

Полетаев Д.А., Соколенко Б.В.

ПРИМЕНЕНИЕ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ВЗВЕШЕННЫХ В ВОДЕ ЧАСТИЦ

Аннотация. В данной работе предложен метод для экспрессного детектирования взвешенных частиц. Проведено теоретическое описание метода. Проанализированы его возможности. Приводится подробная схема экспериментальной установки. Проведена оценка минимального размера обнаруживаемой частицы для предложенной экспериментальной установки.

Ключевые слова: микропластик, цифровая голографическая микроскопия, лазер, интерференция.

Abstract. In this paper an express method for measuring sea water pollution using digital holographic microscopy is proposed. The theory of the proposed method is described in detail. The experimental setup is described and the advantages of the proposed method are indicated. In addition, the minimum size of the detected particle is evaluated.

Keywords: microplastic, digital holographic microscopy, laser, interference.

Введение

Воды мирового океана загрязняются пластиком и его производными – микропластиком [1]. Существующие методы контроля загрязненности воды выпариванием и взвешиванием сухого осадка не удовлетворяют требованиям экспрессности. Методы мониторинга загрязненности морской воды по спектральным характеристикам не отличаются высокой точностью [2, 3]. Задача получения изображений микрочастиц, распределенных в объеме пробы на сегодняшний день решается с помощью метода классической широкопольной оптической микроскопии [4]. Однако к существенным недостаткам данного метода следует отнести невозможность контроля всего объема жидкости, ввиду фокусировки на конкретном объекте.

На сегодняшний день основные методы исследований с субмикронным разрешением основываются на применении зондовой микроскопии, включая ближнеполевую оптическую микроскопию. Данные методы предполагают непосредственный контакт с исследуемой поверхностью либо ограниченные пространственные размеры образца и определенную его подготовку, что ограничивает задачи её применения, например, для биологических объектов, процессов, протекающих в реальном времени, либо для образцов, требующих бесконтактных методов исследования.

Прикладная область сверхразрешающей микроскопии не ограничивается улучшением качества изображения, а находит применение в задачах оптической записи, литографии метрологических исследованиях, оптическом манипулировании. Использование интерференционных методов в сочетании с принципами цифровой обработки голограмм позволяет получить новые возможности в интерферометрии и трехмерной реконструкции изображения геометрии поверхности, её морфологических особенностей на микро и наноуровнях. Решение подобных задач требует использования микроскопов с функцией измерения профиля, принципы действия которых основываются на гетеродинной интерферометрии [5]. Гетеродинная чувствительная часть, основанная на явлении интерференции, предложена в работе [6] и имеет систему, содержащую интерферометр Маха-Цендера, позволяющий измерять деформацию линий интерферограмм. Таким образом, зондирующий когерентный пучок, отразившись от поверхности исследуемого образца и, интерферируя с опорным пучком, проецируется на ПЗС или КМОП камеру, фиксирующую результирующие периодические биения интенсивности сигнала вследствие несколько различной частоты предметного и опорного пучков для каждого пикселя изображения. Фазовая составляющая вычисляется для отдельных точек картины с применением алгоритмов Фурье-преобразования. Известные способы гетеродинного анализа поверхностного профиля различаются величиной разности частот когерентных пучков и отдельными специфическими параметрами оптических систем.

Физический механизм исследования фазовых микрообъектов заключается в получении точных значений фазового запаздывания волны, прошедшей через объект или отраженной от его поверхности, что возможно благодаря определению оптической длины пути, представляющей собой интеграл от функции пространственного распределения показателя преломления по направлению распространения световой волны. При различных углах зондирования образца становится возможным получение набора значений оптической длины пути и реконструкция пространственного трехмерного распределения показателя преломления, благодаря чему можно вычислить различные производные характеристики, такие как: плотность, концентрацию, морфометрические показатели (для биологических образцов).

На данный момент задача визуализации объемных фазовых объектов решается методами: фазового контраста или метода Цернике; методом темного поля; поляризационного контраста; интерференционного контраста; и градиентной фазовой микроскопии [7 – 12]. Распространенным недостатком данных методов в ряде задач является лишь качественный анализ изучаемого

препарата. На современном уровне исследований требуется получение количественной информации при сверхмалых изменениях отдельных параметров, что достигается применением методов высокочувствительных фазовых измерений, каждый из которых имеет свою область применения. Так, количественные исследования характеристик фазовых микрообъектов возможно проводить с помощью интерференционных микроскопов [13 – 15]. Для проведения данных измерений в основном используют микроскопы, в основе которых лежат различные схемы двулучевых интерферометров: Майкельсона, Маха-Цендера и Миро [15 – 17].

Альтернативный метод интерферометрического анализа был предложен в работе [18 – 20], где применена комбинация интерференции двух пучков с различными длинами волн, а также гетеродинная интерферометрия с использованием модифицированного интерферометра Тваймана–Грина. Интенсивность светового поля фиксировалась ПЗС матрицей, затем вычислялись фазовые составляющие полученного изображения. Идентичные измерения повторялись снова для других длин волн. Дальнейшее улучшение данной технологии было осуществлено посредством многолучевой интерферометрии пучков с различной длиной волны [21 – 23]. Однако, точность гетеродинного детектора имела свои ограничения, обусловленные сложностью устойчивого определения разницы фазовых составляющих для пучков с близкими частотными характеристиками. Таким образом, задачи поиска методов для эффективных и быстрых алгоритмов в микроскопии все еще остаются не решенными.

Разработка принципов неинвазивной микроскопии с визуализацией внутренней структуры объектов и дефектов ней актуальна для таких задач, как зондирование поверхности в условиях производственных линий высокоточной электроники, оптических линий связи, сложных рельефов поверхности оптических элементов, наноиндустрии и биотехнологиях/

В настоящее время интенсивно развиваются исследования фазовых возмущений волновых фронтов световых полей, вследствие взаимодействия световой волны и различных объектов [24]. Запись цифровым способом фазовых особенностей поля волны с последующей обработкой и получением изображения микрочастиц получило название цифровой голографической микроскопии. Этот метод обеспечивает восстановление с высокой разрешающей способностью пространственных фазовых распределений волнового поля в зависимости от изменяющегося во времени исходного объекта [18]. Использование цифровой голографической микроскопии позволяет за один

замер определить абсолютное количество взвешенных частиц в исследуемом объеме жидкости, а также их пространственное распределение.

Целью работы является апробация метода цифровой голографической микроскопии для измерения загрязненности морской воды взвешенными частицами и оценка минимального размера обнаруживаемой частицы.

Теоретическая часть

Для численной реконструкции голограммы в плоскости, требуется знать распределение интенсивности поля, которое является результатом интерференции волн. Математически это можно представить следующим образом [25]:

$$I = |o_1 + o_2|^2 = |o_1|^2 + |o_2|^2 + o_1 o_2^* + o_1^* o_2 = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(\varphi_1 - \varphi_2), \quad (1)$$

где o_1 и o_2 – комплексные амплитуды интерферирующих волн $o(x, y) = |o(x, y)| \exp[-i\phi(x, y)]$, o^* – комплексно сопряженная o ; величины φ_1 и φ_2 представляют собой начальную фазу волн.

Таким образом, наблюдаемое распределение интенсивности светового поля зависит только от разности фаз интерферирующих волн. Умножим записанную цифровую голограмму, т. е. интенсивность интерференционной картины $I(x, y)$, на значение поля опорной волны $o_2(x, y)$:

$$o_2(x, y)I(x, y) = o_2(x, y)|o_2(x, y)|^2 + o_2(x, y)|o_1(x, y)|^2 + |o_2(x, y)|^2 o_1(x, y) + o_2^2(x, y)o_1^*(x, y). \quad (2)$$

Первое слагаемое в правой части уравнения (2) пропорционально значению $o_2(x, y)$ опорной волны, второе слагаемое описывает пространственное изменение интенсивности «свечения» вокруг первого порядка дифракции. Вместе они составляют нулевой порядок дифракции, или фоновую составляющую. Третье слагаемое с точностью до известного множителя $|o_2(x, y)|^2$ представляет собой точную копию исходного поля $o_1(x, y) = |o_1(x, y)| \exp(i\phi(x, y))$ и является мнимым изображением объекта. Четвертое слагаемое относится к еще одному изображению объекта, «изображению-двойнику», которое называется действительным изображением.

В процессе записи цифровой голограммы исследуемый трехмерный объект с рассеивающей свет поверхностью располагается на расстоянии d от камеры. Записанная голограмма может рассматриваться как пропускающий транспарант, на котором дифрагирует опорная волна. Для получения результирующей объектной волны в цифровой голографии применяется

численный расчет распространения оптического поля вида $o_2(x, y)I(x, y)$ от плоскости голограммы (ξ, η) до плоскости объекта.

Численное восстановление записанной в цифровом виде голограммы осуществляется в соответствии со скалярной теорией дифракции в приближении Френеля для дифракционного интеграла Рэлея-Зоммерфельда. В нашем исследовании применен метод углового спектра для восстановления голограммы в качестве метода, который не имеет ограничений по расстояниям z от образца до плоскости изображения, при этом размер каждого пикселя восстановленного изображения соответствует размеру пикселя исходной голограммы [34].

Угловой спектр излучаемого поля $E(\xi, \eta)$ в плоскости голограммы ($z = 0$) определяется как преобразование Фурье:

$$A(k_x, k_y) = F[E(\xi, \eta)] = \frac{1}{2\pi} \int \int_{-\infty}^{\infty} d\eta d\xi E(\xi, \eta) \exp[-i(k_x \eta + k_y \xi)], \quad (3)$$

где волновой вектор $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, $k_x = k \frac{x}{z}$, $k_y = k \frac{y}{z}$, $k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$.

После распространения на расстояние z до плоскости изображения (x, y) дифрагирующая волна приобретает дополнительную фазу $\exp(ik_z z)$, таким образом, мы получаем амплитуду в плоскости (x, y) на расстоянии z :

$$E(x, y)_z = \frac{1}{2\pi} \int \int_{-\infty}^{\infty} dk_x dk_y A(k_x, k_y) \exp[i(k_x x + k_y y + \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z)]. \quad (4)$$

Можно переписать уравнение (4) как двойное преобразование Фурье объектного поля $E(\xi, \eta)$:

$$E(x, y)_z = F^{-1} \left\{ F[E(\eta, \xi)] \times \exp(i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z) \right\}, \quad (5)$$

где $k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$. В уравнении (4) и (5) мы предположили, что k_z является действительным, поэтому должно выполняться условие $k^2 \geq k_x^2 + k_y^2$.

Интенсивность $I(x, y; z)$ и фаза $\varphi(x, y; d)$ могут быть получены из комплексного поля $E(x, y)_z$ на расстоянии z с использованием следующих соотношений:

$$I(x, y; z) = |E(x, y)_z|^2, \quad (6)$$

$$\varphi(x, y; d) \arctg \left\{ \frac{\text{Im}[E(x, y)_z]}{\text{Re}[E(x, y)_z]} \right\} = \arg[E(x, y)_z]. \quad (7)$$

Значения фаз $\varphi(x, y; z)$, которые были получены в уравнении (7) соответствуют модулю 2π . Один из известных алгоритмов разворачивания фазы может быть применен для восстановления значений фазы.

Экспериментальная часть

Экспериментальная установка (рисунок 1) включала: полупроводниковый лазер с мощностью оптического излучения 120 мВт на длине волны 535 нм, диафрагму с размером отверстия 25 мкм, кювету с тестовой средой. Для апробации метода и оценки минимального размера обнаруживаемых частиц были подготовлены несколько тестовых сред. Они состояли из дистиллированной воды и взвешенных частиц микропластика, отсортированных сторонним методом по линейным размерам частиц в диапазонах: от 0 до 5 мкм; от 15 до 20 мкм; от 40 до 50 мкм; от 90 до 100 мкм.

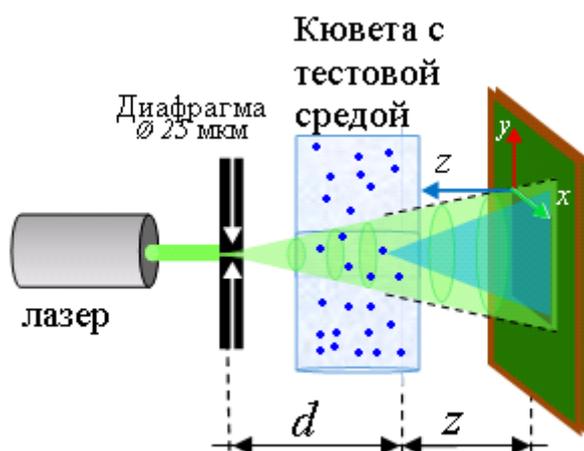


Рисунок 1 – Схема экспериментальной установки

Для получения данных о форме образца из объектной волны в цифровой голографии используется численный расчёт распространения оптического поля от плоскости голограммы к плоскости изображения по формуле (7).

Результаты и обсуждение

На рисунке 2 и рисунке 3 показаны восстановленные численным методом голограммы кюветы с тестовой средой и частицами разных размеров.

Изображение частиц на рисунке 2, а практически неразличимы на уровне шумов. Из рисунка 2 и рисунка 3 следует, что частицы с размерами менее 20 мкм практически не обнаруживаются на данной установке. Время анализа тестовой среды, включая получение изображения и компьютерную обработку, составило не более 100 мкс.

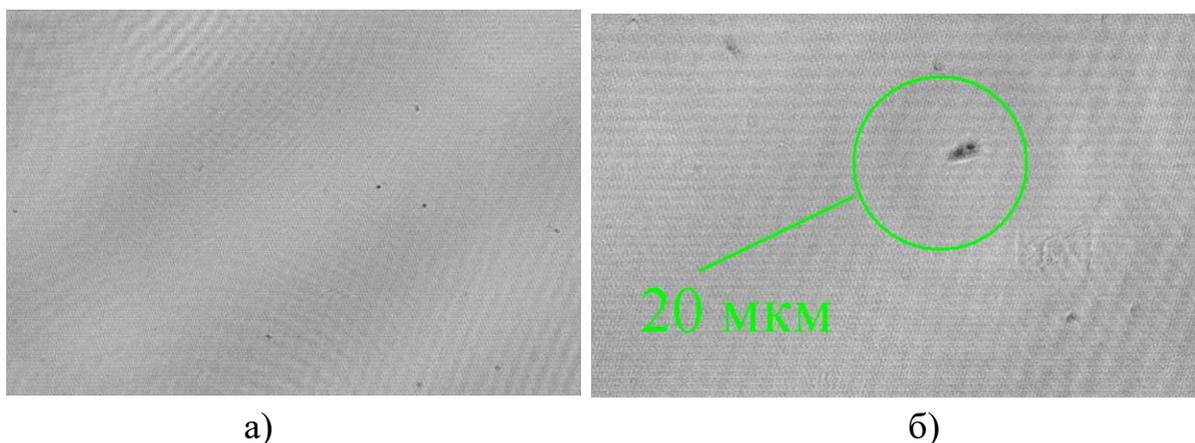


Рисунок 2 – Восстановленные численным методом голограммы в кювете с тестовой средой и частицами, размером: а) от 0 до 5 мкм; б) от 15 до 20 мкм

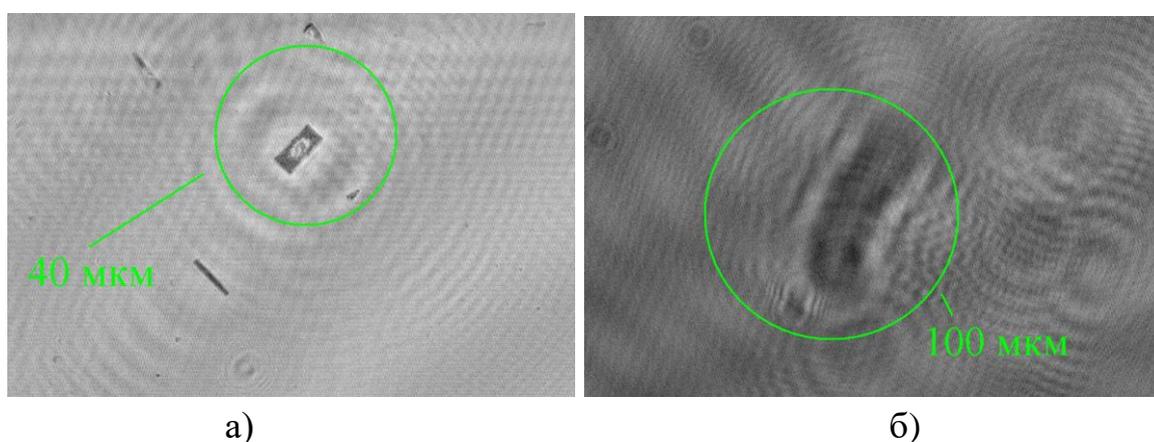


Рисунок 3 – Восстановленные численным методом голограммы в кювете с тестовой средой и частицами, размером: а) от 40 до 50 мкм; б) от 90 до 100 мкм

Заключение

В данной работе представлен метод цифровой голографической дефектоскопии, позволяющий восстановить комплексную амплитуду волны, а значит и амплитуду и фазу волнового фронта от объекта, что, как следствие, решает поиска взвешенных в жидкости частиц. Голографический принцип регистрации позволяет реализовать возможность регистрации нескольких голограмм в различных сечениях кюветы с тестовой средой.

Установлено, что при применении описываемой установки можно достоверно детектировать частицы с размерами более 20 мкм. Предлагаемый метод, помимо качественного наблюдения объемных включений, позволяет восстанавливать трехмерные геометрические формы объектов по массиву накопленных в компьютерной системе данных. Это открывает широкие перспективы данного диагностического метода, одновременно определяющим не только размер частиц, но и тип их материала.

Благодарность

Данное исследование было поддержано Программой развития Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского на 2015 – 2024 годы (ВГ21 / 2019) при финансовой поддержке РФФИ и Совета Министров Республики Крым в соответствии с исследовательским проектом № 19-42-910010, а также стипендиальной программой Президента Российской Федерации для молодых ученых (СП-745.2019.4).

Библиографический список

1. Hansen R. A. Determination of micro plastics in coastal beach sediments along Kattegat Sea, Denmark / R. A. Hansen, A. Gross // *Theoretical and Applied Ecology*. – 2019. – Vol. 2. – P. 75–82.
2. Wozniak S. B. Modeling the optical properties of mineral particles suspended in seawater and their influence on ocean reflectance and chlorophyll estimation from remote sensing algorithms / S. B. Wozniak, D. Stramski // *Applied Optics*. – 2004. – Is. 17 (43). – P. 3489–3503.
3. Tahara T. Multiwavelength digital holography with wavelength-multiplexed holograms and arbitrary symmetric phase shifts / T. Tahara, R. Otani, K. Omae // *Optics Express*. – 2017. – Is. 25. – P. 11157–11172.
4. Vijayakumar A. Interferenceless coded aperture correlation holography – a new technique for recording incoherent digital holograms without two-wave interference / A. Vijayakumar, J. Rosen // *Optics Express*. – 2017. – Is. 25. – P. 13883–13896.
5. Soskin M. S. Singular Optics / M. S. Soskin, M. V. Vasnetsov // *Progress in Optics*. – 2001. – Vol. 42. – P. 219–276.
6. Huang Yeu-Chuen. Polarized Optical Heterodyne Profilometer / Yeu-Chuen Huang, Chien Chou, Ling-Yu Chou [et al.] // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 1998. – Vol. 37, Is. 1. – P. 351.
7. Molloy J. E. Optical tweezers in a new light / J. E. Molloy, K. Dholakia, M. J. Padgett // *Journal of Modern Optics*. – 2003. – Vol. 50. – P. 1501–1507.
8. Feldman L. C. Fundamentals of Surface and Thin Film Analysis / L. C. Feldman, J. W. Mayer. – New York : North-Holland, 1986. – P. 120–25.
9. Shivea L. W. Impact of Thermal Processing on Silicon Wafer Surface Roughness / L. W. Shivea, B. L. Gilmore // *Semiconductor Wafer Bonding 10: Science, Technology, and Applications*. – 2008. – Vol. 16, Is. 8. – P. 401–405.
10. Kranz C. Impact of The Rear Surface Roughness on Industrial-Type Perc Solar Cell / C. Kranz, S. Wyczanowski, S. Dorn [et al.] // *27th European Photovoltaic Solar Energy Conference, Frankfurt, Germany and Exhibition : 27th EU PVSEC* / Ed. K. Aust. – Frankfurt : [s. n.], 2012. – P. 557–560.
11. Sprague R. Surface Roughness Measurement Using White Light Speckle / R. Sprague // *Applied Optics*. – 1972. – Vol. 11, Is. 12. – P. 2811–2816.
12. Zhenrong Z. Roughness Characterization of Well-polished Surfaces by Measurements of Lightscattering Distribution / Z. Zhenrong, Z. Jing, G. Peifu // *Optica Applicata*. – 2010. – Vol. 40, – Is. 4. – P. 811–818.

13. Nevliudov I. Sh. Technology of the Automated Surface Quality Testing / I. Sh. Nevliudov, E. P. Vtorov, V. V. Tokarev // Messenger of the Kharkov economic university. – 1998. – Vol. 1. – P. 86–88.
14. Nevliudov I. Sh. Method of the Interferential Images Analysis During Testing of Quality Parameters of Fiber-Optical Components Surface / I. Sh. Nevliudov, A. I. Filipenko // News of Engineering Sciences Academy of Ukraine: Mechanical engineering and progressive technologies. – 2004. – Vol. 4, Is. 24. – P. 81–87.
15. The Analysis of a Microstructure, Surface Quality and Properties of Aluminum Oxide Substrates / E. S. Lukin, E. V. Anufrieva, N. A. Popova, B. A. Morozov // Functional Ceramics (Nizhny Novgorod , May 13–15 2009). – Nizhny Novgorod : [s. n.], 2009. – P. 35–40.
16. Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue / G. Best, R. Amberger, D. Baddeley [et al.] // Micron. – 2011. – Vol. 42. – P. 335.
17. Huang Yeu-Chuen. Polarized Optical Heterodyne Profilometer / Yeu-Chuen Huang, Chien Chou, Ling-Yu Chou [et al.] // Japanese Journal of Applied Physics. – 1998. – Vol. 37, Is. 1. – P. 351.
18. McMackin L. Multiple wavelength heterodyne array interferometry / L. McMackin, D. G. Voelz, M. P. Fetrow // Optics Express. – 1997. – Vol. 1, Is. 11. – P. 332–337.
19. Barer R. Determination of Dry Mass, Thickness, Solid and Water Concentration in Living Cells / R. Barer // Nature. – 1953. – Vol. 172, Is. 4389. – P. 1097.
20. Kim T. Gradient field microscopy for label-free diagnosis of human biopsies / T. Kim, S. Sridharan, A. Kajdacsy-Balla [et al.] // Applied Optics. – 2013. – Vol. 52, Is. 1. – P. 92.
21. Hsieh Hung-Chih. Two-wavelength full-field heterodyne interferometric profilometry / Hung-Chih Hsieh, Yen-Liang Chen, Zhi-Chen Jian [et al.] // IOP Publishing Ltd Measurement Science and Technology. – 2009. – Vol. 20, Is. 2. – P. 025307.
22. Kitagawa K. Single-shot surface profiling by multiwavelength interferometry without carrier fringe introduction / K. Kitagawa, J. Electron // Imaging. – 2012. – Vol. 21, Is. 2. – P. 021107.
23. Alexeyev C. N. Reciprocal optical activity in multihelicoidal optical fibers / C. N. Alexeyev, E. V. Barshak, B. P. Lapin, M. A. Yavorsky // Physical Review A. – 2018. – Vol. 98. – P. 023824.
24. Alexeyev C. N. Effect of a spacer on localization of topological states in a Bragg multihelicoidal fiber with a twist defect / C. N. Alexeyev, B. P. Lapin, M. A. Yavorsky // Journal of Optics. – 2018. – Is. 20. – P. 025603.
25. Sokolenko B. V. Three-dimensional nanoscale optical vortex profilometry / B. V. Sokolenko, D. A. Poletaev // Proceedings SPIE. – 2017. – Vol. 10350. – P. 1035012.