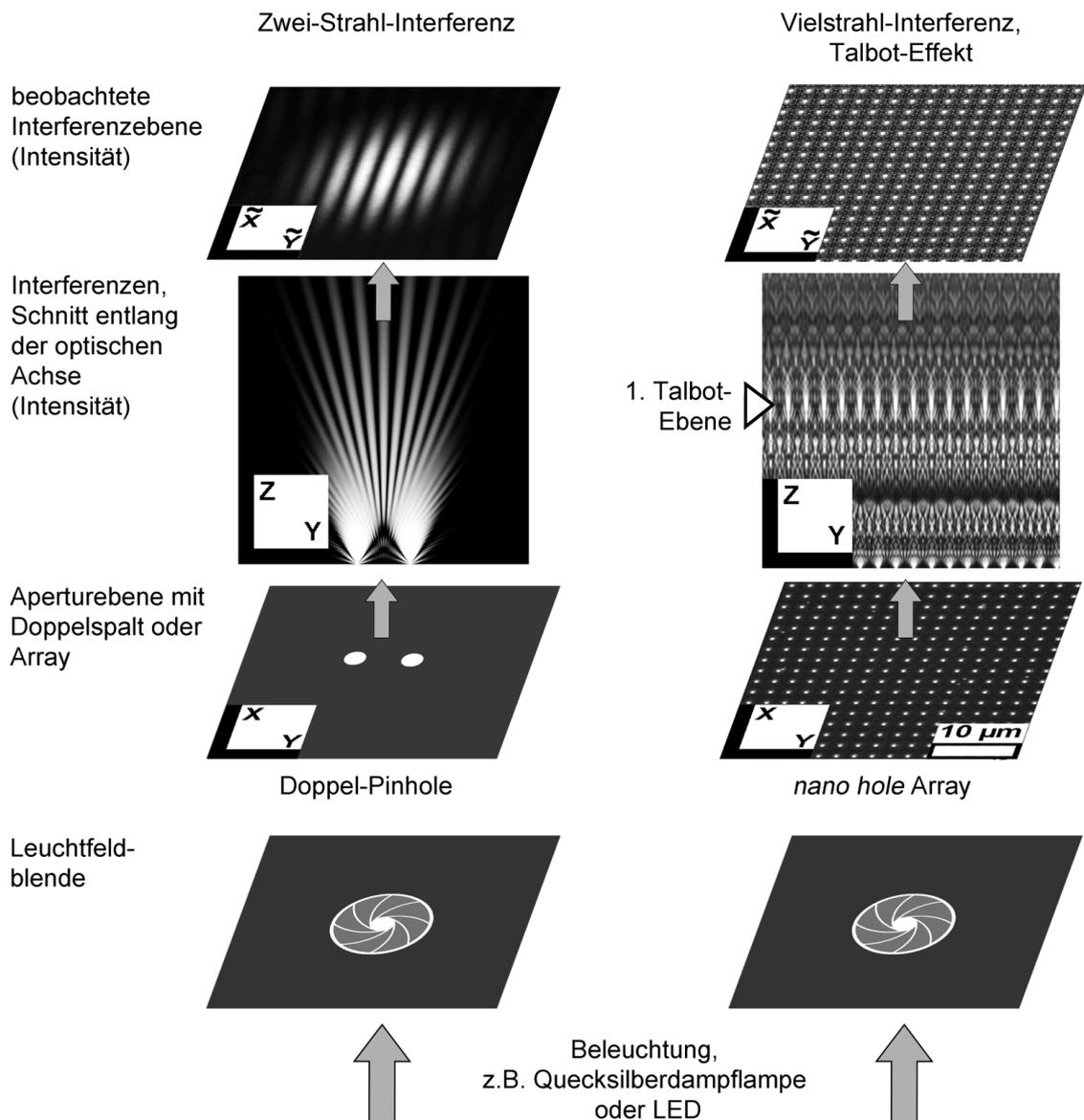


Abb. 5: Prinzip der Messung räumlicher Kohärenz: Das bekannte Doppel-Pinhole-Interferometer (links, Simulation) im Vergleich mit einem Vielstrahl-Interferometer, welches auf einem periodischen *nano hole* Array basiert (rechts, experimentelle Daten). Das Doppel-Pinhole erzeugt Interferenzstreifen, deren Kontrast den räumlichen Kohärenzgrad definieren. Die Vielstrahl-Interferenz der Beugungskegel eines periodischen Arrays lässt sich durch den Talbot-Effekt beschreiben. Die Größe der Interferenz-Spots kann für die Messung des Kohärenzdurchmessers ausgewertet werden. Zur Messung wurde ein Objektiv $100\times/0,75$ verwendet.

Dunkelstromkorrektur. Die Belichtungszeiten der Kameras liegen zwischen 1 ms und 20 s (AxioCam MRm) beziehungsweise zwischen 1 ms und 600 s (AxioCam HRm). Die Kamera AxioCam HRm verfügt zudem über ein schnelles Auslesen von Bilddaten (*streaming*), was die Aufnahme von Videosequenzen ermöglicht.

Um das Rauschverhalten der Kamerasensoren zu untersuchen, wird für verschiedene Belichtungszeiten ein Dunkelbild (engl. *dark frame*), ein Bild ohne jegliche Beleuchtung, aufgenommen. Eine Beispielaufnahme ist in Abbildung 6 dargestellt. Diese zeigt einen 32×32 Pixel großen Ausschnitt eines 1024×1024 Pixel großen Dunkelbilds, welches mit $t_{\text{exp}} = 1$ s Belichtungszeit aufgenommen wurde. Ein Histogramm für das gesamte Dunkelbild wird berechnet. Daraus ergeben sich ein Mittelwert von $\bar{v} = 8,3$ digital counts (dc) sowie eine Standardabweichung von $\sigma_v = 2,4$ dc pro Pixel. Messungen für weitere Belichtungszeiten zwischen 1 ms und 10 s haben ergeben, dass unter Verwendung der Dunkelstromkorrektur der Mittelwert nur sehr gering ansteigt ($< 0,05 \frac{\text{dc}}{\text{s}}$) und die Standardabweichung pro Pixel ebenfalls nur geringfügig zunimmt ($< 0,1 \frac{\text{dc}}{\text{s}}$). Da diese Abweichungen aber größer werden, wenn die Dunkelstromkorrektur nicht aktiv ist, wird die Dunkelstromkorrektur immer verwendet.

Während der Mittelwert \bar{v} einem Offset entspricht, welcher durch Subtraktion korrigiert werden kann, stellt die Standardabweichung σ_v die zu betrachtende Rauschgröße dar. Für das Detektorrauschen wird folgender Zusammenhang bezüglich des resultierenden Signal-Rausch-Verhältnisses formuliert:

$$\text{SNR}_{\text{Detektor}} = \frac{v}{2 \sigma_v} . \quad (2.18)$$

Dabei stellt v einen gemessenen Pixelwert (engl. *pixel value*) dar. Die Standardabweichung σ_v wird experimentell bestimmt (vgl. dazu Abbildung 6). Das Detektorrauschen lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Der ermittelte Rauschwert enthält eine Summe von Rauschanteilen, welche von thermischem Rauschen, Ausleserauschen, aber auch von Pixel-Übersprechen und Pixel-Ungleichmäßigkeiten verursacht werden.

Um Vergleiche zwischen der von den Lichtquellen zur Verfügung gestellten Lichtmenge und der Sensitivität sowie dem Rauschen des Detektors machen zu können, bietet es sich an,

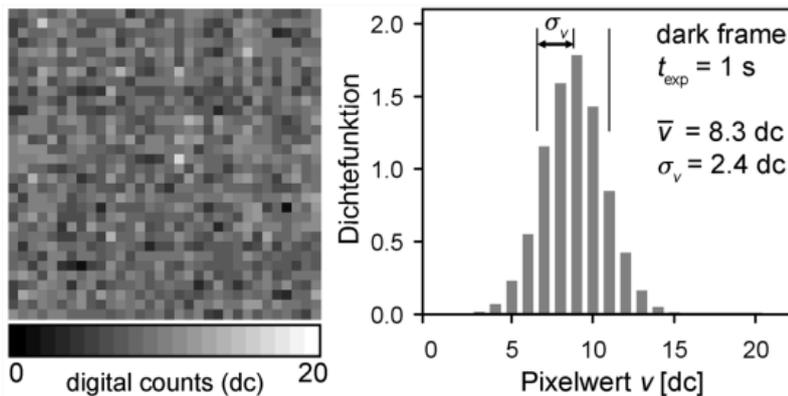


Abb. 6: Untersuchung des Detektorrauschens der verwendeten Kamera AxioCam MRm: Dargestellt sind ein 32×32 Pixel großer Ausschnitt (links) eines 1024×1024 Pixel großen Dunkelbilds, aufgenommen mit $t_{\text{exp}} = 1$ s Belichtungszeit und aktiver Dunkelstromkorrektur, und das dazugehörige Histogramm (rechts).

alle hierfür relevanten Größen in Absolutwerten anzugeben. Im Folgenden werden deshalb die gemessenen Lichtmengen und Strahlungsenergien in Joule (J) oder als Anzahl von Photonen mit der entsprechenden Wellenlänge angegeben. Der verwendete Sensor-Chip besitzt eine Quanteneffizienz von 65 % bei 546 nm (56 % bei 465 nm) und somit eine Sensitivität von 6,4 Photonen pro dc bei 546 nm (7,4 Photonen pro dc bei 465 nm) [35]. Daraus ergeben sich folgende Äquivalenzwerte für die oben genannten Messgrößen: Offset $\bar{v} = 53$ Photonen und Standardabweichung $\sigma_v = 15$ Photonen. Dies entspricht außerdem den absoluten Energien von $\bar{v} = 1,97 \cdot 10^{-17}$ J und einer Standardabweichung von $\sigma_v = 0,44 \cdot 10^{-17}$ J.

Präparation des Array-Chips

Ein am Institut für Photonische Technologien (IPHT) angefertigtes, periodisches Array wird zur Messung räumlich partieller Kohärenz genutzt. Eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme (REM-Aufnahme) eines Beispiel-Arrays ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Dimensionierung des Arrays wird wie folgt an die Messaufgabe angepasst: Bei einer Anwendung partiell-kohärenter Beleuchtung in der interferenzoptischen Mikroskopie liegen die Kohärenzdurchmesser typischerweise im Bereich von etwa $5 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$, womit der Messbereich vorgegeben wird. Daraus folgt, dass der kleinste Abstand im Array höchstens $5 \mu\text{m}$ sein darf, während die Aperturen mit dem größten Abstand mindestens $100 \mu\text{m}$ auseinander liegen müssen. Als Periode wird deshalb sowohl in X - als auch in Y -Richtung $\Lambda = 4 \mu\text{m}$ gewählt. Die maximale Ausdehnung des Arrays wird auf $496 \mu\text{m} \times 496 \mu\text{m}$ festgelegt, um eine statistische Auswertung über mehrere gleichförmige Interferenz-Spots zu ermöglichen. Daraus ergibt sich ein Array mit 125×125 Lochaperturen. Damit die Beugungskegel weit auseinander liegender Lochaperturen auch bei nah gelegenen Talbot-Ebenen ($z_T < 100 \mu\text{m}$) miteinander interferieren können, ist es notwendig, dass die Lochblenden einen möglichst großen Beugungskegel erzeugen. Falls die Lochgröße so klein wie die verwendete Wellen-

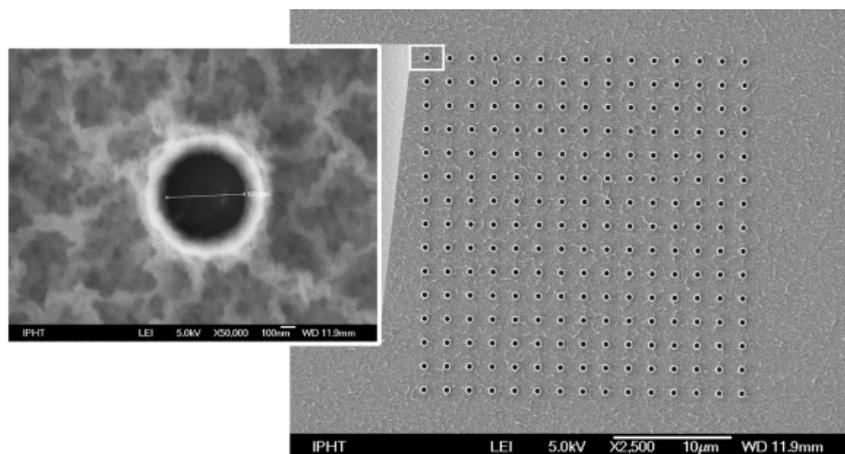


Abb. 7: REM-Aufnahmen der verwendeten *nano hole* Array Maske. Rechts: Beispiel eines 15×15 Test-Arrays mit $2 \mu\text{m}$ Periode. Links: Bestimmung des Durchmessers der verwendeten Aperturen auf 530 nm.

länge wird, erreicht die numerische Apertur des Beugungsbilds der Lochblende einen Wert von Eins, was einem Beleuchtungswinkel von 180° entspricht. Aus diesem Grund wird der Durchmesser der Lochaperturen (*nano holes*) auf 530 nm festgelegt. Der entsprechende Array-Chip wird mittels Elektronenstrahl-Lithografie in einer 150 nm dicken Aluminiumschicht präpariert, welche auf einem Quarzglas-Substrat aufgebracht ist. Die Dicke der Aluminiumschicht ergibt sich durch einem Kompromiss aus einer hohen optischen Dichte für ein hohes Kontrastverhältnis und einem geringen Aspektverhältnis der Strukturen für eine stabilere Herstellung.

Das chip-basierte Array-Interferometer wird in der Probenebene des Mikroskops positioniert und mit einer Quecksilberdampfampe (Zeiss HBO 100) in Durchlichtanordnung beleuchtet. Das Spektrum der Lampe wird mithilfe eines Interferenzfilters (Zeiss BP546/12) im Bereich der grünen Fraunhofer-Linie (*e-line*) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546$ nm gefiltert. Die Linienbreite misst $\Delta\lambda = 5$ nm. Die Kohärenzlänge wird mit einem Michelson-Interferometer auf $L_{\text{coh}} = 38 \mu\text{m}$ bei einem Interferenzkontrast von $\gamma(\tau) \approx 0,15$ bestimmt. Dieser Wert ist ausreichend für die meisten im Array auftretenden Gangunterschiede verschiedener Lochpaare. Die niedrigsten Talbot-Ebenen liegen nach (2.15) bei $z_{(T=\frac{1}{2})} = 29,3 \mu\text{m}$, $z_{(T=1)} = 58,6 \mu\text{m}$ und $z_{(T=\frac{3}{2})} = 87,9 \mu\text{m}$. Zur vergrößerten Abbildung wird ein Objektiv $100\times$ mit einer numerischen Apertur von 0,75 verwendet.

Methoden und Ergebnisse

Die räumliche Kohärenz wird mithilfe der Leuchtfeldblende im Mikrometerbereich variiert und das Interferenzmuster in einer der ersten drei Talbot-Ebenen ($T = \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}$) aufgenommen. Bei geschlossener Leuchtfeldblende lassen sich schmale und kontrastreiche Interferenz-Spots beobachten. Zunächst wird das Intensitätsmaximum dieser Interferenz-Spots gemessen und mit einem herkömmlichen Zwei-Strahl-Interferometer verglichen. Dazu wird ein äquivalentes Doppel-Pinhole wie im Array mit jeweils 530 nm Aperturdurchmesser sowie $4 \mu\text{m}$ Pinhole-Abstand genutzt. Zum direkten Vergleich wird das Beugungs- und Interferenzmuster des Doppel-Pinholes im Abstand von $z = 58,6 \mu\text{m}$ aufgenommen, was dem Abstand der ersten Talbot-Ebene ($T = 1$) entspricht. Das Array erzeugt eine Intensitätserhöhung gegenüber dem Doppel-Pinhole um einen Faktor 1300 ± 300 . Der relativ große Fehlerbereich (± 300) ist dem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis (-11 dB) bei der Messung mit dem Doppel-Pinhole geschuldet. Eine Simulation auf der Basis von Formel (2.14) ergibt einen theoretischen Faktor von 1380. Durch die Erhöhung der Spitzenintensität kann das Signal-Rausch-Verhältnis um bis zu 31 dB verbessert werden.

Durch Vergrößerung des Durchmessers ρ der Leuchtfeldblende wird Folgendes beobachtet: Zum einen verliert das Interferenzmuster zunehmend an Kontrast, zum anderen nimmt der Durchmesser der Interferenz-Spots zu. Zur Auswertung der Spot-Größen dient ein diagonaler Schnitt durch das aufgenommene Interferenzmuster. Der Durchmesser der Spots wird anhand der Halbwertsbreite zwischen dem Intensitätsminimum und -maximum bestimmt.

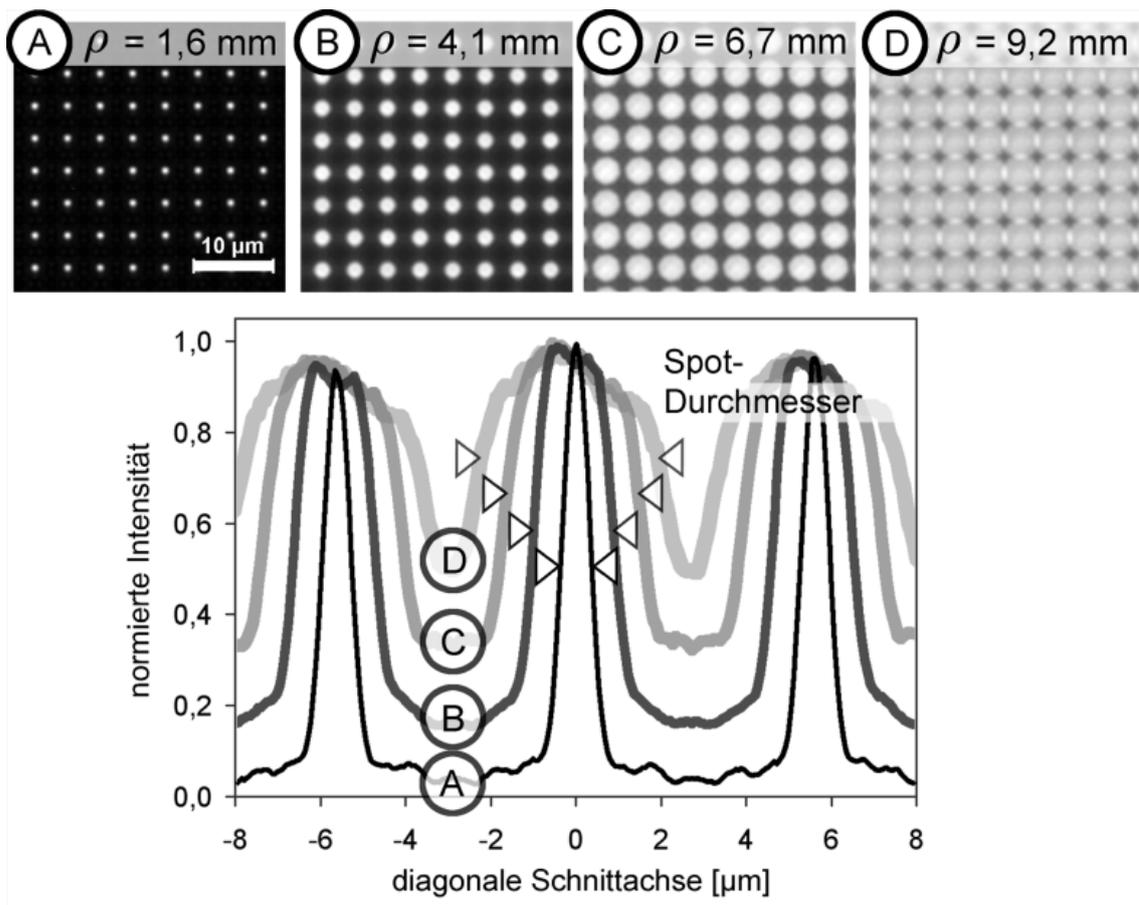


Abb. 8: Interferenzmuster eines 125×125 Arrays mit $4 \mu\text{m}$ Periode, aufgenommen in der ersten Talbot-Ebene bei $z_{T=1} = 58,6 \mu\text{m}$: Die Spot-Durchmesser vergrößern sich mit zunehmendem Blendendurchmesser ρ der Beleuchtung, während der Interferenzkontrast abnimmt. Die Spot-Größe wird anhand der Halbwertsbreite zwischen einem Intensitätsminimum und -maximum entlang eines diagonalen Schnitts bestimmt.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft Ausschnitte der aufgenommenen Interferenzmuster für verschiedene Blendendurchmesser sowie die dazugehörigen Intensitätsprofile zur Bestimmung der Spot-Größen. Die Abhängigkeit dieser Spot-Durchmesser von der Blendengröße sowie der Lage der Talbot-Ebene ist in Abbildung 9 dargestellt. Für einen Blendendurchmesser von $0,8 \text{ mm}$ bis 16 mm werden Spot-Durchmesser im Bereich von $0,5 \mu\text{m}$ bis $4,8 \mu\text{m}$ gemessen. Dabei ist festzustellen, dass zwischen beiden Parametern eine lineare Abhängigkeit vorliegt. An den oberen und unteren Messgrenzen treten zum Teil deutliche Messabweichungen auf. Die untere Messgrenze der Spot-Größe ist hier durch die begrenzte numerische Apertur des Objektivs ($NA_{\text{lens}} = 0,75$) gegeben. Die obere Messgrenze ist vorrangig durch den abnehmenden Interferenzkontrast bei geöffneter Blende gegeben, welcher die Messgenauigkeit der Halbwertsbreite begrenzt. Zudem führt im Experiment eine Inhomogenität der Ausleuchtung innerhalb der Blendenebene für Blendendurchmesser größer 12 mm zu leichten Abweichungen des theoretisch linearen Zusammenhangs.

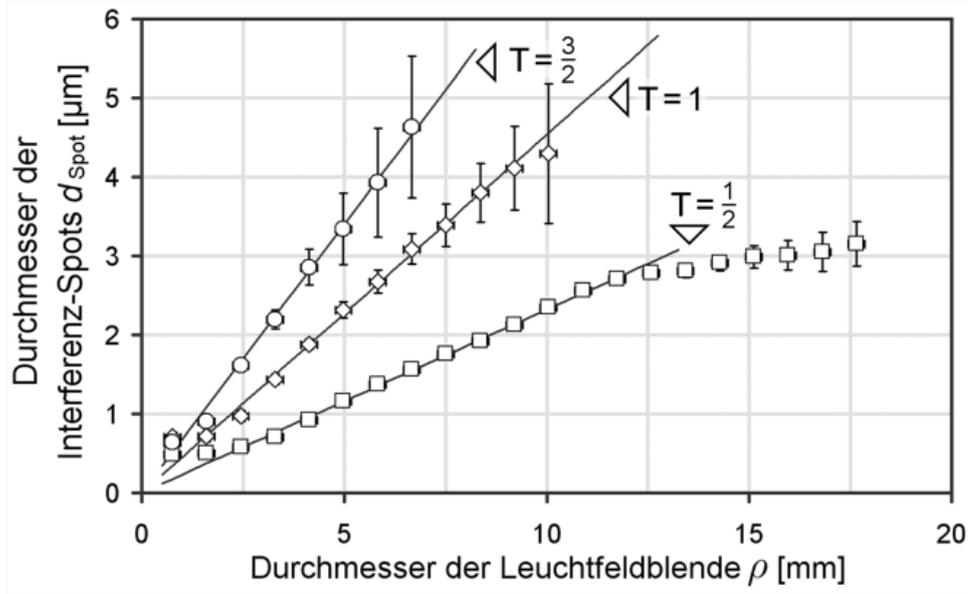


Abb. 9: Durchmesser der durch ein periodisches *nano hole* Array erzeugten Interferenz-Spots in Abhängigkeit vom Durchmesser der Leuchtblende: Die Interferenzmuster in den ersten drei Talbot-Ebenen ($T = \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}$) sind ausgewertet. Zwischen beiden Parametern besteht ein linearer Zusammenhang. Der Spot-Durchmesser wird genutzt, um die Größe der Kohärenzfläche zu bestimmen, welche mithilfe der Leuchtblende zuvor eingestellt wird.

Anhand der so bestimmten Spot-Durchmesser wird anschließend mit der Formel (2.17) die Größe der Kohärenzfläche berechnet. Die berechneten Werte liegen trotz unterschiedlicher Messebenen deckungsgleich übereinander. Es werden Kohärenzdurchmesser im Bereich von $5 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ für einen angenommenen Interferenzkontrast von $|\gamma_{12}| \approx 0,15$ für $m = 0,5$ bestimmt. Die Linie in Abbildung 10 repräsentiert die theoretisch zu erwartenden Werte, welche anhand von Formel (2.11) mit $R = 125 \text{ mm}$ berechnet werden. Die Theorie und die Messungen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Lediglich in den oberen und unteren Messbereichen treten Abweichung auf, welche in den genannten experimentellen Messgrenzen begründet sind.

Messgrenzen dieses Verfahrens sind zum einen durch die Dimensionierung des Arrays, zum anderen durch die Beobachtungsoptik gegeben. Das verwendete Array besitzt eine diagonale Periode von $\Lambda_{\text{diag}} = 5,66 \mu\text{m}$, welche die obere Grenze für die Bestimmung der Spot-Durchmesser bildet. Abgesehen von der Objektivapertur sind die Pinholes mit einer Beleuchtungsapertur von $\text{NA}_{\text{pinhole}} = 1$ für eine minimale Spot-Größe von $d_{\text{Spot}} = \frac{\lambda}{2} = 0,273 \mu\text{m}$ (untere Grenze) verantwortlich. Aus diesen beiden Grenzen ergibt sich für das verwendete Array ein theoretischer Messbereich von $3 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$, je nach Wahl der Talbot-Ebene und dem damit verknüpften Messabstand zum Array. Die Wahl des Kohärenzkriteriums obliegt dabei dem Anwender und letztendlich der interferenzoptischen Anwendung. Für ein strengeres Kriterium von beispielsweise $|\gamma_{12}| \approx 0,88$ für $m = 0,16$ liegt der Messbereich bei $0,9 \mu\text{m}$ bis $30 \mu\text{m}$.

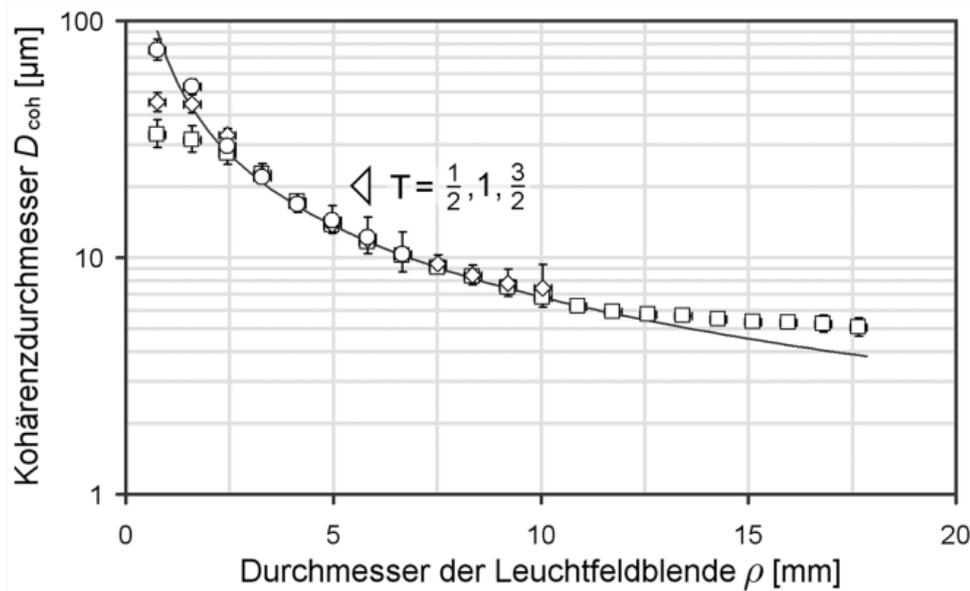


Abb. 10: Vermessung der räumlich partiellen Kohärenz: Anhand der Durchmesser der Interferenz-Spots kann der Kohärenzdurchmesser berechnet werden. Mit dem verwendeten 125×125 Array wird ein Messbereich von $5 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ für einen angenommenen Interferenzkontrast von $|\gamma_{12}| \approx 0,15$ abgedeckt. Die Linie im Diagramm zeigt die auf Formel (2.11) basierenden, theoretisch zu erwartenden Werte, welche mithilfe des Durchmessers der Leuchtfeldblende angepasst werden.

Eine Verkleinerung der Periode im Array hätte zur Folge, dass aufgrund geringerer Talbot-Ebenenabstände der Messbereich für noch kleinere Kohärenzdurchmesser erweitert werden könnte. Allerdings liegen diese Ebenenabstände dann auch in einem Bereich, der durch klassische Fernfeld-Optik nicht mehr ausreichend approximiert werden kann und Fresnel-Approximationen oder Nahfeldanalysen verlangt. Klassische Fernfeld-Optik definiert ein theoretisches Minimum des Kohärenzdurchmessers von $D_{\text{coh},\text{min}} \approx \frac{\lambda}{2}$ [2]. Diese Grenze ist auch durch die Abbesche Auflösungstheorie begründet. Falls die Kohärenzfläche unterhalb der Auflösungsgrenze liegt, spricht man von inkohärenter Beleuchtung. Eine Nahfeldanalyse ermöglicht die Untersuchung von Kohärenzdurchmessern unterhalb dieser Grenze [36].

3 Partii-kohärente Lichtquellen: LED, Halogen- und Quecksilberdampflampe

3.1 Partii-kohärente Lichtquellen

Grundlagen

Um die Kohärenzeigenschaften von Lichtquellen wie Lumineszenzdioden, Halogen- und Quecksilberdampflampen besser verstehen zu können, muss der Emissionsprozess der jeweiligen Quelle betrachtet werden. Grundsätzlich lässt sich dieser Emissionsprozess nach dem quantenmechanischen Modell in spontane Emission und induzierte Emission unterteilen. Spontane Emission wird als inkohärenter Prozess betrachtet, da die Lichtquanten (Photonen) statistisch in alle Raumrichtungen emittiert werden und in Frequenz, Phase und Polarisation schwanken [37]. Induziert emittierte Photonen hingegen weisen eine feste Phasenkorrelation auf und sind somit kohärent zueinander. Das Modell dieser beiden Emissionsprozesse lässt sich mithilfe des Systems zweier Energieniveaus illustrieren. Für die Besetzung dieser Niveaus gilt im thermischen Gleichgewicht die Boltzmann-Verteilung [37]. Die mittlere Photonenzahl \bar{n} pro Mode ist dabei eine Funktion der Temperatur T und der Frequenz ν :

$$\bar{n} = \frac{1}{\exp(h\nu/kT) - 1} . \quad (3.1)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und k die Boltzmann-Konstante. Für den optischen Spektralbereich von $\bar{\nu} = 3,8 \cdot 10^{14}$ Hz bis $7,9 \cdot 10^{14}$ Hz und Temperaturen T zwischen 10 K und 10^4 K ist die mittlere Photonenzahl $\bar{n} < 1$. Unter diesen Bedingungen ist spontane Emission wahrscheinlicher als induzierte Emission, da nach [38]:

$$\frac{w_{\text{ind}}}{w_{\text{spont}}} = n . \quad (3.2)$$

Dabei ist w_{spont} die Wahrscheinlichkeit für spontane Emission und w_{ind} die Wahrscheinlichkeit für induzierte Emission. n ist die Photonenzahl pro Mode (Besetzungszahl einer Phasenzelle). Da \bar{n} nur einen Mittelwert aus vielen Einzelmessungen repräsentiert, unterliegt die konkrete Photonenzahl n einer gewissen Schwankung. Für die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Photonenzahlen einzelner Phasenzellen gilt die Bose-Einstein-Verteilung. Für thermisches Licht (System im thermischen Gleichgewicht) setzt sich diese Schwankung zum einen aus dem Wellencharakter des Lichts, zum anderen aus dem so genannten Korpuskel-

charakter des Lichts (nach dem Teilchenmodell) zusammen. Nach [37] lässt sich das mittlere Schwankungsquadrat dabei wie folgt formulieren:

$$\overline{\Delta n_{\text{therm}}^2} = \bar{n} + \bar{n}^2 . \quad (3.3)$$

Für kleine Besetzungszahlen gilt $\bar{n} \ll 1 \rightarrow \overline{\Delta n_{\text{therm}}^2} \approx \bar{n}$ und für große Besetzungszahlen $\bar{n} \gg 1 \rightarrow \overline{\Delta n_{\text{therm}}^2} \approx \bar{n}^2$. Bei der Emission von Licht in Systemen, welche nicht im thermischen Gleichgewicht sind, wird eine Poisson-Verteilung als Wahrscheinlichkeitsverteilung angenommen. Analytisch gilt:

$$\overline{\Delta n_{\text{Poisson}}^2} = \bar{n} . \quad (3.4)$$

Somit zeigt sich, dass sowohl inkohärentes (thermisches) Licht bei kleinen Photonenzahlen als auch kohärentes (Poisson-verteiltes) Licht den gleichen Schwankungen unterliegt. Diese lassen sich im Messprozess als Photonenrauschen (auch Schrot- oder Quellrauschen) bezeichnen. Unabhängig vom verwendeten Detektor folgt für das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR):

$$\text{SNR}_{\text{Photon}} = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} . \quad (3.5)$$

Hier ist N die Anzahl der detektierten Photonen. In einem optimierten, optischen System mit idealem Detektor ist das Photonenrauschen die unterste Messgrenze.

Um den Anteil induzierter Emission und somit den Anteil kohärent erzeugter Strahlung zu erhöhen, muss entweder die Gleichgewichtstemperatur erhöht werden, oder es müssen Mechanismen verwendet werden, die das thermische Gleichgewicht auflösen. Nicht-thermische Strahlung, so genannte Lumineszenz („kaltes Licht“), lässt sich durch nicht-thermische Felder erzeugen, bei denen die Photonenzahl nicht gleichmäßig auf alle Moden verteilt ist [38]. Dann lässt sich der klassische Temperaturbegriff nur noch eingeschränkt für spezifische Teilchen oder Prozesse definieren und nicht mehr geschlossen für das Gesamtsystem. Um den Anteil induzierter Emission weiter zu erhöhen oder stabil zu halten, können zusätzlich optische Resonatoren zur Anwendung kommen. Diese werden typischerweise für den Bau von Lasern verwendet. Die in der Praxis verwendeten Lichtquellen lassen sich somit grundsätzlich in zwei Gruppen einordnen: die thermischen Strahler und die Lumineszenzstrahler [39].

Lichtquellentypen

Thermische Strahler lassen sich am besten mit dem Modell des schwarzen Körpers und, davon abgeleitet, mit einem Hohlraumstrahler beschreiben, wobei der thermische Gleichgewichtszustand als Grundlage angenommen wird. Die spektrale Energiedichteverteilung lässt sich mithilfe des Planckschen Strahlungsgesetzes formulieren, welches auch die in (3.1) angesetzte Verteilung beinhaltet.

Typische Beispiele für thermische Lichtquellen sind Glühlampen. Dabei wird meist ein Wolframdraht durch elektrischen Stromfluss erhitzt, um mit entsprechender Verteilung zu strahlen. Glühlampen emittieren bei Arbeitstemperaturen zwischen 2000 K und 3000 K den größeren Teil ihrer elektromagnetischen Strahlung im infraroten Spektralbereich. Nur etwa 5 % der Strahlungsleistung liegt im Bereich von sichtbarem Licht. Durch eine Edelgasumgebung kann der Verdampfungsprozess des Metalldrahts reduziert werden. Zusätzliche Halogene können diesen Prozess weiter reduzieren und insgesamt dazu führen, dass die Arbeitstemperatur auf bis zu 3695 K (Schmelzpunkt von Wolfram) erhöht werden kann. Die erreichbaren spektralen Bestrahlungsstärken (*spectral irradiance*) liegen unter $1 \text{ mW/m}^2/\text{nm}$ [40,41].

Durch gezielte, voneinander unabhängige, atomare Prozesse können einzelne Strahlungsmoden stärker besetzt werden. Dadurch geht das thermische Gleichgewicht verloren und die entsprechende Lichtquelle wird den Lumineszenzstrahlern zugeordnet. Generell gilt, dass der Strahlungsübergang einer angeregten Mode in einen energetisch niedrigeren Zustand mit einer festen Wellenlänge λ verknüpft ist nach der Formel [38]:

$$\Delta E = \frac{h c}{\lambda} . \quad (3.6)$$

Dabei ist ΔE die entsprechende Energiedifferenz beider Moden. Lumineszenzstrahler verfügen daher über ein charakteristisches Linienspektrum, welches sich deutlich vom kontinuierlichen Spektrum rein thermischer Strahler unterscheidet. Die Emissionslinien unterliegen homogenen und inhomogenen Verbreiterungsmechanismen wie der natürlichen Linienbreite, der Druck- oder Stoßverbreiterung und der Dopplerverbreiterung. Eine zusätzliche Aufspaltung in Feinstruktur und Hyperfeinstruktur sowie die Besetzung von Energiebändern oder Kontinuumsanregungen und Ionisation können dabei zu einem ganzen Ensemble von nah beieinander liegenden Emissionslinien führen.

Die Vielfalt an Lumineszenzstrahlern ist nahezu so groß wie die Anzahl an Varianten, die eine gezielte Besetzung einzelner Strahlungsmoden ermöglichen. Dabei lässt sich ein solches thermisches Ungleichgewicht auf sehr unterschiedliche Weise erzeugen, z.B. elektrisch (Elektrolumineszenz), chemisch (Chemolumineszenz) oder aber auch durch optische Anregung selbst (Photolumineszenz). Im Folgenden soll auf zwei Beispiele näher eingegangen werden.

Die Quecksilberdampf Lampe zählt zu den Gasentladungslampen. Die nach der Zündung ionisierten Quecksilberatome erzeugen ein leitfähiges Plasma, welches anschließend kontinuierlich durch elektrisch angeregte Stoßionisation aufrechterhalten wird. Die lokale Temperatur des Plasmas liegt dabei mit 4000 K bis 6000 K deutlich über der Temperatur von Glühlampen. In der Regel ist das Spektrum einer Gasentladungslampe durch eine Überlagerung der charakteristischen, materialspezifischen Spektrallinien und eines kontinuierlichen Untergrunds gegeben, welcher der thermischen Strahlung des Plasmas entspricht. Mit steigendem Gasdruck sind die Stoßionisation und somit auch die Druckverbreiterung einzel-

ner Spektrallinien stärker ausgeprägt. Diese druckabhängige Linienverbreiterung kann bei Höchstdrucklampen dazu führen, dass das Gesamtspektrum nahezu kontinuierlich (analog zu einem Temperaturstrahler) verläuft. Die Größe des Lichtbogens deckt eine Fläche von $0,06 \text{ mm}^2$ bis 10 mm^2 ab. Quecksilberdampflampen besitzen sehr hohe spektrale Bestrahlungsstärken bis $30 \text{ mW/m}^2/\text{nm}$ [40, 41].

Lumineszenzdioden sind halbleiterbasierte Lumineszenzstrahler. Die Grundlagen sind eine n- und eine p-dotierte Halbleiterschicht, welche zusammengebracht eine Raumladungszone mit einer neutralen Sperrschicht erzeugen. Wird in Durchlassrichtung eine Spannung angelegt, so werden in diese Raumladungszone Ladungsträger induziert, die anschließend zu einer Rekombination von negativ geladenen Elektronen und positiv geladenen Löchern führen. Falls durch eine geeignete Materialwahl eine direkte Bandlücke zwischen Leitungsband und Valenzband vorliegt, kann diese Rekombination die Aussendung eines Photons ermöglichen. Das Spektrum einer LED wird durch zwei Faktoren bestimmt: Zum einen durch die temperaturabhängige Besetzungsdichte (Boltzmann-Verteilung), zum anderen durch die Zustandsdichte der jeweiligen Energieniveaus. Die geringste Energiedifferenz ist dabei durch den Minimalabstand der Bandlücke gegeben, während die mittlere Wellenlänge durch das spektrale Energiemaximum bei $\Delta E_{\text{max}} = E_{\text{bandgap}} + \frac{kT}{2}$ definiert ist [39]. Aus der spektralen Energieverteilung ergibt sich mit einer Halbwertsbreite in der Größenordnung von $2kT$ [42] eine spektrale Bandbreite von:

$$\Delta\lambda \approx 2 \frac{kT}{hc} \lambda^2 . \quad (3.7)$$

LED weisen spektrale Bestrahlungsstärken von unter $1 \text{ mW/m}^2/\text{nm}$ (bei 520 nm) bis $6 \text{ mW/m}^2/\text{nm}$ (bei 400 nm) auf [41]. Die abstrahlenden Flächen können von $0,06 \text{ mm}^2$ bis 1 mm^2 reichen. Moderne Hochleistungs-LED (z.B. Osram Golden Dragon) nutzen tendenziell größere Abstrahlflächen und eine zusätzliche Wärmesenke, um hohe Strahlungsintensitäten zu ermöglichen, ohne dabei die Zerstörschwelle des Diodenmaterials zu erreichen.

3.2 Messung von zeitlicher und räumlicher Kohärenz

Um einen Vergleich zwischen den in Kapitel 3.1 vorgestellten Emissionsarten zu ermöglichen, sollen verschiedene Lichtquellen untersucht werden. Dabei werden Lichtquellen verwendet, welche sowohl in der Mikroskopie als auch in der Holografie anwendbar sind. Alle Lichtquellen lassen sich in den Aufbau des Mikroskops integrieren, was einen direkten Vergleich ermöglicht. Es werden folgende Quellen untersucht: eine 100 Watt Halogenlampe (Zeiss HAL 100), eine 100 Watt Quecksilberdampfampe (Zeiss HBO 100) sowie eine blaue LED-Lichtquelle (Zeiss Colibri, 470 nm). Für einen Vergleich werden sowohl ein diodengepumpter Festkörperlaser (DPSS Laser, Lasos LasNova 50 green, 532 nm) als auch ein kohärenzmodulierbarer Diodenlaser (Toptica iPulse, 661 nm) verwendet.

Zur Charakterisierung der Lichtquellen werden folgende Parameter untersucht: Die zeitliche und räumliche Kohärenz sowie die spektrale Bestrahlungsstärke der Quellen. Die Kohärenzparameter sollen durch geeignete Techniken verändert und angepasst werden. Es wird auf Filtertechniken zurückgegriffen, wie sie in Kapitel 2.1 beschrieben sind. Die zeitliche Kohärenz, und damit verbunden die longitudinale Kohärenzlänge, wird durch verschiedene Farb- und Interferenzfilter justiert, mit denen das Spektrum der Quelle variiert werden kann. Die räumliche Kohärenz wiederum wird mithilfe der im vorherigen Kapitel vorgestellten Leuchtfeldblende am Mikroskop eingestellt. Dabei ist zu beachten, dass sich die gemessenen Kohärenzparameter meist auf die bereits gefilterten Quellen beziehen. Speziell die Größe der lateralen Kohärenzfläche bezieht sich im Folgenden immer auf die Größe der *sekundären Quelle*, welche durch den Durchmesser der Leuchtfeldblende gegeben ist, und nicht direkt auf die Quelle (Quellgröße der jeweiligen Leuchte) selbst.

In Tabelle 1 sind Werte für verschiedene Durchmesser der Kohärenzfläche zusammengefasst, die durch Anpassung mittels Leuchtfeldblende erzeugt werden können. Ein grafischer Verlauf ist auch in Abbildung 10 (Seite 23) dargestellt. Im Vergleich dazu liegen die räumlichen Kohärenzlängen der beiden Laser-Lichtquellen um Größenordnungen höher. So können die Kohärenzdurchmesser für beide Laser auf $> 10^4 \mu\text{m}$ abgeschätzt werden. Der Grund dafür ist die stimulierte Emission und die Ausbildung phasenkorrelierter Moden beim Laserprozess. Die hohe räumliche Kohärenz ist maßgebend für die geringe Divergenz des emittierten Laserstrahls.

| Leuchtfeldblende [mm] | 0,8 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
|---------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| Kohärenzdurchmesser [μm] | | | | | | | | |
| für $ \gamma_{12} \approx 0,88$ | 27,3 | 21,8 | 10,9 | 7,3 | 5,5 | 4,4 | 2,2 | 1,1 |
| für $ \gamma_{12} \approx 0,50$ | 59,7 | 47,8 | 23,9 | 15,9 | 11,9 | 9,6 | 4,8 | 2,4 |
| für $ \gamma_{12} \approx 0,15$ | 85,3 | 68,3 | 34,1 | 22,8 | 17,1 | 13,7 | 6,8 | 3,4 |
| für $ \gamma_{12} \approx 0$ | 104,1 | 83,3 | 41,6 | 27,8 | 20,8 | 16,7 | 8,3 | 4,2 |

Tab. 1: Räumliche Kohärenz von Lichtquellen: Zusammenhang des Durchmessers der Leuchtfeldblende und des Durchmessers der Kohärenzfläche (Kohärenzdurchmesser D_{coh}) in der Objektebene des verwendeten Mikroskops. Die angegebenen Werte sind für alle untersuchten Quellen (LED, Halogen- und Quecksilberdampflampe) näherungsweise gleich, da die räumliche Kohärenz durch Filterung einer abgebildeten, sekundären Lichtquelle (Abstand $R = 125 \text{ mm}$) angepasst wird. Die Daten basieren auf Berechnungen mit den in Abbildung 10 angegebenen Messwerten. Die verwendete Wellenlänge ist $\lambda = 546 \text{ nm}$.

Die Spektren der Quellen werden zum einen im ungefilterten Zustand, zum anderen mit verschiedenen, angepassten Filtern untersucht. Dabei kommen ein Interferenzfilter mit einer Bandbreite von 12 nm bei einer zentralen Wellenlänge von 546 nm (Zeiss BP546/12) sowie ein Interferenzfilter mit einer Bandbreite von 4 nm bei einer zentralen Wellenlänge von 465 nm (Laser Components LC-465BP4-25) zum Einsatz. Durch Anwendung von For-

mel (2.8) kann aus der Bandbreite des Spektrums die (zeitliche) Kohärenzlänge des Lichts der Quelle bestimmt werden. Zur Verifizierung der gemessenen Daten wird ein Michelson-Interferometer nach Abbildung 1 verwendet und anhand des Interferenzkontrastverlaufs die Kohärenzlänge direkt gemessen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Lichtquelle | Filter | Spektrum | | Kohärenzlänge L_{coh} | |
|--|--------------|----------------|-----------------|--------------------------------|------------------------|
| | | λ | $\Delta\lambda$ | nach (2.8) | gemessen |
| Lumineszenzdiode (Zeiss Colibri LED) | ohne Filter | 465 nm | 28 nm | 3,4 μm | 2,6 μm |
| | Schott GG455 | 472 nm | 20 nm | 4,9 μm | 3,6 μm |
| | LC-465BP4 | 465 nm | 4 nm | 23,9 μm | 22,6 μm |
| Halogenlampe (Zeiss HAL 100) | ohne Filter | kontinuierlich | | - | 1,6 μm |
| | BP546/12 | 546 nm | 12 nm | 11,0 μm | 13,0 μm |
| | LC-465BP4 | 465 nm | 4 nm | 23,9 μm | - |
| Quecksilberdampflampe (Zeiss HBO 100) | ohne Filter | Linienpektrum | | - | - |
| | BP546/12 | 546 nm | 5 nm | 26,3 μm | 23,0 μm |
| Lasos LasNova 50 * | ohne Filter | 532 nm | 0,08 nm | 1561 μm | $\gg 10^3 \mu\text{m}$ |
| Toptica iPulse ** | ohne Filter | 661 nm | variabel | variabel | 108 μm |

Tab. 2: Zeitliche Kohärenz von Lichtquellen: Vergleich spektraler Parameter der verwendeten Lichtquellen (LED, Halogen- und Quecksilberdampflampe sowie Laser) und deren Kohärenzlänge. Die angegebenen Werte beziehen sich auf einen Interferenzkontrast von 50 %. *Die reale Kohärenzlänge der Laserquellen liegt aufgrund sekundärer Kohärenzeffekte und der dadurch periodisch modulierten Kohärenzfunktion deutlich über den anhand des Spektrums zu erwartenden Werten. **Durch Modulation des Diodenstroms lässt sich die Kohärenzlänge variieren, hier ist das Minimum angegeben.

Die Kohärenzfunktionen der beiden Laserlichtquellen weisen besondere Eigenschaften auf. Aufgrund der sehr kurzen Längen der Laserresonatoren im Bereich von wenigen Millimetern treten so genannte sekundäre Kohärenzeffekten [43] auf. Die Resonatoren, welche selbst als Fabry-Perot-Interferometer angesehen werden können, koppeln pro Resonatordurchlauf nur einen gewissen Anteil an Strahlung aus, während der größere Anteil im Resonator verbleibt. Die im Resonator laufende Welle ist dann zu einem hohen Anteil kohärent zu den bereits ausgekoppelten Wellenzügen. Wenn sich ein zuvor ausgekoppelter Wellenzug in einem zweiten Interferometer (z.B. im Michelson-Interferometer) mit einem später ausgekoppelten Wellenzug überlagert, korrelieren beide miteinander und weisen deshalb einen hohen Interferenzkontrast auf. Die zeitliche Kohärenzfunktion solcher Resonatoren weist somit, neben dem durch das Spektrum der Quelle bestimmten, primären Kohärenzbereich, eine periodische Fortführung benachbarter Kohärenzbereiche auf. Diese sind in ihrer Breite ebenso vom Spektrum abhängig, zusätzlich aber aufgrund des Auskoppelgrads des Resonators mit einer Dämpfungskurve eingehüllt. Abbildung 11 zeigt den Verlauf des Interferenz-

kontrasts bei der Messung der zeitlichen Kohärenz des diodengepumpten Festkörperlasers „Lasos LasNova 50“ mithilfe eines Michelson-Interferometers.

Der Diodenlaser der Firma Topptica lässt sich durch zwei Parameter bezüglich des Diodenstroms modulieren. Dabei kann eine sinusförmige Modulation im Bereich von 65 MHz bis etwa 400 MHz stufenlos geregelt werden. Die relative Amplitudenmodulation (peak-to-peak) kann abhängig von der Modulationsfrequenz im Bereich von 0 % bis etwa 80 % gewählt werden. Diese Hochfrequenzmodulation führt zu einer periodischen Unterbrechung und zu einem ständig neuen Anschwingen des Laserprozesses innerhalb des Resonators. Dadurch erhalten alle Longitudinalmoden im Resonator eine annähernd gleiche Besetzung, welche nur vom Verstärkerprofil des Lasermediums gedämpft wird. Während sich bei einem kontinuierlichen Anschwingprozess nur eine oder wenige Longitudinalmoden herausbilden würden, unterbindet der periodische Anschwingprozess diese Modenselektion. Das Emissionsspektrum der Diode setzt sich dann aus einem Ensemble von Longitudinalmoden beziehungsweise eng nebeneinander liegenden Wellenlängen zusammen. Die Modulationsparameter können dabei gezielt auf die Modenselektion und die effektive Breite des Spektrums einwirken. Das variabel modulierbare Spektrum des Diodenlasers entspricht einer Kohärenzlänge im Bereich von $108 \mu\text{m}$ bis etwa $300 \mu\text{m}$, während die nicht modulierte Diode eine Kohärenzlänge von $1218 \mu\text{m}$ aufweist. Diese Kohärenzverminderung ist vom Hersteller vorrangig zur Speckle-Reduktion vorgesehen.

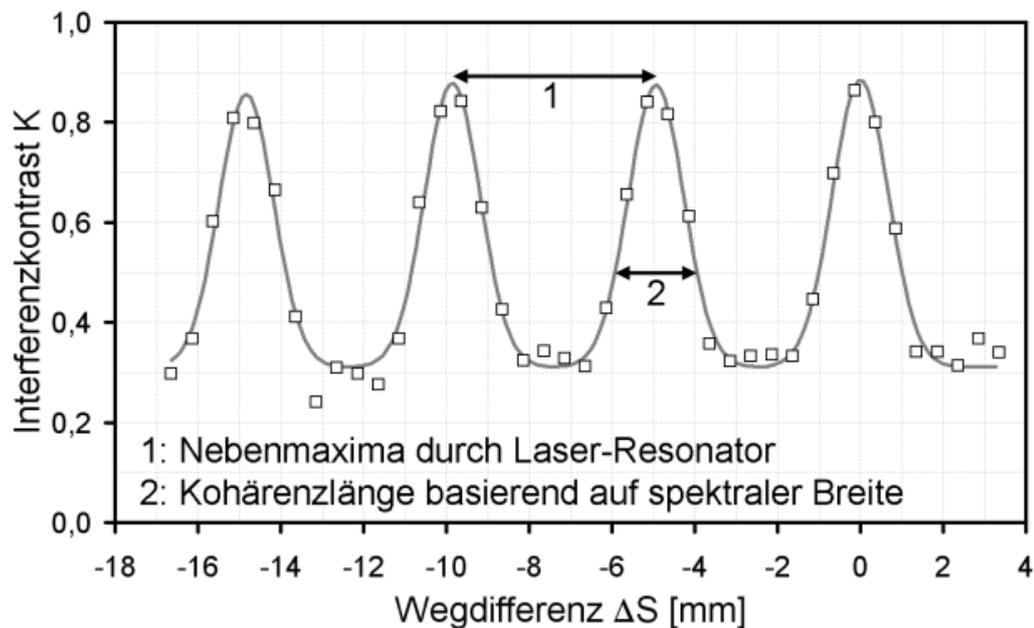


Abb. 11: Verlauf der Kontrastfunktion, gemessen mit einem Michelson-Interferometer: Sekundäre Kohärenzeffekte (Nebenmaxima) bei einem diodengepumpten Festkörperlaser (Lasos LasNova 50) mit einer Resonatorlänge von etwa 2,47 mm. Die durch das Frequenzspektrum bestimmte Kohärenzlänge liegt bei $1000 \mu\text{m}$ (Kontrastabfall auf 50 %). Die reale Kohärenzlänge liegt aufgrund der Nebenmaxima bei $\gg 10^3 \mu\text{m}$.

3.3 Kohärenzvolumen und spektrale Strahlungsstromdichte

Die Anwendung von Filtern, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, hat neben der Kohärenzvariation direkten Einfluss auf die Lichtstärke der resultierenden Beleuchtung. Je schmaler das Ortsfrequenz- oder Frequenzspektrum einer Lichtquelle gefiltert wird, desto weniger Licht bleibt für die mikro-kohärente Beleuchtung erhalten. Dieser Zusammenhang soll quantitativ untersucht werden. Zeitliche und räumliche Kohärenz können nach Formel (2.12) zu einem Kohärenzvolumen zusammengefasst werden. Die Bestrahlungsstärke innerhalb der Objektebene wird für verschiedene Kohärenzvolumina mit einer Fotodiode (Coherent OP-2 VIS) gemessen. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der Messung, bei welcher die Quecksilberdampfampe mit der Halogenlampe und der LED direkt verglichen wird.

Es zeigt sich eine Abnahme der Bestrahlungsstärke für zunehmende Kohärenzvolumina. Bei gleichem Kohärenzvolumen besitzt die Quecksilberdampfampe die höchste Intensität. Die LED und die Halogenlampe liegen mit über einer Größenordnung (15- bis 25-fach) darunter, wobei die verwendete LED etwa das 1,7-fache an Bestrahlungsstärke gegenüber der Halogenlampe leistet. Der Grund für diese Unterschiede liegt in den unterschiedlichen Emissionsprozessen der verschiedenen Lichtquellen. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, variieren die erreichbaren spektralen Bestrahlungsstärken je nach Emissionsprozess. Ausschlaggebend ist dabei, ob bei der Emission ein thermisches Gleichgewicht vorliegt beziehungsweise wie stark dieses gestört ist. Eine Gasentladung ermöglicht deutlich höhere (lokale) Temperaturen als ein thermischer Strahler, ohne dabei die Zerstörschwelle des Leuchtenmaterials zu überschreiten.

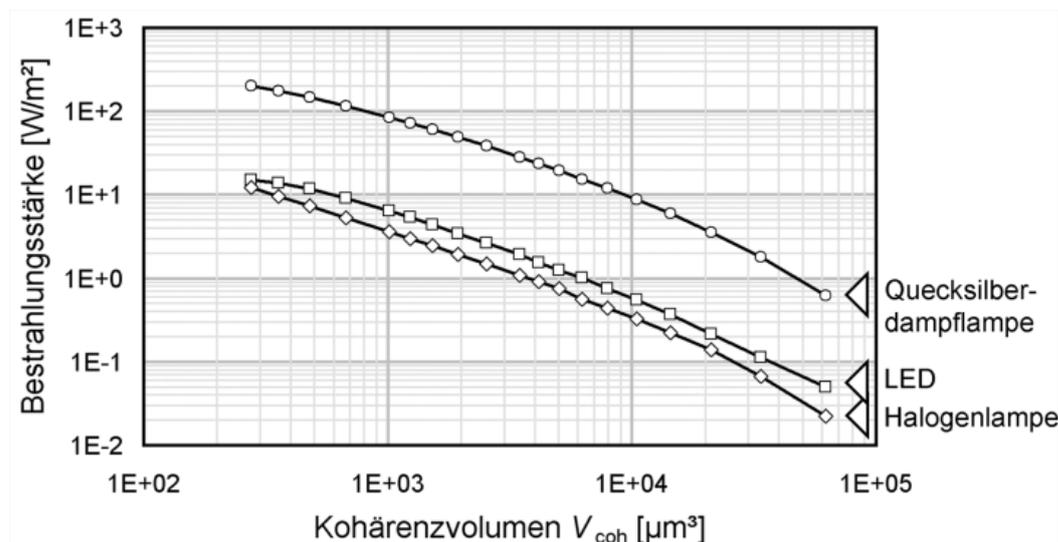


Abb. 12: Bestrahlungsstärke in der Objektebene in Abhängigkeit vom Kohärenzvolumen: Räumliche und zeitliche Kohärenz werden durch Filterung variiert. Mit zunehmender Schmalbandigkeit des Frequenz- und Ortsfrequenzspektrums nimmt das Kohärenzvolumen zu und die nutzbare Intensität gleichzeitig ab. Bei gleichem Kohärenzvolumen liefert die Quecksilberdampfampe die höchste Bestrahlungsstärke, gefolgt von der verwendeten LED und der Halogenlampe.

3.4 Kohärenzvolumen und Signal-Rausch-Verhältnis

In jedem interferenzoptischen Aufbau gibt es einen Detektor, welcher das Messsignal erfassen und gegebenenfalls umwandeln soll. Jeder reale Detektor ist dabei durch eine endliche Sensitivität und durch Rauschen in seinem Messbereich limitiert. Das zu erfassende (optische) Signal bildet zusammen mit der Rauschgrenze des Detektors ein Signal-Rausch-Verhältnis. Die Größe des Signal-Rausch-Verhältnisses ist ausschlaggebend für die praktische Nutzbarkeit des Aufbaus und wird durch die Lichtquelle, den Lichtdurchsatz des optischen Systems sowie den Detektor bestimmt. Im vorherigen Kapitel 3.3 wurde bereits gezeigt, welche Bestrahlungsstärke eine gefilterte Lichtquelle mit mikro-kohärenter Beleuchtung, wie beispielsweise eine LED, in der Objektebene besitzt.

Die mikro-kohärente Beleuchtung in der Probenebene wird bei allen Messungen am Mikroskop durch ein Objektiv und die Tubuslinse vergrößert auf den Sensor der Digitalkamera abgebildet. Dabei wird die Kohärenzfunktion in gleicher Weise vergrößert abgebildet wie die Objektebene, so dass der lokale Interferenzkontrast erhalten bleibt. Der Abbildungsprozess führt zu einer Abnahme der Bestrahlungsstärke. Diese nimmt quadratisch mit $1/M^2$ ab, wobei M der Vergrößerungsfaktor des verwendeten Objektivs ist. Abbildung 13 zeigt den funktionellen Zusammenhang der Bestrahlungsstärke in der Sensorebene für verschiedene Kohärenzvolumina und variable Vergrößerungsfaktoren M . Gut erkennbar ist die quadratische Abnahme der Bestrahlungsstärke für wachsende Vergrößerungsfaktoren. Wird beispielsweise anstatt eines $10\times$ Objektivs ein $100\times$ Objektiv verwendet, schwächt dies bei gleichbleibendem Kohärenzvolumen die nutzbare Bestrahlungsstärke um den Faktor 100

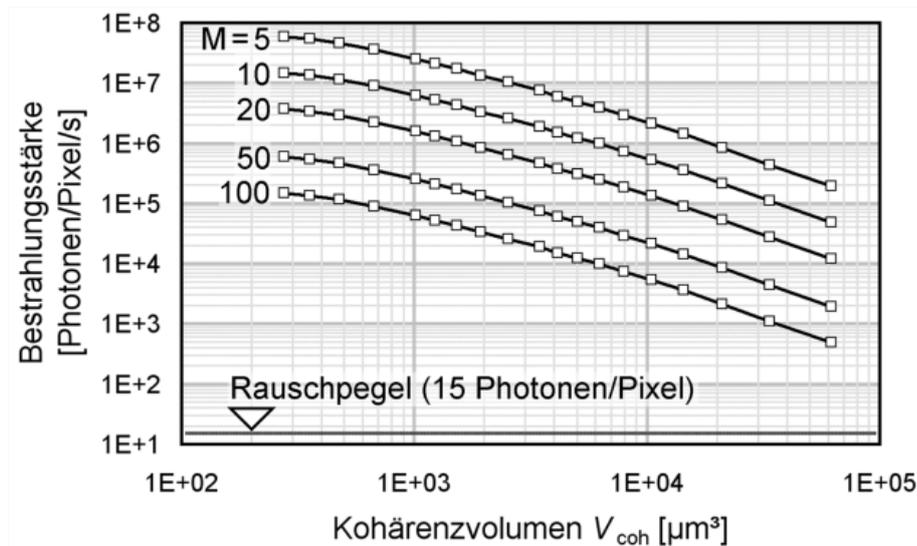


Abb. 13: Bestrahlungsstärke einer LED in der Sensorebene in Abhängigkeit vom Kohärenzvolumen: Es wurden für verschiedene Vergrößerungsfaktoren M je nach Objektivwahl die absoluten Bestrahlungsstärken berechnet. Das Signal-Rausch-Verhältnis ergibt sich aus der jeweils gewählten Belichtungszeit und daraus folgend aus der Bestrahlung (Bestrahlungsenergie pro Fläche) sowie dem Rauschpegel des Sensors (15 Photonen/Pixel bei AxioCam MRm).

ab. Das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis am Detektor ergibt sich dann aus der gewählten Belichtungszeit (1 ms bis 20 s) und daraus folgend aus der Bestrahlung (Bestrahlungsenergie pro Fläche) sowie dem Rauschpegel des Kamerasensors, welcher 15 Photonen pro Pixel misst.

Die Messwerte zeigen, dass für Kohärenzvolumina im Bereich von $10^2 \mu\text{m}^3$ bis $10^5 \mu\text{m}^3$ die Bestrahlungsstärke bei einer Sekunde Belichtungszeit deutlich über dem Rauschpegel der Kamera liegt und somit ein Signal-Rausch-Verhältnis im Bereich über 10 dB selbst für eine 100-fache Vergrößerung erzielt wird. In der digitalen in-line holografischen Mikroskopie liegen die typischen Kohärenzvolumina bei etwa $10^4 \mu\text{m}^3$. Das bedeutet, dass eine mikro-kohärente Beleuchtung mit einer gefilterten LED-Lichtquelle, aber auch mit einer gefilterten Halogenlampe und dem hier verwendeten, kommerziellen Kamerasensor ausreichend ist, um mit Belichtungszeiten unterhalb einer Sekunde und einem guten Signal-Rausch-Verhältnis von über 10 dB Aufnahmen zu ermöglichen. Bei kürzerer Belichtungszeit und entsprechend niedrigerem Signal-Rausch-Verhältnis sollte es sogar möglich sein, Bildaufnahmen mit einer Aufnahmezeit von 25 Bildern pro Sekunde zu realisieren und damit den Zugang zu einer holografischen Videomikroskopie mit mikro-kohärenter Beleuchtung zu schaffen.

4 Digitale in-line holografische Mikroskopie mit mikro-kohärenter Beleuchtung

4.1 Grundlagen zur digitalen in-line holografischen Mikroskopie

Die holografische Bildgebung wurde von Dennis Gabor entwickelt, um die Auflösung in der Elektronenstrahl-Mikroskopie zu verbessern [44–46]. Das Ziel dieser interferenzoptischen Bildgebung ist die direkte Detektion einer Wellenfront ohne optisch abbildende Elemente. Das holografische Verfahren ermöglicht zudem den Zugang zu dreidimensionalen Bildinformationen mit nur einer einzigen Aufnahme. Dabei werden sowohl Intensitäts- als auch Phaseninformationen über das Objekt zugänglich, wobei letztere gerade für die Untersuchung von biologischen Zellen relevant sind, da diese meist klassische Phasenobjekte darstellen.

Gabor nutzte für die klassische Holografie eine teilkohärente, punktförmige Lichtquelle, welche eine sphärische, monochromatische Welle emittiert und experimentell durch eine Pinhole-gefilterte Gasentladungslampe realisiert wurde. Das zu untersuchende Objekt wird von dieser Welle beleuchtet und verändert diese je nach Objekteigenschaft. Die relevanten Prozesse sind dabei die Phasenänderungen durch das Objekt sowie die Beugung am Objekt. Die vom Objekt veränderte Beleuchtungswelle wird Objektwelle u_{obj} genannt, denn sie beinhaltet die Amplituden- und Phaseninformationen über das Objekt. Die Objektwelle allein kann nicht aufgezeichnet werden, da es mit Einzeldetektoren nicht möglich ist, Phaseninformationen direkt zu messen. Daher nutzt man die stationären Eigenschaften der Interferenz, welche diese Phaseninformationen stets enthält. Die ungestörte Beleuchtungswelle dient als bekannte Feldverteilung der späteren Rekonstruktion, daher wird sie als Referenzwelle u_{ref} bezeichnet. Beide Wellenfelder, die Objekt- und die Referenzwelle, überlagern sich und interferieren. Das dabei entstehende Interferogramm wird Hologramm genannt und bietet nun die Möglichkeit, Amplituden- und Phaseninformationen der Objektwelle aus dem stationären Intensitätsbild I_{holo} zu erhalten. Analytisch lässt sich die Entstehung des Hologramms wie folgt formulieren:

$$\begin{aligned} u_{\text{holo}} &= u_{\text{obj}} + u_{\text{ref}} \\ I_{\text{holo}} &= |u_{\text{holo}}|^2 = u_{\text{obj}} u_{\text{obj}}^* + u_{\text{ref}} u_{\text{ref}}^* + u_{\text{obj}} u_{\text{ref}}^* + u_{\text{ref}} u_{\text{obj}}^* . \end{aligned} \quad (4.1)$$

Um aus diesem Intensitätsbild wieder die Objektwelle zu rekonstruieren, wird (4.1) mit der Referenzwelle multipliziert. In der klassischen Holografie entspricht dieser zweite Abbildungsschritt dem erneuten Beleuchten des Hologramms mit der Referenzwelle und deren anschließende Beugung am Hologramm. In der digitalen Holografie wird dieser Schritt numerisch mithilfe eines Computers berechnet und digital ausgewertet. Analytisch folgt aus (4.1):

$$I_{\text{holo}} u_{\text{ref}} = \underbrace{(I_{\text{obj}} + I_{\text{ref}}) u_{\text{ref}}}_{\hat{=} \text{ zero order}} + \underbrace{I_{\text{ref}} u_{\text{obj}}}_{\hat{=} \text{ object image}} + \underbrace{u_{\text{ref}}^2 u_{\text{obj}}^*}_{\hat{=} \text{ twin image}} . \quad (4.2)$$

Während bei der *off-axis*-Methode durch eine schräg einfallende Referenzwelle diese drei Terme räumlich getrennt liegen, überlagern sich bei der hier verwendeten *in-line*-Methode alle Anteile entlang der optischen Achse. Um die nullte Ordnung (engl. *zero order*) zu minimieren, bietet sich die Berechnung des *Kontrasthologramms* [47, 48] an. Während nach Kreuzer [47] die Intensitäten direkt subtrahiert werden, wird nach Kanka [48] von der Wurzel der Hologrammintensität die Wurzel der Referenzintensität subtrahiert (Amplitudendifferenz). In einem weiteren Berechnungsschritt wird durch eine Normierung mit der Referenzwelle beziehungsweise Referenzintensität eine durch die sphärische Beleuchtungswelle inhomogene Intensitätsverteilung angepasst und man erhält nach beiden Korrekturen das rekonstruierte Wellenfeld:

$$u_{\text{rec}} = \begin{cases} (I_{\text{holo}} - I_{\text{ref}}) \frac{u_{\text{ref}}}{I_{\text{ref}}} & \dots \text{ nach Kreuzer et al. [47]} \\ (\sqrt{I_{\text{holo}}} - |u_{\text{ref}}|) \frac{u_{\text{ref}}}{|u_{\text{ref}}|} & \dots \text{ nach Kanka et al. [48]} \end{cases} \quad (4.3)$$

Für kleine Objekte gilt $I_{\text{obj}} \ll I_{\text{ref}}$, weshalb der verbleibende *zero order*-Term vernachlässigt werden kann. Abgesehen von einem immer vorhandenen *Zwillingsbild* (*twin image*) entspricht die rekonstruierte Welle der ursprünglichen Objektwelle. Es gilt in guter Näherung $u_{\text{rec}} \approx u_{\text{obj}}$. Das *Zwillingsbild* stellt bei geeigneten Geometrien sowie kleinen Objekten nur eine geringe Störung da [47], lässt sich aber auch durch spezielle iterative Maßnahmen wie beispielsweise eine Absorptionsanalyse [49] oder eine objektgestützte Rekonstruktion [50] minimieren.

An die Rekonstruktion anschließend, muss die Objektwelle von der Hologrammebene zurück in die Objektebene ausgebreitet werden. Denn nur dort lässt sich die Objektwelle wieder als das ursprüngliche Objekt betrachten. Hologramme, welche über ein ausreichend feines Stützstellenraaster (engl. *sampling*) verfügen, weil sie wie in dieser Arbeit mit zusätzlicher Vergrößerung mittels Mikroskop aufgenommen wurden, können mit der *angular spectrum* Methode [51] ausgebreitet werden. Dabei wird eine Faltung der rekonstruierten Objektwelle mit der Übertragungsfunktion des Freiraums im Ortsraum vorgenommen. Typischerweise wird diese Faltung als Produkt beider Fouriertransformierten berechnet. Man erhält dann die Objektwelle in der gewünschten Objektebene und kann nach Intensitäts-

bildung das Bild des Objekts betrachten.

In der digitalen Holografie werden digitale Bildsensoren, wie CCD- oder CMOS-Sensoren, zur Aufzeichnung des Hologramms verwendet. Die typischen Pixel-Rasterabstände (*pixel pitch*) liegen zwischen $1,3 \mu\text{m}$ und etwa $13 \mu\text{m}$. Das Sampling-Theorem nach Nyquist und Shannon [52,53] besagt, dass das Signal (hier die laterale Interferenzstruktur) mit doppelter Periode abgetastet werden muss, um es vollständig aufzulösen.

In der klassischen *linsenlosen* in-line holografischen Mikroskopie wird das Objekt mit einer sphärischen Welle beleuchtet. Durch diese kegelartige Beleuchtungsgeometrie vergrößert sich das Hologramm des Objekts mit zunehmendem Abstand des Detektors und damit vergrößern sich auch die lateralen Interferenzstrukturen. Bei geeigneter Dimensionierung kann dann das Hologramm unabhängig vom *pixel pitch* des Bildsensors aufgezeichnet werden.

Bei der Beleuchtung mit einer ebenen Welle findet diese Vergrößerung nicht automatisch statt, da hier eine parallele Beleuchtungsgeometrie vorliegt. Die kleinsten lateralen Interferenzstrukturen können dann, je nach Abstand des Detektors, lediglich $\lambda/2$ betragen, so dass das Sampling moderner Digitalsensoren in der Regel nicht ausreicht, um das Hologramm vollständig aufzulösen. Um dennoch Hologramme mit hoher Auflösung detektieren zu können, ist eine Zwischenschaltung von zusätzlichen Objektiven möglich, wobei das Hologramm dann vergrößert auf den Detektor abgebildet wird. Diese Vorgehensweise stellt eine Anpassung der lateralen Auflösung an den bestehenden Bildsensor dar, allerdings unter Einschränkung des Bildfelds.

Für das Auflösungsvermögen eines in-line holografischen Mikroskops gelten die Abbeschen Gesetze [31,32]. Für die kleinste, noch auflösbare Gitterperiode p_{\min} gilt bei kohärenter, ebener Beleuchtung:

$$p_{\min} = \frac{\lambda}{\text{NA}_{\min}} . \quad (4.4)$$

Dabei ist NA_{\min} die kleinste, im gesamten System vorhandene numerische Apertur. Diese kann durch den Bildsensor, durch die numerische Apertur der optional genutzten Mikroskopoptik, aber auch durch begrenzte, partielle Kohärenz gegeben sein. Die Kohärenzbedingung stellt zusammen mit der Geometrie und der Dimensionierung des Aufbaus die wesentlichen Anforderungen an die Beleuchtung dar. Der Einsatz mikro-kohärenter Beleuchtung mit Kohärenzlängen im Bereich von $5 \mu\text{m}$ bis etwa $100 \mu\text{m}$ kann dabei auch zu einer Einschränkung der effektiven numerischen Apertur führen.

Holografie und holografische Mikroskopie mit partieller Kohärenz

In der holografischen Mikroskopie werden in der Regel Laser zur Beleuchtung eingesetzt [54,55], denn diese Lichtquellen besitzen eine hohe Kohärenz für die interferenzoptische Messung. Die Kohärenzlängen und Kohärenzdurchmesser der meisten Laserlichtquellen liegen deutlich über einem Millimeter. In vielen experimentellen Aufbauten befinden sich

Elemente wie Objektive, Probenhalter und Deckgläser, aber auch Schutzgläser für Kamerasensoren. Zusätzliche Interferenzen als Folge von Mehrfachreflexionen an diesen optischen Grenzflächen und Schichtsystemen treten auf. Raue Oberflächen, kleine Schmutzpartikel, Fassungen und Halterahmen, welche (ungewollt) beleuchtet werden, erzeugen statistische Interferenzen, auch Speckle [56] genannt. Eine raue Probe kann aufgrund von Streuung *intrinsische* Speckle [57, 58] selbst erzeugen, falls deren Interferenzen nicht aufgelöst werden können. Derartige Interferenzen, welche nicht durch die eigentliche Probe verursacht werden oder nur unvollständig aufgelöst sind, können numerisch nur unzureichend oder gar nicht gefiltert werden. Laserquellen mit großen Kohärenzlängen führen demnach zu parasitären, kohärenzverursachten Effekten. Die Rekonstruktion des Hologramms beinhaltet dann Störungen, welche die Bildqualität der rekonstruierten Probe erheblich schwächen können [59–61]. Diese Störungen führen zu einem statistischen Untergrund (Speckle) und daraus folgend zu einem verminderten Bildkontrast, aber auch zu Artefakten, welche nicht der Probe zugeordnet werden können und diese überlagern.

Die Anwendung reduzierter (partieller) Kohärenz ist ein Ansatz zur Verminderung kohärenzverursachter Störungen. Speckle lassen sich durch partiell-kohärente Beleuchtung reduzieren [62, 63]. So wurde gezeigt, dass räumlich partiell-kohärentes Licht durch einen bewegten Diffusor, beispielsweise eine rotierende Streuscheibe, künstlich erzeugt werden kann [13, 64] und in der Holografie anwendbar ist [65–67]. Es ließen sich jene parasitären Effekte reduzieren [68, 69]. Eine alternative Vorgehensweise ist mit dem Einsatz zeitlich partiell-kohärenter Lichtquellen gegeben [70]. So lassen sich beispielsweise kurzkohärente Dauerstrich-Laser [71] oder Kurzpulslaser, aber auch lichtemittierende Dioden (LED) [68, 72, 73] oder Superlumineszenzdioden (SLD) [74] für die holografische Mikroskopie nutzen. Die dabei verwendeten Lichtquellen wurden mit einem Pinhole oder einer Blende gefiltert und in *off-axis* Aufbauten [68, 73, 74] oder in *in-line* Aufbauten [72] verwendet. In der Literatur wurden vorrangig qualitative Aussagen über Einsatzbeispiele partieller Kohärenz getroffen.

Eine Studie [75] beschäftigte sich mit der Verbreiterung der Impulsantwort bei Anwendung partieller Kohärenz in der linsenlosen in-line holografischen Mikroskopie. Als Lichtquellen wurden dabei Laserdioden mit spektralen Bandbreiten von 2 nm und 12 nm verwendet, welche über ein 1 μm oder ein 5 μm Pinhole gefiltert wurden. Die zeitliche Kohärenzlänge entsprach dabei etwa 100 μm (Bandbreite 2 nm) beziehungsweise etwa 15 μm (Bandbreite 12 nm). Bei der von Gopinathan verwendeten linsenlosen *in-line* Anordnung wurden in der Hologrammebene Kohärenzdurchmesser von etwa 10 mm (1 μm Pinhole) beziehungsweise etwa 2 mm (5 μm Pinhole) erreicht.

In der interferenzoptischen Mikroskopie sind Gesichtsfelder unterhalb eines Millimeters typisch. Die Ausdehnung der lateralen Kohärenzfläche muss nicht größer als dieses Gesichtsfeld sein. Meist reicht es aus, wenn sich die Interferenzen eines Objekts über einen ausreichend großen Teil des Gesichtsfelds erstrecken. Die typischen Kohärenzdurchmesser

sollten dann, je nach Kohärenzkriterium, im Bereich von $10 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$ liegen. Die kleinsten Abstände zwischen benachbarten, optischen Grenzflächen sind meist durch das Objektträgerdeckglas (typischerweise $170 \mu\text{m}$) gegeben. Die zeitliche Kohärenzlänge sollte unterhalb dieses Werts liegen, um Interferenzen aus Mehrfachreflexionen zu vermeiden. Je nach Geometrie sollten Kohärenzlängen im Bereich von $5 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$ ausreichen.

4.2 Bildqualität und Auflösungskriterium

Angepasste Kohärenz und Bildqualität

Die Anwendbarkeit von mikro-kohärenter Beleuchtung soll qualitativ und quantitativ untersucht werden. Dazu wird ein digitales in-line holografisches Mikroskop verwendet, welches auf dem Mikroskop Zeiss Axioskop 2 MAT mot basiert. Es werden die in Kapitel 3 vorgestellten Lichtquellen (LED, Halogen- und Quecksilberdampfampe) an den Durchlichtkanal angeschlossen und mit entsprechenden Interferenzfiltern sowie der Leuchtfeldblende gefiltert. Abbildung 14 zeigt eine schematische Anordnung mit ebener Objektbeleuchtung. Eine ähnliche Anordnung wurde beispielsweise auch von Moon und Javidi [76] genutzt.

Zunächst wird ein fasergekoppelter, diodengepumpter Festkörperlaser (Lasos LasNova 50 green) zur Beleuchtung genutzt. Als Testobjekt wird eine Probe bestehend aus $1,06 \pm 0,05 \mu\text{m}$ großen *Polymethylmethacrylat*-(PMMA)-Kugeln auf einem $170 \mu\text{m}$ dicken Deckglas verwendet. Die PMMA-Kugeln werden in einer flüssigen Suspension aufgebracht und anschließend eingetrocknet, wodurch sich teilweise hexagonal angeordnete Monolagen in größeren Gruppen ausbilden. Diese Objekte erweisen sich aufgrund ihrer engen Toleranzen im Durchmesser sowie der selbstanordnenden, periodischen Struktur als eine gut reproduzierbare, gitterähnliche Probe für Auflösungstests. Das Probendeckglas wird in der

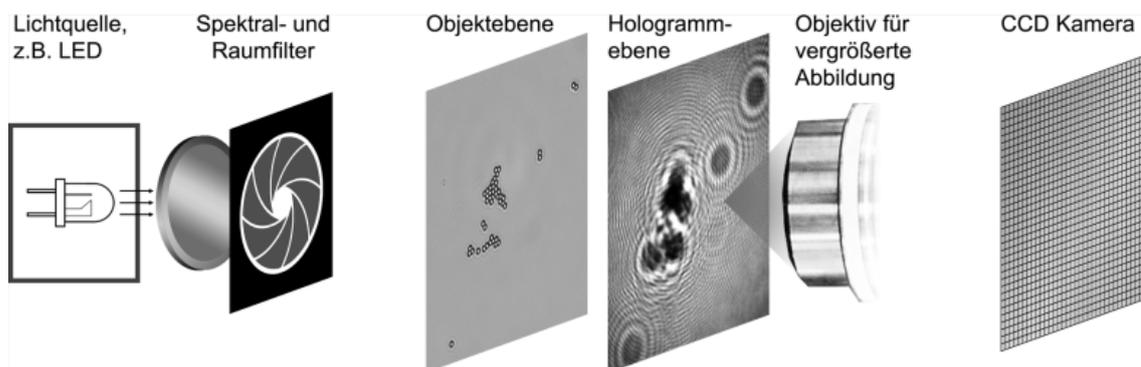


Abb. 14: Schematischer Aufbau für eine mikro-kohärente Beleuchtung und Anwendung in der digitalen in-line holografischen Mikroskopie: Das Licht einer Quelle (LED, Halogen- oder Quecksilberdampfampe) wird spektral durch Interferenzfilter und räumlich durch die Leuchtfeldblende des Mikroskops gefiltert und erzeugt eine ebene, mikro-kohärente Beleuchtung in der Objektebene. Die Hologrammebene, welche durch Interferenz hinter der Objektebene entsteht, wird durch ein Objektiv vergrößert in die Sensorebene abgebildet und dort von einer CCD Kamera detektiert.

Objektebene des Mikroskops positioniert und mit verschiedenen Lichtquellen beleuchtet.

Das vom Objekt gebeugte Licht (Objektwelle) überlagert sich mit dem ungebeugten Teil der nahezu ebenen Beleuchtungswelle (Referenzwelle) und erzeugt durch Interferenz beider Wellen das Hologramm. Ein $100\times$ Objektiv (Zeiss LD EC Epiplan-Neofluar $100\times/0,75$ HD DIC) mit einer numerischen Apertur von $NA_{\text{lens}} = 0,75$ wird zur vergrößerten Abbildung der Hologrammebene genutzt, welche hier in $z = 30 \mu\text{m}$ Abstand hinter der Objektebene liegt. Zusätzlich wird eine Aufnahme ohne Objekt (Deckglas ohne Probe) gemacht und nach Formel (4.3 nach Kanka) die rekonstruierte Welle des Kontrasthologramms berechnet. Die Ausbreitung zurück in die Objektebene erfolgt mit der *angular spectrum* Methode [51]. Da das rekonstruierte und ausgebreitete Kontrasthologramm den *zero order* Term unterdrückt, betrachtet man im Intensitätsbild der rekonstruierten Objektebene (abgesehen vom defokussierten *twin image*) lediglich das Objekt selbst, ohne die eigentliche Objektbeleuchtung. Diese Darstellung führt dazu, dass im Vergleich zu einer Rekonstruktion eines Hologramms ohne Berechnung des Kontrasthologramms, das Objekt invertiert erscheint. Während die nahezu transparenten PMMA-Kugeln im Durchlicht ursprünglich als dunkle Kreise auf hellem Untergrund zu beobachten sind, erscheinen nun im rekonstruierten Objektbild des Kontrasthologramms helle Kreise auf dunklem Untergrund.

Abbildung 15 zeigt eine Gegenüberstellung verschiedener Beleuchtungsvarianten für die beschriebene Aufnahmesituation. In Teilabbildung 15(a) ist die holografische Aufnahme mit Laserbeleuchtung durchgeführt. Die (zeitliche) Kohärenzlänge ist $L_{\text{coh}} \gg 10^3 \mu\text{m}$ und der Durchmesser der Kohärenzfläche ist $D_{\text{coh}} > 10^4 \mu\text{m}$. Im Vergleich mit der Dimensionierung des Aufbaus entspricht dies einer Beleuchtung mit einem Kohärenzgrad von $\gamma \rightarrow 1$. Die Objektstrukturen sind zwar aufgelöst, aber von parasitären Interferenzen deutlich gestört. In der Detailansicht (untere Reihe) ist erkennbar, dass diese Störungen sowohl zu Amplituden- als auch zu Phasenfehlern führen. Die Objektstrukturen weisen sowohl laterale Verschiebungen als auch leichte Defokussierungen auf. Die Gesamtstruktur bleibt zwar als solche noch erkennbar, einzelne Details aber gehen verloren. Für eine quantitative Bewertung dieser Störungen wird ein Intensitätsschnitt durch die Objektstruktur angefertigt (Schnitt und Ansicht A). Die normierte Intensität wird anschließend mit einer angesetzten Fit-Funktion ($\sim \cos^2$) verglichen und die Varianz beider Größen über den gewählten Messbereich (Schnitt über $9,5 \mu\text{m}$ mit ≥ 150 Messpunkten) berechnet. Es ergibt sich eine Standardabweichung von 25,9 %.

Weiterhin wird eine gefilterte LED-Lichtquelle als Beleuchtung verwendet, alle anderen Einstellungen bleiben gleich. Die Lichtquelle (Zeiss Colibri) nutzt eine Lumineszenzdiode mit einer zentralen Wellenlänge von $\lambda = 465 \text{ nm}$ und einer Bandbreite von $\Delta\lambda = 28 \text{ nm}$. Das Spektrum der LED wird mit einem Interferenzfilter auf eine Breite von $\Delta\lambda = 4 \text{ nm}$ eingeschränkt, was einer Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 22,6 \mu\text{m}$ bei einem Interferenzkontrast von $|\gamma(\tau)| = 50 \%$ entspricht. Zusätzlich wird die Leuchtfeldblende des Mikroskops (125 mm Abstand zur Objektebene) auf einen Durchmesser von 0,8 mm verringert und

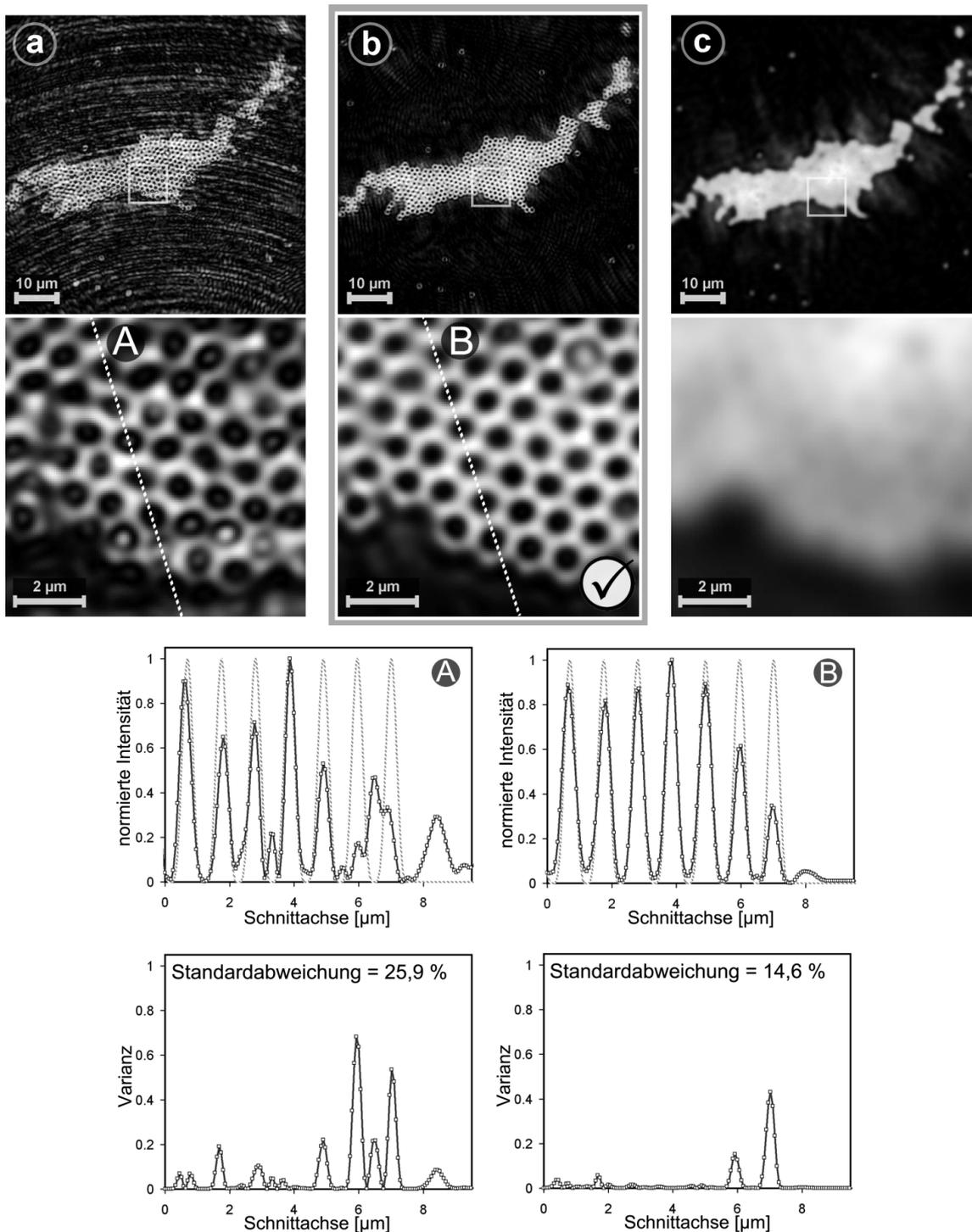


Abb. 15: Holografische, mikroskopische Bildgebung von $1,06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln mit unterschiedlich kohärenter Beleuchtung: Rekonstruktion des Kontrasthologramms (Intensität). (a) Zu hohe Kohärenz (Kohärenzlänge $L_{\text{coh}} \gg 10^3 \mu\text{m}$, Kohärenzdurchmesser $D_{\text{coh}} > 10^4 \mu\text{m}$) verursacht störende Effekte wie Interferenzen aus Mehrfachreflexionen und Speckle. (b) Das Optimum wird durch eine angepasste Kohärenz erreicht (im Beispiel $L_{\text{coh}} = 22,6 \mu\text{m}$, $D_{\text{coh}} = 59,7 \mu\text{m}$). (c) Zu niedrige Kohärenz ($L_{\text{coh}} = 2,6 \mu\text{m}$, $D_{\text{coh}} = 59,7 \mu\text{m}$) limitiert das Auflösungsvermögen.

dadurch der Kohärenzdurchmesser auf $D_{\text{coh}} = 59,7 \mu\text{m}$ für einen Interferenzkontrast von $|\gamma_{12}| = 50 \%$ eingestellt. Die zeitliche und die räumliche Kohärenz sind ausreichend, um Interferenzen in der Hologrammebene zu erzeugen. Die Rekonstruktion ist in Teilabbildung 15(b) dargestellt. Die PMMA-Kugeln sind vollständig aufgelöst. Außerdem werden die kohärenzverursachten Störungen weitestgehend unterdrückt und sind nicht mehr sichtbar. Zur quantitativen Bewertung der Bildqualität wird ebenfalls ein Schnitt durch das rekonstruierte Intensitätsbild der Probe angefertigt (Schnitt und Ansicht B). Der Schnitt B zeigt eine im Vergleich zu Schnitt A deutlich bessere Übereinstimmung der Probe mit dem angesetzten Intensitätsprofil. Lediglich im Randbereich der Probe (Schnittachse bei $7 \mu\text{m}$) sind relevante Abweichungen erkennbar, welche auf eine Überlagerung des rekonstruierten Objekts und seines (defokussierten) Zwillingsbilds zurückzuführen sind. Diese Überlagerung ist typisch für in-line holografische Anordnungen und ist Gegenstand aktueller Studien [47, 49, 77]. Die berechnete Standardabweichung für den gewählten Bereich liegt bei 14,6 %. Für den Bereich innerhalb der Probenstruktur (Schnittkoordinaten im Bereich $0 \mu\text{m}$ bis etwa $5 \mu\text{m}$) kann die Abweichung um mehr als einen Faktor 2 verringert und somit die Bildqualität erheblich verbessert werden.

Dieselbe LED-Lichtquelle wird ohne spektrale Filterung verwendet. Die ungefilterte spektrale Bandbreite der LED beträgt $\Delta\lambda = 28 \text{ nm}$, was einer Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 2,6 \mu\text{m}$ ($|\gamma(\tau)| = 50 \%$) entspricht. Die Leuchtfeldblende bleibt unverändert und der Kohärenzdurchmesser weiterhin auf $D_{\text{coh}} = 59,7 \mu\text{m}$ justiert. Die dazugehörige Rekonstruktion ist in Teilabbildung 15(c) dargestellt. Die Gruppe der PMMA-Kugeln ist als solche noch gut erkennbar, allerdings ohne jegliche Details. Die Verringerung eines Kohärenzparameters führt dazu, dass sich die $1,06 \mu\text{m}$ -Objektstruktur nicht mehr auflösen lässt. Kohärenzverursachte Störungen wie in Teilabbildung 15(a) sind visuell nicht nachweisbar.

Der Vergleich aller Beleuchtungssituationen lässt sich zusammenfassen: Für die Dimensionierung des Aufbaus zu groß gewählte Kohärenzlängen und Kohärenzdurchmesser sind zwar ausreichend, um Interferenzen zu erzeugen, die eine Auflösung von Objektstrukturen um einen Mikrometer zulassen, führen aber zu parasitären Störungen, welche die Bildqualität nachweislich negativ beeinflussen und Detailaussagen über die Probe erschweren. Eine angepasste Kohärenz im Mikrometerbereich (Kohärenzlänge L_{coh} zwischen $5 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$, Kohärenzdurchmesser D_{coh} zwischen $10 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$) reduziert diese Störungen und ermöglicht visuell nahezu störungsfreie Rekonstruktionen. Für die mikro-kohärente Beleuchtung kann beispielsweise eine gefilterte LED-Lichtquelle verwendet werden. Eine Anpassung der Kohärenzparameter ist notwendig, um den in der in-line holografischen Mikroskopie nötigen Interferenzkontrast zu erhalten, welcher bei einer Rekonstruktion des Objekts für die laterale Auflösung der Objektstrukturen ausschlaggebend ist. Eine nicht ausreichende Filterung der Quelle, und somit ein zu geringer Interferenzkontrast in der Hologrammebene, führt zu einer eingeschränkten Auflösung des holografischen Verfahrens.

Mikro-Kohärenz und Auflösungskriterium

Im Folgenden ist der quantitative Zusammenhang zwischen den räumlichen und zeitlichen Kohärenzlängen und der Auflösungsgrenze thematisiert.

Abbildung 16 zeigt die geometrischen Zusammenhänge im Strahlengang, basierend auf dem schematischen Aufbau der verwendeten in-line Anordnung. Es wird ein punktförmiges Einzelobjekt angenommen, da jede ausgedehnte Objektstruktur einer realen Probe durch eine Summe solcher punktförmiger Objekte dargestellt werden kann. Nach dem in der kohärenten Wellenoptik geltenden Superpositionsprinzip werden die komplexwertigen Amplituden der einzelnen Punkt-Objektwellen aufsummiert und formen die komplexe Objektwelle. Das punktförmige Einzelobjekt erzeugt eine sphärische Objektwelle, welche sich im Abstand z hinter der Objektebene mit der ungestörten Referenzwelle überlagert und in der Hologrammebene durch Interferenz das Hologramm erzeugt. Das dabei entstehende Hologramm entspricht im Aussehen der Fresnelschen Zonenplatte [37]. Der lokale Interferenzkontrast ist durch den raumzeitlichen Kohärenzgrad gegeben. Die zwischen der Objekt- und der Referenzwelle auftretenden Laufzeitunterschiede Δs müssen kleiner oder gleich der

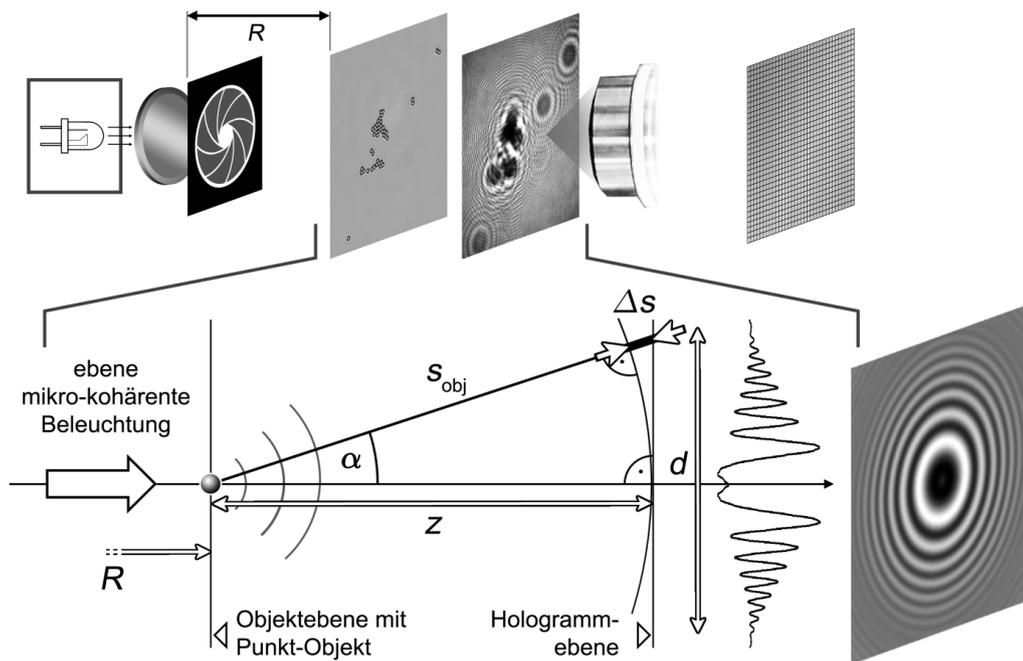


Abb. 16: Geometrie der Strahlengänge im verwendeten Aufbau für digitale in-line holografische Mikroskopie. Ein mikro-kohärent beleuchtetes Punkt-Objekt in der Objektelebene erzeugt eine sphärische Objektwelle, welche sich mit der ungestörten Referenzwelle in der Hologrammebene überlagert und durch Interferenz das Hologramm (Fresnelsche Ringe) erzeugt. Der Interferenzkontrast wird durch die zeitliche und die räumliche Kohärenz bestimmt. Der Gangunterschied Δs zwischen der Objekt- und der Referenzwelle darf nicht größer sein als die zeitliche Kohärenzlänge L_{coh} . Der Durchmesser d muss innerhalb des Kohärenzdurchmessers D_{coh} liegen, wenn es zur Interferenz kommen soll. Der dabei aufgespannte Halbwinkel α bestimmt die numerische Apertur der partiell-kohärenten Beleuchtung und ist maßgebend für die Auflösbarkeit des rekonstruierten Objekts.

(zeitlichen) Kohärenzlänge L_{coh} sein, um einen ausreichenden Interferenzkontrast zu erzeugen. Die laterale Ausdehnung d des Punkt-Hologramms ist auch durch den (räumlichen) Kohärenzdurchmesser D_{coh} limitiert. Der Abstand z zwischen der Objekt- und der Hologrammebene ist klein gegen den Abstand der Lichtquelle zur Objektebene ($z \ll R$), so dass die Größe des Kohärenzdurchmessers in diesen beiden Ebenen näherungsweise gleich ist. Des Weiteren sind das Bildfeld sowie die Ausdehnung d der Hologrammebene klein gegen den Quellabstand R ($d \ll R$), weshalb angenommen wird, dass die Objektebene bei dieser Anordnung näherungsweise von einer ebenen Welle beleuchtet wird.

Beide Kohärenzparameter bestimmen somit den Bereich, in welchem ein ausreichender Interferenzkontrast vorhanden ist. Dabei ist ein Abfall des Kontrasts für einen zunehmenden Abstand von der optischen Achse zu erkennen, auf der sich das Punkt-Objekt befindet. Das Vorhandensein von Interferenzen ist ein notwendiges Kriterium für das interferenzoptische Prinzip der Holografie. Eine Annahme für die Rekonstruktion in-line holografischer Bilder ist, dass das Objekt nur eine kleine Störung der Beleuchtung verursacht ($I_{\text{obj}} \ll I_{\text{ref}}$). Es wird angenommen, dass ein relativ schwacher Interferenzkontrast ausreichend ist, um das Objekt zu rekonstruieren. Daraus ergeben sich die Wahl des Kohärenzkriteriums sowie die Größe des Kohärenzdurchmessers und der Kohärenzlänge. Für die Betrachtung zur räumlichen Kohärenz wird das Kohärenzkriterium $m = 0,61$ gewählt (siehe Kapitel 2.1 und Formel (2.11)). Bei kreisrunden Lichtquellen entspricht dies der ersten Nullstelle einer Airy-scheibchenförmigen räumlichen Kohärenzfunktion, womit sich ein räumlicher Kohärenzgrad von $|\gamma_{12}| \approx 0$ ergibt. Für die zeitliche Kohärenz wird für die Kohärenzlänge L_{coh} der doppelte Wert aus Formel (2.8) angenommen, welcher an die Halbwertsbreite der zeitlichen Kohärenzfunktion gekoppelt ist. Bei gaußförmigen Spektren entspricht dies einem zeitlichen Kohärenzgrad von $|\gamma(\tau)| \approx 6,25\%$.

Der Bereich von auswertbaren Interferenzen mit ausreichendem Kontrast ist in Abbildung 16 durch den Parameter d charakterisiert. Zusammen mit der Strecke s_{obj} , welche die Objektwelle zurücklegt, ergibt sich ein Aperturwinkel α und somit eine numerische Apertur NA_{holo} für das Hologramm durch:

$$\text{NA}_{\text{holo}} = \sin \alpha = \frac{d}{2 s_{\text{obj}}} . \quad (4.5)$$

Der maximale Wegunterschied zwischen der Objekt- und der Referenzwelle ist durch $\Delta s = s_{\text{obj}} - z$ gegeben. Wenn dieser durch die Kohärenzlänge L_{coh} limitiert ist ($\Delta s \equiv L_{\text{coh}}$), folgt für die numerische Apertur $\text{NA}_{\text{holo}}(L_{\text{coh}}, z)$ [61]:

$$\text{NA}_{\text{holo}}(L_{\text{coh}}, z) = \frac{d}{2 s_{\text{obj}}} = \frac{\sqrt{s_{\text{obj}}^2 - z^2}}{s_{\text{obj}}} = \frac{\sqrt{1 + \frac{2z}{L_{\text{coh}}}}}{1 + \frac{z}{L_{\text{coh}}}} . \quad (4.6)$$

Für den Fall, dass der Kohärenzdurchmesser D_{coh} die Ausdehnung des Interferogramms limitiert ($d \equiv 2 D_{\text{coh}}$), ergibt sich hingegen folgende Abhängigkeit der numerischen Aper-

tur $\text{NA}_{\text{holo}}(D_{\text{coh}}, z)$ [61]:

$$\text{NA}_{\text{holo}}(D_{\text{coh}}, z) = \frac{d}{2 s_{\text{obj}}} = \frac{d}{\sqrt{d^2 + 4 z^2}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{z}{D_{\text{coh}}}\right)^2}}. \quad (4.7)$$

Die numerische Apertur des gesamten Systems berechnet sich aus der kleinsten numerischen Apertur von Beleuchtung und Detektion. So können neben einer begrenzten Kohärenz der Beleuchtung auch Begrenzungen seitens der Detektion bestehen. Ein zur vergrößerten Abbildung genutztes Objektiv kann das Auflösungsvermögen des Interferenzmusters beschränken. Aber auch durch den technisch limitierten Pixelabstand des digitalen Kamerasensors ergibt sich ein begrenzter Aufnahmewinkel für das Hologramm. Letzteres ist vor allem bei der Entwicklung von Anordnungen für die *linsenlose* digitale in-line holografische Mikroskopie von besonderer Bedeutung [78, 79]. Für die kleinste noch auflösbare Gitterstruktur ergibt sich basierend auf Formel (4.4) folgender Zusammenhang [61]:

$$p_{\text{min}} = \frac{\lambda}{\min \{ \text{NA}_{\text{holo}}(L_{\text{coh}}, z), \text{NA}_{\text{holo}}(D_{\text{coh}}, z), \text{NA}_{\text{lens}}, \text{NA}_{\text{sensor}}, \dots \}}. \quad (4.8)$$

Das bedeutet, dass, abgesehen von einer limitierten Detektion, sowohl die zeitliche als auch die räumliche Kohärenz zur Auflösung der Objektstruktur beitragen. Der ausschlaggebende Kohärenzparameter ist dabei immer der, der die kleinere numerische Apertur bestimmt.

Numerische Untersuchung zur Auflösung

Um diese theoretischen Annahmen zu überprüfen, werden zunächst Simulationen gemacht. Für die Simulation wird ein künstliches Objekt entworfen, welches aus einer Anordnung von kleinen Löchern in einer halbtransparenten Maske besteht und die vier Buchstaben „IPHT“ darstellt. Es werden folgende Parameter verwendet: Wellenlänge $\lambda = 546 \text{ nm}$, Lochdurchmesser von 273 nm ($\frac{\lambda}{2}$) und Lochperiode $p_{\text{min}} = 1 \text{ }\mu\text{m}$. Um die Objektperiode nach der Rekonstruktion auflösen zu können, ist eine numerische Apertur von $\text{NA}_{\text{min}} \geq 0,546$ nötig.

Das Objekt wird in der Simulation mit einer ebenen, partiell-kohärenten Welle beleuchtet. Das Hologramm wird in einem Abstand $z = 50 \text{ }\mu\text{m}$ hinter dem Objekt auf der Basis von Formel (2.14) für die partiell-kohärente Vielstrahl-Interferenz berechnet. Dafür werden die Phasendifferenzen zwischen allen Lochblenden sowie der halbtransmittierten Referenzwelle und die jeweils wechselseitigen Kohärenzgrade $|\gamma_{12}(\tau)|$ für jeden Bildpunkt in der Hologrammebene berücksichtigt. Die anschließende Rekonstruktion des Kontrasthologramms erfolgt nach Formel (4.3 nach Kanka). Mithilfe der *angular spectrum* Methode wird die Ausbreitung der rekonstruierten Objektwelle zurück in die ursprüngliche Objektebene berechnet und anschließend das Intensitätsbild bezüglich der lateralen Auflösung untersucht. Dazu wird ein Intensitätsschnitt durch die periodische Objektstruktur angefertigt.

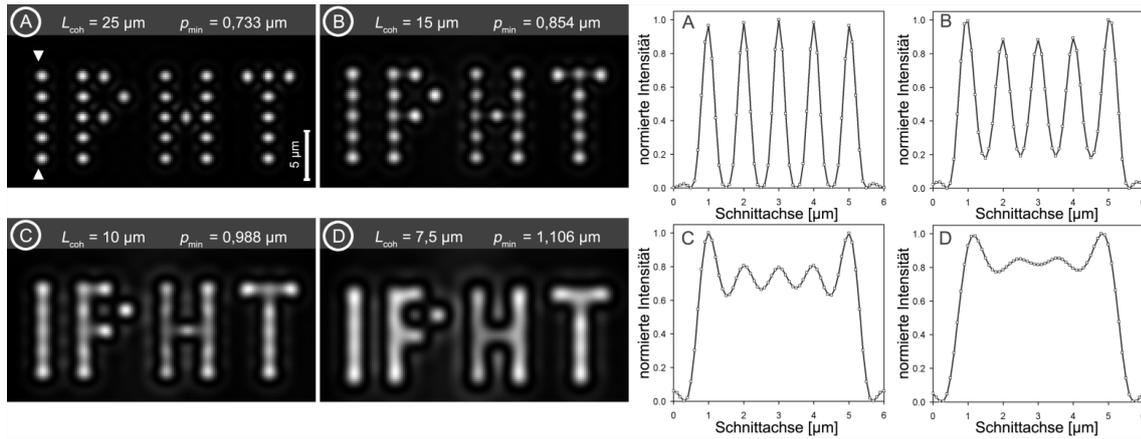


Abb. 17: Simulation von in-line holografisch mikroskopischer Bildgebung mit *zeitlich* partiell-kohärenter Beleuchtung; Die Kohärenzlänge L_{coh} wird im Mikrometerbereich variiert und die Auflösbarkeit einer Struktur mit $1 \mu\text{m}$ Periode untersucht. Dazu werden Schnitte (rechts) für die rekonstruierten Intensitätsbilder (links) der simulierten Objektstruktur angefertigt. Die theoretisch auflösbare Periode p_{min} wird berechnet und mit den Rekonstruktionen verglichen. Um $1 \mu\text{m}$ Periode auflösen zu können, ist eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} \geq 9,7 \mu\text{m}$ nötig. Dies entspricht einer numerischen Apertur von $\text{NA}_{\text{min}} \geq 0,55$ bei einer Wellenlänge von 546 nm . Der Abstand zwischen Objekt- und Hologrammebene beträgt $z = 50 \mu\text{m}$.

Zunächst wird der Einfluss zeitlich partieller Kohärenz untersucht. Dazu wird der räumliche Kohärenzgrad $|\gamma_{12}| = 1$ gesetzt und die Kohärenzlänge L_{coh} zwischen $7,5 \mu\text{m}$ und $25 \mu\text{m}$ variiert. Abbildung 17 zeigt die rekonstruierten Objektstrukturen für verschiedene Werte von L_{coh} sowie die dazugehörigen Intensitätsschnitte zur Auswertung der Auflösbarkeit. Zudem wird die theoretisch auflösbare Periode p_{min} berechnet und mit der Rekonstruktion verglichen. Zum Erreichen der geforderten numerischen Apertur von $\text{NA}_{\text{min}} \geq 0,546$ ist nach Formel (4.6) eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} \geq 9,68 \mu\text{m}$ nötig. Die Simulationen bestätigen diesen Wert. Für eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 10 \mu\text{m}$ ist die Objektperiode, wenn im Kontrast auch nur schwach, aufgelöst. Für eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 7,5 \mu\text{m}$ ist die Objektperiode hingegen nicht mehr aufgelöst.

Um den Einfluss räumlich partieller Kohärenz zu untersuchen, wird der zeitliche Kohärenzgrad $|\gamma(\tau)| = 1$ gesetzt und der Kohärenzdurchmesser D_{coh} zwischen $29,0 \mu\text{m}$ und $70,7 \mu\text{m}$ variiert. Abbildung 18 zeigt die rekonstruierten Objektstrukturen für verschiedene Werte von D_{coh} sowie die dazugehörigen Intensitätsschnitte zur Auswertung der Auflösbarkeit. Analog zu einer Mindestgröße der zeitlichen Kohärenz wird für den Kohärenzdurchmesser ein Minimum von $D_{\text{coh}} \geq 32,6 \mu\text{m}$ berechnet. Auch hier bestätigen die Simulationen diesen Wert. Bei einem Kohärenzdurchmesser von $D_{\text{coh}} = 34,1 \mu\text{m}$ ist die Objektperiode noch aufgelöst, während die Auflösung bei einem Kohärenzdurchmesser von $D_{\text{coh}} = 29,0 \mu\text{m}$ nicht ausreicht, um mit einer Wellenlänge von 546 nm eine Periode von $1 \mu\text{m}$ zu rekonstruieren.

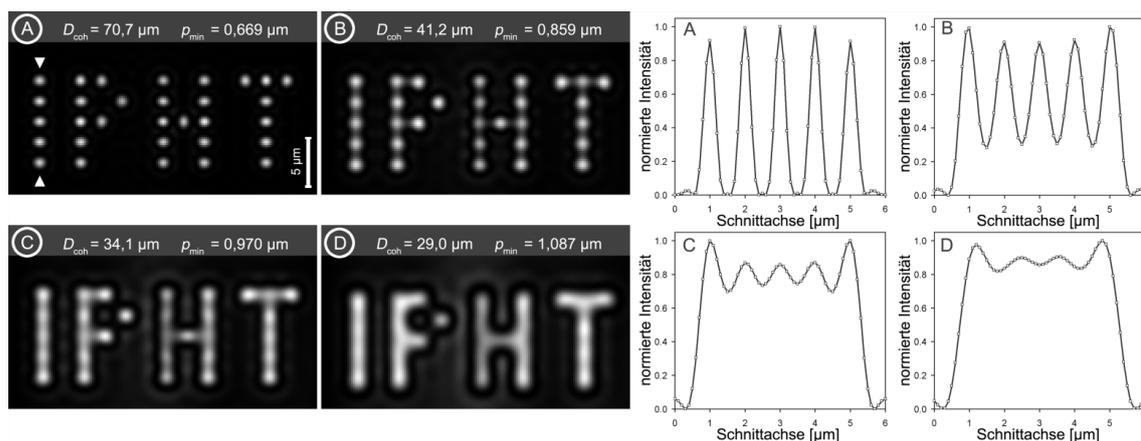


Abb. 18: Simulation von in-line holografisch mikroskopischer Bildgebung mit *räumlich* partiell-kohärenter Beleuchtung: Der Kohärenzdurchmesser D_{coh} wird im Mikrometerbereich variiert und die Auflösbarkeit einer Struktur mit $1 \mu\text{m}$ Periode untersucht. Dazu werden Schnitte (rechts) für die rekonstruierten Intensitätsbilder (links) der simulierten Objektstruktur angefertigt. Die theoretisch auflösbare Periode p_{min} wird berechnet und mit den Rekonstruktionen verglichen. Um $1 \mu\text{m}$ Periode auflösen zu können, ist ein Kohärenzdurchmesser von $D_{\text{coh}} \geq 32,6 \mu\text{m}$ nötig. Dies entspricht einer numerischen Apertur von $\text{NA}_{\text{min}} \geq 0,55$ bei einer Wellenlänge von 546 nm . Der Abstand zwischen Objekt- und Hologrammebene beträgt $z = 50 \mu\text{m}$.

Quantitative experimentelle Untersuchung zur Auflösung

Die in den Simulationen gezeigten Übereinstimmungen mit der Theorie sollen im Experiment überprüft werden. Dazu werden PMMA-Kugeln mit einem Durchmesser von $1,06 \pm 0,05 \mu\text{m}$ als Objekte verwendet. Die Struktur der selbstanordnenden Monolagen, welche bei der Probenpräparation entstehen können, ist durch ein hexagonales Muster gekennzeichnet. Durch diese hexagonale Anordnung entsteht eine effektive, minimale Objektperiode von $p_{\text{hex}} = \sqrt{\frac{3}{4}} p_{\text{beads}} = 0,918 \mu\text{m}$. Die PMMA-Kugeln sind dabei auf einem $170 \mu\text{m}$ dicken Deckglas aufgebracht und in der Objektebene des Mikroskops positioniert. Als Objektiv wird ein Zeiss Epiplan $50\times/0,70 \text{ HD}$ verwendet. Die damit abgebildete Hologrammebene liegt in einem Abstand $z = (30, 60 \text{ oder } 90) \mu\text{m}$ hinter der Objektebene. Es werden digitale Hologramme mit 1024×1024 Pixeln und einem rechnerischen Pixelpitch von $0,128 \mu\text{m}$ erfasst. Das Bildfeld in der Hologrammebene ist somit $(130 \mu\text{m})^2$ groß.

Wie in den Simulationen wird der Einfluss von zeitlich und räumlich partiell-kohärenter Beleuchtung getrennt voneinander untersucht. Zunächst wird die räumliche Kohärenz so eingestellt, dass der Kohärenzdurchmesser nicht der begrenzende Parameter ist. Die zeitliche Kohärenz wird durch eine geeignete Kombination von Lichtquellen und spektralen Filtern variiert. Die Leuchtfeldblende am Mikroskop ist vollständig geschlossen ($\rho = 0,8 \text{ mm}$), wodurch der Kohärenzdurchmesser auf $D_{\text{coh}} = 88,6 \mu\text{m}$ ($m = 0,61$) eingestellt wird. Als Lichtquelle kommt eine LED (Zeiss Colibri, $\lambda = 465 \text{ nm}$) mit zwei verschiedenen Filtern (LC-465BP4 mit $\Delta\lambda = 4 \text{ nm}$, Schott GG455 mit $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$) zum Einsatz. Außerdem wird eine Halogenlampe (Zeiss HAL 100, $\lambda = 546 \text{ nm}$) mit einem Bandpassfilter (Zeiss

BP546/12 mit $\Delta\lambda = 12$ nm) verwendet. Die Kohärenzlängen werden somit auf folgende Werte für $|\gamma(\tau)| \approx 6,25$ % justiert: $L_{\text{coh}} = 45,1$ μm und $L_{\text{coh}} = 7,1$ μm (LED) sowie $L_{\text{coh}} = 25,9$ μm (Halogenlampe).

Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 19 gezeigt. Exemplarisch sind für verschiedene Parameterkombinationen von Kohärenzlänge L_{coh} und Abstand z der Hologrammebene die rekonstruierten Kontrasthologramme als Intensitätsbild dargestellt. Die Überprüfung der lateralen Auflösbarkeit erfolgt anhand von Intensitätsschnitten, welche für drei ausgewählte Parameterkombinationen ebenfalls dargestellt sind (Ansichten A–C). Die auf Formel (4.8) basierenden Theoriewerte für die maximal erreichbare Auflösung p_{min} werden berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen. Die kleinste Periode von $p_{\text{min}} = 0,664$ μm ist dabei nicht durch die Kohärenzlänge, sondern durch die limitierte numerische Apertur der Detektionslinse ($\text{NA}_{\text{lens}} = 0,7$) begrenzt. Der Vergleich zeigt eine sehr gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment.

Das gleiche Experiment wird mit räumlich partiell-kohärenter Objektbeleuchtung wiederholt. Die zeitliche Kohärenz wird so eingestellt, dass sie nicht mehr der limitierende Parameter ist. Dazu wird die LED-Lichtquelle zusammen mit einem schmalbandigen Filter (LC-465BP4) und daraus folgend mit einer Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 45,1$ μm verwendet. Der Kohärenzdurchmesser ist durch die Größe der Leuchtblende am Mikroskop variabel. Mit den Blendendurchmessern $\rho = 0,8$ mm, 1,6 mm und 2,9 mm wird der Kohärenzdurchmesser in der Objektebene auf $D_{\text{coh}} = 88,6$ μm , 44,3 μm und 24,7 μm für ein Kohärenzkriterium von $m = 0,61$ und eine Wellenlänge von $\lambda = 465$ nm eingestellt. Die Auswertung der experimentellen Ergebnisse erfolgt in gleicher Weise wie zuvor bei Variation der zeitlichen Kohärenz und ist in Abbildung 20 gezeigt. Auch hier ist eine gute Übereinstimmung von theoretischen und experimentellen Werten nachweisbar. Lediglich eine Messung ($D_{\text{coh}} = 24,7$ μm und $z = 60$ μm) zeigt eine Abweichung von Theorie und Experiment. Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, dass die reale Kohärenzfunktion einen nahezu Airy-scheibchenförmigen Verlauf besitzt. Nach der ersten Nullstelle dieser Funktion, welche hier als Kohärenzkriterium angesetzt wurde, kommt es zu einem erneuten Anstieg des Interferenzkontrasts bis auf fast 10 % im ersten Nebenmaximum. Die entstehenden Interferenzen aus diesem Nebenmaximum können zum Informationsgehalt des Hologramms beitragen, auch wenn sie außerhalb der festgelegten Kohärenzfläche liegen. Unter Berücksichtigung dieses ersten Nebenmaximums würde die numerische Apertur $\text{NA}_{\text{holo}}(D_{\text{coh}}, z)$ größer ausfallen als theoretisch zu erwarten ist und die Auflösung würde besser werden. Im Vergleich aller Messungen liegen die angesetzten Kohärenzkriterien für die Größe der Kohärenzlänge ($|\gamma(\tau)| \approx 6,25$ %) und des Kohärenzdurchmessers ($|\gamma_{12}| \approx 0$ %) dennoch in einem guten Bereich, was die Übereinstimmung von Theorie und Experiment bestätigt.

Abschließend werden alle Messwerte unter Berücksichtigung der experimentellen Grenzen (numerische Apertur sowie Bildfeldbegrenzung des verwendeten Objektivs) mit der theoretisch erreichbaren numerischen Apertur verglichen. Abbildung 21 zeigt eine Gegen-

Zeitliche Kohärenz und Auflösungskriterium

Test Objekt: 1,06 μm PMMA beads in hexagonaler Anordnung
 Test Periode: $p_{\text{hex}} = 0,918 \mu\text{m}$

Experimentelles Ergebnis: \checkmark = aufgelöst \times = nicht aufgelöst

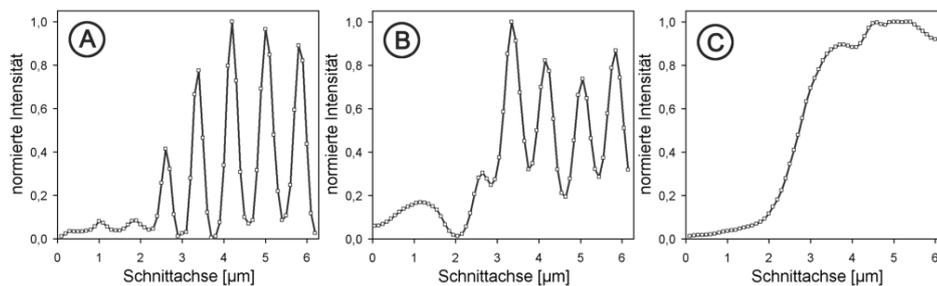
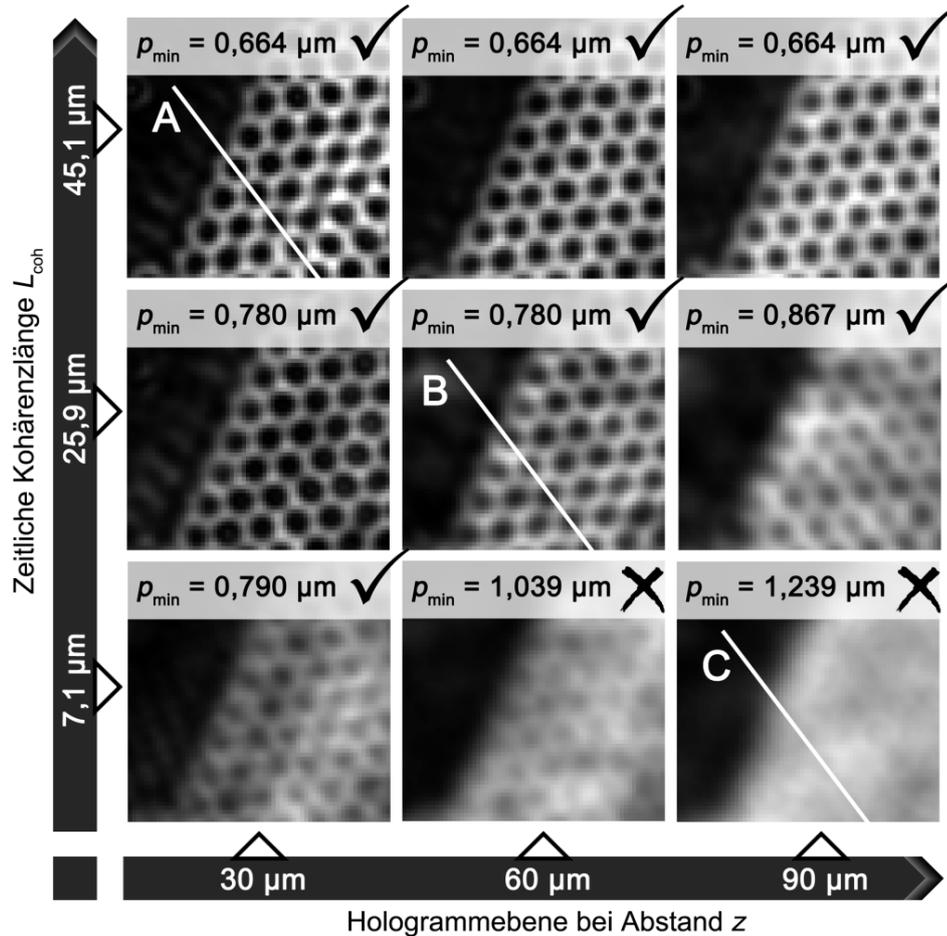


Abb. 19: Experimente zur in-line holografischen Mikroskopie mit variabler, *zeitlich* partiellkohärenter Beleuchtung: Die Kohärenzlänge L_{coh} wird im Mikrometerbereich von 7,1 μm bis 45,1 μm ($|\gamma(\tau)| \approx 6,25 \%$) variiert und die Auflösbarkeit einer Struktur mit 0,92 μm (hexagonaler) Periode untersucht. Die Struktur ist bei geringer Kohärenz und größerem Hologrammabstand nicht aufgelöst. Bei größeren Kohärenzlängen und kürzeren Hologrammabständen verbessert sich die Auflösung. Die theoretisch auflösbare Periode p_{min} wird berechnet und mit den Rekonstruktionen verglichen. Der verwendete räumliche Kohärenzdurchmesser ist mit $D_{\text{coh}} = 88,6 \mu\text{m}$ nicht der limitierende Parameter.

Räumliche Kohärenz und Auflösungskriterium

Test Objekt: 1,06 μm PMMA beads in hexagonaler Anordnung
 Test Periode: $p_{\text{hex}} = 0,918 \mu\text{m}$

Experimentelles Ergebnis: \checkmark = aufgelöst \times = nicht aufgelöst

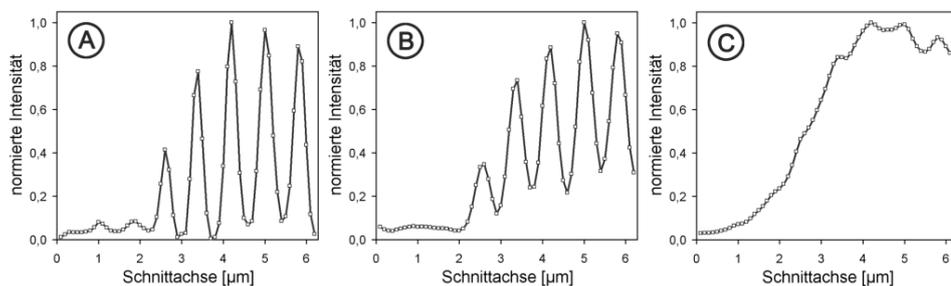
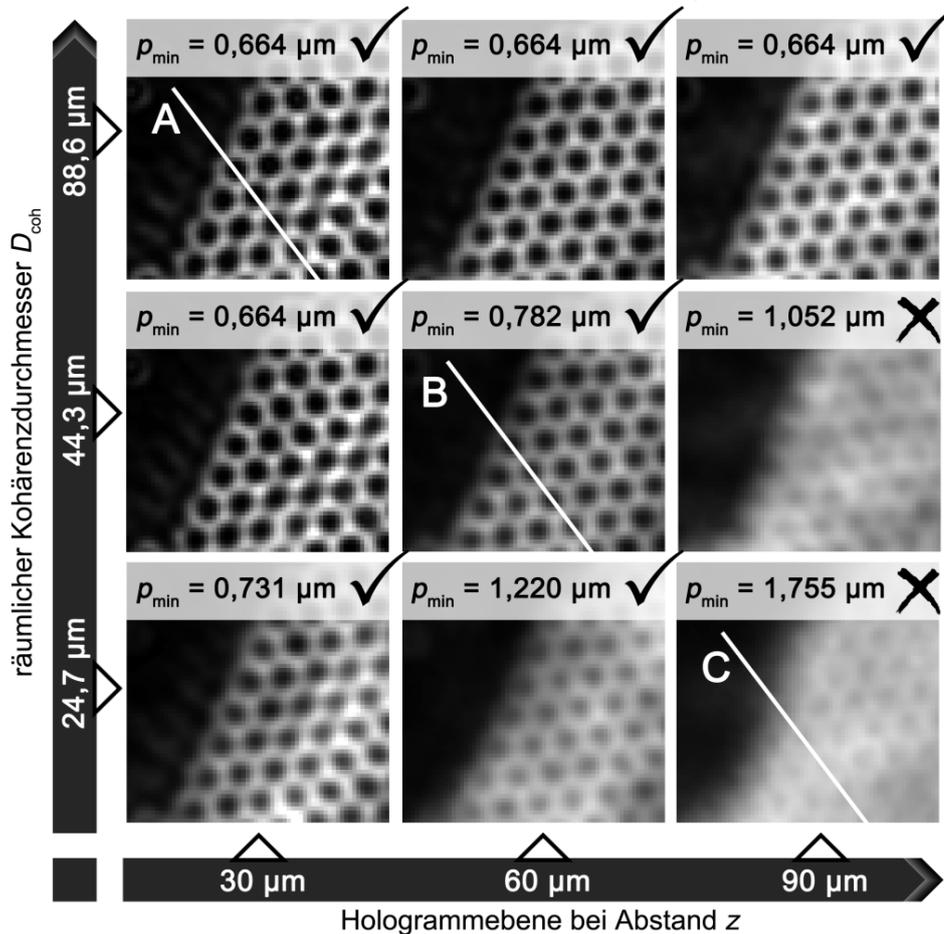


Abb. 20: Experimente zur in-line holografischen Mikroskopie mit variabler, *räumlich* partiell-kohärenter Beleuchtung: Der Kohärenzdurchmesser D_{coh} wird im Mikrometerbereich von 24,7 μm bis 88,6 μm ($|\gamma_{12}| \approx 0 \%$) variiert und die Auflösbarkeit einer Struktur mit 0,92 μm (hexagonaler) Periode untersucht. Die Struktur ist bei geringer Kohärenz und größerem Hologrammabstand nicht aufgelöst. Bei größeren Kohärenzdurchmessern und kürzeren Hologrammabständen verbessert sich die Auflösung. Die theoretisch auflösbare Periode p_{min} wird berechnet und mit den Rekonstruktionen verglichen. Die verwendete zeitliche Kohärenzlänge ist mit $L_{\text{coh}} = 45,1 \mu\text{m}$ nicht der limitierende Parameter.

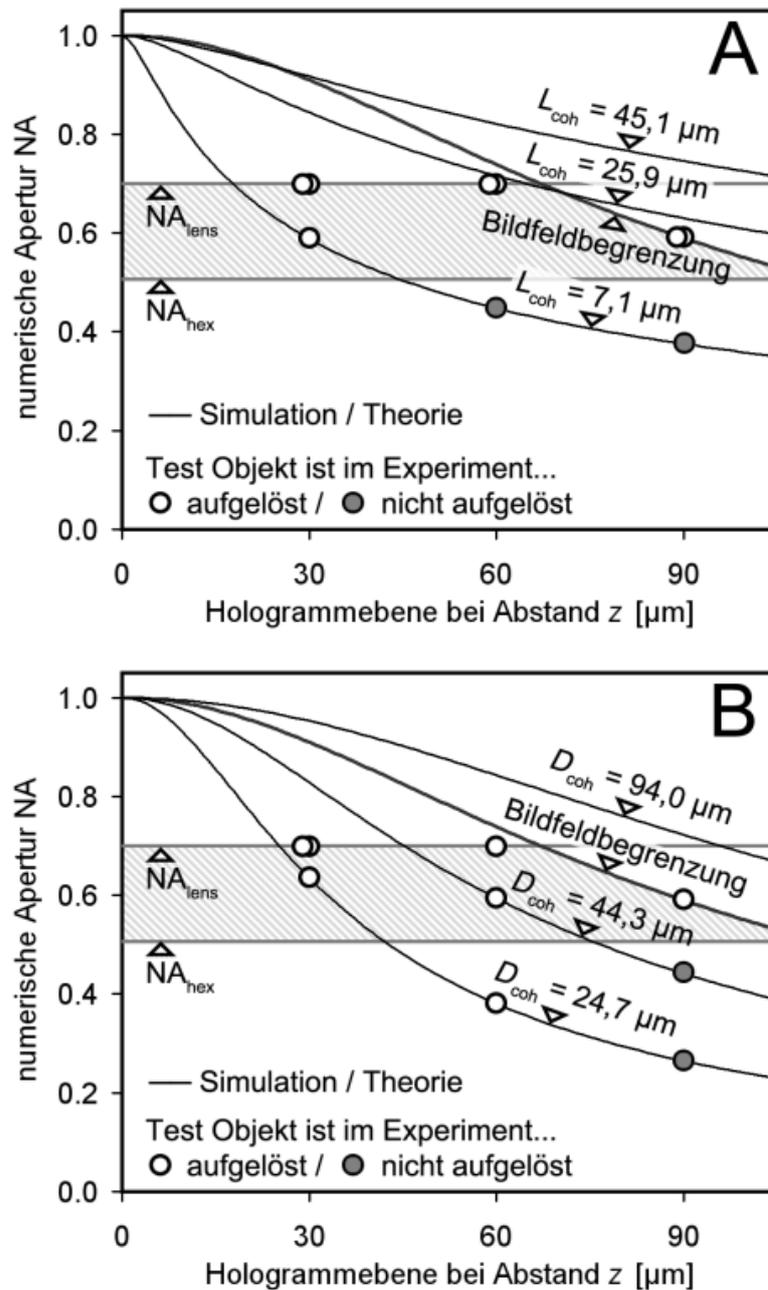


Abb. 21: Vergleich zwischen den experimentellen Ergebnissen und den theoretischen Kurven für zeitlich partiell-kohärente Beleuchtung (A) und räumlich partiell-kohärente Beleuchtung (B). Die numerischen Aperturen aller auftretenden Parameter (Kohärenz, Objektiv, Bildfeld) sind berücksichtigt. Um die hexagonale Objektperiode $p_{\text{hex}} = 0,92 \mu\text{m}$ auflösen zu können, ist eine numerische Apertur $NA_{\text{hex}} = 0,51$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 465 \text{ nm}$ nötig. Die Verläufe der Kohärenzlängen L_{coh} und der Kohärenzdurchmesser D_{coh} basieren auf Formel (4.8). Die schraffierte Fläche zeigt jeweils den optimalen Bereich bei angepasster Kohärenz an. Dieser Bereich ist einerseits durch die benötigte numerische Apertur zur Auflösung der Objektstrukturen vorgegeben und andererseits durch die numerische Apertur des Objektivs (NA_{lens}) sowie das Bildfeld begrenzt. Liegt der eingestellte Kohärenzparameter unterhalb dieser Fläche, reicht die Kohärenz nicht aus, um das rekonstruierte Objekt aufzulösen. Wird ein Kohärenzparameter zu groß gewählt, können kohärenzverursachte Störungen die Bildqualität erheblich mindern.

überstellung von experimentellen Daten und theoretischen Kurvenverläufen. Dabei ist die benötigte numerische Apertur durch die hexagonale Objektperiode $p_{\text{hex}} = 0,918 \mu\text{m}$ vorgegeben. Bei einer verwendeten Wellenlänge von $\lambda = 465 \text{ nm}$ wird eine numerische Apertur von $\text{NA}_{\text{hex}} = 0,51$ benötigt. Eine obere Grenze ist einerseits durch die numerische Apertur des Objektivs ($\text{NA}_{\text{lens}} = 0,7$) und andererseits durch die Größe des Bildfelds $(130 \mu\text{m})^2$ gegeben. Diese obere und untere Grenze umschließen einen Bereich (im Diagramm schraffiert dargestellt), welcher für die Wahl des jeweiligen Kohärenzparameters als Optimum angesehen werden kann. Kohärenzparameter ($L_{\text{coh}}, D_{\text{coh}}$), die unterhalb dieses Bereichs liegen, reichen nicht aus, um bei der verwendeten Geometrie die benötigte numerische Apertur zur Auflösung der Objektstrukturen zu gewährleisten. Kohärenzparameter, die oberhalb dieses Bereichs liegen, reichen zwar zur Auflösung aus, können aber aufgrund eines zu hohen Kohärenzgrads zu Bildstörungen wie Interferenzen aus Mehrfachreflexionen oder Speckle führen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte beziehen sich immer auf eine in-line Anordnung mit *ebener* partiell-kohärenter Objektbeleuchtung. Eine abweichende Geometrie, wie sie etwa bei einer Pinhole-Beleuchtung mit *sphärischer* Welle auftritt [47, 78], bedarf einer Anpassung der Formeln (4.6) sowie (4.7). Eine Analyse der Impulsantwort eines solchen linsenlosen Systems bei partiell-kohärenter Beleuchtung wurde beispielsweise durch Gopinathan et al. [75] untersucht. Eine Anpassung der Kohärenz führt auch bei einem linsenlosen Aufbau zur Verbesserung der Bildqualität. Durch den Einsatz des kohärenzmodulierbaren Lasers Toptica iPulse konnte erstmals eine numerische Apertur von $\text{NA} = 0,8$ in der *linsenlosen* digitalen in-line holografischen Mikroskopie erreicht werden [80].

4.3 Signal-Rausch-Analyse und Bildaufnahmen mit Videorate

Wie in Kapitel 3 bereits dargelegt, ist das durch Filterprozesse eingestellte Kohärenzvolumen über die spektrale Strahlungsstromdichte an eine *Bestrahlungsstärke* gekoppelt, welche für jede Lichtquelle einen charakteristischen Wert annimmt. Dabei gilt, dass sich mit zunehmender Schmalbandigkeit des Filters einerseits das Kohärenzvolumen vergrößert und andererseits die Bestrahlungsstärke abnimmt. Die resultierende Bestrahlungsstärke (gemessen in $[\text{W}/\text{m}^2]$ oder $[\text{Photonen}/\text{Pixel}/\text{s}]$) bestimmt zusammen mit der Belichtungszeit t_{exp} des Detektors die *Bestrahlung*, welche durch die Bestrahlungsenergie pro Fläche definiert ist (gemessen in $[\text{J}/\text{m}^2]$ oder $[\text{Photonen}/\text{Pixel}]$). Die Sensitivität und das Rauschverhalten des Detektors bestimmen dann das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Praktikabilität der gewünschten mikro-kohärenten Lichtquelle. Die Ursachen und die Charakterisierung von Rauschen bei der holografischen Bildgebung waren Gegenstand früherer Studien [81–85]. Dabei wurden grundlegende Aussagen über thermisches sowie Schrot- und Quantisierungsrauschen getroffen und Methoden zur Rauschreduzierung diskutiert.

Bei den hier zuvor gezeigten, digitalen Hologrammaufnahmen mit Belichtungszeiten von teilweise mehreren Sekunden ist das Signal-Rausch-Verhältnis immer ausreichend hoch (> 20 dB). Im Folgenden soll der Einfluss der Belichtungszeit bei zuvor festgelegtem Kohärenzvolumen analysiert werden. Es soll untersucht werden, wo die praktische Grenze beim Einsatz von gefilterten Lichtquellen liegt und welche Belichtungszeiten erreicht werden können.

Signal-Rausch-Analyse

Zur Untersuchung des experimentellen Signal-Rausch-Verhältnisses werden die beiden im Experiment auftretenden Rauschquellen, das Photonenrauschen der Lichtquelle und das Detektorrauschen der Kamera, gleichermaßen berücksichtigt. Das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis setzt sich aus beiden Teilen basierend auf Formel (3.5) und Formel (2.18) zusammen [86]:

$$\text{SNR}_{\text{Hologramm}} = \frac{I_{\text{max}} - I_{\text{min}}}{\sqrt{I_{\text{max}} + 2 \sigma_v}}. \quad (4.9)$$

Dabei wird im Hologramm nicht der Maximalwert allein, sondern die Differenz von Maximum und Minimum als Signal (hier in *digital counts* oder Photonen) bewertet. Die im Hologramm gespeicherte Information basiert nicht allein auf Intensitätsmaxima, sondern auf einer lokalen Modulation der Intensität um einen Mittelwert. Der Wurzelterm im Nenner beschreibt den Rauschanteil der Lichtquelle, welcher als Photonenrauschen betrachtet wird. Der zweite Summand im Nenner ist durch den Rauschanteil des Detektors gegeben, welcher anhand der Standardabweichung σ_v eines Dunkelbilds bestimmt wird. Alle hier verwendeten Parameter werden experimentell gemessen.

Für die experimentelle Untersuchung wird ebenfalls eine Gruppierung von $1,06 \mu\text{m}$ großen PMMA-Kugeln als Objekt verwendet. Die in Kapitel 4.2 vorgestellte Anordnung

wird beibehalten. Als Lichtquelle kommt die LED-Lichtquelle (Zeiss Colibri) zusammen mit dem Bandpassfilter (LC-465BP4) zum Einsatz. Der Abstand z zwischen Objekt- und Hologrammebene beträgt $z = 50 \mu\text{m}$. Zur vergrößerten Abbildung wird ein 50-fach Objektiv (Zeiss Epiplan $50\times/0,70$ HD) mit einer numerischen Apertur von 0,7 verwendet. Zur Auflösung der hexagonalen Objektstruktur ist bei der verwendeten Wellenlänge $\lambda = 465 \text{ nm}$ eine numerische Apertur von $\text{NA}_{\text{hex}} = 0,51$ nötig. Nach Formel (4.6) und Formel (4.7) ergeben sich daraus eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} \geq 8,0 \mu\text{m}$ und ein Kohärenzdurchmesser von $D_{\text{coh}} \geq 29,4 \mu\text{m}$. Im Experiment wird eine Kohärenzlänge von $L_{\text{coh}} = 45,1 \mu\text{m}$ ($|\gamma(\tau)| \approx 6,25 \%$) und ein Kohärenzdurchmesser von $D_{\text{coh}} = 44,3 \mu\text{m}$ ($|\gamma_{12}| \approx 0 \%$) gewählt und eingestellt. Die damit erreichbare numerische Apertur für das Hologramm liegt bei $\text{NA}_{\text{holo}} = 0,66$ und ist dabei durch die räumlich partielle Kohärenz begrenzt. Dieser Wert wird bewusst größer als die erforderliche NA_{hex} gewählt, einerseits, um einen guten Kontrast im rekonstruierten Objektbild zu erhalten, und andererseits, um experimentelle Reserven für größere Abstände ($z > 50 \mu\text{m}$) oder kleinere Objektgrößen ($p_{\text{min}} < 0,918 \mu\text{m}$) sicher zu stellen. Das Kohärenzvolumen ist somit $V_{\text{coh}} = 7,0 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$ groß. Die von der LED erzeugte Bestrahlungsstärke in der Objektebene liegt bei $0,11 \text{ W/m}^2$.

Es werden Hologramme mit 1024×1024 Pixeln und einem rechnerischen Pixelpitch von $0,128 \mu\text{m}$ aufgenommen. Zunächst werden sowohl die Signal-Rausch-Verhältnisse für das Photonenrauschen als auch für das Detektorrauschen bestimmt. Um das reine, rauschfreie Signal ($I_{\text{max}} - I_{\text{min}}$) abschätzen zu können, werden Bildserien mit jeweils 16 Aufnahmen von ein und derselben Szenerie unter gleichen Aufnahmebedingungen gemacht und gemittelt. Die 16-fache Mittelung entspricht einem 4-fach besseren Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber einer Einzelaufnahme und wird als näherungsweise rauschfrei angenommen. Aus der Wurzel des gemittelten Intensitätsmaximums wird der Rauschanteil des Photonenrauschens berechnet. Der Rauschanteil des Detektors ist anhand eines Dunkelbilds (Einzelaufnahme) für die jeweils gewählte Belichtungszeit messbar. Dabei wird die Standardabweichung σ_v , wie in Abbildung 6 gezeigt, bestimmt. Die Belichtungszeit wird im Bereich von 5 ms bis 5000 ms variiert. Die gemessenen Pixelwerte werden zunächst in Photonen pro Pixel umgerechnet und anschließend in die radiometrische Einheit Joule pro Quadratmeter umgeformt. Die berechneten Signal-Rausch-Verhältnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Im Vergleich beider Rauschquellen zeigt sich, dass für 53 detektierte Photonen ($1,35 \cdot 10^{-3} \frac{\text{J}}{\text{m}^2}$) das Quellrauschen und das Detektorrauschen zu einem vergleichbaren Signal-Rausch-Verhältnis von 4,8 dB führen. Da das Detektorrauschen mit der Belichtungszeit nur sehr gering ansteigt (Anstieg $< 0,1 \frac{dc}{s}$, σ_v zwischen 15 Photonen bei 5 ms und 17 Photonen bei 5000 ms), wird das $\text{SNR}_{\text{Detektor}}$ des Detektors mit zunehmender Belichtungszeit deutlich besser (bis 30 dB). Das Photonenrauschen hingegen nimmt mit $\sqrt{I_{\text{max}}}$ zu und erreicht deshalb nur ein $\text{SNR}_{\text{Photon}}$ von 18 dB. Für mehr als 53 detektierte Photonen pro Pixel ist das Quell- beziehungsweise Photonenrauschen demnach der limitierende Parameter. Beide Rauschgrößen ergeben zusammen das Signal-Rausch-Verhältnis $\text{SNR}_{\text{Hologramm}}$

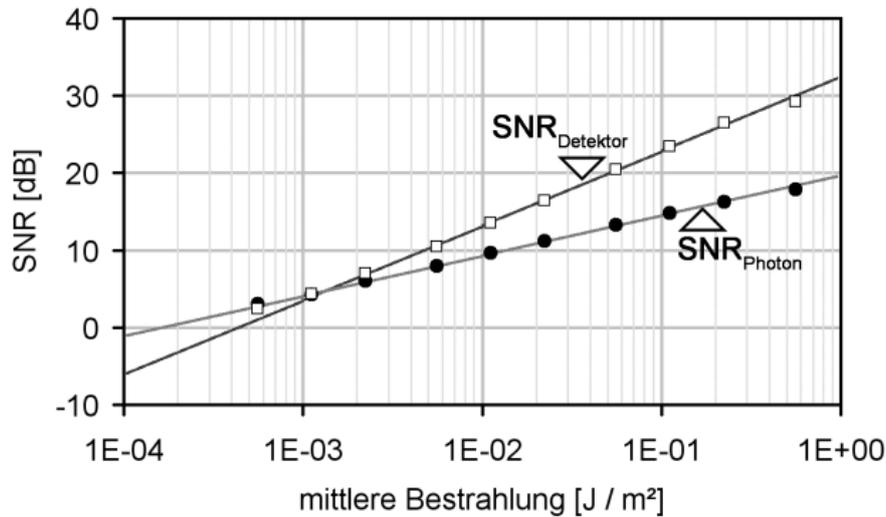


Abb. 22: Experimentell erreichte Signal-Rausch-Verhältnisse von (1) allen untersuchten Lichtquellen (LED, Halogen- und Quecksilberdampfampe und deren Photonenrauschen, $\text{SNR}_{\text{Photon}}$) und (2) dem verwendeten Sensor (Zeiss AxioCam MRm und dessen Detektorrauschen, $\text{SNR}_{\text{Detektor}}$), für verschiedene Belichtungszeiten und daraus folgend verschiedene Bestrahlungen. Für 53 detektierte Photonen sind beide Rauschanteile gleich groß, im Diagramm liegt der Schnittpunkt bei $1,35 \cdot 10^{-3} \frac{\text{J}}{\text{m}^2}$ und 4,8 dB. Für eine höhere Anzahl detektierter Photonen dominiert das Photonenrauschen, weshalb hier $\text{SNR}_{\text{Photon}} < \text{SNR}_{\text{Detektor}}$ ist.

des aufgenommenen Hologramms.

Die aufgenommenen Hologramme werden ohne vorherige Berechnung eines Kontrasthologramms rekonstruiert. Der Verzicht auf eine Berechnung des Kontrasthologramms ist hier insofern wichtig, da sich sonst bei der Differenzbildung nach Formel (4.3) mit der experimentell aufgenommenen Referenzwelle unkorrelierte Rauschterme überlagern und sich das resultierende Signal-Rausch-Verhältnis um einen Faktor $\sqrt{2}$ verringert. Zur Rekonstruktion wird eine ebene Welle angesetzt und für die Ausbreitung zurück in die Objektebene wird die *angular spectrum* Methode verwendet. Durch die bei der Wellenausbreitung auftretende Fokussierung der Objektwelle in der Objektebene kommt es zu einer Erhöhung des (Objekt-)Signals. Zudem führt die Bandbegrenzung bei der Wellenausbreitung zu einer Abschwächung des Rauschpegels, was auf eine Mittelung zwischen benachbarten Pixeln (Abschneiden evaneszenter Anteile) zurückzuführen ist. Insgesamt findet bei der Ausbreitung in die Objektebene eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses statt. Im Experiment liegt das $\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}}$ des rekonstruierten Intensitätsbilds um einen Faktor von etwa 2 (3 dB) über dem $\text{SNR}_{\text{Hologramm}}$ des Hologramms. Abbildung 23 zeigt die experimentell erreichten Signal-Rausch-Verhältnisse des Hologramms und der dazugehörigen Rekonstruktion für verschiedene Belichtungszeiten und somit verschiedene Bestrahlungen während der digitalen Aufnahme.

Abbildung 24 zeigt 128×128 Pixel ($16,4 \mu\text{m} \times 16,4 \mu\text{m}$) große Ausschnitte der rekonstruierten Objektwelle als normiertes Intensitätsbild für verschiedene Belichtungszeiten

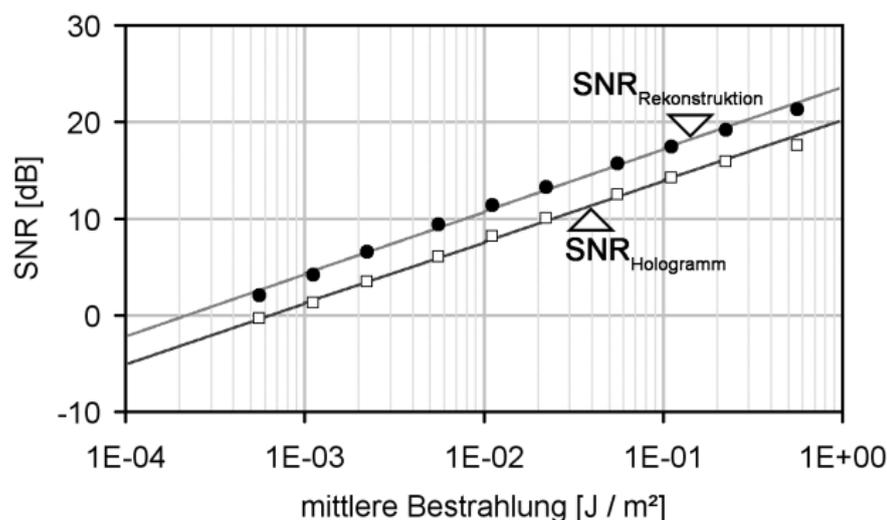


Abb. 23: Experimentell erreichtes Signal-Rausch-Verhältnis (1) im Hologramm ($\text{SNR}_{\text{Hologramm}}$) und (2) in der Rekonstruktion ($\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}}$) für verschiedene Belichtungszeiten und daraus folgend verschiedene Bestrahlungen. Die ermittelten Werte beziehen sich auf alle genutzten Lichtquellen (LED, Halogen- und Quecksilberdampfampe) und den Bildsensor (Zeiss AxioCam MRm) in der in Abbildung 14 gezeigten Anordnung. Durch die Rekonstruktion kommt es zu einer Verbesserung des SNR um etwa 3 dB, was einerseits an der Fokussierung der Objektwelle und andererseits an einer durch die bandbegrenzte Ausbreitung verursachten Mittelung benachbarter Pixel (Abschneiden evaneszenter Anteile) liegt.

und somit verschiedene Signal-Rausch-Verhältnisse. Es ist bemerkenswert, dass die Objektstruktur bereits bei einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis unterhalb von 10 dB visuell gut erkennbar ist. Gleichzeitig ist gezeigt, dass nicht der gesamte Dynamikumfang des Kamerasensors (volle Kapazität bei etwa 26.000 Photonen pro Pixel, volle Dynamik 12 bit) genutzt werden muss, um ein Hologramm zu detektieren. Bei den hier gezeigten Beispielen ist eine Dynamik von ≥ 4 bit im Hologramm (etwa ≥ 160 Photonen) bereits ausreichend, um eine visuell gut erkennbare Rekonstruktion zu erhalten. Diese Ergebnisse stehen im Ein-

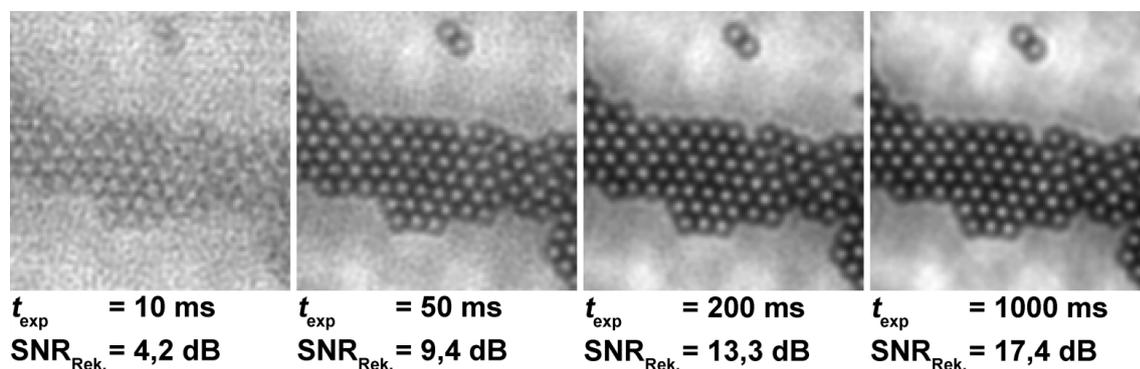


Abb. 24: Beispiele für Rekonstruktionen (Ausschnitte von 128×128 Pixeln bzw. $16,4 \mu\text{m} \times 16,4 \mu\text{m}$), welche mit verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommen werden und deshalb verschiedene Signal-Rausch-Verhältnisse erreichen. Bereits unterhalb von 10 dB sind die Objektstrukturen visuell gut erkennbar.

klung mit vorangegangenen Studien [87, 88], in welchen das Quantisierungsverhalten von digitalen Hologrammen untersucht wurde. Eine Dynamik von 4 bit (16 Graustufen) im Hologramm ist ausreichend, um Objekte darzustellen, welche näherungsweise durch eine binäre Hell-Dunkel-Struktur gekennzeichnet sind. Um Objekte mit nicht-binären Strukturen holografisch zu erfassen und deren Rekonstruktionen darzustellen, ist eine höhere Dynamik erforderlich.

Bildaufnahmen mit Videorate

Eine video-gestützte Erfassung von Daten wird in der Mikroskopie für die Teilchenverfolgung (engl. *particle tracking*) [89–92], aber auch für biologische Studien zur Zelldynamik [93–95] eingesetzt. Bei den vorangegangenen Studien [89–95] kamen ausschließlich Laser als Lichtquellen zum Einsatz, deren hoher Kohärenzgrad zu kohärenzverursachten Störungen führen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz einer angepassten mikro-kohärenten Beleuchtung das Auftreten solcher Störungen verhindert (vgl. dazu Abbildung 15 sowie [59–61]).

Ein Ergebnis ist die erreichte, minimale Belichtungszeit bei zuvor festgelegter Lichtquelle und den erforderlichen Systemparametern wie Kohärenzvolumen und Hologrammabstand. Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, ist eine Belichtungszeit von $t_{\text{exp}} = 50$ ms bereits ausreichend, um ein mittleres Signal-Rausch-Verhältnis (9,4 dB) zu erhalten. Diese kurze Belichtungszeit ermöglicht eine schnelle Bildaufnahme mit Bildwiederholraten von ≥ 20 Bildern pro Sekunde (engl. *frames per second*, fps). Damit ist eine Videoaufnahme von Hologrammen mit mikro-kohärenter Beleuchtung möglich.

Um den experimentellen Beweis zu dieser Aussage zu erbringen, werden Videoaufnahmen von Hologrammen gemacht. Die zuvor gesetzten Parameter werden beibehalten. Um eine dynamische Bewegung der PMMA-Kugeln zu erreichen, werden diese in eine Suspension aus Wasser und Ethanol gegeben. Der dabei entstandene, dünne Film auf dem Objektträger ist durch thermische Anregung (Beleuchtung) in einer ständigen inneren Bewegung (Konvektion). Zur Aufnahme wird die Kamera Zeiss AxioCam HRm verwendet, die sich vom zuvor genutzten Typ (Zeiss AxioCam MRm) insofern unterscheidet, dass sie ein schnelles Auslesen von Bilddaten ermöglicht. Dabei wird ein spezielles Software-Modul zum direkten Schreiben auf Festplatte (engl. *streaming*) genutzt. Die streaming-Geschwindigkeit hängt von der Auslesezeit des Kamerasensors und damit auch indirekt von der Größe des ausgelesenen Bildbereichs (engl. *region of interest* kurz ROI) ab. Für einen Ausschnitt von 1024×1024 Pixeln wird eine Auslesegeschwindigkeit von 14,2 fps erreicht. Bei einer Verkleinerung des Bildbereichs auf 512×512 Pixel erhöht sich die Auslesegeschwindigkeit auf 25,3 fps. Die Belichtungszeiten t_{exp} werden entsprechend dieser Werte auf 60 ms (für 14,2 fps) beziehungsweise 35 ms (für 25,3 fps) angepasst. Die zeitliche Lücke zwischen zwei Bildern entspricht dann der Auslesezeit der Kamera.

Abbildung 25 zeigt Einzelbildausschnitte aus jeweils 20 Sekunden langen Videosequen-

zen mit dem aufgenommenen Hologramm und der dazugehörigen Rekonstruktion. Die vollständigen Videosequenzen sind in [86] publiziert. Teilabbildung 25(A) stellt einen 512×512 Pixel großen Ausschnitt dar, welcher mit 25,3 fps aufgenommen wurde. Teilabbildung 25(B) zeigt die dazugehörige Rekonstruktion der Objektebene. Das Signal-Rausch-Verhältnis liegt bei dieser Aufnahme bei $\text{SNR}_{\text{Hologramm}} = 3,1$ dB im Hologramm und $\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}} = 8,0$ dB in der Rekonstruktion. In Teilabbildung 25(C) ist eine ähnliche Szene mit einem 1024×1024 Pixel großen Ausschnitt dargestellt, aufgenommen mit 14,2 fps. In Teilabbildung 25(D) ist die dazugehörige Rekonstruktion zu sehen. Das Signal-Rausch-Verhältnis liegt bei dieser Aufnahme bei $\text{SNR}_{\text{Hologramm}} = 5,6$ dB im Hologramm und $\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}} = 10,3$ dB in der Rekonstruktion. Es ist zu bemerken, dass bei diesen Aufnahmen zwar die Erfassung der Hologramme mit Videorate erfolgt, die Rekonstruktion der Einzelbilder inklusive der Ausbreitung zurück in die Objektebene und die Berechnung des Intensitätsbilds jedoch momentan noch jeweils ≥ 1 Sekunde pro Bild in Anspruch nimmt.

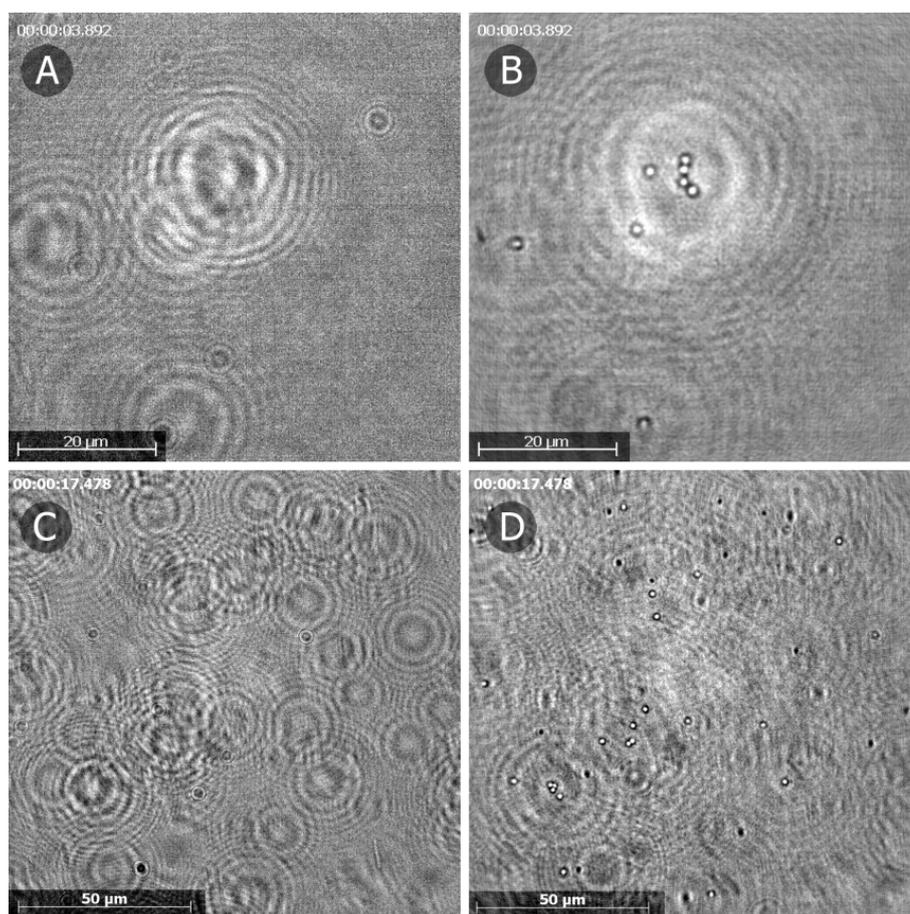


Abb. 25: Einzelbildausschnitte aus Videosequenzen: (A) 512×512 Pixel großes Hologramm, mit 25,3 fps aufgenommen, $\text{SNR}_{\text{Hologramm}} = 3,1$ dB. (B) Die dazu gehörige Rekonstruktion, $\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}} = 8,0$ dB. (C) 1024×1024 Pixel großes Hologramm, mit 14,2 fps aufgenommen, $\text{SNR}_{\text{Hologramm}} = 5,6$ dB. (D) Die dazu gehörige Rekonstruktion, $\text{SNR}_{\text{Rekonstruktion}} = 10,3$ dB.

5 Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung durch separierte Vielstrahl-Interferenz

5.1 Moderne Verfahren der hochauflösenden Weitfeldmikroskopie

Die klassische Auflösungsgrenze eines optischen Mikroskops ist durch die numerische Apertur des verwendeten Objektivs NA_{lens} sowie durch die verwendete Wellenlänge λ der Beleuchtung gegeben. Die numerische Apertur $NA = n \sin \alpha$ beschreibt den Halbwinkel α , unter dem das vom Objekt gebeugte Licht erfasst werden kann, wobei n der Brechungsindex des objekteinbettenden Mediums ist. Die absolute Grenze liegt bei einem Halbwinkel von 90° (Vollwinkel von 180°), womit der gesamte Objekt-Halbraum erfasst wird. Die Wellenlänge von optischem Licht liegt zwischen 400 nm und 700 nm und kann durch den Einsatz von hochbrechenden Medien wie beispielsweise Immersionsöl bis zu einem Faktor von etwa $n = 1,5$ verkürzt werden. Die Abbesche Beugungstheorie [31,32] zum Auflösungsvermögen von gitterartigen Strukturen besagt, dass die minimal auflösbare Gitterstruktur eine Periode von p_{\min} mit

$$p_{\min} = \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha} \quad (5.1)$$

besitzt, wobei in diesem Fall eine inkohärente Objektbeleuchtung vorausgesetzt wird. Daraus ergibt sich eine generelle Auflösungsgrenze im visuellen Spektralbereich bei etwa 150 nm bis 200 nm. Als Faustformel wird typischerweise $p_{\min} \approx \frac{\lambda}{2}$ angegeben.

Die beugungsbegrenzte Abbildung des Objektivs führt dazu, dass ein infinitesimaler Punkt im Objektraum nur verbreitert („verwaschen“) in den Bildraum abgebildet werden kann. Diese Abbildung kann mit einer optischen Transferfunktion oder mit der so genannten Punktbildverwaschungsfunktion (engl. *point spread function*, PSF) beschrieben werden. Die Transferfunktion beinhaltet das übertragbare Spektrum der Ortsfrequenzen des Objektraums. Eine Faltung der PSF mit der Objektfunktion im Ortsraum ergibt das übertragene Bild. Die Form dieser PSF lässt sich analytisch meist mit einer Airy-Funktion beschreiben, deren Halbwertsbreite die Auflösungsgrenze bedingt.

Die Größen von Zellstrukturen liegen in einem Bereich von einigen Mikrometern (z.B. Zellkern) bis zu einigen Nanometern (z.B. Aktin Filamente). Damit reichen sie bis zu einem

makromolekularen Maßstab, welcher deutlich unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze optischer Weitfeldverfahren liegt. Bisher wurden zur Analyse solcher Strukturen Nahfeld- oder Elektronenmikroskope verwendet, welche aber beide relativ kontrastarm sind. Sie können zudem nur oberflächennah eingesetzt werden und benötigen teilweise eine aufwendige Probenvorbereitung [96]. Um auch die Vorzüge optischer Weitfeldmikroskope nutzen zu können, wurden in den letzten Jahrzehnten Techniken und Verfahren entwickelt, um das Auflösungsvermögen von optischen Fernfeld-Mikroskopen zu verbessern.

Das Ziel besteht darin, durch den Einsatz spezieller Beleuchtungs- und Aufnahmetechniken sowie Auswertungen eine optische Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze des Objektivs zu erreichen. Dafür bieten sich verschiedene Vorgehensweise an, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

Eine Herangehensweise stützt sich auf die Annahme, dass ein *lokal separierbares* Beleuchtungsvolumen in der Probenebene unterhalb der Auflösungsgrenze liegt. Dieses wird zwar verwaschen abgebildet und detektiert, kann aber anschließend auf die ursprüngliche Größe zurückgerechnet werden. Die lokale Separation ist deshalb wichtig, weil nur jene Beleuchtungsvolumina rekonstruiert werden können, welche im Rahmen des Auflösungsvermögens des verwendeten Mikroskops auch eindeutig trennbar sind. Die Auswertung einzelner Punktobjekte, welche zwar verwaschen, aber dennoch voneinander trennbar detektiert werden können, war bereits im Jahre 1903 die Grundlage für die von Siedentopf und Zsigmondy entwickelte „Ultramikroskopie“ [97].

Die Erzeugung eines solchen lokal separierten Beleuchtungsvolumens kann direkt oder indirekt erfolgen. Zum einen kann das Beleuchtungsvolumen direkt durch eine gezielte Fluoreszenzauslöschung derart verkleinert werden, dass die übertragene Information grundsätzlich nur aus einem Volumen stammen kann, welches unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegt. Diese Vorgehensweise ist typisch für das *Stimulated Emission Depletion* (STED) Verfahren [98–100]. Zum anderen kann die Probe indirekt, stochastisch zum Leuchten gebracht und detektiert werden. Wenn einzelne Fluoreszenzmoleküle weit genug voneinander entfernt für sich allein detektierbar sind, kann aus deren PSF durch eine Schwerpunktbestimmung eine Lokalisierung erfolgen, welche unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze liegt. Diese Art der (indirekten) Beleuchtung und Auswertung wird bei der *photoactivated localization* Mikroskopie (PALM) [101] und bei der *stochastic optical reconstruction* Mikroskopie (STORM) [102, 103] angewandt.

All diese Verfahren (STED, PALM, STORM) benötigen für ihre Realisierung photoschaltbare Fluorophore. Die erreichten, lateralen Auflösungen reichen bis etwa 20 nm. Durch den Einsatz von hohen Strahlungsintensitäten, vor allem beim STED-Verfahren, kann es zum ungewollten Photobleichen der Fluorophore, aber auch zu irreversiblen Zellschädigungen kommen.

Eine andere Herangehensweise ist durch eine strukturierte Beleuchtung (engl. *structured illumination microscopy*, SIM) [104, 105] gegeben. Die Grundlagen hierfür wurden be-

reits 1963 von Lukosz und Marchand [106] gelegt. Dabei wird die optische Transferfunktion künstlich erweitert. Durch die Überlagerung eines sehr feinen, gerade noch auflösbaren Beleuchtungsgitters mit der noch feineren Gitterstruktur des Objekts entsteht ein Moiré-Muster. Das Moiré-Muster trägt unter anderem die Differenzfrequenz beider Gitter (vergleichbar mit einer Schwebung) in sich. Hohe Ortsfrequenzen, welche sonst außerhalb der optischen Transferfunktion liegen, werden dadurch zu tieferen Ortsfrequenzen verschoben und können dann vom Objektiv erfasst werden. Für eine Trennung von verschobenen, hohen Ortsfrequenzen und (nicht verschobenen) niedrigen Ortsfrequenzen muss ein Scan mit mindestens fünf verschiedenen Phasenlagen gemacht werden. Dies erfolgt in der Regel durch ein Verschieben (Abrastern) des Beleuchtungsgitters über die Probe. Eine zusätzliche Drehung des Beleuchtungsgitters in mindestens drei verschiedene Winkellagen ermöglicht die Hochauflösung in beiden lateralen Dimensionen. In der Rekonstruktion müssen diese verschobenen Frequenzen über ein Gleichungssystem voneinander separiert und an der ursprünglichen Stelle im Ortsfrequenzspektrum wieder eingefügt werden. Das rekonstruierte Ortsfrequenzspektrum des Objekts ist dann maximal doppelt so groß wie jenes, welches vom Objektiv übertragen werden kann. Die Auflösung kann dadurch höchstens um einen Faktor 2 verbessert werden.

Durch eine zusätzliche, nicht-lineare Intensitätsresponse von sättigbaren Fluorophoren unter hohen Beleuchtungsintensitäten können bei diesem Verfahren höhere Harmonische im Ortsfrequenzspektrum erzeugt und übertragen werden. Die Anzahl der benötigten Scanschritte muss dann entsprechend angehoben werden. Durch diese Nicht-Linearitäten kann eine laterale Auflösung bis 50 nm erreicht werden [107, 108].

Alle Verfahren haben gemein, dass sie die Information über das zu untersuchende Objekt durch *selektive* und *separierte* Beleuchtung und eine lineare oder nicht-lineare Fluoreszenzantwort erhalten. Durch diese Vorgehensweise wird ein Scan der Probe nötig, um die gesamte Probenfläche bzw. das Probenvolumen abzurastern. Alle Verfahren benötigen außerdem eine nachträgliche Aufbereitung (Rekonstruktion) der detektierten Bilddaten, da das Gesetz der beugungsbegrenzten Abbildung in jedem Fall gilt.

Eine strukturierte Beleuchtung über das gesamte Gesichtsfeld des Detektionsobjektivs bietet die höchstmögliche Parallelisierung bei der Aufnahme der Rohdaten in Form von nur wenigen Einzelbildern und besitzt deshalb ein hohes Potential für schnelle Bildaufnahmen und eine geringe Probenbelastung. Außerdem ist eine (lineare) strukturierte Beleuchtung auch ohne Fluoreszenz denkbar, während STED, PALM und STORM speziell schaltbare Fluorophore benötigen [109].

5.2 Strukturierte Beleuchtung durch planare Array-Chips

In der Praxis wird für eine strukturierte Beleuchtung meist der Auflicht-Strahlengang verwendet [107,110]. Die Beleuchtung der Probe erfolgt dabei durch dasselbe Objektiv, welches auch zur Detektion verwendet wird. Dazu wird meist ein Amplituden- oder Phasen-Gitter in einer konjugierten Bildebene des Objektivs positioniert und auf die Probe abgebildet. Die Abbildung erfolgt unter dem höchstmöglichen, objektivbedingten Aperturwinkel. Die so erzeugte Beleuchtungsstruktur, meist ein Liniengitter mit \sin^2 -förmiger Intensitätsmodulation, besitzt dann die kleinste noch auflösbare Gitterperiode. Durch einen Scan der Beleuchtung innerhalb der Probenebene und eine anschließende Rekonstruktion kann das Auflösungsvermögen des verwendeten Objektivs maximal um einen Faktor 2 gesteigert werden [105]. Mithilfe einer zusätzlichen Gitter-Modulation entlang der optischen Achse kann die Tiefenauflösung ebenfalls erhöht werden [110]. Mit zusätzlichen Nicht-Linearitäten kann eine weitere Verbesserung der Auflösung erreicht werden [107,108]. Dazu sind einerseits hohe Laserleistungen und andererseits nicht-linear reagierende Substanzen (in der Regel spezielle Fluoreszenzmarker) nötig. Generell ist beim Auflicht-Strahlengang die numerische Apertur der Beleuchtung gleich der numerischen Apertur der Detektion. Da eine möglichst hohe Auflösung erreicht werden soll, kommen ausschließlich Immersionsobjektive mit sehr hoher numerischer Apertur ($NA \geq 1,3$) zum Einsatz. Diese Objektive verfügen in der Regel nur über ein sehr begrenztes Gesichtsfeld von wenigen 10 bis 100 Mikrometern.

Eine alternative Beleuchtungsmethode ist durch linsenlos erzeugte Interferenzmuster beziehungsweise eine Beleuchtung mit stehenden Wellen gegeben [107,111]. Diese kann auch ohne das Objektiv erzeugt werden und ist somit vom Objektiv entkoppelbar.

Beleuchtung und Detektion

Das Ziel der hier entwickelten Beleuchtungstechnik mit planaren Chips [112,113] ist die Entkopplung der optischen Elemente, welche für die Beleuchtung und die Detektion verwendet werden. Diese Entkopplung erlaubt unterschiedliche numerische Aperturen von Beleuchtung und Detektion. Es wird der Durchlicht-Strahlengang verwendet. Die Probe wird dabei von der Rückseite beleuchtet. Ein Schema des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 26 dargestellt. Die strukturierte Beleuchtung wird durch Vielstrahl-Interferenzen erzeugt. Diese werden von einem Array-Interferometer generiert, welches, wie in Kapitel 2 beschrieben, auch zur Messung der räumlichen Kohärenz im Mikrometerbereich eingesetzt wird. Das Array-Interferometer besteht aus einer ebenen, periodischen Anordnung von kleinen, kreisrunden Löchern (sog. *nano holes*). Dieses Array wird rückseitig mit einer nahezu ebenen Welle beleuchtet. Dafür wurde im experimentellen Aufbau der Faserausgang eines fasergekoppelten DPSS Lasers ($\lambda = 532$ nm) über zusätzliche Umlenkspiegel und Linsenelemente zu einem aufgeweiteten und möglichst parallel laufenden Strahlenbündel geformt, welches das Array beleuchtet (vereinfachte Darstellung in Abbildung 26).

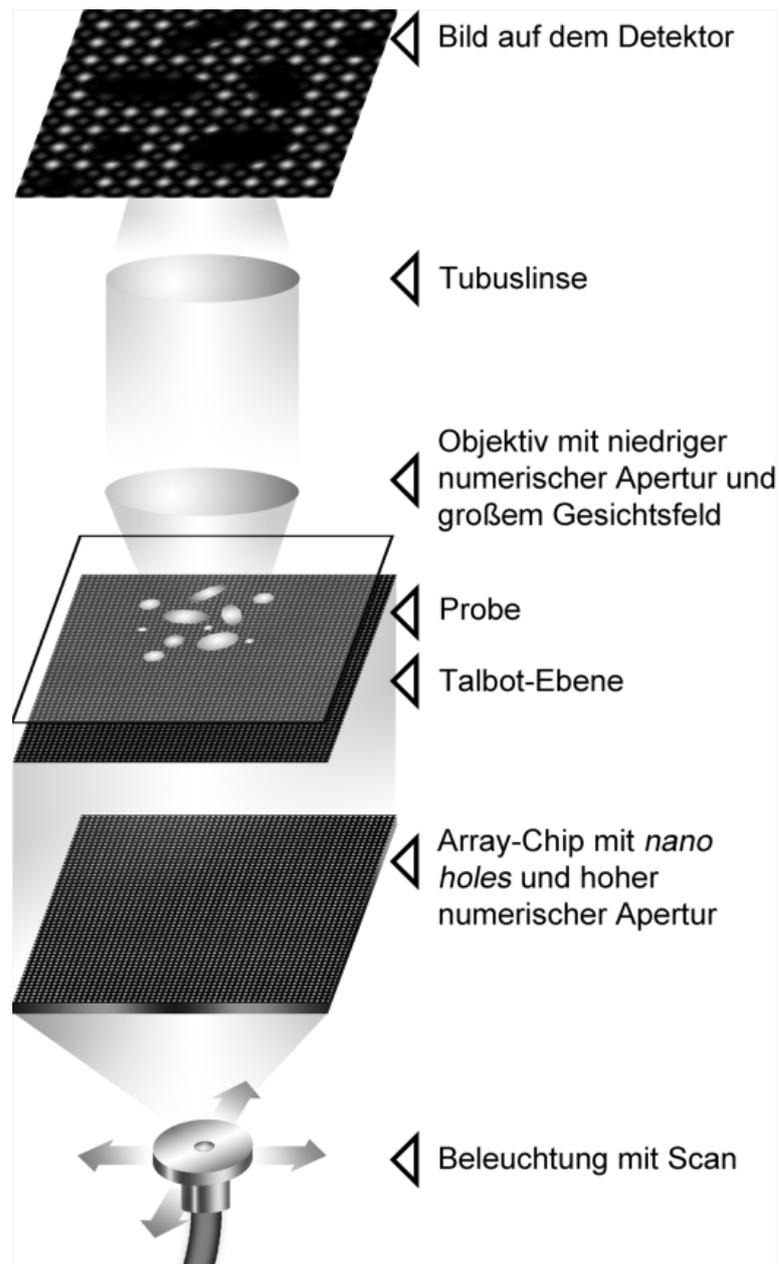


Abb. 26: Schema des Aufbaus für eine Durchlicht-Mikroskopie mit chip-basierter, strukturierter Beleuchtung. Ein *nano hole* Array-Chip (80×80 Lochaperturen, je 530 nm Durchmesser, $6 \mu\text{m}$ periodischer Abstand) wird von einem fasergekoppelten Laser (Wellenlänge 532 nm) beleuchtet. Der Array-Chip generiert ein Interferenzmuster mit hoher numerischer Apertur ($\text{NA}_{\text{illum}} \geq 0,8$). Bei diversen Talbot-Abständen (erste Talbot-Ebene bei $135 \mu\text{m}$) werden kleine kontrastreiche Interferenz-Spots (Durchmesser bei $\text{FWHM} \leq 300 \text{ nm}$) erzeugt. Die Probe wird in einer solchen Talbot-Ebene positioniert und von einem Objektiv vergrößert abgebildet. Das Detektionsobjektiv besitzt eine geringe numerische Apertur ($10\times / \text{NA}_{\text{lens}} = 0,2$), aber ein großes Gesichtsfeld ($\geq 1 \text{ mm}$). Ein Scan der Beleuchtung in der Probenebene (bspw. 30×30 Schritte) wird durch einen mechanischen Scan der Lichtquelle (Faserausgang) realisiert. Die Beleuchtung mit hoher Apertur ist von der Detektion mit niedriger Apertur getrennt. Durch eine Rekonstruktion der Einzelbilder kann ein hochauflöstes Mikroskopbild mit einem großen Gesichtsfeld kombiniert werden.

Jedes einzelne *nano hole* erzeugt eine näherungsweise sphärische Welle. Diese sphärischen Wellen überlagern sich und interferieren. Das Interferenzbild direkt hinter dem Array lässt sich mit dem Talbot-Effekt [25,26,28] beschreiben. In charakteristischen Abständen z_T (vgl. Formel (2.15)) existieren Talbot-Ebenen, in denen ein besonders hoher Interferenzkontrast erreicht wird. Die laterale Interferenzstruktur ähnelt dabei der Intensitätsverteilung in der Array-Ebene. An den ursprünglichen X-Y-Positionen der *nano holes* entstehen schmale Interferenz-Spots mit einem sehr hohen Kontrast. Die Periode der Spots ist identisch mit der Periode der *nano holes* im Array-Chip. Eine vergleichbare Methode zur Erzeugung einer solchen strukturierten Beleuchtung ist auch mit binären Phasen-Arrays möglich [114]. Dabei war zwar der Lichtdurchsatz durch das Array sehr hoch, allerdings wurden nur sehr geringe numerische Aperturen der Beleuchtung erreicht.

Die Größe (Durchmesser) der Interferenz-Spots richtet sich nach der numerischen Apertur NA_{illum} der Beleuchtung. Neben der bereits in Kapitel 2 diskutierten Abhängigkeit der numerischen Apertur von der räumlichen Kohärenz der Beleuchtung, sind die Größe der *nano holes* sowie die geometrische Ausdehnung des Arrays ausschlaggebend. In Abbildung 27 sind diese beiden Abhängigkeiten grafisch dargestellt. Teilabbildung 27(A) zeigt die Begrenzung der Beleuchtungsapertur durch den Pinhole-Durchmesser a . Der Beugungskegel eines Pinholes, welches einen Durchmesser $a > 1,22 \lambda$ besitzt, gibt den Halbwinkel α vor, welcher

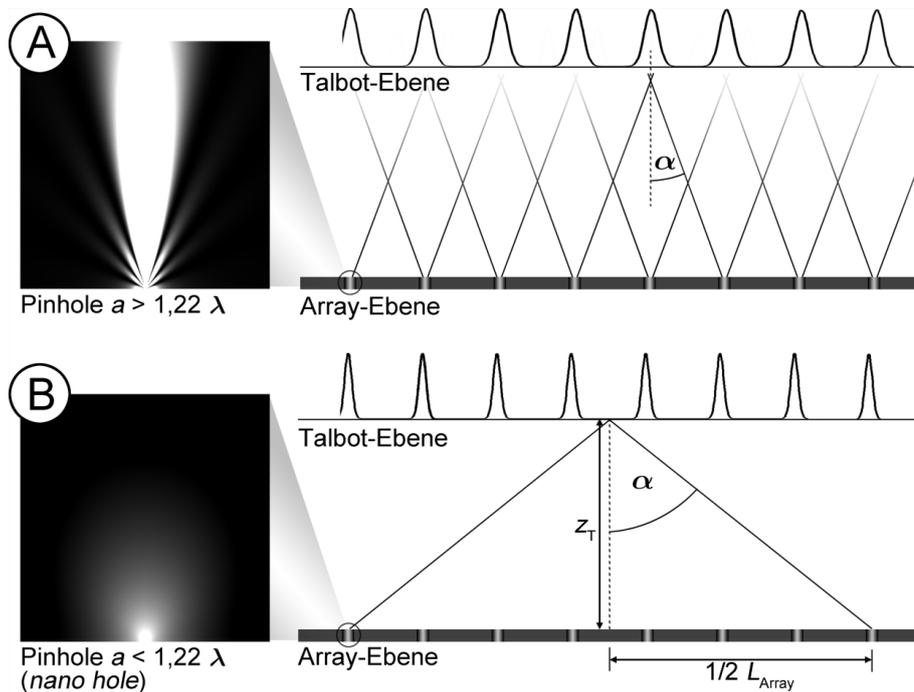


Abb. 27: Beleuchtungsapertur in Abhängigkeit vom Pinhole-Durchmesser und der geometrischen Anordnung: Für Pinhole-Durchmesser $a > 1,22 \lambda$ bestimmt der Beugungskegel des Pinholes (hier Simulation) den Halbwinkel α der Beleuchtung (Fall A). Für kleinere Pinhole-Durchmesser (*nano hole*) sind die laterale Ausdehnung L_{Array} des Arrays sowie der Abstand z_T der Talbot-Ebene für den Aperturwinkel der Beleuchtung ausschlaggebend (Fall B).

die numerische Apertur NA_{illum} bestimmt. Falls der Pinhole-Durchmesser $a \leq 1,22 \lambda$ erreicht, werden von diesen Pinholes (*nano holes*) Beugungskegel mit einem Halbwinkel von 90° erzeugt. Dann ist der Beleuchtungswinkel α von der geometrischen Anordnung, genauer vom Abstand z_T der Talbot-Ebene sowie der lateralen Ausdehnung L_{Array} des Arrays abhängig. Dieser Fall ist in Teilabbildung 27(B) dargestellt. Es wird davon ausgegangen, dass die *nano holes* einen Durchmesser $< 1,22 \lambda$ besitzen, so dass sich alle Teilwellen geometrisch überlagern. Weiterhin wird angenommen, dass der laterale Kohärenzdurchmesser D_{coh} mindestens so groß ist wie die räumliche Ausdehnung (Kantenlänge) L_{Array} des Arrays, so dass alle *nano hole* Wellen mit einem sehr hohen Kontrast ($\gamma_{12} \rightarrow 1$) miteinander interferieren können. Der dann begrenzende Parameter der numerischen Apertur der Beleuchtung ist durch die Ausdehnung des Arrays selbst gegeben. Diese spannt zusammen mit dem Abstand z_T der Talbot-Ebene den Beleuchtungswinkel α auf und es gilt:

$$\text{NA}_{\text{illum}} = \sin(\alpha) = \frac{L_{\text{Array}}}{2 \sqrt{z_T^2 + \frac{1}{4} L_{\text{Array}}^2}} . \quad (5.2)$$

Die Parameter des im Experiment verwendeten Arrays sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die numerische Apertur der Beleuchtung bestimmt die für das Verfahren maximal erreichbare Auflösung.

| | | | |
|---|-------------------|---|-------------------|
| Durchmesser der <i>nano holes</i> a | 530 nm | erste Talbot-Ebene $z_{T=1}$ | 135 μm |
| Periode der <i>nano holes</i> Λ | 6 μm | Halbwinkel α der Beleuchtung | 60° |
| Kantenlänge des Arrays L_{Array} | 474 μm | numerische Apertur NA_{illum} | 0,87 |
| Wellenlänge λ | 532 nm | (simulierte) Spot-Größe d_{Spot} | 300 nm |

Tab. 3: Parameter des im Experiment genutzten 80×80 Array-Chips und der damit erzeugten Beleuchtung.

Die Interferenz-Spots in der ersten Talbot-Ebene können nicht direkt, sondern nur beugungsbegrenzt vermessen werden. Aus diesem Grund wird die Talbot-Ebene numerisch mithilfe von Formel (2.14) pixelweise berechnet und ausgewertet. Der bei dieser Simulation bestimmte Wert für die Halbwertsbreite der Spot-Durchmesser liegt bei durchschnittlich 300 nm. Die anhand von Formel (2.16) theoretisch erreichbare Spot-Größe ist somit $d_{\text{Spot}} = \text{Spot}_{\text{Beleuchtung}} = 300 \text{ nm}$. Der durch Simulation berechnete Wert stimmt sehr gut mit dem theoretischen Minimum überein. Diese Spot-Größe bestimmt die minimale Größe der Objektstruktur, welche später numerisch rekonstruiert werden kann.

Für die Detektion ist es nicht notwendig, diese Spot-Größe auch tatsächlich aufzulösen. Eine beugungsbegrenzte Auflösung des Interferenzmusters ist bis zu einer bestimmten Minimalapertur möglich. Der Abbildungsprozess des Interferenzmusters mit einem Objektiv geringer numerischer Apertur ist in Abbildung 28 im Detail dargestellt. Für die Detektion der Interferenz-Spots ist gemäß der Abbeschen Abbildungstheorie die Anzahl der

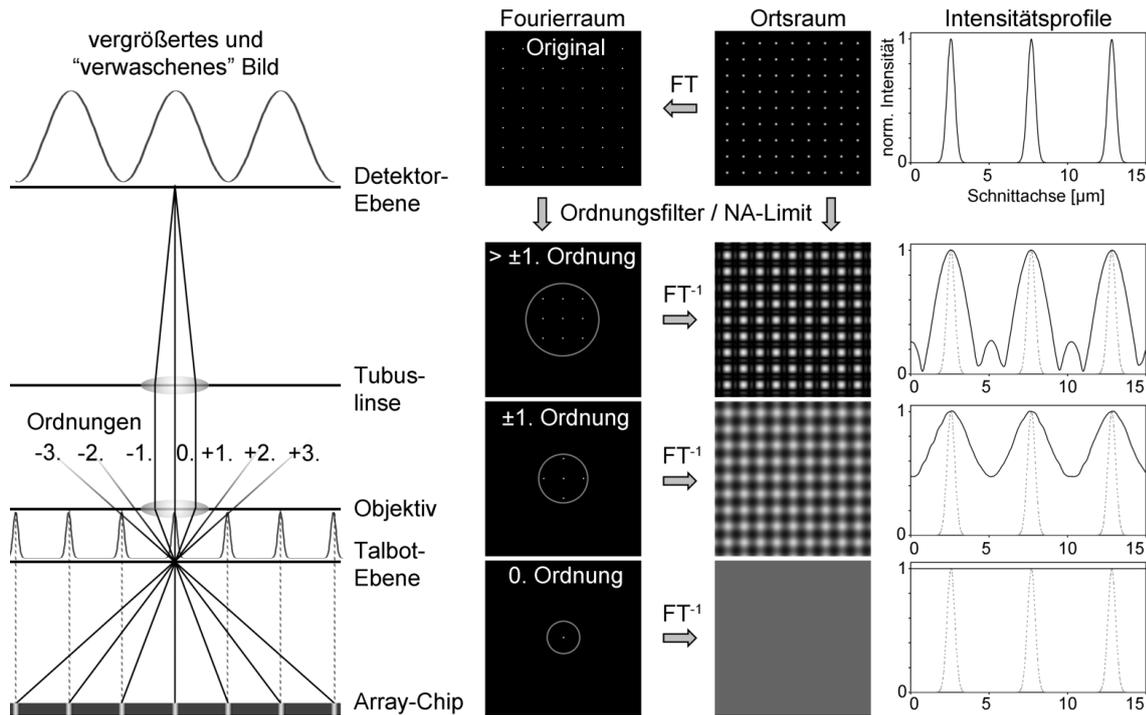


Abb. 28: Beugungsbegrenzte Abbildung eines durch Vielstrahl-Interferenz erzeugten Spot-Musters: Das Schema des optischen Aufbaus ist links dargestellt. Die von den *nano holes* des Array-Chips erzeugten, sphärischen Wellen, welche gleichzeitig als Beugungsordnungen eines einzelnen Interferenz-Spots angesehen werden können, interferieren in der Talbot-Ebene zu einem selbstähnlichen Spot-Muster. Dieses wird vom Objektiv beugungsbegrenzt erfasst und mit der Tubuslinse vergrößert, aber „verwaschen“ auf den Kameradetektor abgebildet. Die numerische Apertur des Objektivs entscheidet darüber, welche diskreten Beugungsordnungen bei dieser zweistufigen Abbildung erfasst werden können. Eine Limitierung von höheren Ordnungen führt dabei zu einer Verbreiterung („Verwaschung“) der Interferenz-Spots (rechts dargestellt). Es muss mindestens die ± 1 . Beugungsordnung vorhanden sein, um das Interferenzmuster aus der Objektebene (Talbot-Ebene) noch auflösen zu können. Das bedeutet, dass es ausreichend ist, die Periode der Spots (im Beispiel hier $5 \mu\text{m}$), nicht aber die Spot-Größe selbst (hier $0,5 \mu\text{m}$) auflösen zu können. Dafür genügt bereits eine niedrige numerische Apertur (bspw. $\text{NA}_{\text{lens}} = 0,1$ bei $\lambda = 532 \text{ nm}$).

Beugungsordnungen ausschlaggebend. Die Beugungsordnungen des Interferenzmusters in einer Talbot-Ebene sind durch die sphärischen Wellen der verschiedenen *nano holes* und deren Ortsfrequenzen innerhalb der Talbot-Ebene vorgegeben. Dieses Ortsfrequenzspektrum lässt sich nach einer Fouriertransformation der Intensitätsverteilung analysieren. Das Interferenzmuster kann in erster Näherung als eine Faltung einer Kamm-Funktion mit einem schmalen Gauß-Profil betrachtet werden. Deren Fouriertransformation ist ebenfalls wieder eine Kamm-Funktion, welche von einer sehr breiten Gauß-Funktion eingehüllt ist (vgl. dazu Abbildung 28 obere Reihe).

Das Detektionsobjektiv besitzt eine numerische Apertur, welche die maximal erfassbaren Ortsfrequenzen limitiert. Höhere Ortsfrequenzen, welche unter größeren Winkeln α (siehe Abb. 27) vom Objekt oder dem Interferenzmuster in der Talbot-Ebene ausgehen, können vom Objektiv nicht mehr erfasst werden. Das Objektiv bildet die erfassten Ortsfrequenzen

zunächst ins Unendliche (in die Fourierebene) ab, bevor diese von der Tubuslinse wiederum auf dem Detektor als vergrößertes Objektbild abgebildet werden. Welche Auswirkungen die Limitation der dabei zur Verfügung stehenden Ortsfrequenzen (beziehungsweise in diesem Fall diskreten Beugungsordnungen) hat, wird in einer Simulation untersucht. Das Abschneiden von höheren Beugungsordnungen führt zu einer Verschmierung („Verwaschung“) des ursprünglichen Interferenzmusters. In Abbildung 28 (rechts) sind Intensitätsprofile der beugungsbegrenzt abgebildeten Spot-Muster gezeigt und mit dem originalen Spot-Muster verglichen. Je weniger Beugungsordnungen vom Objektiv übertragen werden, desto größer wird die abgebildete Spot-Größe des Interferenzmusters. Dabei stellt die Erfassung der ± 1 . Ordnung das absolute Limit für die Informationsübertragung dar. In diesem Fall wird nur noch die Grundfrequenz Λ des Beleuchtungsgitters übertragen. Fehlen selbst diese Ordnungen kann keine Gitter-Abbildung mehr erfolgen (vgl. 0. Ordnung).

Das Detektionsobjektiv muss demnach für die Detektion des Interferenzgitters wenigstens die erste Beugungsordnung übertragen. Im Fall der experimentell verwendeten Array- und Gitterperiode von $\Lambda = 6 \mu\text{m}$ ergibt sich eine numerische Apertur von $\text{NA}_{\text{lens}} \geq 0,044$ für eine Wellenlänge von $\lambda = 532 \text{ nm}$. Objektive mit einer derart geringen numerischen Apertur besitzen in der Regel ein sehr großes Gesichtsfeld, aber eben auch nur eine geringe optische Auflösung. Zudem erlauben sie einen verhältnismäßig großen Arbeitsabstand zur Probe und sind kostengünstig. Ein Vergleich ausgewählter kommerzieller Objektive ist in folgender Tabelle gegeben.

| Objektiv | numerische Apertur NA_{lens} | Auflösung p_{min} [μm] | Gesichtsfeld (Durchmesser) [mm] | Arbeitsabstand [mm] |
|------------------------|--|--|---------------------------------|---------------------|
| EC Epiplan 10 \times | 0,2 | 1,33 | 2,30 | 14,3 |
| EC Epiplan 20 \times | 0,5 | 0,53 | 1,25 | 2,2 |
| Epiplan 50 \times | 0,7 | 0,38 | 0,46 | 1,1 |

Tab. 4: Vergleich ausgewählter Objektive (der Firma Zeiss) bezüglich ihres Auflösungsvermögens (Gitterauflösung nach Formel 5.1 mit $\lambda = 532 \text{ nm}$ und $n = 1$), Gesichtsfelds und Arbeitsabstands [115].

Für den Scan des Beleuchtungsmusters über die Probe wird die Lichtquelle zusammen mit der Beleuchtungsoptik lateral verschoben. Dafür sind der Faserausgang, der Umlenkspiegel und die Kollimationsoptiken auf einer Schiene montiert, welche mithilfe zwei motorisierter Lineartische (PI Physik Instrumente M-410.DG und M-224.50) in der X- und Y-Richtung bewegt werden kann. Die laterale Verschiebung der Lichtquelle und somit die seitliche Verschiebung der Chip-Beleuchtung führt zu einer leichten Kippung der nahezu ebenen Beleuchtungswellenfront in der Ebene des Array-Chips. Diese Wellenfrontkippung führt zu einer Phasendifferenz benachbarter *nano hole* Paare und deshalb zu einer lateralen

Verschiebung der Interferenz-Spots innerhalb der Talbot- beziehungsweise Probenebene. Der Kipp- oder Scan-Winkel muss dabei so groß sein, dass ein Interferenz-Spot in einer Dimension genau eine Periode Λ überstreicht, um das gesamte Bildfeld zu erfassen. Im Fall der ersten Talbot-Ebene mit $z_{T=1} = 135 \mu\text{m}$ und einer Periode der *nano holes* von $\Lambda = 6 \mu\text{m}$ ist dieser Winkel etwa $2,5^\circ$ groß. Der relativ große Abstand des Faserausgangs zur Chip-Ebene von etwa 250 mm erlaubt eine relativ große Schrittweite des Lineartisches pro Scan-Schritt. Für einen vollständigen Scan entlang einer Achse müssen dafür etwa 11 mm lateral verfahren werden. Bei 30 Scan-Schritten (in einer Dimension) liegt der Fahrweg pro Scan-Schritt bei etwa 0,37 mm, was bei einer Positioniergenauigkeit der Lineartische von mindestens $1 \mu\text{m}$ problemlos justierbar ist. In der Probenebene wird ein Interferenz-Spot dann um lediglich $0,2 \mu\text{m}$ pro Scan-Schritt lateral verschoben.

Diese Variante des Scans mithilfe einer Verschiebung der Beleuchtung hat gegenüber anderen Scan-Verfahren die folgenden Vorteile: Die Scan-Mechanik ist sowohl vom Array-Chip als auch von der Probe sowie dem Detektionsobjektiv physisch getrennt. Diese Trennung erhöht die mechanische Stabilität des Aufbaus. Eine mechanische Verschiebung der Probe oder des Array-Chips entfällt. Zudem ist aufgrund der Beleuchtungsgeometrie keine Positioniergenauigkeit unterhalb eines Mikrometers nötig, wodurch der Einsatz hochpräziser Stellelemente nicht notwendig ist.

Im folgenden Abschnitt soll erklärt werden, wie aus einem beugungsbegrenzt detektierten Bild und dem Scan die Auflösung erreicht werden kann, welche durch die ursprüngliche Beleuchtungsapertur NA_{illum} gegeben ist.

Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bilds

Die Rekonstruktion von Rohdaten, welche mit strukturierter Beleuchtung aufgenommen werden, erfolgt in der Regel nach einer entsprechenden Fouriertransformation im Ortsfrequenzraum und durch Lösung eines Gleichungssystems [104, 105]. Im Gegensatz dazu arbeitet der hier angewandte Algorithmus nur im Ortsraum und Fouriertransformationen kommen nicht zum Einsatz.

Für die Rekonstruktion des digital erfassten Scans wird eine selbst geschriebene, C-basierte Software genutzt. Die Rekonstruktion eines einzelnen, hochaufgelösten Bilds aus einer Serie mit vielen Einzelaufnahmen implementiert eine indirekte Entfaltung des detektierten Bilds. Die grundlegende Idee bei diesem Algorithmus ist die Bestimmung von Größe und Lage eines ursprünglichen Beleuchtungspunkts in der Objektebene anhand des detektierten Spots, welcher durch das Objektiv bandbegrenzt und deshalb verwaschen auf dem Detektor abgebildet wird. Eine ähnliche Vorgehensweise wird auch beim PALM- und STORM-Verfahren angewandt. Anstelle eines verwaschen detektierten Beleuchtungspunkts wird im rekonstruierten Bild ein schmaler, scharfer Beleuchtungs-Spot gesetzt, welcher mit dem ursprünglichen Spot in der Probenebene möglichst identisch sein soll.

Die Grundvoraussetzung bei der Detektion des periodischen Spot-Musters ist, dass die

Auflösung des verwendeten Objektivs ausreichend ist, um die Grundperiode des Interferenzmusters aufzulösen. Nur wenn einzelne Interferenz- oder Fluoreszenz-Spots voneinander eindeutig trennbar detektiert werden können, lassen sich diese anschließend rekonstruieren. Für die Positionsbestimmung des periodischen Spot-Musters wird ein Fit-Algorithmus durchgeführt. Der Fit basiert auf einem Simplex-Algorithmus und berücksichtigt folgende Parameter des Beleuchtungsmusters sowie des Scans: die Periode des Beleuchtungsgitters, eine eventuelle Rotation des Beleuchtungsmusters um die Z -Achse, die durchschnittliche Größe (Halbwertsbreite), die durchschnittliche Amplitude der Interferenz-Spots und die Startkoordinaten des Scans sowie die Schrittweiten des Scans in X - und Y -Richtung innerhalb der Objektebene. Die Spots werden bei der Berechnung mit einem gaußförmigen Intensitätsprofil angenommen. Anhand der so bestimmten Parameter lässt sich die Position jedes einzelnen Interferenz- oder Fluoreszenz-Spots in jeder einzelnen Scan-Aufnahme berechnen. Das Verhältnis der mittleren Halbwertsbreite der detektierten Spots und der tatsächlichen Spot-Größe in der Objektebene bestimmt einen Faktor F , welcher bei der Rekonstruktion zur indirekten Entfaltung genutzt wird. Es gilt:

$$F = \frac{\text{Spot}_{\text{Detektion}}}{\text{Spot}_{\text{Beleuchtung}}}, \quad (5.3)$$

wobei die tatsächliche Größe der Beleuchtungs-Spots anhand einer Simulation bestimmt wird, da die Spots nicht exakt – weil beugungsbegrenzt – gemessen werden. Die Simulation basiert auf Formel (2.14) und wird direkt, pixelweise berechnet. Dieser Faktor F bestimmt gleichzeitig die mögliche Verbesserung der Auflösung nach der Rekonstruktion des Scans.

Ein optionaler Berechnungsschritt vor der eigentlichen Rekonstruktion wird zur Glättung des Untergrunds, des Hintergrunds ohne Objekte genutzt. Die Rekonstruktion ist schematisch in Abbildung 29 dargestellt. Ein Einzelbild des Scans wird in kleine Kacheln zerlegt, wobei eine Kachel immer genau einen Interferenz- oder Fluoreszenz-Spot in der Mitte der Kachel enthält. Anstelle einer direkten Entfaltung jedes einzelnen beugungsbegrenzten Spots wird eine indirekte Entfaltung durch eine Neuordnung dieser Kacheln vorgenommen. Die Kacheln einer Einzelaufnahme haben eine Periode Λ . Diese werden – ohne Umskalierung – in ein neues Bild mit gleichem Pixelrasterabstand übertragen. Dabei werden allerdings einzelne Kacheln mit einer neuen Periode $F \cdot \Lambda$ angeordnet. Die genauen Positionen ergeben sich aus den zuvor bestimmten Spot-Koordinaten. Pixel-Positionen, welche nicht exakt auf dem neuen Pixelraster liegen, werden mit einer bilinearen Interpolation angepasst. Daraus folgend liegen dann die (unveränderten) Spots weiter voneinander entfernt. Diese neue Anordnung entspricht dann einer relativen Verkleinerung der Spots im Verhältnis zur konstanten Spot-Periode. Alle weiteren Einzelbilder werden in gleicher Art und Weise in dieses neue, hochaufgelöste Bild übertragen. Die Intensitätswerte werden dazu pixelweise addiert. Bei geeignetem Scan-Abstand füllen alle aufsummierten Spots eine Fläche (ohne Probe) homogen auf. Alle so rekonstruierten Einzelaufnahmen ergeben

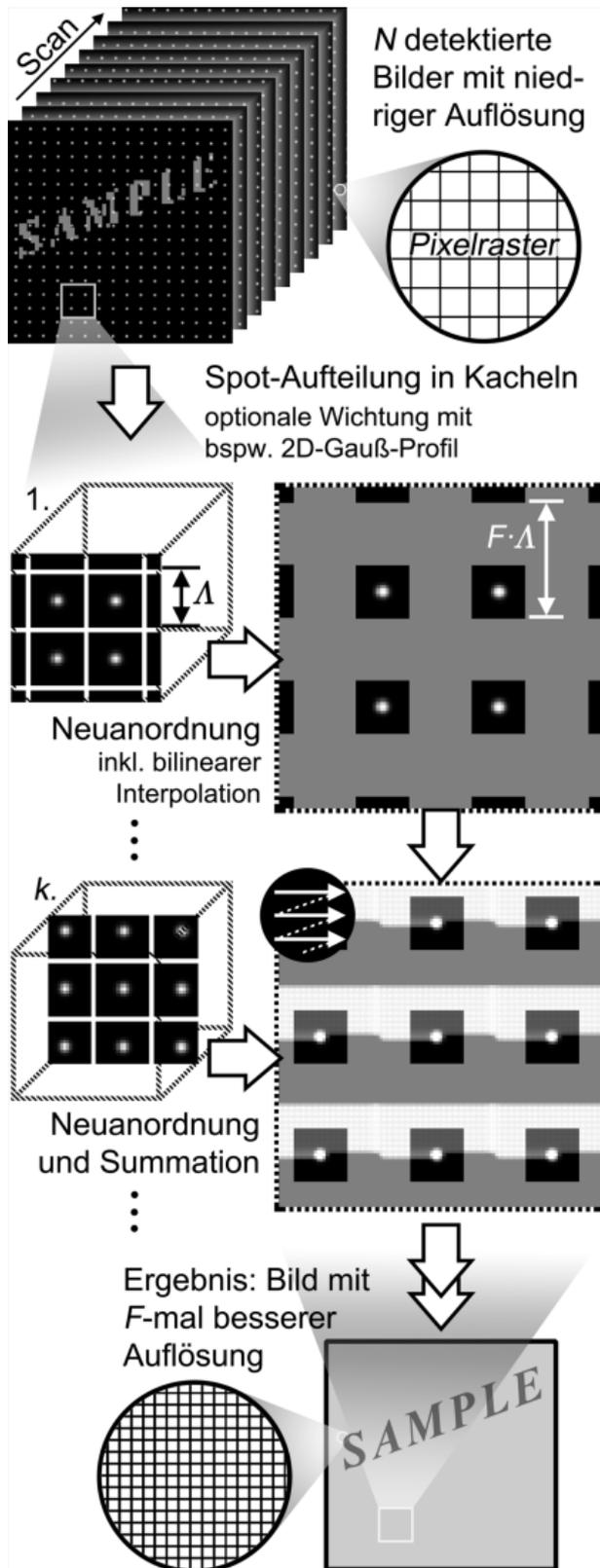


Abb. 29: Schema des Rekonstruktionsalgorithmus für hochaufgelöste Mikroskopbilder mit großem Gesichtsfeld. Ein Fit-Algorithmus berechnet die Lage und Größe der Interferenz- oder Fluoreszenz-Spots. Jedes Einzelbild wird in kleine Kacheln unterteilt, wobei jede Kachel genau einen Spot enthält. Die Abstände der Einzelkacheln im detektierten Bild entsprechen genau der Periode Δ , welche auch die Periode der Interferenz-Spots ist. Diese Einzelkacheln werden in einem größeren Bild neu angeordnet. Dazu werden die Abstände der Einzelkacheln um den Faktor F vergrößert, welcher sich durch die Verbreiterung eines Einzel-Spots durch die bandbegrenzte Abbildung ergibt. Sequenziell werden so alle Kacheln eines Einzelbilds in ein neues, größeres Bild mit gleichem Pixelraster übertragen. Auf diese Art und Weise werden alle Kacheln aller Einzelbilder in ein neues, hochaufgelöstes Bild übertragen und aufsummiert. Das Ergebnis ist ein Bild mit einer F -mal besseren Auflösung verglichen mit der eines detektierten Einzelbilds.

zusammen eine resultierende Bildaufnahme mit einer F -mal besseren Auflösung und einer F^2 -mal größeren Pixelanzahl verglichen mit einem Einzelbild.

Um Streulicht, Artefakte im Interferenzmuster und Bildrauschen zu reduzieren, kann vor jedem Kopierschritt eine zusätzliche Filterung jeder einzelnen Kachel vorgenommen werden. Dazu wird das detektierte Spot-Muster mit einer Gitterfunktion gewichtet, wobei jeder einzelne Interferenz- oder Fluoreszenz-Spot beispielsweise mit einem zweidimensionalen Gauß-Profil multipliziert wird. Dadurch lässt sich der Kontrast im rekonstruierten Bild verbessern.

Der Vorteil dieser Rekonstruktionsmethode besteht darin, dass keine Fouriertransformationen oder andere aufwendige, bildverarbeitende Algorithmen verwendet werden müssen. Es findet lediglich ein in kleinen Kacheln angepasster, zusammengefasster Kopierprozess der einzelnen Pixelwerte statt. Die Bestimmung der exakten Lage des Interferenzmusters erfordert zwar einen numerischen und zeitlichen Aufwand, welcher aber bei anderen Rekonstruktionsmethoden (wie beispielsweise PALM) ebenfalls gegeben ist.

5.3 Ergebnisse mit erhöhter Auflösung und großem Gesichtsfeld

5.3.1 Nicht-fluoreszierende Proben

Um eine quantitative Bewertung im Experiment vorzunehmen, wird ein spezielles Auflösungsstestchart verwendet. Dabei handelt es sich um das „nanoscale standard“ der Firma Supracon, welches ursprünglich für Auflösungsstests beim Einsatz von Mikroskopen mit Wellenlängen bis ins tiefe Ultraviolett entwickelt wurde [116]. Dieses Testchart umfasst verschiedene Strich- und Kreuzgitter sowie Kreisstrukturen mit Strukturperioden zwischen $0,16 \mu\text{m}$ und $1,00 \mu\text{m}$ und mit einem Tastgrad (engl. *duty cycle*) von 1:1. Die Strukturen sind in eine 25 nm dicke Schicht aus nanokristallinem Silizium geschrieben, welche eine mittlere optische Dichte (Extinktion) von etwa $0,67$ besitzt und somit als halbtransparent eingestuft werden kann. Abbildung 30 zeigt eine Übersichtsaufnahme dieses Testcharts (links oben), wie es im Durchlicht bei Weißlichtbeleuchtung und mit einem $10\times$ Objektiv mit einer numerischen Apertur von $0,2$ gesehen wird. Der Bildausschnitt ist dabei 1024×1024 Pixel groß, was einer absoluten Bildgröße von $653 \mu\text{m}\times 653 \mu\text{m}$ entspricht.

Zum Vergleich der Gesichtsfelder verschiedener Objektive sind bei konstantem Bildausschnitt des Kamerasensors die mit einem $20\times$ Objektiv und einem $50\times$ Objektiv detektierbaren Bildausschnitte in dieser Übersichtsaufnahme gekennzeichnet (Abb. 30, gestrichelte Rahmen). Mit steigendem Vergrößerungsgrad nimmt die Größe des Bildausschnitts ab. Mit dem verwendeten $50\times$ Objektiv kann somit bei einem 1024×1024 Pixel großen Bildausschnitt lediglich ein absolutes Gesichtsfeld von $131 \mu\text{m}\times 131 \mu\text{m}$ beobachtet werden.

Der Einsatz stärker vergrößernder Objektive verbessert das optische Auflösungsvermögen des Mikroskops. Für einen Vergleich des lateralen Auflösungsvermögens von Objektiven

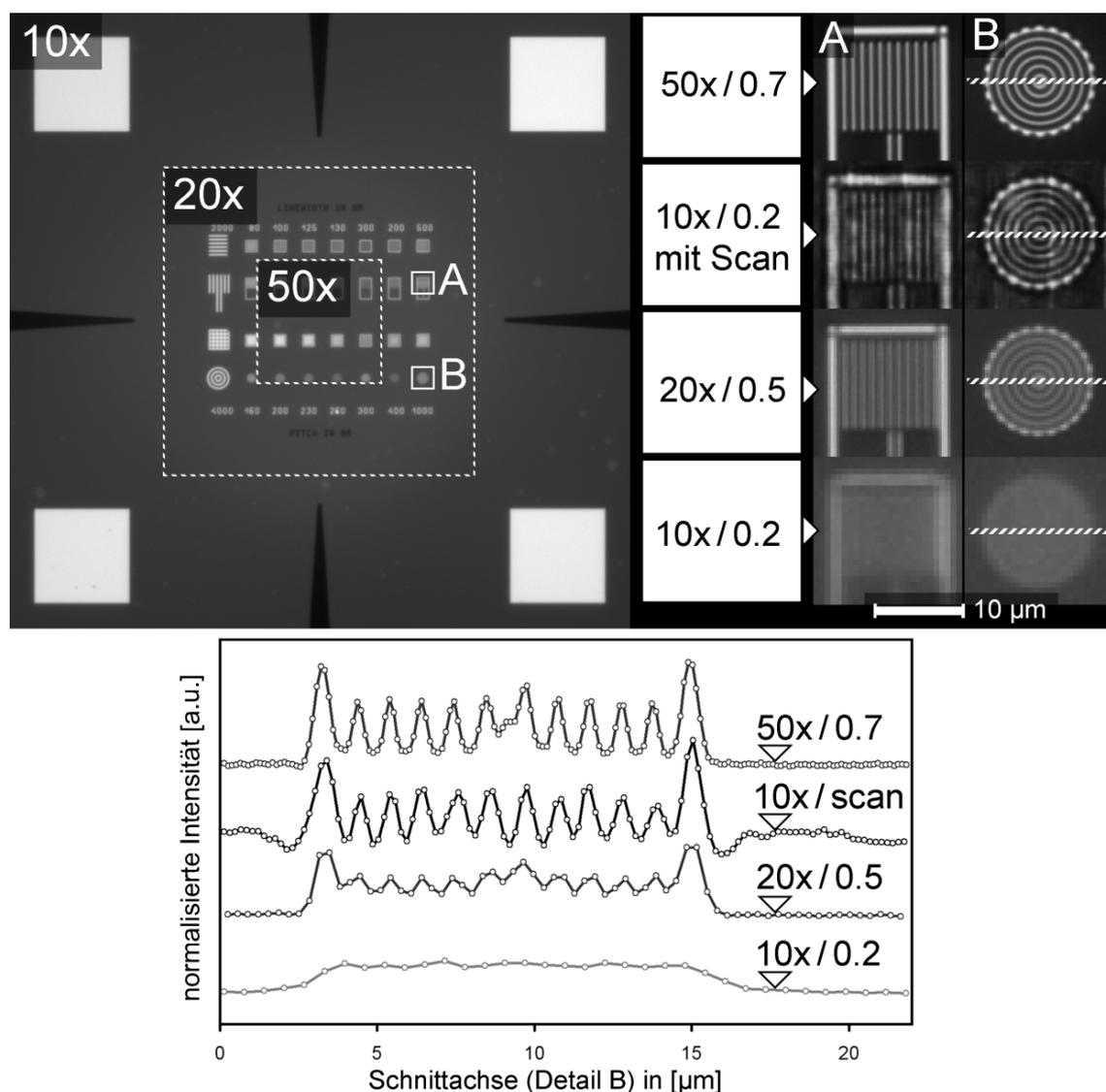


Abb. 30: Ein Auflösungstestchart (Supracon nanoscale standard [116]) mit verschiedenen Strukturperioden soll quantitativ untersucht werden. Es werden eine Übersichtsaufnahme (links oben) und Detailansichten A und B mit $1\ \mu\text{m}$ Strukturperiode ($0,5\ \mu\text{m}$ Strukturgröße) gezeigt. Die Größe der Gesichtsfelder für eine Aufnahme mit einem Bildausschnitt von 1024×1024 Pixeln für verschiedene Vergrößerungsfaktoren ($10\times$, $20\times$ und $50\times$) ist markiert. Die entsprechenden Detailansichten für verschiedene Objektive mit unterschiedlicher numerischer Apertur ($0,2$; $0,5$ und $0,7$) sind dargestellt und für Detailansicht B quantitativ in Form eines Intensitätsprofils (unten) ausgewertet. Die Methode der chip-basierten, strukturierten Beleuchtung mit einem 30×30 Scan mit $0,2\ \mu\text{m}$ Schrittweite (pro Spot) verbessert die optische Auflösung um einen theoretischen Faktor von $F = 3,5$ (entspricht einer resultierenden numerischen Apertur von $0,7$) verglichen mit der Auflösung des zur Detektion verwendeten Objektivs ($10\times/0,2$). Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung zu dem experimentellen Ergebnis, denn die Auflösung und der Kontrast der Strukturen (Durchmodulation) entsprechen einer äquivalenten numerischen Apertur deutlich über $0,5$ und nahe $0,7$. Alle Vergleichsaufnahmen sind mit Köhlerscher Beleuchtung und einer Weißlichtquelle (ungefilterte Halogenlampe und Kondensator) erstellt.

mit unterschiedlichen numerischen Aperturen sollen zwei verschiedene Strukturdetails des Testcharts genauer untersucht werden. Dabei handelt es sich um ein einfaches Liniengitter (Detail A) und eine kreisförmige Struktur (Detail B). Beide Strukturen haben eine Periode von $1 \mu\text{m}$ beziehungsweise eine Strukturbreite von $0,5 \mu\text{m}$. Für die Auflösung dieser gitterartigen Strukturgrößen ist nach Abbe mindestens eine numerische Apertur von $0,27$ bei inkohärenter Beleuchtung mit einer mittleren Wellenlänge von 532 nm nötig. Die im Vergleich genutzten Objektive haben folgende numerische Aperturen: $0,2$ sowie $0,5$ und $0,7$ (siehe dazu auch Tabelle 4 auf Seite 67).

In Abbildung 30 sind die entsprechenden Detailansichten vergrößert dargestellt (rechts oben). Für eine quantitative Analyse werden Intensitätsprofile der Kreisstruktur angefertigt und in einem Diagramm (Abbildung 30, unten) ausgewertet. Die numerische Apertur von $0,2$ des $10\times$ Objektivs liegt unter der erforderlichen Apertur, welche zur Auflösung der $1 \mu\text{m}$ Strukturperiode benötigt wird. Deshalb sind in den Detailbildern keine Objektstrukturen zu erkennen. Anders ist es bei der Verwendung des $20\times$ Objektivs, welches mit einer numerischen Apertur von $0,5$ über dem erforderlichen Wert von $0,27$ liegt. Sowohl die $1 \mu\text{m}$ Periode des Liniengitters als auch die $1 \mu\text{m}$ Periode der Kreisstrukturen sind in den Detailansichten gut zu erkennen. Bemerkenswert ist dabei der relativ schwache Kontrast, der sich auch im Intensitätsprofil durch eine nur geringe Modulation zeigt. Dies ist auf die Übertragungsfunktion eines inkohärent abbildenden, optischen Systems zurückzuführen, welche für höhere Ortsfrequenzen einen nahezu linearen Amplitudenabfall zeigt [2]. Die Verwendung einer höheren numerischen Apertur verbessert den Kontrast der abgebildeten Strukturperiode. Dies lässt sich für das verwendete $50\times$ Objektiv mit einer numerischen Apertur von $0,7$ in den Detailbildern sowie im Intensitätsprofil gut erkennen.

Es wird eine Aufnahme mit chip-basierter, strukturierter Beleuchtung mit den Aufnahmen verschiedener Objektive und klassischer Durchlichtbeleuchtung verglichen. Dazu wird ein Array mit 80×80 *nano holes* mit jeweils 530 nm Lochdurchmesser und einer Periode von $6 \mu\text{m}$ genutzt (siehe auch Tabelle 3 auf Seite 65). Es wird ein 30×30 Scan mit einer Schrittweite von $0,2 \mu\text{m}$ aufgenommen. Zur Detektion wird das $10\times/0,2$ Objektiv verwendet. Mithilfe des Fit-Algorithmus wird eine durchschnittliche, detektierte Spot-Größe (Halbwertsbreite) von $0,99 \mu\text{m}$ gemessen. Unter der Annahme, dass die Beleuchtungs-Spots im Mittel tatsächlich nur $0,30 \mu\text{m}$ groß sind, ergibt sich ein Faktor von etwa $F = 3,3$. Damit wird das Sampling nach der Rekonstruktion von ursprünglich $0,64 \mu\text{m}$ pro Pixel auf etwa $0,18 \mu\text{m}$ pro Pixel verbessert. Gleichzeitig wird die resultierende numerische Apertur erhöht. Die tatsächliche Auflösung des Objektgitters kann bei Summation aller rekonstruierten Spots nicht besser sein als der doppelte Spot-Durchmesser der Beleuchtung, da mit diesem die Gitterstruktur des Objekts abgetastet wird. Deshalb kann die kleinste, noch auflösbare Strukturperiode nach Rekonstruktion des Scans im besten Fall $p_{\min} \geq 0,6 \mu\text{m}$ groß sein. Dies entspricht einer numerischen Apertur von etwa $0,88$ und ist somit nahezu deckungsgleich mit dem angenommenen Wert der numerischen Apertur der Beleuchtung

($NA_{\text{illum}} = 0,87$), welcher auf der Geometrie von Chip-Ausdehnung und der Lage der Talbot-Ebene basiert.

Die Vorgehensweise bei der Rekonstruktion des Scans ist in Abbildung 29 beschrieben. Jeder Einzel-Spot (jede Kachel) wird mit einem 2D-Gauß-Profil gewichtet, um umliegende Störanteile zu unterdrücken. Die Halbwertsbreite der Wichtungsfunktion wird dabei doppelt so groß gewählt ($1,98 \mu\text{m}$) wie die im Fit bestimmte mittlere Halbwertsbreite der detektierten Spots. Nach Rekonstruktion sind die $1 \mu\text{m}$ Perioden der Teststruktur deutlich aufgelöst. Der Kontrast der Strukturen (Durchmodulation) entspricht einer äquivalenten numerischen Apertur deutlich über $0,5$ und nahe $0,7$. Damit ist die Verbesserung des Auflösungsvermögens des verwendeten $10\times/0,2$ Detektionsobjektivs experimentell nachgewiesen.

Um die berechnete Auflösungsgrenze von $0,6 \mu\text{m}$ zu überprüfen, werden weitere Detailbilder ausgewertet. Abbildung 31 stellt Liniengitter desselben Testcharts mit Objektperioden von $0,7 \mu\text{m}$ sowie $0,5 \mu\text{m}$ dar. Die klassischen Aufnahmen mit inkohärenter Beleuchtung (Weißlicht, Kondensator) in Durchlichtanordnung zeigen die jeweiligen Auflösungsgrenzen der verwendeten Objektive. Mit einer $NA_{\text{lens}} = 0,2$ sind beide Strukturen nicht auflösbar. Mit einer $NA_{\text{lens}} = 0,5$ ist die Auflösung der $0,7 \mu\text{m}$ Struktur grenzwertig und die Auflösung der $0,5 \mu\text{m}$ Struktur nicht möglich. Mit einer $NA_{\text{lens}} = 0,7$ ist die Auflösung der $0,7 \mu\text{m}$ Struktur mit gutem Kontrast möglich und die Auflösung der $0,5 \mu\text{m}$ Struktur grenzwertig.

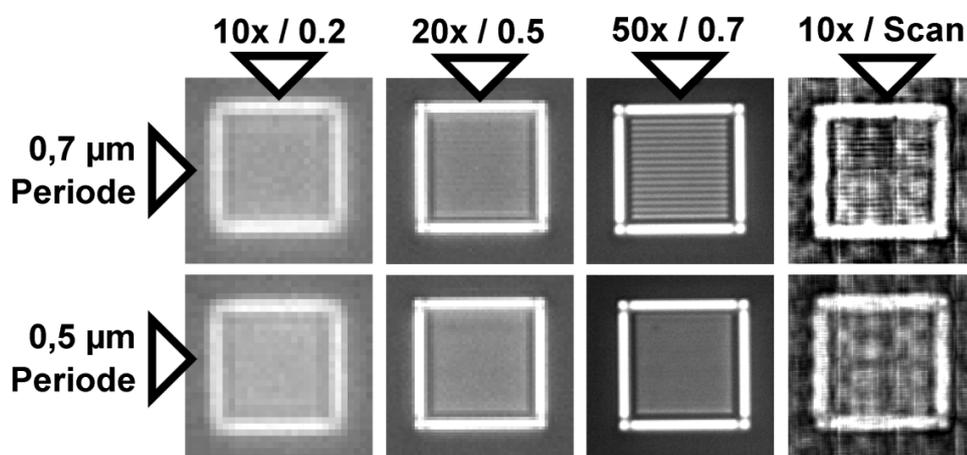


Abb. 31: Bestimmung der Auflösungsgrenze mit einem Auflösungstestchart (Supracon nanoscale standard): Es werden Liniengitter mit $0,7 \mu\text{m}$ Periode sowie $0,5 \mu\text{m}$ Periode mit verschiedenen Objektiven vermessen und mit einem rekonstruierten Scan verglichen. Im klassischen Fall wird eine inkohärente Beleuchtung (Weißlicht und Kondensator) in Durchlichtanordnung verwendet. Der Scan der strukturierten Beleuchtung wird mit dem $10\times/0,2$ Objektiv aufgenommen. Mit diesem Objektiv lassen sich beide Strukturperioden klassisch nicht auflösen. Im rekonstruierten Scan sind bei dem $0,7 \mu\text{m}$ Liniengitter periodische Strukturen erkennbar. Die Auflösung der $0,5 \mu\text{m}$ Struktur ist nicht möglich. Allerdings ist das rekonstruierte Bild von Artefakten überlagert, was zu einer inhomogenen Strukturabbildung und Auflösungsfehlern führen könnte. Aus diesem Grund können keine Intensitätsprofile ausgewertet werden. Die Abbildungen sind für die Darstellung im Kontrast angepasst.

Im rekonstruierten Scan sind bei dem $0,7 \mu\text{m}$ Liniengitter periodische Strukturen erkennbar. Die Auflösung der $0,5 \mu\text{m}$ Struktur ist nicht möglich. Allerdings ist das rekonstruierte Bild von Artefakten überlagert, was zu einer inhomogenen Strukturabbildung und Auflösungsfehlern führen könnte. Diese Artefakte sind auf eine Instabilität der Scan-Mechanik, auf eine inhomogene Beleuchtung des Array-Chips, aber auch auf eine eventuelle Defokussierung der Talbot-Ebene oder Objektebene zurückzuführen. Aufgrund dieser Artefakte im rekonstruierten Scan ist eine quantitativ aussagekräftige Auswertung der tatsächlichen Auflösung der Liniengitter mithilfe von Intensitätsprofilen an dieser Stelle nicht möglich. Dennoch zeigen die Aufnahmen, dass die Auflösung einer $0,7 \mu\text{m}$ Periode möglich und die Auflösung einer $0,5 \mu\text{m}$ Periode nicht möglich ist. Die erwartete Auflösungsgrenze von $0,6 \mu\text{m}$ liegt genau dazwischen.

Die erreichten Aufnahmezeiten für einen vollständigen Scan sowie dessen Rekonstruktion sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Bei der Einzelbildaufnahme ist die zur Verfügung stehende Intensität, welche ausschlaggebend für die Belichtungszeit des Einzelbilds ist, relevant. Diese liegt bei den hier gezeigten Aufnahmen zwischen 10 ms und 30 ms. Es kommt jene Zeit hinzu, welche der motorisierte Tisch samt Lichtquelle für den Fahrweg eines Scan-Schritts braucht. Zwischen diesen beiden Zeiten sind Pausen eingefügt, die einerseits eventuellen Instabilitäten des mechanischen Scans entgegenwirken und andererseits eine bessere Synchronisation beider Prozesse gewährleisten sollen, da diese nicht über ein und dieselbe Software ansteuerbar sind. Die Zeit für einen gesamten Scan richtet sich außerdem nach der Anzahl der Scan-Schritte (400 bis 900) und liegt bei den hier angefertigten Aufnahmen zwischen 10 min und 30 min. Die Prozesszeiten für die spätere Auswertung am PC (Intel® Core™ 2 Duo, 3 GHz, 2 GB RAM) sind vor allem durch die Größe des Bildausschnitts (Pixelanzahl) vorgegeben. Die Zeiten für den Gitter-Fit liegen zwischen 5 min und 15 min, die Zeiten für die Rekonstruktion des Scans liegen zwischen 10 min und 25 min. Alle Prozesszeiten sind verkürzbar. Allerdings wird für einen reinen Grundsatzbeweis der Methode („*proof of concept*“) auf eine detaillierte Optimierung von Hard- und Software verzichtet.

5.3.2 Fluoreszierende Proben

Biologische Proben wie Zellen werden aufgrund ihrer optischen Eigenschaften typischerweise als Phasenobjekte angesehen. Im Durchlicht sind dünne Phasenobjekte bei korrekter Fokussierung kaum sichtbar, da sie einen zu geringen Kontrast im Bild erzeugen. Aus diesem Grund greifen Biologen zu Hilfsmitteln, die den Bildkontrast künstlich verstärken. Eine Methode ist der Einsatz von Fluoreszenzmarkern. Dazu werden fluoreszierende Proteine spezifisch an zelleigene Proteine angekoppelt („*Fluoreszenzlabel*“), welche für die zu untersuchende Zellstruktur (z.B. Zellkern oder Cytoskelett) typisch sind. Bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge leuchten dann die fluoreszenzmarkierten Zellbestandteile mit einer rot-verschobenen Emissionswellenlänge auf, was nach geeigneter Wellenlängen-

filterung zu einer enormen Kontraststeigerung bei der mikroskopischen Bildgebung von biologischen Proben führen kann und außerdem eine spezifizierte Zellanalyse ermöglicht.

Das Prinzip der chip-basierten, strukturierten Beleuchtung ist auch für fluoreszierende Proben geeignet. Die durch Vielstrahl-Interferenz erzeugten Spots in einer Talbot-Ebene beleuchten die Objektstruktur, welche an den Stellen fluoresziert, an denen sie von jeweils einem Interferenz-Spot abgetastet wird. Ein an die Anregungs- und Emissionswellenlänge angepasster Filter trennt beide Wellenlängen, so dass vom Detektor nur das emittierte Fluoreszenzsignal der Probe erfasst wird. Dazu wird im Mikroskopaufbau ein zusätzlicher Filterwürfel zwischen Objektiv und Tubuslinse eingebaut. Der Filterwürfel umfasst einen dichroitischen Spiegel (AHF Analysetechnik HC Laser-Strahlenteiler BS R532) in 45°-Stellung sowie einen Langpass-Interferenzfilter (Melles Griot XLP-532.0-250M-A), welcher die Emissionswellenlänge passieren lässt (Transmission $\geq 95\%$) und die Anregungswellenlänge blockt (optische Dichte ≥ 6). Der dichroitische Spiegel ist notwendig, da das Anregungslicht sonst am Langpass-Filter reflektiert und zurück in die Probenebene abgebildet wird, was bei strukturierter Beleuchtung nicht gewünscht ist. Als Anregungswellenlänge wird $\lambda = 532$ nm verwendet. Das spektrale Maximum der Emissionswellenlänge ist vom verwendeten Farbstoff abhängig und kann ≥ 540 nm detektiert werden.

Die Effizienz bei der Fluoreszenzanregung und -emission liegt bei den hier untersuchten Proben bei etwa $5 \cdot 10^{-4}$. Aus diesem Grund steht nur ein verhältnismäßig geringes Detektionssignal zur Verfügung, so dass eine Anpassung der Belichtungszeiten unverzichtbar ist. Die Belichtungszeiten pro Einzelaufnahme liegen deshalb zwischen 10 s und 20 s. Bei einem 30×30 Scan mit insgesamt 900 Einzelaufnahmen verlängert sich die Gesamtaufnahmezeit auf bis zu 5 Stunden. Derart lange Aufnahmezeiten stellen hohe Anforderungen an die Langzeitstabilität des gesamten Aufbaus.

Als fluoreszierende Probe wird herkömmlicher Textmarker verwendet. Dieser wird als dünne Schicht auf einem $170 \mu\text{m}$ dicken Deckglas aufgebracht und dort eingetrocknet. Bei der Präparation bilden sich kleine inselförmige Bereiche ohne Textmarker aus, deren Umrandung durch eine sehr feine Struktur geprägt ist. Diese Struktur ist vergleichbar mit dendritenartigen Stegen, welche teils Breiten unterhalb von $1 \mu\text{m}$ besitzen. Diese Strukturgröße ist mit dem verwendeten $10 \times$ Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,2 nicht auflösbar.

Für den Scan wird der Probenträger mit der Probenseite dem Array-Chip zugewandt („*upside down*“) und in der ersten Talbot-Ebene bei $135 \mu\text{m}$ positioniert. Es wird ein 30×30 Scan mit einer Schrittweite von $0,2 \mu\text{m}$ durchgeführt. Die Aufnahmeserie erfolgt, abgesehen von der längeren Belichtungszeit, analog zu den Messungen mit nicht-fluoreszierenden Proben. Es soll ein Bildausschnitt von 256×256 Pixeln untersucht werden, der einer tatsächlichen Bildgröße von $163 \mu\text{m} \times 163 \mu\text{m}$ entspricht.

Bei fluoreszierenden Proben werden dort Spots detektiert, wo sich die Probe befindet. Somit wird das Signal komplementär zu nicht-fluoreszierenden Proben beobachtet, bei de-

nen Spots nur dort detektiert werden können, wo sie von der Probe nicht absorbiert oder gestreut werden. Für den Gitter-Fit zur Bestimmung der Lage der Spots können hier numerische Instabilitäten auftreten, falls die Probe selbst nur sehr vereinzelt auf dem Probenträger vorhanden ist und somit im Einzelbild nur wenige Fluoreszenz-Spots detektiert werden. Eine ausreichende Anzahl an Spots ist für einen guten Gitter-Fit erforderlich. Um diesem numerischen Problem entgegenzutreten, wird eine Probenmaskierung verwendet. Aus der einfachen Summation aller Scan-Bilder können jene Bereiche, welche zur Probe gehören, gering aufgelöst kenntlich gemacht werden. Anschließend wird anhand eines Schwellwerts (typischerweise 50 % des auftretenden Maximalwerts) eine binäre Objektmaskierung berechnet. Diese Probenmaskierung wird dann im Gitter-Fit genutzt, um Bereiche, welche keine Probeninformation enthalten, auszusparen. Somit wird der Gitter-Fit nur anhand von tatsächlich vorhandenen Fluoreszenz-Spots berechnet. Die durchschnittliche, gemessene Spot-Größe liegt bei etwa $2 \mu\text{m}$, wodurch sich ein Faktor von $F = 6$ ergibt. Der hier, verglichen mit den Aufnahmen mit nicht-fluoreszierenden Proben, etwa doppelt so große Spot-Durchmesser kann unterschiedliche Ursachen haben: Probenträgerinterne Reflexionen von strukturiertem Anregungslicht oder auch isotrop emittiertem Fluoreszenzlicht können zu einer zusätzlichen Verbreiterung der fluoreszierenden Spots führen.

Abbildung 32(A) zeigt die Summe aller Einzelaufnahmen ohne Rekonstruktion. Das Objekt (Textmarker) ist als helle Fläche auf dunklem, fluoreszenzfreiem Untergrund erkennbar. Im Bildausschnitt sind auch mehrere Bereiche zu erkennen, in denen sich bei der Präparation feine Strukturen ausgebildet haben. In den Detailansichten (1) und (2) sind zwei solche Bereiche vergrößert dargestellt.

Die Rekonstruktion erfolgt anschließend mithilfe der bereits beschriebenen Methode. Es wurde ein 1536×1536 Pixel großer Ausschnitt rekonstruiert. Die Rekonstruktion wird in Abbildung 32(B) gezeigt. Die erwartete Auflösungserhöhung ist auch bei den Fluoreszenzaufnahmen deutlich erkennbar. Die Detailabbildungen zeigen nicht nur eine bessere Auflösung in Form von schmalere Objektstrukturen, sondern auch das Vorhandensein von Objektstrukturen, welche bei klassischer Mikroskopie ohne erhöhte Auflösung nicht sichtbar gewesen sind. Es wird ein Intensitätsprofil für je ein Objektdetail angefertigt und ausgewertet. Dafür wird ein Gauß-Fit in das Profil gelegt und dessen Halbwertsbreite bestimmt. Die hochaufgelösten Strukturen weisen eine Halbwertsbreite von $0,7 \mu\text{m}$ auf, während dieselben Strukturen ohne Rekonstruktion des Scans nur mit einer Halbwertsbreite von $2,0 \mu\text{m}$ detektiert werden können. Dies entspricht einer realen Auflösungsverbesserung um einen Faktor von etwa 2,9.

Das Beispiel zeigt, dass die vorgestellte Methode einer chip-basierten, strukturierten Beleuchtung für fluoreszierende Proben anwendbar ist. Damit besitzt das Verfahren ein hohes Potential für Analysen von biologischen Präparaten und Zellen, bei denen sowohl eine hohe Orts-Auflösung als auch ein großes Gesichtsfeld wünschenswert sind.

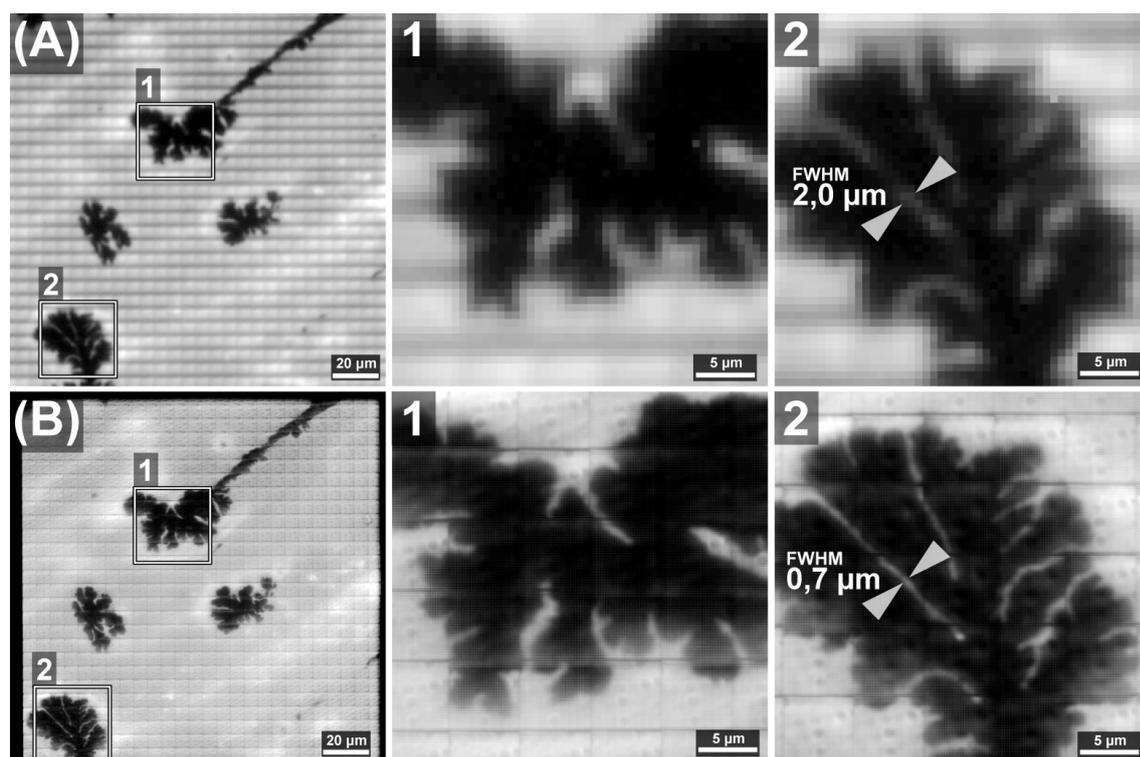


Abb. 32: Mikroskopie mit separater strukturierter Beleuchtung und großem Gesichtsfeld für fluoreszierende Proben: Als ein fluoreszierendes Beispielobjekt wird Textmarker, aufgebracht auf einem $170\ \mu\text{m}$ dicken Mikroskopdeckglas, untersucht. Die einfache Summation aller 900 Scan-Schritte ohne weitere Rekonstruktion ist in Teilabbildung (A) sowie in den Detailansichten 1 und 2 (obere Reihe) gezeigt. Die Auflösung entspricht jener, welche klassisch im Durchlicht mit Kondensator und mit einem $10\times$ Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,2 erreicht werden kann. Das rekonstruierte Bild ist in Teilabbildung (B) sowie in den Detailansichten in der unteren Reihe dargestellt. Durch die Rekonstruktion erhält man ein hochaufgelöstes Bild des Objekts bei gleichbleibend großem Gesichtsfeld. Es sind Intensitätsprofile für je ein Objektdetail angefertigt und deren Halbwertsbreiten bestimmt. Die Auflösung eines Einzelobjekts wird hier von $2,0\ \mu\text{m}$ auf $0,7\ \mu\text{m}$ verbessert. Dies entspricht einem Faktor von etwa 2,9.

5.4 Diskussion und Ausblick

In diesem abschließenden Abschnitt werden die Grenzen des Verfahrens erörtert sowie ein Ausblick auf mögliche Weiterentwicklungen gegeben.

Die relative Auflösungsverbesserung hängt von der Beleuchtungs- und Detektionsapertur ab (siehe dazu Formel (5.3)). Die Detektionsapertur selbst ist durch das verwendete Objektiv gegeben. Diese muss so gewählt werden, dass sie wenigstens die Grundperiode Λ des Interferenzmusters auflösen kann. Im hier gezeigten Experiment (siehe Abb. 30 und Abb. 32) liegt die Grundperiode bei $\Lambda = 6\ \mu\text{m}$, so dass eine numerische Apertur von $\text{NA}_{\text{lens}} = 0,05$ bei Verwendung einer grünen Wellenlänge bereits ausreichend wäre. Das Detektionsobjektiv legt außerdem die Größe des Gesichtsfelds fest. Die Beleuchtungsapertur kann ohne den Einsatz von Immersion höchstens Eins erreichen. Der maximal erreichbare Faktor F für eine Verbesserung der Auflösung lässt sich somit theoretisch auf etwa

$F \approx 20$ abschätzen. Dieser Faktor entspricht auch genau dem Verhältnis zwischen der Spot-Periode Λ ($6 \mu\text{m}$) und dem Spot-Durchmesser d_{Spot} ($0,3 \mu\text{m}$), wobei Λ die minimale Detektionsapertur bestimmt und d_{Spot} durch die Beleuchtungsapertur gegeben ist.

Eine Einzelbildaufnahme kann außer durch die numerische Apertur des Objektivs auch durch das Sampling des Bildsensors in der Auflösung beschränkt sein. Das Sampling ist in der Regel aber mehr als ausreichend und hat zudem keinen direkten Einfluss auf die absolute Auflösungsgrenze eines rekonstruierten, hochaufgelösten Bilds. Die resultierende Auflösung hängt lediglich von der Beleuchtungsapertur ab. Ein sehr grobes Sampling könnte allerdings zu Artefakten in der Rekonstruktion in Form einer zusätzlichen Rasterung führen. Solche Artefakte lassen sich aber durch angepasste Rekonstruktionsalgorithmen reduzieren.

Die absolute Auflösungsgrenze dieses Verfahrens ist durch die Beleuchtungsapertur und somit durch die erreichbare Spot-Größe der Vielstrahl-Interferenzen gegeben. Diese Spot-Größe hängt von der verwendeten Wellenlänge λ , vom Kohärenzdurchmesser D_{coh} , aber auch von der Kohärenzlänge L_{coh} , von der Größe der *nano holes* sowie von der geometrischen Anordnung, gegeben durch die Lage der Talbot-Ebene bei z_T und die Ausdehnung L_{Array} des Arrays, ab. Der Kohärenzgrad sollte für alle *nano hole* Paare hoch sein ($|\gamma_{12}(\tau)| \rightarrow 1$), damit sie konstruktiv interferieren können. Die Durchmesser der *nano holes* sollten in der Größenordnung der Wellenlänge liegen ($a \leq 1,22\lambda$), um möglichst große Beleuchtungswinkel ($\rightarrow 180^\circ$) zu erreichen.

Im Experiment wird die erste Talbot-Ebene mit einem Abstand $z_T = 135 \mu\text{m}$ gewählt. Dieser Abstand ist zum einen durch die Wellenlänge, vor allem aber durch die Periode Λ im Array vorgegeben (siehe Formel (2.15)). Das Array besitzt eine Ausdehnung von $L_{\text{Array}} = 474 \mu\text{m}$. Daraus ergibt sich eine Beleuchtungsapertur von $\text{NA}_{\text{illum}} = 0,87$ ($\lambda = 532 \text{ nm}$). Um die Beleuchtungsapertur weiter zu erhöhen ($\text{NA}_{\text{illum}} \rightarrow 1$), müsste einerseits die Ausdehnung des Arrays deutlich größer werden. Andererseits müsste der Abstand der Talbot-Ebene z_T verkürzt werden, was durch eine Verkürzung der Array-Periode Λ zu erreichen wäre. Beide Vorgehensweisen haben aber ihre Grenzen. Bei einer sehr großen Array-Ausdehnung werden die Intensitätsanteile von weit entfernt liegenden *nano holes* zunehmend schwächer (Amplitudenabfall der sphärischen Welle mit $1/R$) und gehen bei einer unendlichen Array-Ausdehnung schließlich gegen Null. Eben diese Anteile sind aber nötig, um möglichst hohe Beleuchtungsaperturen zu erzeugen. Die Verkürzung der Array-Periode Λ ist technologisch zwar möglich, führt aber einerseits dazu, dass der Abstand zwischen dem Array-Chip und der Probenebene sehr klein ($< 100 \mu\text{m}$) und deshalb schwer kontrollierbar wird. Andererseits führt eine Verkleinerung der Array-Periode auch zu einer reduzierten Periode der Interferenz-Spots, wodurch die Auswahl an Detektionsobjektiven eingeschränkt wird, weil diese Periode mindestens aufgelöst werden muss.

Eine geometrische Anpassung der Beleuchtungsapertur ist demnach nur theoretisch bis $\text{NA}_{\text{illum}} = 1$ möglich. In der Praxis werden die Grenzen, ähnlich wie bei (Trocken-)Ob-

jektiven, bei etwa $NA = 0,95$ liegen. Um darüber hinaus eine weitere Erhöhung zu erreichen, kann die effektive Wellenlänge λ verkürzt werden. Dies kann zum einen durch Auswahl einer Lichtquelle mit einem Emissionsspektrum im nahen Ultraviolett erfolgen. Zum anderen ist der Einsatz von Immersionsflüssigkeiten möglich, wobei hier eine Verbesserung bis zu einem Faktor von etwa $n = 1,5$ erzielt werden kann. Letztendlich wird die erreichbare Spot-Größe höchstens $\lambda/(2n)$ – und demnach etwa 130 nm – erreichen können.

Der Einsatz von hochbrechendem Material kann von Vorteil sein um Grenzflächeneffekte zu minimieren, beispielsweise wenn Zellen in einem flüssigen Medium beobachtet werden sollen. So ist es vorstellbar, den Raum zwischen dem Array-Chip und der Probenebene mit einem hochbrechenden Medium zu füllen. Dies kann in der Praxis beispielsweise dadurch erreicht werden, dass das Array in einen speziellen Objektträger eingebettet wird.

Für den Umgang mit fluoreszierenden Proben ist es wichtig, die Stabilität des Aufbaus zu gewährleisten. Um die Messzeit pro Scan-Schritt zu verkürzen, müsste die Leistung der Lichtquelle erhöht werden. Im Experiment kommt ein diodengepumpter Festkörperlaser mit Faserkopplung und einer Ausgangsleistung von etwa 8 mW zum Einsatz. Die Belichtungszeiten liegen zwischen 10 s und 20 s. Um hier eine deutliche Verkürzung der Aufnahmezeit zu erreichen, müsste die Ausgangsleistung des Lasers um mindestens zwei Größenordnungen erhöht werden. Zudem wird die Detektion des Fluoreszenzsignals durch Streulicht negativ beeinflusst. Um diesen Effekt zu reduzieren, bietet es sich an, die Probe in einer Immersion einzubetten. Diese Vorgehensweise stellt hohe Anforderungen an die Probenpräparation sowie die Halterung und Positionierung der Probe.

Im experimentellen Aufbau ist nicht nur die Beleuchtung von der Detektion separiert. Auch der Scan der Beleuchtung ist physisch vom Array-Chip sowie vom abbildenden Mikroskopsystem getrennt. Das hat den Vorteil, dass mechanische Störeinflüsse des Scans vom restlichen Mikroskopaufbau entkoppelt sind. Der Scan selbst wird durch zwei Linearomotoren realisiert. Hier besteht die Möglichkeit, den Scan der Lichtquelle zu verbessern, indem man auf mechanische Bauteile gänzlich verzichtet. So könnte ein elektrisch schaltbares Lichtquellen-Array zum Einsatz kommen. Aber auch eine Wellenfrontkipfung mit einem phasenmodulierenden Flüssigkeitskristalldisplay ist denkbar. Beides könnte den Scan sowohl beschleunigen als auch noch stabiler gestalten.

Nicht zuletzt besteht die Möglichkeit die Rekonstruktionsalgorithmen zu verbessern und anzupassen. Zu prüfen wäre, ob die laterale Auflösung durch den Einsatz spezieller Verfahren weiter erhöht werden kann. Beispielsweise könnte anstatt einer einfachen Summation der hochaufgelösten Teilbilder („Kacheln“ in Abbildung 29) eine Maximumsbestimmung jedes Pixels [117] im hochaufgelösten Bild durchgeführt werden. Ebenso könnten zusätzliche Algorithmen wie beispielsweise eine angepasste Tiefpassfilterung zur Glättung des Untergrunds und zur Reduzierung von Artefakten eingesetzt werden. Zudem lässt sich der gesamte Rekonstruktionsalgorithmus hinsichtlich der Rechenzeit optimieren.

6 Zusammenfassung

Die Themen der Arbeit sind die partielle Kohärenz im Mikrometerbereich sowie eine interferenzoptische Beleuchtung und beider Anwendung in der optischen Mikroskopie. Dazu wird eine Chip-Anordnung zum Vermessen der räumlichen Kohärenzeigenschaften von LED-Lichtquellen, Halogen- und Quecksilberdampflampen erarbeitet. Beispielhaft werden die Vorteile einer Mikro-Kohärenz für die digitale in-line holografische Mikroskopie und die Anwendbarkeit eines Beleuchtungs-Chips in der strukturierten Beleuchtung für die Mikroskopie gezeigt.

Es wird ein Verfahren zur Vermessung räumlich partieller Kohärenz im Mikrometerbereich entwickelt. Eine definiert einstellbare, mikro-kohärente Beleuchtung wird in der digitalen in-line holografischen Mikroskopie angewandt.

Für die Messung der partiellen Kohärenz wird ein 2-dimensionales Array-Interferometer genutzt [12, 24]. Dieses besteht aus einem planaren Chip mit 125×125 photolithografisch präparierten Lochaperturen (sog. *nano holes*, Durchmesser jeweils 530 nm) mit einem periodischen Abstand von $4 \mu\text{m}$. Die von den Aperturen erzeugten Beugungskegel überlagern sich und interferieren. Für die Messung der räumlichen Kohärenz werden die Durchmesser der Interferenz-Spots als Maß für die Kohärenz ausgewertet. Mit diesem Verfahren werden Kohärenzflächen mit Durchmessern von $5 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ experimentell vermessen, welche für eine interferenzoptische Mikroskopie relevant sind. Die Spitzenintensitäten sind, verglichen mit einem äquivalenten, herkömmlich genutzten Doppel-Pinhole-Interferometer, aufgrund von Vielstrahl-Interferenzen um den Faktor 1300 ± 300 erhöht. Dies entspricht im Experiment einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) des Interferenzkontrasts um 31 dB. Die obere Messgrenze für größere Kohärenzflächen (Durchmesser der Kohärenzfläche $\geq 50 \mu\text{m}$) ist durch die numerische Apertur des verwendeten, optischen Beobachtungssystems (Objektiv $100\times/0.75$) gegeben. Die untere Messgrenze ($5 \mu\text{m}$) ist durch die Dimensionierung des verwendeten Arrays variierbar. Mit diesem Array kann ein Kohärenzflächendurchmesser bis zu $0,9 \mu\text{m}$ (bei $\lambda = 546 \text{ nm}$) gemessen werden, bezogen auf das Kohärenzkriterium von $m = 0,16$ (Kontrast $|\gamma_{12}| \approx 0,88$).

Mithilfe des Array-Interferometers werden die partiell-kohärente Beleuchtung einer LED, einer Halogen- sowie einer Quecksilberdampflampe vermessen. Mithilfe von Bandpassfiltern sowie einer verstellbaren Blende wird das Kohärenzvolumen dieser Lichtquellen im Bereich von $10^2 \mu\text{m}^3$ bis $10^5 \mu\text{m}^3$ definiert eingestellt. Eine zunehmende Kohärenz der Beleuchtung durch eine schmalbandigere Filterung der Lichtquellen reduziert die Strahlungsenergie. Die zur Verfügung stehende Bestrahlungsstärke liegt in einem Bereich von 10^{-2} W/m^2 bis

10^2 W/m^2 . Der Schlüsselparameter von mikro-kohärenten Lichtquellen ist die spektrale Strahlungsstromdichte der Quelle. Als Detektor kommt eine einfach gekühlte CCD Kamera (Zeiss AxioCam MRm) zum Einsatz. Bei etwa 50 detektierten Photonen pro Kamera-Pixel sind das Quellrauschen (Photonenrauschen) und das Detektorrauschen vergleichbar groß. Bei der Detektion von mehr als 50 Photonen pro Pixel liegt das Photonerauschen über dem Rauschpegel des verwendeten Sensors (15 Photonen pro Pixel). Die damit im Experiment erzielten Signal-Rausch-Verhältnisse liegen für Belichtungszeiten von 2 ms bis 20 s zwischen 0 dB und 30 dB. Das bedeutet, dass Lichtquellen, welche bisher als gering kohärent eingestuft werden, für eine moderne interferenzoptische Mikroskopie durchaus nutzbar sind. Eine interferenzoptische Bildgebung mit LED und Halogenlampen ist möglich und sinnvoll.

Die mikro-kohärente Beleuchtung wird für die interferenzoptische Mikrobildgebung eingesetzt. Dafür wird ein digitales in-line holografisches Mikroskop genutzt. Bei einem typischen Abstand der Hologrammebene vom Objekt von $50 \mu\text{m}$ werden eine zeitliche Kohärenzlänge von mindestens $8 \mu\text{m}$ und eine räumliche Kohärenzlänge (Durchmesser der Kohärenzfläche) von mindestens $30 \mu\text{m}$ benötigt, um bei ebener Objektbeleuchtung Strukturen von $1 \mu\text{m}$ auflösen zu können. Dies entspricht einer numerischen Apertur von mindestens 0,5 für Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm. Im Experiment liegt das typische Kohärenzvolumen bei $7 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3$ [61]. Interferenzen aus Mehrfachreflexionen an optischen Grenzflächen im Aufbau sowie statistische Interferenzen (Speckle) werden durch den Einsatz einer LED-Beleuchtung weitestgehend vermieden. Dies führt zu einer erheblichen Verbesserung der Bildqualität [59, 60]. Die dabei zur Verfügung stehende Lichtmenge ist ausreichend, um holografische Bildaufnahmen mit Belichtungszeiten von 35 ms und einem SNR von 3,1 dB zu erhalten. Für das rekonstruierte Objektbild wird ein SNR von 8,0 dB ermittelt. Dabei kann erstmals gezeigt werden, dass mit mikro-kohärenter LED-Beleuchtung eine nahezu störungsfreie Aufnahme holografischer Bilder mit Videorate (25 fps) bei einer gleichzeitigen optischen Auflösung von $1 \mu\text{m}$ möglich ist [86].

Als eine neue Variante für die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung bietet sich die direkte Beleuchtung mit dem Pinhole-Array an. Abweichend von der üblichen strukturierten Beleuchtung wird dabei die Beleuchtungsapertur von der Detektionsapertur getrennt. Es wird eine planare Chip-Anordnung im Durchlicht verwendet. Das ermöglicht einen einfachen und kompakten Aufbau, mit welchem ein bestehendes Mikroskop (Zeiss Axioskop 2 MAT mot) modular ergänzt wird. Die Chip-Anordnung wird durch ein Array-Interferometer mit 80×80 *nano holes* mit einem Durchmesser von jeweils 530 nm und einem periodischem Abstand von $6 \mu\text{m}$ realisiert. Die strukturierte Beleuchtung wird durch Vielstrahl-Interferenzen erzeugt. Die Probe wird dabei von kleinen, kontrastreichen Interferenz-Spots (Durchmesser $0,3 \mu\text{m}$, Abstand $6 \mu\text{m}$) beleuchtet und durch eine mechanisch getrennte, verfahrbare Lichtquelle gescannt. Die vom Objektiv entkoppelte Beleuchtung ermöglicht eine hohe Auflösung (etwa $0,7 \mu\text{m}$ Periode; gegeben durch die Be-

leuchtungsapertur des Chips, $NA_{\text{illum}} = 0,87$) für ein großes Gesichtsfeld (Durchmesser 2,3 mm; gegeben durch das Detektionsobjektiv $10\times/0,2$) bei einer Wellenlänge von 532 nm. Die numerische Rekonstruktion experimenteller Daten ermöglicht eine Erhöhung der optischen Auflösung um den Faktor 3. Damit kann bei gleichbleibend großem Gesichtsfeld die Auflösungsgrenze des Detektionsobjektivs unterschritten werden. Das Verfahren ist für fluoreszierende sowie nicht-fluoreszierende Proben anwendbar.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Schlosshauer. Decoherence, the measurement problem, and interpretations of quantum mechanics. *Rev. Mod. Phys.*, 76(4):1267–1305, 2004.
- [2] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 7. edition, 1999.
- [3] W. Lauterborn and T. Kurz. *Coherent Optics: Fundamentals and Applications*. Springer, 2. edition, 2003.
- [4] N. Wiener. Generalized harmonic analysis. *Acta Math.*, 55:117–258, 1930.
- [5] A. Khintchine. Korrelationstheorie der stationären stochastischen Prozesse. *Math. Ann.*, 109:604–615, 1934.
- [6] J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, and S. H. Heinemann, editors. *Handbook of Biophotonics, Vol. 1: Basics and Techniques*. Wiley-VCH, 2011.
- [7] P. H. van Cittert. Die wahrscheinliche Schwingungsverteilung in einer von einer Lichtquelle direkt oder mittels einer Linse beleuchteten Ebene. *Physica*, 1:201–210, 1934.
- [8] F. Zernike. The concept of degree of coherence and its application to optical problems. *Physica*, 5:785–795, 1938.
- [9] E. Hecht. *Optik*. Addison-Wesley, 1992.
- [10] E. S. Barr. Men and milestones in optics II: Thomas Young. *Appl. Optics*, 2(6):639–647, 1963.
- [11] B. J. Thompson and E. Wolf. Two-beam interference with partially coherent light. *J. Opt. Soc. Am.*, 47(10):895–902, 1957.
- [12] P. Petrucek, R. Riesenberger, and R. Kowarschik. Empfindliches Messen partieller Kohärenz mit Pinhole-Array. *Tech. Mess.*, 77(9):473–478, 2010.
- [13] M. V. R. K. Murty. Interference between wavefronts rotated or reversed with respect to each other and its relation to spatial coherence. *J. Opt. Soc. Am.*, 54(10):1187–1188, 1964.

- [14] M. Imai, K. Itoh, and Y. Ohtsuka. Measurements of complex degree of spatial coherence at the end face of an optical fiber. *Opt. Commun.*, 42(2):97–100, 1982.
- [15] M. Imai, Y. Ohtsuka, and S. Satoh. Spatial coherence analysis of light propagation in optical fibers by interferometric methods. *J. Opt. Soc. Am. A*, 3(7):1059–1064, 1986.
- [16] M. Santarsiero and R. Borghi. Measuring spatial coherence by using a reversed-wavefront young interferometer. *Opt. Lett.*, 31(7):861–863, 2006.
- [17] G. Verschaffelt, G. Craggs, M. L. F. Peeters, S. K. Mandre, H. Thienpont, and I. Fischer. Spatially resolved characterization of the coherence area in the incoherent emission regime of a broad-area vertical-cavity surface-emitting laser. *IEEE J. Quantum. Elect.*, 45(3):249–255, 2009.
- [18] A. I. González and Y. Mejía. Nonredundant array of apertures to measure the spatial coherence in two dimensions with only one interferogram. *J. Opt. Soc. Am. A*, 28(6):1107–1113, 2011.
- [19] J. C. Barreiro and J. Ojeda-Castañeda. Degree of coherence: a lensless measuring technique. *Opt. Lett.*, 18(4):302–304, 1993.
- [20] R. Castañeda and Z. Jaroszewicz. Determination of the spatial coherence of schell-model beams with diffraction gratings. *Opt. Commun.*, 173:115–121, 2000.
- [21] Y. Mejía and A. I. González. Measuring spatial coherence by using a mask with multiple apertures. *Opt. Commun.*, 273(2):428–434, 2007.
- [22] T. Asakura, H. Fujii, and K. Murata. Measurement of spatial coherence using speckle patterns. *J. Mod. Optic.*, 19(4):273–290, 1972.
- [23] T. S. McKechnie. Measurements of some second order statistical properties of speckle. *Optik*, 39(3):258–267, 1974.
- [24] P. Petruck, R. Riesenber, U. Hübner, and R. Kowarschik. Spatial coherence on micrometer scale measured by a nanohole array. *Opt. Commun.*, 285(4):389–392, 2012.
- [25] H. F. Talbot. Facts relating to optical science. No. IV. *Philos. Mag.*, 9(56):401–407, 1836.
- [26] J. T. Winthrop and C. R. Worthington. Theory of fresnel images I. Plane periodic objects in monochromatic light. *J. Opt. Soc. Am.*, 55(4):373–381, 1965.
- [27] W. D. Montgomery. Self-imaging objects of infinite aperture. *J. Opt. Soc. Am.*, 57(6):772–775, 1967.

- [28] K. Patorski. *Progress in Optics XXVII*, chapter The Self-Imaging Phenomen and its Applications, pages 1–108. Elsevier, 1989.
- [29] O. Bryngdahl. Image formation using self-imaging techniques. *J. Opt. Soc. Am.*, 63(4):416–419, 1973.
- [30] P. Latimer. Talbot plane patterns: grating images or interference effects? *Appl. Optics*, 32(7):1078–1083, 1993.
- [31] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosk. Anat. En.*, 9:413–468, 1873.
- [32] E. Abbe. *Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop*. Vieweg, 1910.
- [33] M. Françon. *Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie*. G. Braun-Verlag, 1967.
- [34] Axioskop 2 plus, Axioskop 2 mot plus, Aufrechte Life-Science-Mikroskope. Broschüre von Carl Zeiss Lichtmikroskopie, 2002.
- [35] Axiocam MRm, Absolut empfindlich. Broschüre von Carl Zeiss Lichtmikroskopie, 2006.
- [36] J. Grondalski and D. F. V. James. Is there a fundamental limitation on the measurement of spatial coherence for highly incoherent fields? *Opt. Lett.*, 28(18):1630–1632, 2003.
- [37] H. J. Eichler, A. Fischer, J. Kross, M. Krystek, H. Lang, H. Niedrig, H. Rauch, G. Schmahl, H. Schoenebeck, E. Sedlmayr, H. Weber, and K. Weber. *Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, Optik*. Walter de Gruyter, 9. edition, 1993.
- [38] W. Demtröder. *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper*. 3. Springer, 2005.
- [39] H. Gross. *Handbook of Optical Systems, Volume 1: Fundamentals of Technical Optics*. Wiley-VCH, 2005.
- [40] A. Nolte, L. Höring, and M. W. Davidson. Fundamentals of illumination sources for optical microscopy.
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/lightsources/lightsourcefundamentals.html>, 29.06.2012.
- [41] K. R. Spring, T. J. Fellers, and M. W. Davidson. Non-coherent light sources for confocal microscopy.
<http://www.olympusfluoview.com/theory/noncoherentsources.html>, 29.06.2012.

- [42] J. Jahns. *Photonik: Grundlagen, Komponenten und Systeme*. Oldenbourg Verlag, 2001.
- [43] G. Indebetouw. Modulated interferograms with sources having a structured coherence function: application to the simulation of long wavelengths. *J. Optics (Paris)*, 17(1):53–57, 1986.
- [44] D. Gabor. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098):777–778, 1948.
- [45] D. Gabor. Microscopy by reconstructed wave-fronts. *P. R. Soc. A*, 197:454–487, 1949.
- [46] D. Gabor. Microscopy by reconstructed wave fronts II. *P. Phys. Soc. Lond. B*, 64:449–469, 1951.
- [47] J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy. *Appl. Optics*, 45(5):836–850, 2006.
- [48] Mario Kanka. *Bildrekonstruktion in der digitalen inline-holografischen Mikroskopie*. PhD thesis, Technische Universität Ilmenau, 2011.
- [49] T. Latychevskaia and H.-W. Fink. Solution to the twin image problem in holography. *Phys. Rev. Lett.*, 98:233901–4, 2007.
- [50] D. Tseng, O. Mudanyali, C. Oztoprak, S. O. Isikman, I. Sencan, O. Yaglidere, and A. Ozcan. Lensfree microscopy on a cellphone. *Lab Chip*, 10(12):1787–1792, 2010.
- [51] J. W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. Electrical and Computer Engineering. McGraw-Hill Companies, Inc., 2. edition, 1996.
- [52] H. Nyquist. Certain topics in telegraph transmission theory. *AIEE Trans.*, 47:617–644, 1928.
- [53] C. E. Shannon. Communication in the presence of noise. *Proc. IRE*, 37(1):10–21, 1949.
- [54] P. Ferraro, A. Wax, and Z. Zalevsky, editors. *Coherent Light Microscopy: Imaging and Quantitative Phase Analysis*. Springer Series in Surface Sciences 46, 2011.
- [55] M. K. Kim. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews*, 1:018005/1–50, 2010.
- [56] J. W. Goodman. *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications*. Roberts & Company, 2006.
- [57] H. Meng, W. L. Anderson, F. Hussain, and D. D. Liu. Intrinsic speckle noise in in-line particle holography. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10(9):2046–2058, 1993.

-
- [58] Y. Pu and H. Meng. Intrinsic speckle noise in off-axis particle holography. *J. Opt. Soc. Am. A*, 21(7):1221–1230, 2004.
- [59] P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and U. Huebner. Partially coherent illumination and application to holographic microscopy. In *4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques Conference 2009*, pages 71–72, 2009.
- [60] P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and R. Kowarschik. Speckle-free holographic microscopy. In *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging (DH) OSA Conference*, page DMB6, 2010.
- [61] P. Petruck, R. Riesenberger, and R. Kowarschik. Optimized coherence parameters for high-resolution holographic microscopy. *Appl. Phys. B-Lasers O.*, 106(2):339–348, 2012.
- [62] T. S. McKechnie. *Laser Speckle and Related Phenomena*, chapter Speckle Reduction, pages 123–170. Springer, 1984.
- [63] J. W. Goodman. *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications*, chapter Optical Methods for Suppressing Speckle, pages 141–186. Roberts & Company, 2007.
- [64] W. Martienssen and E. Spiller. Coherence and fluctuations in light beams. *Am. J. Phys.*, 32(12):919–926, 1964.
- [65] D. J. De Bitetto. On the use of moving scatterers in conventional holography. *Appl. Phys. Lett.*, 8(4):78–80, 1966.
- [66] M. Lurie. Effects of partial coherence on holography with diffuse illumination. *J. Opt. Soc. Am.*, 56(10):1369–1371, 1966.
- [67] R. Pawluczyk. Coherent noise elimination in holographic microscope. *Opt. Commun.*, 7(4):366–370, 1973.
- [68] F. Dubois, L. Joannes, and J.-C. Legros. Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with a source of partial spatial coherence. *Appl. Optics*, 38(34):7085–7094, 1999.
- [69] F. Dubois, M.-L. Novella Requena, C. Minetti, O. Monnom, and E. Istasse. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source. *Appl. Optics*, 43(5):1131–1139, 2004.
- [70] G. I. Kosourov, I. N. Kalinkina, and M. P. Golovei. Reconstruction of an image from a hologram in nonmonochromatic light. *Pisma Zh. Tekh. Fiz.*, 4(3):84–86, 1966.
- [71] G. Pedrini and H. J. Tiziani. Short-coherence digital microscopy by use of a lensless holographic imaging system. *Appl. Optics*, 41(22):4489–4496, 2002.

- [72] L. Repetto, E. Piano, and C. Pontiggia. Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination. *Opt. Lett.*, 29(10):1132–1134, 2004.
- [73] B. Kemper, S. Stuerwald, C. Remmersmann, P. Langehanenberg, and G. von Bally. Characterisation of light emitting diodes (leds) for application in digital holographic microscopy for inspection of micro and nanostructured surfaces. *Opt. Laser Eng.*, 46(7):499–507, 2008.
- [74] P. Langehanenberg, G. von Bally, and B. Kemper. Application of partially coherent light in live cell imaging with digital holographic microscopy. *J. Mod. Optic.*, 57(9):709–717, 2010.
- [75] U. Gopinathan, G. Pedrini, and W. Osten. Coherence effects in digital in-line holographic microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*, 25(10):2459–2466, 2008.
- [76] I. Moon and B. Javidi. 3-D visualization and identification of biological microorganisms using partially temporal incoherent light in-line computational holographic imaging. *IEEE T. Med. Imaging*, 27(12):1782–1790, 2008.
- [77] D. S. Monaghan, D. P. Kelly, N. Pandey, and B. M. Hennelly. Twin removal in digital holography using diffuse illumination. *Opt. Lett.*, 34(23):3610–3612, 2009.
- [78] M. Kanka, R. Riesenber, and H. J. Kreuzer. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images. *Opt. Lett.*, 34(8):1162–1164, 2009.
- [79] M. Kanka, A. Wuttig, C. Graulig, and R. Riesenber. Fast exact scalar propagation for an in-line holographic microscopy on the diffraction limit. *Opt. Lett.*, 35(2):217–219, 2010.
- [80] M. Kanka, R. Riesenber, P. Petruck, and C. Graulig. High resolution ($NA = 0.8$) in lensless in-line holographic microscopy with glass sample carriers. *Opt. Lett.*, 36(18):3651–3653, 2011.
- [81] P. S. Idell and A. Webster. Resolution limits for coherent optical imaging: signal-to-noise analysis in the spatial-frequency domain. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(1):43–56, 1992.
- [82] F. Charrière, T. Colomb, F. Montfort, E. Cuhe, P. Marquet, and C. Depeursinge. Shot-noise influence on the reconstructed phase image signal-to-noise ratio in digital holographic microscopy. *Appl. Optics*, 45(29):7667–7673, 2006.
- [83] M. Gross and M. Atlan. Digital holography with ultimate sensitivity. *Opt. Lett.*, 32(8):909–911, 2007.
- [84] M. Marim, E. Angelini, J.-C. Olivo-Marin, and M. Atlan. Off-axis compressed holographic microscopy in low-light conditions. *Opt. Lett.*, 36(1):79–81, 2011.

-
- [85] N. Pandey and B. Hennelly. Quantization noise and its reduction in lensless fourier digital holography. *Appl. Optics*, 50(7):B58–B70, 2011.
- [86] P. Petruck, R. Riesenberger, and R. Kowarschik. Partially coherent light-emitting diode illumination for video-rate in-line holographic microscopy. *Appl. Optics*, 51(13):2333–2340, 2012.
- [87] G. A. Mills and I. Yamaguchi. Effects of quantization in phase-shifting digital holography. *Appl. Optics*, 44(7):1216–1225, 2005.
- [88] A. M. S. Maallo, P. F. Almoró, and S. G. Hanson. Quantization analysis of speckle intensity measurements for phase retrieval. *Appl. Optics*, 49(27):5087–5094, 2010.
- [89] J. Sheng, E. Malkiel, and J. Katz. Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions. *Appl. Optics*, 45(16):3893–3901, 2006.
- [90] J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer. 4-d imaging of fluid flow with digital in-line holographic microscopy. *Optik*, 119(9):419–423, 2008.
- [91] T. Meinecke, N. Sabitov, and S. Sinzinger. Information extraction from digital holograms for particle flow analysis. *Appl. Optics*, 49(13):2446–2455, 2010.
- [92] S. Weiße, M. Heydt, T. Maier, S. Schulz, J. P. Spatz, M. Grunze, T. Haraszti, and A. Rosenhahn. Flow conditions in the vicinity of microstructured interfaces studied by holography and implications for the assembly of artificial actin networks. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(29):13395–13402, 2011.
- [93] H. Sun, B. Song, H. Dong, B. Reid, M. A. Player, J. Watson, and M. Zhao. Visualization of fast-moving cells *in vivo* using digital holographic video microscopy. *J. Biomed. Opt.*, 13(1):014007/1–9, 2008.
- [94] S.K. Jericho, P. Klages, J. Nadeau, E.M. Dumas, M.H. Jericho, and H.J. Kreuzer. In-line digital holographic microscopy for terrestrial and exobiological research. *Planet. Space Sci.*, 58(4):701–705, 2010.
- [95] J. Hahn, S. Lim, K. Choi, R. Horisaki, and D. J. Brady. Video-rate compressive holographic microscopic tomography. *Opt. Express*, 19(8):7289–7298, 2011.
- [96] K. Weisshart, Y. Novikau, G. Krampert, and M. Kempe. Strukturierte Beleuchtung in der Hochauflösungsmikroskopie. *Optik & Photonik*, 5(1):40–45, 2010.
- [97] H. Siedentopf and R. Zsigmondy. Über Sichtbarmachung und Grössenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Ann. Phys.*, 10(1):1–39, 1903.

- [98] S. W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.
- [99] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(15):8206–8210, 2000.
- [100] S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828):1153–1158, 2007.
- [101] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [102] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3(10):793–795, 2006.
- [103] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864):810–813, 2008.
- [104] R. Heintzmann and C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc. SPIE*, 3568:185–196, 1998.
- [105] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.-Oxford*, 198(2):82–87, 2000.
- [106] W. Lukosz and M. Marchand. Optische Abbildung unter Überschreitung der beugungsbedingten Auflösungsgrenze. *Opt. Acta*, 10(3):241–255, 1963.
- [107] R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer. Saturated patterned excitation microscopy – a concept for optical resolution improvement. *J. Opt. Soc. Am. A*, 19(8):1599–1609, 2002.
- [108] M. G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102(37):13081–13086, 2005.
- [109] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.*, 190(2):165–175, 2010.
- [110] M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.*, 94(12):4957–4970, 2008.

- [111] J. T. Frohn, H. F. Knapp, and A. Stemmer. True optical resolution beyond the rayleigh limit achieved by standing wave illumination. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(13):7232–7236, 2000.
- [112] R. Riesenberg, P. Petruck, M. Kanka, and J. Bergmann. Multi-spot illumination for super-resolution microscopy. In *Proc. of Focus on Microscopy 2010*, 2010.
- [113] R. Riesenberg and P. Petruck. Super-resolution wide field microscopy by illumination with a nano hole array. In *Proc. of Focus on Microscopy 2011*, 2011.
- [114] A. W. Lohmann and J. A. Thomas. Making an array illuminator based on the Talbot effect. *Appl. Optics*, 29(29):4337–4340, 1990.
- [115] Objektive. Carl Zeiss Objektiv Informationen.
<http://www.micro-shop.zeiss.com>, 23.03.2010.
- [116] U. Huebner, W. Morgenroth, R. Boucher, M. Meyer, W. Mirandé, E. Buhr, G. Ehret, G. Dai, T. Dziomba, R. Hild, and T. Fries. A nanoscale linewidth/pitch standard for high-resolution optical microscopy and other microscopic techniques. *Meas. Sci. Technol.*, 18(2):422–429, 2007.
- [117] R. Heintzmann and P. A. Benedetti. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. *Appl. Optics*, 45(20):5037–5045, 2006.

Publikationen

Referierte Publikationen

P. Petruck, R. Riesenberg, and R. Kowarschik. *Sensitive Measurement of Partial Coherence Using a Pinhole Array*. *Technisches Messen* **77**(9), 473–478 (2010).

M. Kanka, R. Riesenberg, P. Petruck, and C. Graulig. *High resolution ($NA = 0.8$) in lensless in-line holographic microscopy with glass sample carriers*. *Optics Letters* **36**(18), 3651–3653 (2011).

P. Petruck, R. Riesenberg, U. Hübner, and R. Kowarschik. *Spatial coherence on micrometer scale measured by a nanohole array*. *Optics Communications* **285**(4), 389–392 (2012).

P. Petruck, R. Riesenberg, and R. Kowarschik. *Optimized coherence parameters for high-resolution holographic microscopy*. *Applied Physics B: Lasers and Optics* **106**(2), 339–348 (2012).

P. Petruck, R. Riesenberg, and R. Kowarschik. *Partially coherent light emitting diode illumination for video-rate in-line holographic microscopy*. *Applied Optics* **51**(13), 2333–2340 (2012).

Konferenzbeiträge

P. Petruck, R. Riesenberg, and R. Kowarschik. *Sensitive Measurement of Partial Coherence Using a Pinhole Array*. *Proceedings of OPTO 2009, 9th International Conference on Optical Technologies for Sensing and Measurement* (2009).

R. Riesenberg, M. Kanka, and P. Petruck. *Structured Illumination and Holographic Microscopy*. *Proceedings of FOM 2009, Focus on Microscopy* (2009).

P. Petruck, R. Riesenberg, M. Kanka, and U. Hübner. *Partially Coherent Illumination and Application to Holographic Microscopy*. *Proceedings of the 4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques* (2009).

R. Riesenberg, P. Petruck, and M. Kanka. *Structured Illumination and Holography*. *Proceedings of the 4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques* (2009).

R. Riesenberg, P. Petruck, M. Kanka, and J. Bergmann. *Multi-spot Illumination for Super-Resolution Microscopy*. *Proceedings of FOM 2010, Focus on Microscopy* (2010).

Fortsetzung auf der nächsten Seite

P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and R. Kowarschik. *Speckle-Free Holographic Microscopy*. Proceedings of Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, OSA Technical Digest, paper DMB6 (2010).

R. Riesenberger and P. Petruck. *Super-Resolution Wide Field Microscopy by Illumination with a Nano Hole Array*. Proceedings of FOM 2011, Focus on Microscopy (2011).

P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, U. Hübner, and R. Kowarschik. *Kohärenz im Mikrometerbereich, Messung und Anwendung*. DGaO Proceedings (2011).

Vorträge

P. Petruck, R. Riesenberger, and R. Kowarschik. *Sensitive Measurement of Partial Coherence Using a Pinhole Array*. OPTO 2009, 9th International Conference on Optical Technologies for Sensing and Measurement, 26.05.2009, Nuremberg, Germany.

P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and R. Kowarschik. *Speckle-Free Holographic Microscopy*. OSA Conference on Digital Holography and Three-Dimensional Imaging, 12.04.2010, Miami, USA.

P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, U. Hübner, and R. Kowarschik. *Kohärenz im Mikrometerbereich, Messung und Anwendung*. 112. Jahrestagung der DGaO, 15.06.2011, Ilmenau, Germany.

Poster

R. Riesenberger, P. Petruck, A. Maryasov, and U. Hübner. *Structured Illumination Generated by Nano Hole Arrays for Subdiffraction Microscopy*. NANOMETTA, 2nd European Topical Meeting on Nanophotonics and Metamaterials, 05.01.2009, Seefeld, Austria.

P. Petruck, R. Riesenberger, M. Kanka, and U. Hübner. *Partially Coherent Illumination and Application to Holographic Microscopy*. 4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques, 10.06.2009, Jena, Germany.

Auszeichnungen

„Best Poster Presentation“ at the 4th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques, 10.06.2009, Jena, Germany.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Photonische Technologien (IPHT) e.V. in Jena angefertigt. Auf dem Weg der Entstehung bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit haben mich verschiedene Personen durch Ratschläge, konstruktive Kritik und so manche Zuarbeit unterstützt. Es ist mir eine Freude, mich bei ihnen allen zu bedanken.

Prof. Dr. Richard Kowarschik möchte ich zunächst für die Vermittlung an das IPHT, in die Arbeitsgruppe von Dr. Rainer Riesenberg danken. Diesen beiden Betreuern meiner Arbeit sage ich Danke dafür, dass ich wissenschaftlich arbeiten durfte sowie für die förderlichen Diskussionen und entscheidenden Hinweise während der gesamten Promotionszeit. Prof. Dr. Richard Kowarschik danke ich zudem für seine Arbeit als Erstgutachter.

Prof. Dr. Jürgen Popp danke ich für das Schaffen der strukturellen Rahmenbedingungen, durch die ich am IPHT wirken durfte.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Cornelia Denz und Prof. Dr. Monika Ritsch-Marte für die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit. Prof. Dr. Cornelia Denz danke ich zudem für das Auftreten als Korreferentin und die fachliche Auseinandersetzung während der Disputation. Ebenso danke ich allen Mitgliedern der Promotionskommission.

Prof. Dr. Hans Jürgen Kreuzer, Prof. Dr. Rainer Heintzmann sowie Dr. Giancarlo Pedrini danke ich für hilfreiche Hinweise bei einem zur Veröffentlichung eingereichten Manuskript. Ich möchte mich zudem bei Prof. Dr. Rainer Heintzmann für die interessanten Diskussionen zur Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung bedanken. Ebenso danke ich Dr. Joachim Bergmann für Ratschläge, diverse Leihgaben von Laborausüstung und das kritische Lesen von Teilen der vorliegenden Arbeit.

Meinen Kollegen Dr. Andreas Wuttig, Dr. Alexej Grjasnow, Dr. Mario Kanka, Christian Graulig sowie meiner Kollegin Ilse Schumann danke ich für die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und Hinweise sowie für das stets angenehme Arbeitsklima. Außerdem danke ich ihnen allen für die zur Verfügung gestellte Software, ohne die eine Auswertung meiner experimentellen Daten nur erschwert möglich gewesen wäre. Christian Graulig danke ich zudem für Ratschläge bei experimentellen Aufbauten sowie der Probenpräparation.

Für die gewissenhafte Anfertigung der Chip-Masken mit Pinhole und *nano hole* Strukturen, welche für die experimentelle Arbeit existenziell waren, möchte ich mich bei Dr. Uwe Hübner, Dr. Günter Mayer und allen daran beteiligten Mitarbeitern des IPHT bedanken.

Allen Mitarbeitern der Werkstatt des IPHT danke ich für die Anfertigung von speziell angepassten Adaptern und Halterungen.

Dank gilt auch Dr. Michael Graf von der Carl Zeiss MicroImaging GmbH, der das Software-Modul für eine schnelle Videoaufnahme mit der Kamera Zeiss AxioCam HRm für Testzwe-

cke zur Verfügung stellte.

Nicht zuletzt geht ein besonderer Dank an meine Frau Myriam, die die Arbeit nicht nur sehr gewissenhaft Korrektur gelesen hat, sondern neben der Arbeit stets für einen erholsamen Ausgleich sorgte. Ohne ihren Rückhalt und ihre kraftspendenden Worte und Taten würde es diese Arbeit in dieser Form nicht geben.

Danke!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und der Auswertung des Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Dr. Rainer Riesenberg und Prof. Dr. Richard Kowarschik betreuten die Arbeit inhaltlich.
2. Dr. Uwe Hübner und Dr. Günter Mayer stellten die Masken mit den Pinhole und *nano hole* Chips zur Verfügung. Dr. Uwe Hübner stellte zudem das verwendete Auflösungsstestchart zur Verfügung.
3. Dr. Andreas Wuttig, Dr. Alexej Grjasnow, Dr. Mario Kanka und Christian Graulig stellten Software zur Verfügung, welche für die Verarbeitung und Rekonstruktion der digitalen Hologramme sowie für die partielle Auswertung von digitalen Bilddaten benötigt wurde.
4. Die Präparation der fluoreszierenden Proben wurde zusammen mit Christian Graulig durchgeführt.

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 andere 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 anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, 24. Juni 2013

Paul Petruck

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------|-----------------------|
| Name | Paul Petruck |
| Geburtsdatum | 24. Dezember 1982 |
| Geburtsort | Jena |
| Familienstand | verheiratet, ein Sohn |

Ausbildung und Beruf

| | |
|-------------------|---|
| 09/1993 – 08/1997 | Gymnasium „Ernst Haeckel“ Jena |
| 09/1997 – 08/2001 | Gymnasium „Carl Zeiss“ Jena, math.-nat.-techn. Spezialschulteil |
| 06/2001 | Abitur |
| 09/2001 – 06/2002 | Zivildienst am Klinikum der FSU Jena |
| 07/2002 – 09/2002 | Technischer Mitarbeiter am Klinikum der FSU Jena |
| 10/2002 – 03/2008 | Studium der Physik/Technischen Physik an der FSU Jena |
| 11/2004 – 12/2006 | Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Festkörperphysik (IFK) der FSU Jena |
| 12/2006 – 03/2008 | Diplomarbeit zum Thema „Herstellung und Analyse von 2D und 3D Nanostrukturen mittels Interferenz-Lithographie“ bei der Carl Zeiss AG Jena |
| 03/2008 | Studienabschluss als Diplom-Physiker |
| seit 06/2008 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Photonische Technologien Jena e.V. |
| 28.05.2013 | Tag der Disputation |

Jena, 24. Juni 2013

Paul Petruck