

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

TESTOVÁNÍ REFLEXNÍHO MÓDU MULTIMODÁLNÍHO HOLOGRAFICKÉHO MIKROSKOPU

TESTING OF MULTIMODAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE IN REFLECTION MODE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUKÁŠ KACHTÍK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ANETA KŘÍŽOVÁ

BRNO 2014

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav fyzikálního inženýrství

Akademický rok: 2013/14

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Lukáš Kachtík

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Fyzikální inženýrství a nanotechnologie (3901R043)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Testování reflexního módu multimodálního holografického mikroskopu

v anglickém jazyce:

Testing of multimodal holographic microscope in reflection mode

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Nově instalovaný multimodální holografický mikroskop umožňuje zobrazování v reflexním holografickém módu. Tento mód zobrazování nebyl zatím systematicky testován. Ověření funkčnosti mikroskopu a stanovení jeho základních parametrů je tedy předmětem této bakalářské práce.

Cíle bakalářské práce:

- 1) Vypracování rešerše metody reflexní holografické mikroskopie.
- 2) Zobrazení a proměření vhodných vzorků a porovnání zobrazení s referenční metodou.
- 3) Stanovení axiálního i laterálního rozlišení mikroskopu při použití jednotlivých objektivů.
- 4) Testování dalších parametrů mikroskopu a jejich změření.

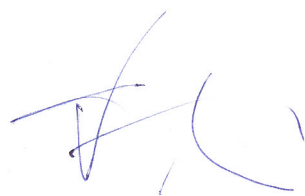
Seznam odborné literatury:

- [1] Kim, M.: Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications, Springer, 2011
- [2] Radim Chmelík, Zdeněk Harna, "Parallel-mode confocal microscope," Optical Engineering 38, 1635-1639 (1999)
- [3] Radim Chmelík, Zdeněk Harna, "Surface profilometry by parallel-mode confocal microscope," Optical Engineering 41, 744-745 (2002)
- [4] Tomáš Slabý, Pavel Kolman, Zbyněk Dostál, Martin Antoš, Martin Lošťák, and Radim Chmelík, "Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope," Opt. Express 21, 14747-14762 (2013)

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Aneta Křížová

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2013/14.

V Brně, dne 29.10.2013



prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
Ředitel ústavu



prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc., dr. h. c.
Děkan

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá testováním reflexního módu Multimodálního holografického mikroskopu zkonstruovaného ve spolupráci s firmou TESCAN. Testováním se myslí především stanovení osového a laterálního rozlišení, ověření osově intenzitní odezvy a zdokumentování chyb a nedostatků nalezených při měření. Závěr práce je věnován srovnání s mikroskopem atomárních sil.

Správné pochopení ovládání mikroskopu a vypracování postupu k jeho naladění bylo nezbytnou součástí této práce.

Summary

The thesis is focused on testing of reflection mode of Multimodal holographic microscope constructed in cooperation with TESCAN company. The assessment of axial and lateral resolution, verification of axial intensity response and documentation errors and deficiencies found while measuring are included in the testing procedure. In the conclusion, the Multimodal holographic microscope is compared to an atomic force microscope.

A proper understanding of microscope operation and a formulation of an adjustment procedure were essential components of this work.

Klíčová slova

holografický mikroskop, profilometrie, osová intenzitní odezva, axiální a laterální rozlišovací schopnost

Keywords

holographic microscope, profilometry, axial intensity response, axial and lateral resolution ability

KACHTÍK, Lukáš. *Testování reflexního módu multimodálního holografického mikroskopu*. Brno, 2014. 41 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství. Vedoucí práce Aneta KŘÍŽOVÁ.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci *Testování reflexního módu multimodálního holografického mikroskopu* vypracoval samostatně pod vedením Anety Křížové, s použitím materiálů uvedených v seznamu literatury.

30.5.2014

Lukáš Kachtík

Děkuji své školitelce Ing. Anetě Křížové za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a vstřícný přístup, Ing. Petru Dvořákovi za pomoc s referenční metodou, Bc. Jiřímu Babockému za poskytnuté vzorky, své rodině za podporu a přítelkyni za trpělivost.

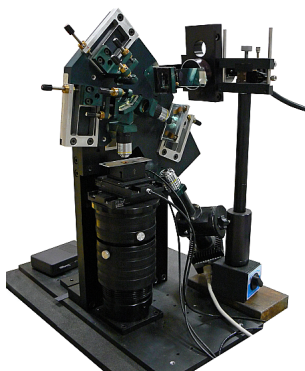
Lukáš Kachtík

Obsah

Úvod	1
1. Reflexní digitální holografický mikroskop (RDHM)	3
1.1. Principy RDHM	3
1.1.1. Interference světla	3
1.1.2. Osová a mimoosová holografie	4
1.1.3. Vlnová délka světla	4
1.1.4. Koherence světla	4
1.2. Schéma RDHM	5
1.3. Popis hlavních částí RDHM	6
1.4. Návod na obsluhu RDHM	8
1.4.1. Nastavení RDHM a získání hologramu	9
1.4.2. Autojustáž (vhodný postup a parametry)	10
1.4.3. Měření a ukládání dat	10
1.4.4. Zpracování po měření	11
2. Teoretický výpočet testovaných vlastností	13
2.1. Rozlišení RDHM	13
2.2. Osová intenzitní odezva	13
3. Testování	17
3.1. Rozlišení RDHM	17
3.1.1. Osové rozlišení	17
3.1.2. Laterální rozlišení	22
3.2. Osová intenzitní odezva	25
3.3. Zjištěné nedostatky během testování	30
3.3.1. Softwarové chyby a nedostatky	30
3.3.2. Technické chyby a nedostatky	30
3.3.3. Návrhy na vylepšení	31
4. Referenční metoda - AFM	33
4.1. Měření a srovnání	33
4.2. Výhody a nevýhody RDHM a AFM	37
Závěr	39
Literatura	41

Úvod

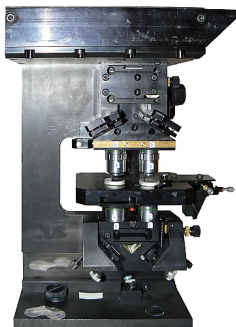
Tato práce se zabývá testováním reflexního módu Multimodálního holografického mikroskopu instalovaného v Laboratoři experimentální biofotoniky Ústavu fyzikálního inženýrství (ÚFI) VUT v Brně. Testování představuje především proměřování charakteristických odezev mikroskopu, měření laterálního a osového rozlišení, proměřování povrchů vzorků, porovnání s referenční metodou a dokumentaci nedostatků zjištěných při testování.



Obrázek 1: Koherencí řízený holografický mikroskop - reflexní.

Holografická mikroskopie se stala jednou z populárních metod současnosti, a to díky rychlé výpočetní technice umožňující zpracovávání obrazu (hologramu) prakticky v reálném čase. Je to metoda využívající fázový posuv.

Vývoj holografických mikroskopů má na ÚFI VUT v Brně několikaletou tradici [1]. Pod vedením prof. RNDr. Radima Chmelíka Ph.D. byl sestaven koherencí řízený holografický mikroskop (obr. 1) využívající nekoherentní osvětlení v mimoosovém uspořádání [2].



Obrázek 2: Koherencí řízený holografický mikroskop - transmisní.

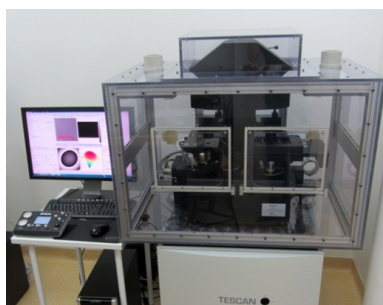
Tento mikroskop podporoval pouze reflexní mód a byl zkonstruován v rámci disertační práce Ing. Ludka Lovicara, Ph.D. Byl určen pro měření povrchů a v porovnání s jinými

ÚVOD

holografickými metodami má tento mikroskop řadu výhod, které jsou zmíněné v kap. 1. Rozsáhlá měření pak byla zpracována v disertační práci [2] a článku [3].

Dále byl v rámci disertační práce Ing. Pavla Kolmana, Ph.D. zkonstruován transmisní holografický mikroskop (obr. 2), jehož výhody byly rozebrány a popsány v pracích [1] a [4].

Další vývoj vedl ke zkonstruování prototypu ve spolupráci s firmou TESCAN, a to v rámci projektu Multimodální holografický mikroskop (obr. 3). Účastníci¹ získali za tuto spolupráci ocenění Nejlepší spolupráce roku 2013 [5].



Obrázek 3: Multimodální holografický mikroskop.

Tento mikroskop umožňuje 3 módy zobrazení - holografický transmisní, holografický reflexní a fluorescenční. Transmisní mód je nejvíce užívaným módem mikroskopu. Lze pomocí něj kontrastně zobrazovat živé buňky v rozptylujícím prostředí, které mikroskop úspěšně potlačuje a sledovat jejich pohyb v reálném čase díky mimoosovému uspořádání. Konvenční optické mikroskopy neumožňují zobrazování fázového posuvu, buňky pomocí nich tedy nelze zobrazovat tak kontrastně.

Reflexní mód není tak často užívaný, avšak mikroskop nabízí řadu výhod i pro něj. Mikroskop dosahuje osového rozlišení řádu jednotek nanometrů [6]. Toho se využívá například při měření profilometrie povrchů. V porovnání s mikroskopem atomárních sil (AFM), holografický mikroskop umožňuje zaznamenat výšku povrchu jedním snímkem, zatímco měření AFM vyžaduje dlouhou dobu rastrování a složitější přípravu než holografický mikroskop. Nevýhodou holografického mikroskopu v porovnání s AFM je laterální rozlišení srovnatelné s konvenčními konfokálními mikroskopy [6].

I přes zmíněné výhody nebyl doposud reflexní mód nově instalovaného multimodálního holografického mikroskopu systematicky testován. Ověření funkčnosti mikroskopu a stanovení jeho základních parametrů je tedy předmětem této bakalářské práce.

Označením RDHM bude v celé následující práci míněn reflexní mód Multimodálního holografického mikroskopu zkonstruovaného ve spolupráci s firmou TESCAN umístěného v Laboratoři experimentální biofotoniky FSI VUT v Brně.

Cíle bakalářské práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Ověřit funkčnost reflexního módu, zaznamenat nedostatky a návrhy na vylepšení
- Stanovit osově a laterální rozlišení mikroskopu při použití jednotlivých objektivů
- Testovat další parametry mikroskopu a provést jejich změření (stabilita, šum)
- Zobrazit a proměřit vhodné vzorky a porovnat zobrazení s referenční metodou

¹Firma TESCAN, Vysoké učení technické v Brně a Ústav molekulární genetiky AV ČR [5]

1. Reflexní digitální holografický mikroskop (RDHM)

RDHM vychází z mikroskopu konfokálního doplněného o referenční větev s využitím unikátních vlastností mimoosové holografie s prostorově a časově nekoherentním osvětlením [6].

Nekoherentní holografie přináší řadu výhod, jako je kvalitní amplitudový a fázový obraz. Tohoto typu holografie lze dosáhnout omezením prostorové a časové koherence. K omezení prostorové koherence dojde otevřením aperturní clony, čímž získáme lepší laterální rozlišení [6]. Časovou koherenci redukuje použití polychromatického osvětlení a spolu s omezením prostorové koherence získáme úspěšné potlačení úrovně šumu vznikající např. u laserových zdrojů [6]. Navíc je amplituda hloubkově diskriminována, jelikož optické dráhy obou větví jsou stejné (koherentní buňky) [6]. To přináší možnost provádět optické řezy vzorkem.

RDHM dále poskytuje výhody osově holografie (in-line) i mimoosové holografie (off-axis) zároveň [6]. Osová holografie přináší možnost použití nekoherentního osvětlení, mimoosová možnost zachycení pouze jednoho snímku hologramu [6]. Využití výhod obou sestav se současnou redukcí nevýhod bylo dosaženo achromatickým, prostorově invariantním uspořádáním s použitím difrakční mřížky [6].

RDHM je tedy schopen poskytnout obraz vzorku se značným potlačením šumu, v reálném čase, s použitím optických řezů, fázovým kontrastem a laterálním rozlišením srovnatelným s konvenčními optickými mikroskopy [6].

1.1. Principy RDHM

Holografický mikroskop využívá řadu fyzikálních vlastností, díky kterým získává výjimečné vlastnosti zobrazování a možnost zobrazení objektu ve třech dimenzích. Tato kapitola pojednává o dosažení těchto vlastností.

1.1.1. Interference světla

Holografický mikroskop je uspořádán tak, aby využíval interferenci světla. Obě větve jsou sestaveny ze stejných optických prvků a obě mají stejnou optickou dráhu. Ta se dá nastavit pomocí zrcadel připojených k piezoelektrickému posuvu, který ovládá délku referenční větve. Celé uspořádání je achromatické, což slouží k zachování nezávislosti na vlnové délce světla použitého k zobrazování, a díky difrakční mřížce také prostorově invariantní, aby se oba paprsky rozdělené na děliči opět sešly ve stejném místě detektoru. Při zachování tohoto uspořádání dochází na CCD čipu k interferenci světla. Je-li v objektové větvi vložen vzorek, paprsek se od něj odrazí a s rozdílnou fází pak dopadne na detektor, což se projeví i v interferenčním obrazci (hologramu). Z výsledného hologramu se poté

1. REFLEXNÍ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP (RDHM)

numericky vypočítá nejen amplituda, ale i fáze, která se poté převede na výšku vzorku. Využitím interference získává holografický mikroskop nesrovnatelně lepší osově rozlišení oproti mikroskopu konfokálnímu.

1.1.2. Osová a mimoosová holografie

Bylo navrženo mnoho holografických systémů, které využívají osově uspořádání (in-line). Tyto systémy vykazují nulový (nebo skoro nulový) úhel mezi objektovou a referenční větví při dopadu na čip CCD kamery [6]. Použití světla s nízkou prostorovou a časovou koherencí zde dovoluje potlačení koherenčního šumu a možnost tvorby optických řezů [6]. K sestavení fáze jsou však potřeba nejméně 3 interferogramy [1]. To může být v časově proměnných vzorcích limitujícím faktorem. U časově neproměnných vzorků může docházet k vibracím způsobeným okolím, což může způsobit chyby měření.

Opačným případem osově holografie je mimoosová holografie (off-axis) vykazující nenulový úhel mezi oběma větvemi. V tomto uspořádání však není možné použití nekoherentního světla [6]. Z toho důvodu není potlačení šumu nebo tvorba optických řezů možná. Výhodou tohoto sestavení je ale zachycení pouze jednoho snímku hologramu, což je nutnou podmínkou pro sledování rychlých dějů probíhajících např. v živých buňkách.

RDHM je sestaven sice mimoosově, ale achromaticky a prostorově invariantně. Lze tedy použít světlo s nízkou koherencí, které umožňuje využití výhod obou sestav zároveň s eliminací jejich nevýhod. RDHM je tedy schopen zobrazování bez koherenčního šumu s možnostmi optických řezů a tím i potlačení vedlejších interferencí, se zobrazením fázového kontrastu, a to všechno v jeden okamžik (real-time) [6].

1.1.3. Vlnová délka světla

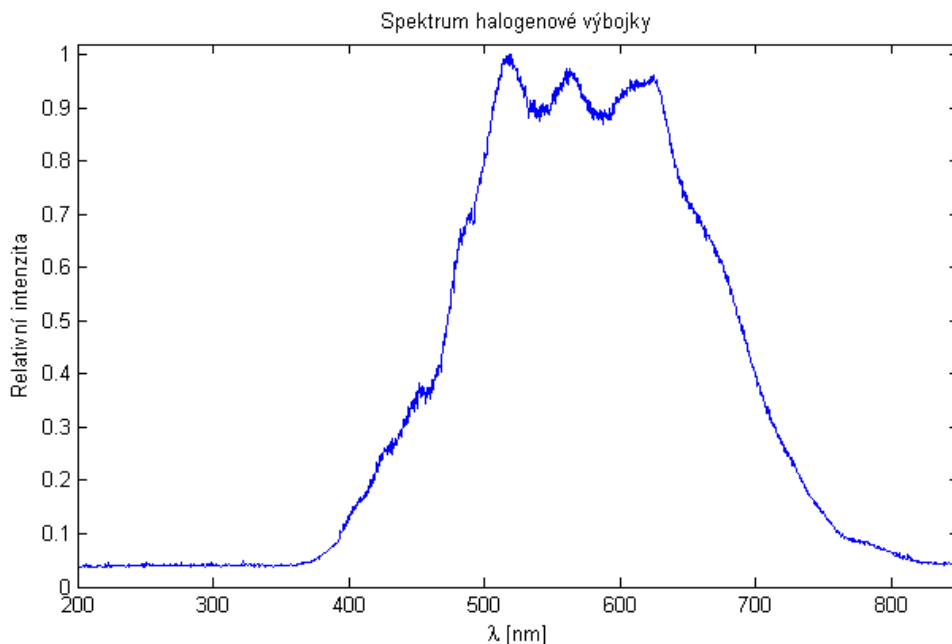
Důležitým parametrem mikroskopu je použité světlo k zobrazování. Jedná se především o vlnovou délku světla s danou spektrální šířkou. Díky achromatickosti celé sestavy lze použít světla o různých vlnových délkách a tím dosáhnout lepšího laterálního i osově rozlišení (dokonce lze použít i bílé světlo). Spektrální šířka svazku nám zase určuje časovou koherenci paprsku a s tím spojené vlastnosti. K získání tohoto osvětlení slouží halogenová výbojka s příslušnými interferenčními filtry, pomocí kterých si zvolíme, jaký typ osvětlení požadujeme.

1.1.4. Koherence světla

V běžně dostupných přístrojích užitých k holografii přetrvává použití laserového světla s vysokou koherencí, popř. jiné koherentní zdroje [7, 8]. Tato vysoká koherence způsobuje koherenční šum a nežádoucí interference v optické soustavě [1]. Všechny tyto jevy způsobují ve výsledku horší kvalitu zobrazení. Proto je vhodné použít zdroj světla s nižší prostorou a časovou koherencí. Toho docílíme například použitím laseru a matnice, popř. použitím halogenové výbojky, čímž se nám otevře možnost využití celého spektra vlnových délek. Snížením koherence potlačíme šum pocházející z rozptylových center ležících mimo předmětovou rovinu objektivu. Tím dojde také k potlačení nežádoucích interferencí pocházejících z rozhraní optických členů [1].

Malá koherenční délka navíc nabízí možnost optických řezů. Využívá opět efektu potlačení světla rozptýleného mimo rovinu ostroti, čímž dochází ke zlepšení kontrastu a SNR (signal-to-noise-ratio) [1]. Toho se využívá především v transmisním módu při pozorování buněk v rozptylujícím prostředí, ale i v reflexním módu se tato vlastnost využije, požadujeme-li tvorbu optických řezů, tzv. hloubkovou diskriminaci.

V našem případě je k zajištění nekoherentního osvětlení použita halogenová výbojka. Její emisní spektrum bylo proměřeno spektrometrem a je vidět na obr. 1.1.



Obrázek 1.1: Emisní spektrum halogenové výbojky.

Koherenční délka se poté vypočte ze vztahu

$$L = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}, \quad (1.1)$$

kde λ je centrální vlnová délka použitého osvětlení a $\Delta\lambda$ je pološířka spektra.

Pro případ světla¹ o centrální vlnové délce 547 nm a pološířce spektra 10 nm je koherenční délka rovna hodnotě 29,92 μm . Při aproximaci spektra na obr. 1.1 spektrem s centrální vlnovou délkou 575 nm a pološířkou 220 nm, je koherenční délka rovna hodnotě 1,50 μm , což je asi 20x méně než v předešlém případě

1.2. Schéma RDHM

Schéma mikroskopu je zobrazeno na obr. 1.2. Dá se rozdělit na osvětlovací část, objektovou a referenční větev a detekční část.

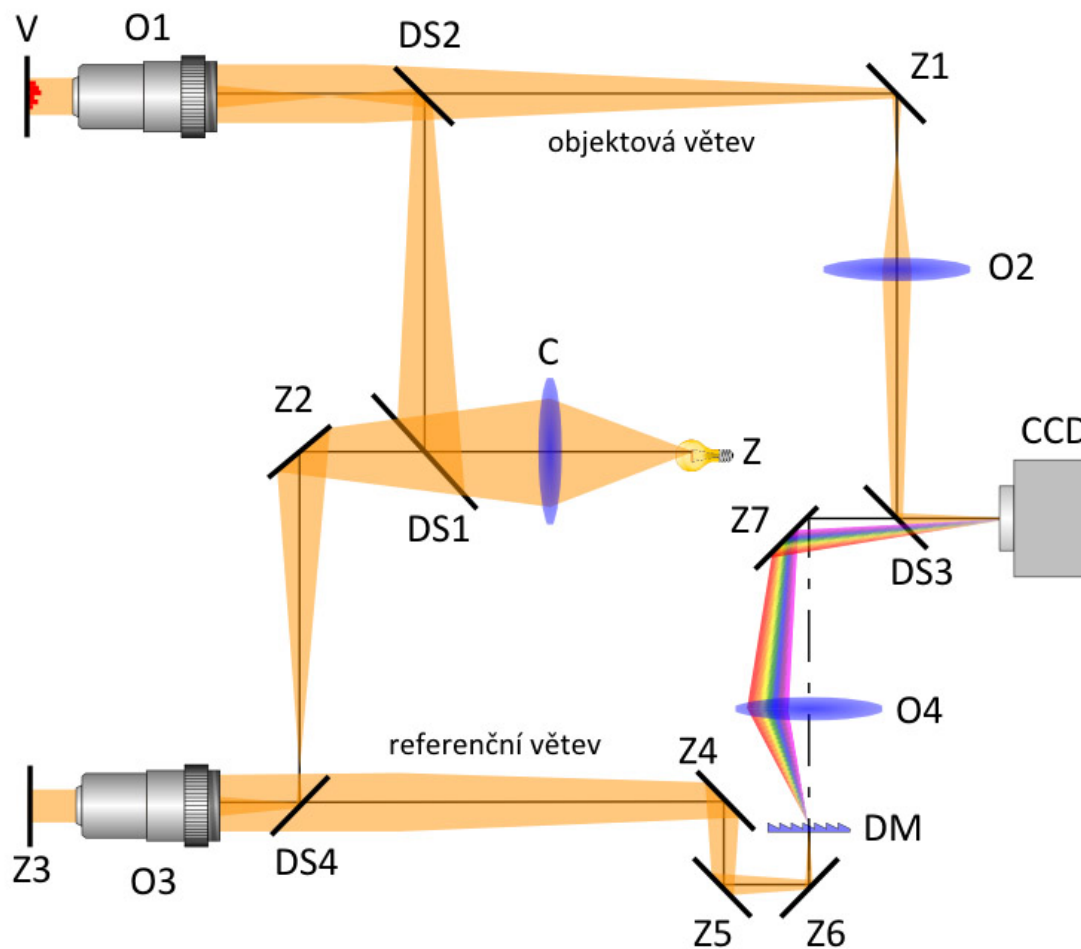
Zdroj tvoří halogenová výbojka (Z). Svazek ze zdroje nejprve prochází čočkou (C) a dále dopadá na dělič svazků (DS1). Zde se svazek rozdělí na dva. Jeden dále postupuje objektovou větví a druhý větví referenční.

V objektové větvi se svazek odráží od děliče svazků (DS2), prochází skrze objektiv (O1) a dopadá na vzorek (V). Odtud se svazek odráží a postupuje opět skrze objektiv (O1), dělič svazků (DS2), odráží se od zrcadla (Z1), prochází objektivem (O2), odráží se na dělič svazků (DS3) a dopadá na čip CCD kamery (CCD).

Svazek procházející referenční větví se odrazí nejprve od zrcadla (Z2) a děliče svazků (DS4), prochází objektivem (O3) a dopadá na zrcadlo (Z3). Zde se svazek odrazí, prochází opět objektivem (O3), děličem svazků (DS4) a odrazem od zrcadel (Z4, Z5 a Z6) dopadá na

¹Interferenční filtr 547 (10) nm byl nepoužívanějším filtrem při měření v této práci

1. REFLEXNÍ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP (RDHM)



Obrázek 1.2: Schéma uspořádání RDHM. Z – zrcadlo Z – zdroj, C – čočka, V – vzorek, Z1 – Z7 – zrcadla, O1 – O4 – objektivy, DS1 – DS4 – děliče svazků, DM – difrakční mřížka, CCD – CCD kamera. Převzato a upraveno z [6].

binární difrakční mřížku (DM). Zde je vybrán 1. difrakční řád. Tento svazek dále prochází objektivem (O4), odráží se od zrcadla (Z7), prochází děličem svazků (DS3) a dopadá na čip CCD kamery.

Na čipu CCD kamery poté dochází k interferenci obou svazků a vzniká hologram. Vzniklý hologram je poté počítačově zpracován, čímž je získána obrazová amplituda a fáze.

1.3. Popis hlavních částí RDHM

Zdroj mikroskopu tvoří halogenová výbojka, u které je vyžadován dostatečný výkon pro osvětlení. Vezmeme-li v úvahu ideální stav, kdy na děličích svazků dochází ke ztrátě 50 % intenzity, na difrakční mřížce ke ztrátě více než 50 % a že zrcadla mají 100% odrazivost, dojde průchodem optickými prvky soustavy ke ztrátám nejméně 90 % intenzity. V případě, že je v objektové větvi navíc vložen vzorek s mnohem menší odrazivostí než zrcadlo, budou ztráty ještě podstatně větší. Při výpočtu ztrát vychází, že v objektové větvi by mělo docházet k polovičním ztrátám oproti větvi referenční, jelikož zde není difrakční mřížka. Avšak z praxe lze vidět, že je v objektové větvi při vloženém vzorku ve většině případů mnohem méně světla, než ve větvi referenční. To dokazuje, že celkem dochází ke ztrátě nejméně 94% intenzity.

Měnič interferenčních filtrů (není ve schématu 1.2 zobrazen) obsahuje osm pozic pro interferenční filtry. Výběrem správného filtru lze ovlivňovat jak velikost koherence svazku, tak i zobrazovací vlastnosti mikroskopu. Většina pozic byla v průběhu vypracovávání této práce prázdná, k dispozici byl pouze filtr 540 (10) nm, avšak za účelem rozsáhlejších měření v této práci byly zakoupeny další filtry, viz kap. 3.3.3. Použitím prázdné pozice dojde k použití celého spektra halogenové výbojky (obr. 1.1), což vede k největší intenzitě, ale také nejmenší koherenci osvětlení.

Měnič interferenčních filtrů je oddělený od transmisního módu (transmisní mód má svůj vlastní měnič), lze tedy plně využít všech osm pozic pro potřeby reflexního módu.

Následující seznam uvádí výpis dostupných interferenčních filtrů. Tučně jsou vyznačeny filtry použité při měření v této práci.

Seznam dostupných filtrů:

- 515 (10) nm
- **547 (10) nm**
- 550 (80) nm
- 589 (10) nm
- 610 (10) nm
- 650 (10) nm
- 694 (10) nm
- **prázdná pozice**

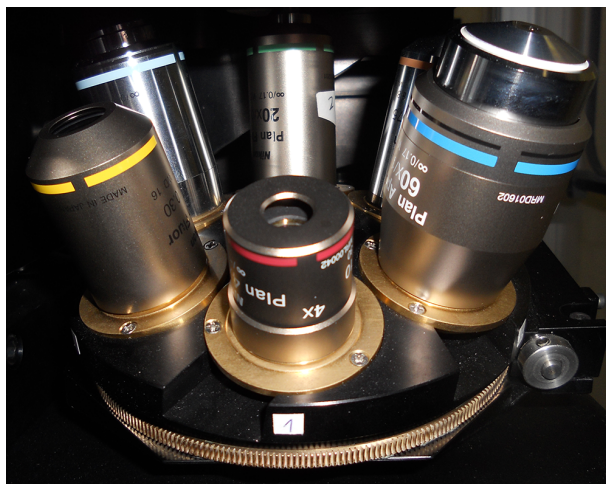
Objektivy O1 a O3 jsou umístěny na revolverovém měniči (obr. 1.3). Jejich výměna probíhá paralelně a jsou použity vždy dva stejné objektivy, aby byly zachovány stejné optické prvky v obou větvích. Jejich vhodnou volbou lze měnit velikost zvětšení a v závislosti na velikosti numerické apertury (NA) i ovlivňovat vlastnosti výsledného zobrazení, především velikost optického řezu.

Revolverový měnič obsahuje celkem šest pozic. Všechny tyto pozice jsou plně obsazeny, jelikož se objektivy používají společně pro reflexní i transmisní mód.

Následující tabulka uvádí seznam všech dostupných objektivů (včetně těch, které momentálně nejsou instalovány v měniči, ale jsou uschovány), tučně jsou poté vyznačeny objektivy jakkoliv použité k měření v této práci.

Název objektivu	Zvětšení	NA
Nikon L Plan	2,5x	0,075
Nikon Plan	4x	0,1
Nikon Plan Fluor	10x	0,3
Nikon Plan Fluor	20x	0,5
Nikon Plan Apo (olejový)	40x	1,0
Nikon Plan Apo VC (olejový)	60x	1,4
Nikon LU Plan Fluor	100x	0,95

1. REFLEXNÍ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP (RDHM)



Obrázek 1.3: Revolverový měnič objektivů v referenční větvi se šesti pozicemi. Každá pozice obsahuje jiný objektiv. Měnič v objektové větvi obsahuje stejné objektivy jako měnič v referenční větvi.

Dále jsou objektivy O1 a O3 připojeny na piezoelektrický posuv. Lze tedy jednoduše a přesně provádět absolutní ostření vzorku. Objektivy O1 a O3 se při tomto ostření pohybují současně. Tento typ posuvu je zmíněn v kap. 1.4.1, bodě 13.

Čočka C je zaostřena do stejné roviny jako objektivy O1 a O3. Vzorek (V) a zrcadlo (Z3) jsou tedy osvětlovány Köhlerovým osvětlením.

Objektivem O1 je možné pohybovat i samostatně a provádět tak relativní ostření. Použití relativního ostření není v reflexním módu nezbytné, avšak je dobré ho zmínit, jelikož se tento typ posuvu dá použít v jiných aplikacích při měření - pokud chceme například doostřit vzorek, aniž bychom si rozostřili referenční větev. Jak je navíc v kap. 3.3.1 vysvětleno, použití tohoto typu ostření bylo při měření v určitých případech nezbytné.

Vzorek V je připojen na piezoelektrický posuv. Pohybem do stran můžeme na vzorku zacílit strukturu, pohybem v optické ose poté měřit osovou intenzitní odezvu.

Zrcadlo Z3 není na rozdíl od vzorku (V) připojeno na piezoelektrický posuv. Stolek se zrcadlem je připojen na šroub s mikrometrickým posuvem, je tedy nutné provést manuální ostření pomocí tohoto šroubu zmíněné v kap. 1.4.1, bod 15.

Zrcadla Z5 a Z6 jsou připojena současně na jeden piezoelektrický posuv, čímž se zajišťuje možnost změny délky větví vůči sobě. Pohybem těchto zrcadel lze tedy seřadit stejnou délku větví, tzv. autojustáž zmíněná v kap. 1.4.1, bod 19.

Objektivy O2 a O4 jsou zaostřeny do stejného místa čipu CCD kamery, kde dochází k interferenci paprsků a tedy k vytvoření hologramu.

1.4. Návod na obsluhu RDHM

Ačkoliv se mikroskop neustále vyvíjí a řada prvků je již automatizována, je nutné mikroskop před začátkem měření nastavit a seřadit pro získání co nejlepšího výsledku. Následující postup slouží ke správnému nastavení RDHM.



Obrázek 1.4: Ovladač holografického mikroskopu k jednodušší práci s mikroskopem.

1.4.1. Nastavení RDHM a získání hologramu

1. Zasunout optický kabel do zdroje v zadní části mikroskopu
2. Zasunout děliče svazků pro reflexní mód v obou větvích (páčka na každé straně mikroskopu)
3. Zapnout mikroskop hlavním spínačem
4. Zapnout program CCHM a vybrat profil pro reflexní mód (počkat, dokud se mikroskop automaticky neinicializuje)
5. Vložit zrcadlo odraznou plochou dolů do referenční větve² (pro lepší manipulaci lze zvednout kondenzory)
6. Vložit vzorek do objektové větve (směrem dolů)
7. Zapnout zdroj osvětlení tlačítkem "Lamp" v programu CCHM
8. Zapnout kameru tlačítkem "Live" v programu CCHM
9. Vybrat požadovaný objektiv ze seznamu objektivů v programu CCHM, popř. na ovladači (obr. 1.4)
10. Vybrat požadovaný interferenční filtr ze seznamu filtrů v programu CCHM, popř. na ovladači (obr. 1.4)
11. Zavřít polní clonu zasunutím páčky v levé dolní části mikroskopu
12. Otevřít objektovou větev tlačítkem "Objektová" v záložce "Illuminator" v programu CCHM (referenční zůstává zavřená)
13. Zaostrit polní clonu absolutním ostřením levým horním kolečkem na ovladači (obr. 1.4) (v případě slabého obrazu lze zvýšit intenzitu světla, popř. prodloužit expozici kamery)
14. Zavřít objektovou větev a otevřít větev referenční tlačítkem "Referenční" v záložce "Illuminator" v programu CCHM

²Referenční větev je v levé části mikroskopu, objektová v části pravé, viz obr. 3

1. REFLEXNÍ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP (RDHM)

15. Zaostrit polní clonu manuálním ostřením (šroubem s mikroposuvem umístěným za objektivu referenční větve)
16. Otevřít objektovou větev - obě větve otevřené
17. Sesadit obrazy polní clony na sebe pomocí dvou větších šroubů umístěných v přední části mikroskopu u referenční větve (obrazy by měly být na sobě, v praxi jsou avšak většinou mírně od sebe).
18. Otevřít polní clonu
19. Autojustáž (detailní popis v kap. 1.4.2)
20. Měření a ukládání dat (detailní popis v kap. 1.4.3)

1.4.2. Autojustáž (vhodný postup a parametry)

Dále je nutné získat stejné optické dráhy v obou větvích, proto je potřeba proskenovat vzájemnou délku větví se správnými parametry. Tento proces je dvoustupňový. Nejprve pracuje rychlý krok a poté jemný. Je nutno počkat na dokončení obou kroků. Pro lepší zvolení rychlého kroku slouží následující tabulka, která udává přibližné hodnoty pološířek osových intenzitních odezev objektivů různých numerických apertur s osvětlením $\lambda = 547(10)$ nm. Rychlý krok by poté neměl přesáhnout hodnotu dané pološířky, aby nedošlo k přeskočení správné vzájemné délky.

NA	pološířka [μ m]
0,075	11,50
0,1	10,42
0,25	4,87
0,3	3,79
0,5	1,60
0,95	0,35

Pokud se v předešlém kroku nepodařilo získat správnou vzájemnou optickou délku větví, je nutno zkontrolovat označení nosné frekvence. K tomu lze využít autodetekci. Pokud je ale signál příliš slabý, autodetekce nefunguje správně a je nutné vybrat nosnou frekvenci ručně. Po vybrání (alespoň přibližně) správné pozice nosné frekvence je nutné opakovat předešlý krok. Po nalezení signálu je vhodné vybrat nosnou frekvenci přesně a je doporučeno opakovat předešlý krok ještě jednou, aby došlo k co nejlepšímu sladění délek větví.

Pokud je nosná frekvence vybrána správně a stále se nepodařilo najít správnou délku větví, je pravděpodobné, že je nastaven příliš malý rozsah skenování, popř. je nastaven příliš velký rychlý krok. Proto je vhodné zvolit větší rozsah měření, popř. zmenšit velikost rychlého kroku a provést autojustáž znovu.

1.4.3. Měření a ukládání dat

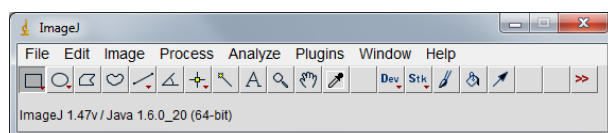
Po dokončení autojustáže stačí snímky pouze uložit a následně patřičně zpracovat. Z nabídky ukládání lze zvolit hologram, amplitudu, fázi, navázanou fázi, navázanou a vyrovnanou fázi a metadata. Obecně stačí uložit pouze hologram, ze kterého lze všechny ostatní snímky dopočítat v off-line režimu programu CCHM a metadata, která slouží k uložení určitých informací o měření.

Zejména při měření více snímků za sebou, jako tomu bývá u měření osově intenzitní odezvy, je doporučeno ukládat pouze nejnútnejší snímky, aby nedocházelo ke zbytečnému vytížení výkonu počítače a tím zmenšení frekvence výpočtu obrazu (tzv. FPS - frame per second). Pokud tedy není nutné ukládat například navázanou a navázanou vyrovnanou fázi, je dobré tyto položky z nabídky ukládání odškrtnout. Dále je nutné vypnout pluginy, které tyto položky počítají (samotné vypnutí ukládání nestačí - zapnuté výpočetní pluginy zpomalují proces výpočtu).

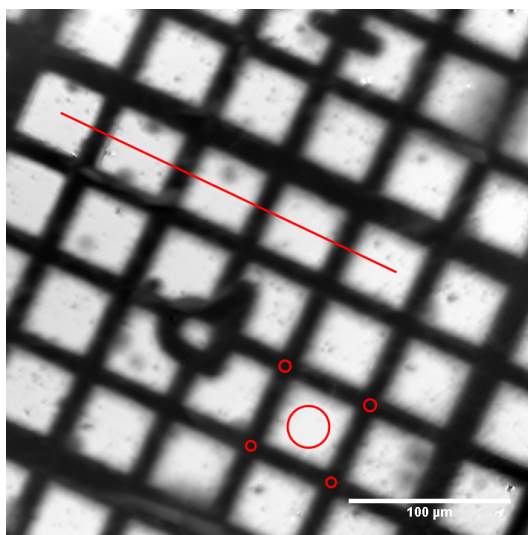
Všechny položky se následně ukládají ve formátu TIFF (Tagged Image File Format) sloužícímu k ukládání rastrové počítačové grafiky. Tento formát má tu výhodu, že do něj lze uložit hodnotu každého pixelu a tím vykreslit 3D model měřeného předmětu. TIFF podporuje bitové rozlišení až 32 bitů, což stačí k tomu, aby byla výška zaznamenána s dostatečnou přesností. Lze tedy nejen vykreslit 3D model snímaného objektu, ale taky velmi přesně určit jeho výšku v daném bodě.

1.4.4. Zpracování po měření

Uložené snímky lze následně zpracovat například programem ImageJ (obr. 1.5), který má dobrou podporu formátu TIFF a který nabízí sadu různých nástrojů k měření. Následující postup zpracování ukazuje pouze základní funkce programu ImageJ.



Obrázek 1.5: ImageJ.



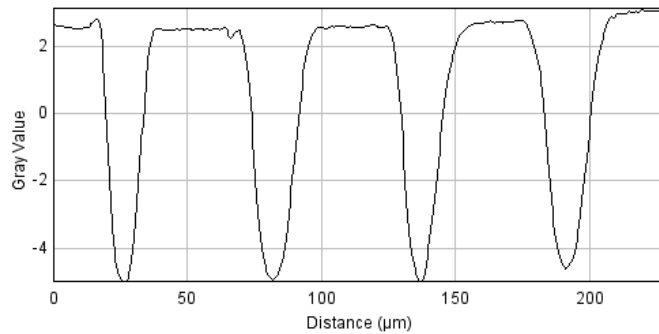
Obrázek 1.6: Vzorek: CELLocate. Vyrovnaná navázaná fáze. Červená úsečka značí výběr profilu povrchu zobrazeného v obr. 1.7. Oblasti vyznačené červenými kolečky značí oblasti pro výpočet výšky.

K vykreslení profilu povrchu slouží vyrovnaná navázaná fáze zobrazená na obr. 1.6. Jako ukázka nám posloužil vzorek CELLocate.

Pro zobrazení profilu povrchu stačí vybrat úsečkou oblast, kterou chceme zobrazit. Výsledný graf je vidět na obr. 1.7. K přesnému určení výšky buněk poté slouží výběr

1. REFLEXNÍ DIGITÁLNÍ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP (RDHM)

oblastí zobrazených na obr. 1.6 (červená kolečka). Čtyři kruhové oblasti kolem buňky jsou vybrány proto, aby došlo k odstranění chyby způsobené mírným náklonem celého snímku³. Oblast vybraná červenými kolečky tvoří několik tisíc bodů (hodnot).



Obrázek 1.7: Profil povrchu vyznačeného na obr. 1.6 červenou úsečkou.

Pomocí programu ImageJ byla změřena průměrná hodnota vystouplé buňky, která činí $(4,13 \pm 0,05)$ radiánů, což při použití osvětlení o vlnové délce 547 nm odpovídá hodnotě $(179,6 \pm 2,1)$ nm. Průměrná hloubka okolí buňky činila $(-3,52 \pm 0,11)$ radiánů, tedy $(-153,2 \pm 5,2)$ nm. Z rozdílu hodnot nám tedy vyšla výška buňky (323 ± 5) nm. Pro srovnání, v disertační práci [1] vyšla v transmisním koherenci řízeném holografickém mikroskopu výška buňky 367 nm.

Vzorec pro přepočet fáze na výšku v reflexním módu, za předpokladu, že $n = 1$, ukazuje vztah

$$\Delta z = \frac{\lambda}{4\pi} \Delta \varphi, \quad (1.2)$$

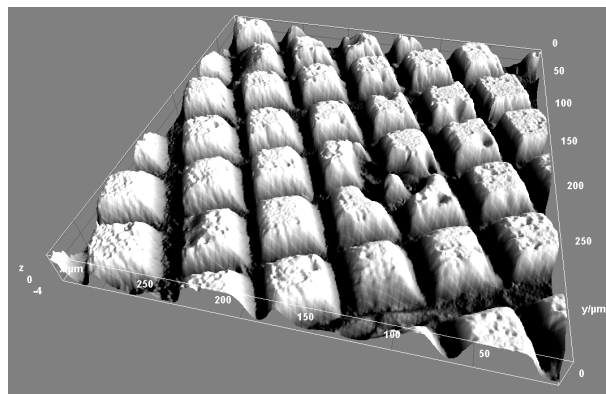
kde Δz je výškový rozdíl dvou ploch a $\Delta \varphi$ je fázový rozdíl dvou ploch.

Pro porovnání, v transmisním módu platí vztah

$$\Delta z = \frac{\lambda}{2\pi(n - n_0)} \Delta \varphi, \quad (1.3)$$

kde n je index lomu měřeného materiálu a n_0 index lomu okolí.

Jak již bylo řečeno, vyrovnaná navázaná fáze nám slouží také k zobrazení 3D modelu zmíněného snímku. Tento model lze vidět na obr. 1.8.



Obrázek 1.8: 3D model vzorku CELLlocate.

³Tento náklon je způsoben nedokonalým vyrovnaním fáze v programu CCHM

2. Teoretický výpočet testovaných vlastností

2.1. Rozlišení RDHM

Úhlové rozlišení popisuje schopnost optického přístroje rozeznat detaily malého objektu. Je definováno jako schopnost optického přístroje rozeznat od sebe dva sobě blízké body. Rozlišitelnost dvou bodů je omezena difrakcí, při které se vytváří Airyho kroužky. Rayleighovo kritérium popisující mez rozlišitelnosti dvou bodů, je definováno jako vzdálenost prvního maxima prvního objektu a prvního minima druhého objektu, zapsané vztahem

$$R = 1,22 \frac{\lambda}{2NA}. \quad (2.1)$$

Vztah 2.1 platí při použití nekoherentního osvětlení, což je případ i holografického mikroskopu. Při použití koherentního osvětlení je rozlišitelnost dvou bodů 2x horší.

V případě světla o vlnové délce $\lambda = 547 \text{ nm}$ a numerické apertuře $NA = 0,5$ je vzdálenost rozlišitelnosti dvou bodů rovna hodnotě 667 nm . Pro objektiv s $NA = 0,95$ je tato hodnota rovna 351 nm .

V případě holografického mikroskopu dosahuje osově rozlišení jednotek nanometrů [6], a to díky možnosti dopočítat fázi z hologramu a převést ji na výšku. Navíc by při použití polychromatického osvětlení mělo dojít ke zlepšení osově rozlišení v poměru dle vztahu 2.7 [9].

RDHM dosahuje tedy laterálního rozlišení, které je dané Rayleighovým kritériem a osově rozlišení v jednotkách nanometrů. Tyto parametry byly změřeny a ověřeny v kapitole 3.1.

2.2. Osová intenzitní odezva

Osová intenzitní odezva je schopnost mikroskopu provádět hloubkovou diskriminaci povrchu [9]. Je to závislost intenzity na vzdálenosti z zrcadla od ohniskové roviny objektivu, přičemž dochází ke změně i vzájemné optické délky větví. Vezmeme-li v potaz aproximaci pro nízké numerické apertury, předpoklad, že spektrální hustota $I(\kappa)$ je nenulová pouze na intervalu (κ_1, κ_2) , kde κ je vlnčet světla definovaný vztahem $\kappa = 1/\lambda$, lze dle [9, 10, 11, 12] zapsat amplitudu osově odezvy pro polychromatické světlo vztahem

$$u^i(z^i) = \exp[2\pi i(\kappa_2 + \kappa_1 \cos \alpha)z^i] \text{sinc}[2\pi(\kappa_2 - \kappa_1 \cos \alpha)z^i], \quad (2.2)$$

kde α je úhlová numerická apertura, $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$ a i značí obecně komplexní hodnotu. Hodnoty $\kappa_{1,2}$ lze získat vztahem

$$\kappa_{1,2} = \frac{1}{\lambda \pm \frac{\Delta\lambda}{2}} = \frac{1}{\lambda_{2,1}}, \quad (2.3)$$

2. TEORETICKÝ VÝPOČET TESTOVANÝCH VLASTNOSTÍ

příčemž λ je centrální vlnová délka propuštěného světla s pološířkou $\Delta\lambda$. Pro intenzitu dále platí

$$I(z) = uu^*. \quad (2.4)$$

Výslednou závislost intenzity na vzdálenosti od předmětové roviny lze tedy poté zapsat ve tvaru

$$I_{poly}(z) = \text{sinc}^2[2\pi(\kappa_2 - \kappa_1 \cos \alpha)z] = \frac{\sin^2[2\pi(\frac{1}{\lambda - \frac{\Delta\lambda}{2}} - \frac{1}{\lambda + \frac{\Delta\lambda}{2}} \cos \alpha)z]}{[2\pi(\frac{1}{\lambda - \frac{\Delta\lambda}{2}} - \frac{1}{\lambda + \frac{\Delta\lambda}{2}} \cos \alpha)z]^2}. \quad (2.5)$$

Vezmeme-li v úvahu monochromatické světlo, dosadíme za $\Delta\lambda = 0$, tedy $\kappa_1 = \kappa_2 = \kappa$, $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda$, pak dostaneme

$$I_{mono}(z) = \text{sinc}^2[\kappa(1 - \cos \alpha)z] = \frac{\sin^2[\frac{2\pi}{\lambda}(1 - \cos \alpha)z]}{[\frac{2\pi}{\lambda}(1 - \cos \alpha)z]^2}. \quad (2.6)$$

Pološířky maxim osových intenzitních odezev pro monochromatické osvětlení a pro polychromatické osvětlení jsou poté v poměru [9, 10, 12]

$$\frac{\delta_{poly}}{\delta_{mono}} \approx \frac{\kappa(1 - \cos \alpha)}{\kappa_2 - \kappa_1 \cos \alpha}. \quad (2.7)$$

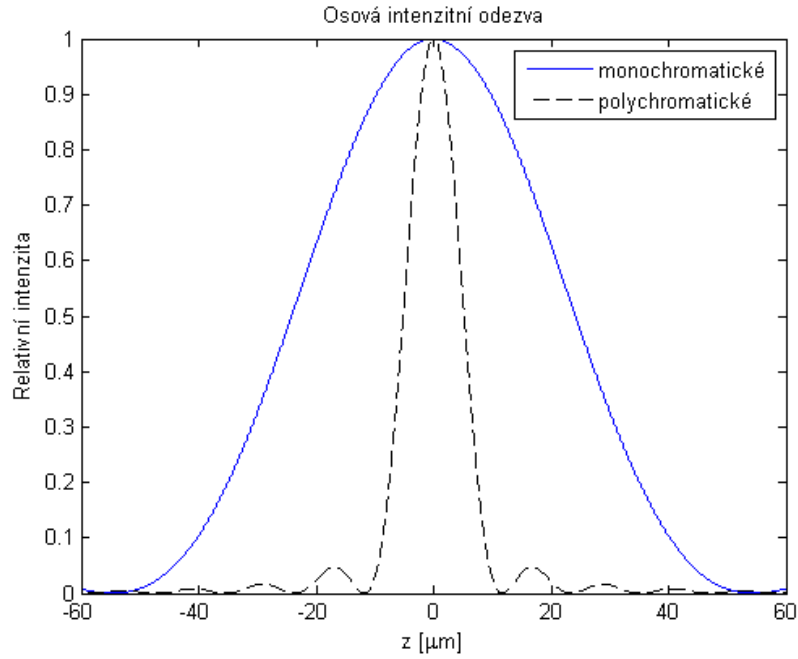
Při porovnání osových rozlišení mikroskopu při použití polychromatického a monochromatického osvětlení nastává tentýž poměr ve prospěch polychromatického osvětlení, jelikož jsou tato rozlišení úměrná pološířce osových intenzitních odezev [9]. Zmíněné průběhy osových intenzitních odezev jsou vidět v obr. 2.1, pološířky maxim jsou poté v popisu obrázku vypočítány dle vztahu¹

$$\delta = \frac{1,39156}{\pi(\kappa_2 - \kappa_1 \cos \alpha)}. \quad (2.8)$$

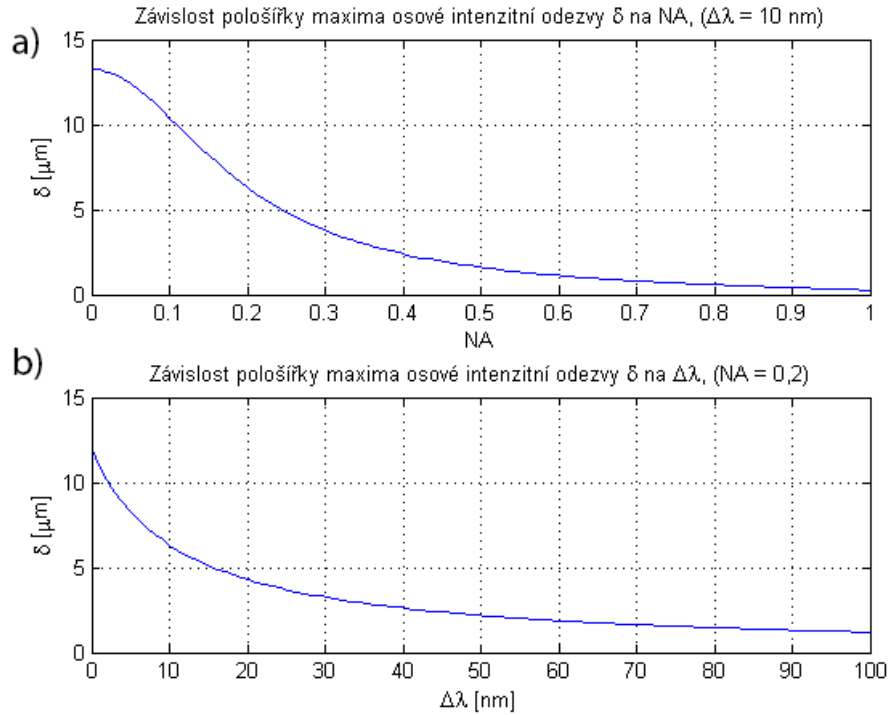
Dále lze pomocí vztahu 2.8 vypočítat závislost pološířky osové intenzitní odezvy na velikosti numerické apertury a na velikosti koherence (velikosti pološířky propuštěného spektra) použitého osvětlení. Obě tyto závislosti jsou vidět v grafech na obrázku 2.2. Lze z nich vyčíst, že při zvětšování numerické apertury dochází ke zmenšování pološířky osové intenzitní odezvy. Stejného výsledku dosáhneme u zmenšující se koherence (zvětšující se pološířky propustnosti), akorát s mírně odlišným průběhem.

Měření konkrétních osových intenzitních odezev v závislosti na různých numerických aperturách je provedeno v kapitole 3.2.

¹Hodnota 1,39156 je argument x funkce $\text{sinc}^2(x)$ taková, pro které se hodnota této funkce rovná hodnotě 0,5. Hodnota byla získána pomocí výpočetního enginu WolframAlpha (www.wolframalpha.com). Při výpočtech byla použita přesnost na 30 desetinných míst.



Obrázek 2.1: Průběh osové intenzitní odezvy pro monochromatické osvětlení vypočítaný dle vztahu 2.6 (modrá spojitá čára) a pro polychromatické osvětlení s pološířkou propustnosti $\Delta\lambda = 10$ nm vypočítaný dle vztahu 2.5 (černá přerušovaná čára). Vlnová délka použitého osvětlení $\lambda = 547$ nm, numerická apertura $NA=0,1$. Pološířka pro monochromatické osvětlení $\delta_{mono} \approx 48,3 \mu\text{m}$, pro osvětlení polychromatické $\delta_{poly} \approx 10,42 \mu\text{m}$. Pro srovnání: koherenční délka tohoto polychromatického osvětlení vypočítaná dle vztahu 1.1 je rovna hodnotě $29,92 \mu\text{m}$



Obrázek 2.2: Závislost pološířky osové intenzitní odezvy δ na a) numerické apertuře NA , b) pološířce propuštěného spektra $\Delta\lambda$.

2. TEORETICKÝ VÝPOČET TESTOVANÝCH VLASTNOSTÍ

3. Testování

3.1. Rozlišení RDHM

Rozlišení mikroskopu je zejména v reflexním módu důležitým parametrem k určení meze rozlišitelnosti dvou bodů a stanovení nejistot výšky povrchu. Teoretický popis byl zmíněn v kapitole 2.1. Tato kapitola popisuje metodiku měření a získání patřičných hodnot v závislosti na různých parametrech.

3.1.1. Osové rozlišení

Metodika stanovení osového rozlišení byla stejná, jako používá firma a známý výrobce holografických mikroskopů Lyncée tec¹. Jedná se o dvojnásobek „přesnosti“, přičemž přesnost je definována jako časová standardní směrodatná odchylka jednoho pixelu z 30 snímků [7].

Měření probíhalo tak, že do objektové větve bylo vloženo zrcátko a mikroskop byl nastaven dle postupu 1.4.1. Poté bylo zapnuto automatické snímání a ukládání. Pokud nebude uvedeno jinak, v celé této kapitole 3.1.1 bude myšleno následující nastavení parametrů: Snímkovací frekvence: 1 snímek za sekundu, použité osvětlení: $\lambda = 547 (10) \text{ nm}$, expozice kamery: 400 ms, průměrování snímků: vypnuté (1 snímek), intenzita zdroje: 100 %.

Kromě hologramu byla ukládána také navázaná vyrovnaná fáze. Poté se v programu ImageJ načetla sekvence 30 snímků, a byl vybrán jeden pixel (v případě závislosti na expozici, v ostatních případech byly vybrány 3 pixely k zajištění více dat ke zpracování). Výběr pixelu probíhal vždy v blízkosti maximální amplitudy snímku, kde byla hladina šumu nejmenší. Pokud se mikroskop nijak v průběhu měření nepřenastavoval, byly k měření vybrány 3 identické pixely pro každý parametr, aby nedošlo k chybě způsobné výběrem pixelu.

Expozice kamery

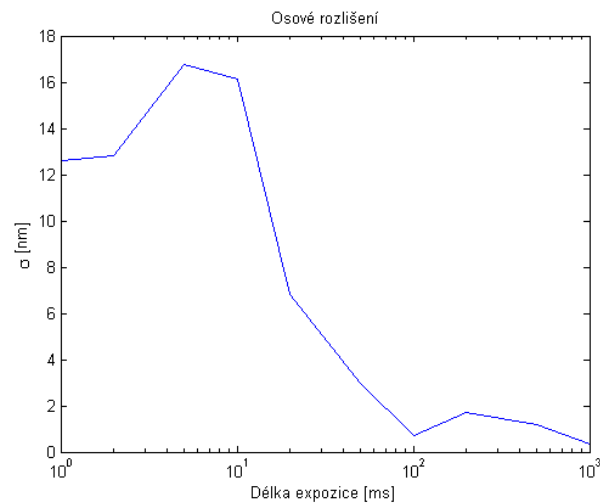
Prvním z měřených parametrů byla závislost osového rozlišení na délce expozice kamery. Tato metoda nevyžadovala přenastavování mikroskopu v průběhu měření, tudíž byl vždy vybrán jeden daný pixel na všech snímcích. U expozic 500 a 1000 ms byla nastavena intenzita zdroje na 70 %, jelikož kamera nebyla schopna pojmout tolik světla.

¹<http://www.lynceetec.com/>

3. TESTOVÁNÍ

Následující tabulka udává hodnoty změřeného osového rozlišení při použití objektivu $NA = 0,1$, průběh lze pak vidět v grafu na obr. 3.1.

Expozice [ms]	σ [rad]	σ [nm]
1	0,289	12,58
2	0,294	12,80
5	0,385	16,76
10	0,371	16,15
20	0,156	6,79
50	0,068	2,95
100	0,016	0,70
200	0,039	1,70
500	0,027	1,16
1000	0,008	0,36

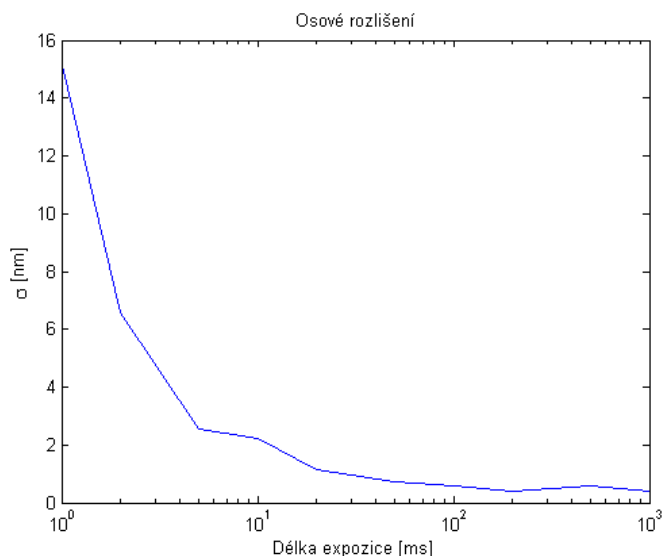


Obrázek 3.1: Závislost osového rozlišení na délce expozice kamery. $NA = 0,1$

Jak lze z grafu 3.1 vidět, hodnoty při krátké době expozice poměrně kolísaly. Z tohoto grafu je však zřejmé, že při delších dobách expozice dosáhneme lepšího osového rozlišení. Při zpracování těchto dat bylo později zjištěno, že mikroskop nebyl úplně nejlíp nalaďen, což kazilo měřené výsledky. Proto byla tato závislost změřena znovu při použití jiného objektivu.

Následující tabulka udává hodnoty změřeného osového rozlišení při použití objektivu $NA = 0,5$, průběh lze pak vidět v grafu na obr. 3.2.

Expozice [ms]	σ [rad]	σ [nm]
1	0,350	15,24
2	0,151	6,57
5	0,058	2,53
10	0,051	2,21
20	0,026	1,14
50	0,017	0,73
100	0,013	0,57
200	0,009	0,40
500	0,013	0,57
1000	0,009	0,41



Obrázek 3.2: Závislost osového rozlišení na délce expozice kamery. $NA = 0,5$

Při druhém měření už byl mikroskop řádně naladěný, což je vidět i na obr. 3.2. Z něj je zřejmé zlepšující se osově rozlišení při prodlužování doby expozice.

Jak moc hodnoty měřeného pixelu kolísaly, neboli jak moc se hodnoty měřené fáze lišily na jednotlivých snímcích, je vidět na obr. 3.3. Pro zachování přehlednosti byly zobrazeny pouze průběhy pro 1, 10, 100 a 1000 ms.

Jak lze z obr. 3.3 vidět, k největšímu kolísání hodnot, a tedy i nejhoršímu rozlišení, docházelo při velmi krátkých dobách expozice. Tento výsledek nebyl překvapivý, jelikož už při samotném měření bylo možné si všimnout vysoké hodnoty šumu a vyššího kolísání navázané vyrovnané fáze. U expozice nad 50 ms se hodnota osového rozlišení pohybovala už pod hodnotou 1 nm. Konkrétně pro délku expozice 200 ms byla hodnota osového rozlišení menší než 0,5 nm.

Lepšího osového rozlišení lze tedy dosáhnout pouze při použití delší doby expozice, díky čemuž dojde k většímu využití bitové hloubky kamery. Vzhledem k požadavkům při měření RDHM však ani není příliš nutno nastavovat krátkou dobu expozice, a tento faktor tedy není limitující.

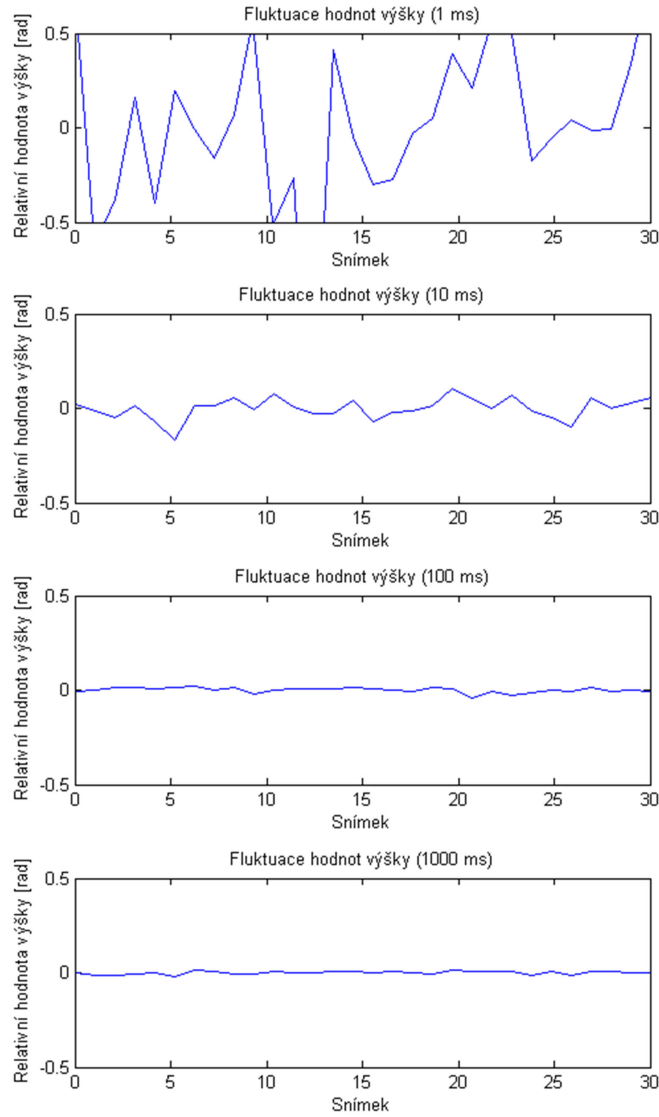
Numerická apertura objektivu

Závislost na numerické apertuře byl druhý parametr při měření osového rozlišení.

Následující tabulka udává závislost osového rozlišení na numerické apertuře objektivu.

NA	σ [rad]	σ [nm]
0,1	0,013	0,54
	0,009	0,39
	0,011	0,49
0,3	0,093	4,07
	0,090	3,90
	0,109	4,74
0,5	0,020	0,86
	0,009	0,37
	0,015	0,65

3. TESTOVÁNÍ



Obrázek 3.3: Kolísání fáze na jednotlivých snímcích zobrazené pro délky expozic 1, 10, 100 a 1000 ms. $NA = 0,5$.

Z tabulky je vidět velký výkyv hodnot pro $NA = 0,3$. To bylo způsobeno nemožností kvalitního naladění mikroskopu pro tento objektiv. Jak bylo dalším měřením zjištěno, i přes veškeré snahy nebylo možné mikroskop při tomto objektivu naladit na kvalitu srovnatelnou s jinými objektivy. V programu CCHM si pak bylo možné všimnout nižší hodnoty amplitudy u tohoto objektivu (hodnota amplitudy v programu CCHM určitým způsobem koreluje s kvalitou nastavení mikroskopu, především se vzájemnou optickou délkou větví). U objektivů s $NA = 0,1$ a $0,5$ byla hodnota této amplitudy >7000 , u objektivu s $NA = 0,3$ tato hodnota téměř nikdy nepřesáhla hodnotu 1000.

Z předešlého vysvětlení je tedy zřejmé, že hodnoty objektivu s $NA = 0,3$ nelze u tohoto měření brát v úvahu. Zbývající hodnoty se poté liší v řádu chyby způsobené výběrem pixelu, tudíž z tohoto měření nelze potvrdit ani vyvrátit závislost osového rozlišení na numerické apertuře objektivu.

Průměrování snímků

Průměrování snímků je jedna z funkcí programu CCHM. Program jednoduše udělá průměr z předem nastaveného počtu snímků hologramů. Lze nastavit až deset snímků. I přesto, že průměrování snímků nesouhlasí s metodikou měření osového rozlišení podle [7], byla tato závislost změřena, aby bylo možné dojít k závěru, jaké nastavení povede k nejlepšímu osovému rozlišení.

Následující tabulka udává závislost osového rozlišení na počtu průměrování snímků ($NA = 0,3$).

Počet snímků	σ [rad]	σ [nm]
1	0,08	3,7
	0,07	3,0
	0,05	2,4
3	0,09	4,1
	0,09	3,8
	0,06	2,4
10	0,15	6,6
	0,14	6,1
	0,10	4,1

Ve všech třech případech výběru pixelů dochází ke zhoršování osového rozlišení s narůstajícím počtem snímků k průměrování. To může být zapříčiněno tím, jakým způsobem program CCHM průměruje a počítá snímky - tvoří průměry z hologramů a z výsledného hologramu vypočítá fázi. Není to tedy tak, že by z každého hologramu vypočítal fázi a pak z těchto fází udělal průměr.

Navíc byla tato závislost změřena na objektivu s $NA = 0,3$, který byl v předešlých měřeních deklarován jako nevhodný k získání kvalitního obrazu (v průběhu měření závislosti na průměrování snímků se o tomto nevědělo). Proto byla tato závislost změřena ještě jednou na jiném objektivu. Navíc byla použita metoda měření s cílem odstranit časovou závislost rozladování mikroskopu (měření v opačném pořadí), zřejmá z následující tabulky.

Následující tabulka udává závislost osového rozlišení na průměrování snímků ($NA = 0,5$).

Počet snímků	σ [rad]	σ [nm]
1	0,011	0,46
	0,012	0,54
	0,009	0,39
3	0,005	0,23
	0,008	0,35
	0,007	0,32
10	0,004	0,19
	0,008	0,34
	0,005	0,23
3	0,004	0,18
	0,005	0,24
	0,007	0,29
1	0,007	0,29
	0,008	0,38
	0,011	0,46

3. TESTOVÁNÍ

Z tabulky jsou jednoznačně vidět lepší osová rozlišení způsobená použitím objektivu s $NA = 0,5$ místo $NA = 0,3$. Dále je vidět zlepšující se osově rozlišení se stoupajícím počtem průměrovaných snímků (opak oproti předešlému měření). Jednoznačnou závislost narušuje výsledek při navrácení počtu snímků k průměrování z deseti na tři, kdy dvě ze tří hodnot vyšly lépe pro menší počet snímků. Vypadá to tedy, že osově rozlišení nezávisí tak na počtu snímků k průměrování jak na kvalitě jeho naladění.

Nutno zdůraznit, že jedna hodnota osového rozlišení vyšla 0,18 nm.

Získání nejlepšího rozlišení

Předešlá měření neměla za cíl pouze získat průběhy závislosti osového rozlišení na různých parametrech, měla také ukázat, jaké zvolit nastavení, aby bylo na RDHM dosaženo nejvyššího osového rozlišení. Většina měření však vedla k závěru, jaké nastavení nepoužít. I to se dá ale aplikovat a proto bylo dodatečně provedeno měření za účelem získání nejlepšího osového rozlišení.

Nastavení bylo následující:

- Expozice: 600 ms (s dostatečně velkou intenzitou osvětlení)
- NA: 0,5
- $\lambda = 547 (10)$ nm
- Průměrování: vypnuté

Výsledky několika měření s výše zmíněným nastavením ukazuje následující tabulka. Více hodnot je uvedeno proto, protože byl RDHM vícekrát přeladěn (především byla měněna kolmost zrcátka na optickou osu v referenční větvi) a pro každé přeladění bylo změřeno osově rozlišení.

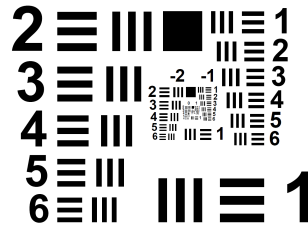
Číslo měření	σ [rad]	σ [nm]
1	0.130	5.66
2	0.025	1.08
3	0.092	4.02
4	0.054	2.33
5	0.011	0.49
6	0.031	1.37
7	0.004	0.17

Z tabulky je vidět vysoká závislost osového rozlišení na naladění mikroskopu. I přesto, že byl mikroskop řádně naladěn, hodnoty rozlišení se od sebe značně lišily. To poukazuje na to, že nezáleží až tak na parametrech nastavení jak na sladění celého mikroskopu.

3.1.2. Laterální rozlišení

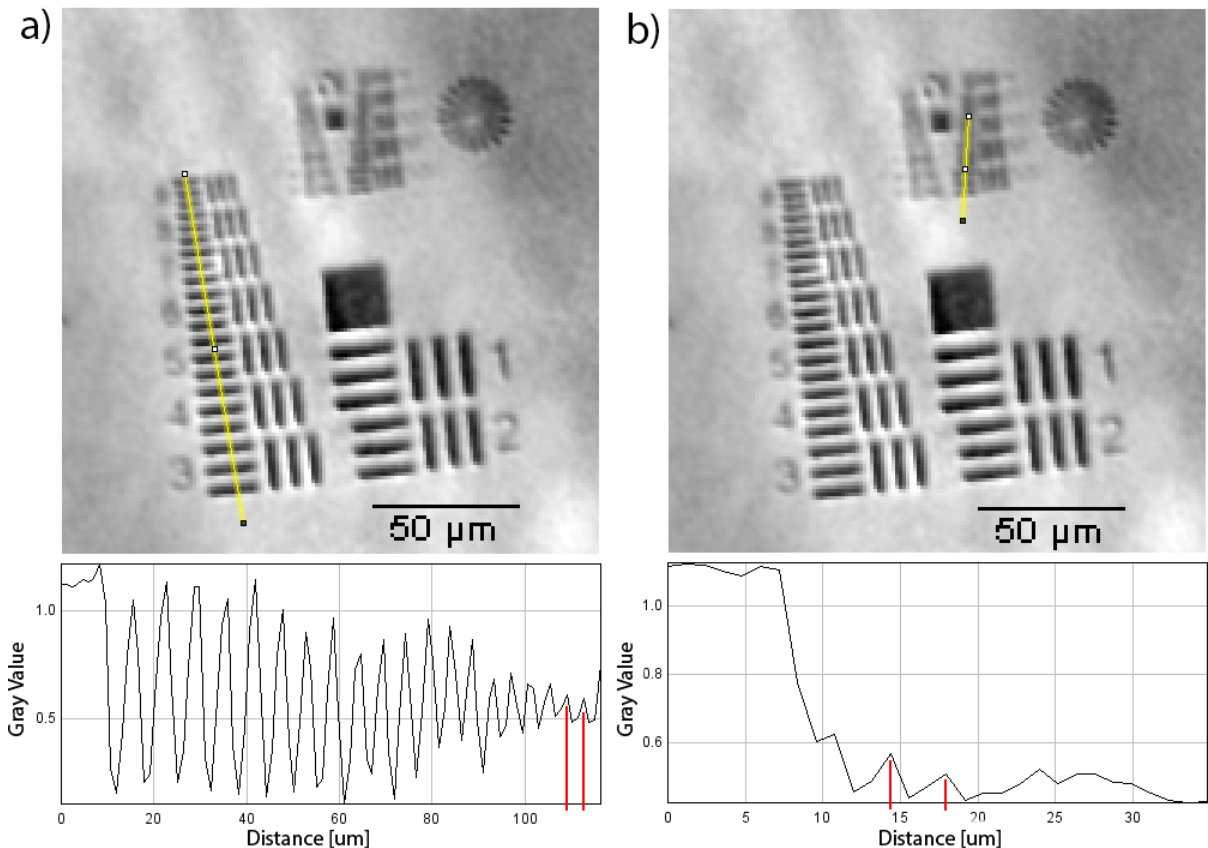
Metodika testování laterálního rozlišení spočívala v rozlišitelnosti dvou čar USAF testu (obr. 3.4) a stanovení jejich vzájemné vzdálenosti. USAF test jsou pruhované čtvercové oblasti s definovanou vzdáleností jednotlivých pruhů.

Čtvercové oblasti se postupně zmenšují, stejně tak vzdálenosti pruhů. Vzdálenosti pro každou čtvercovou oblast lze poté najít v tabulce. V případě této práce byl použit USAF test vyrobený na ÚFI VUT.



Obrázek 3.4: USAF test

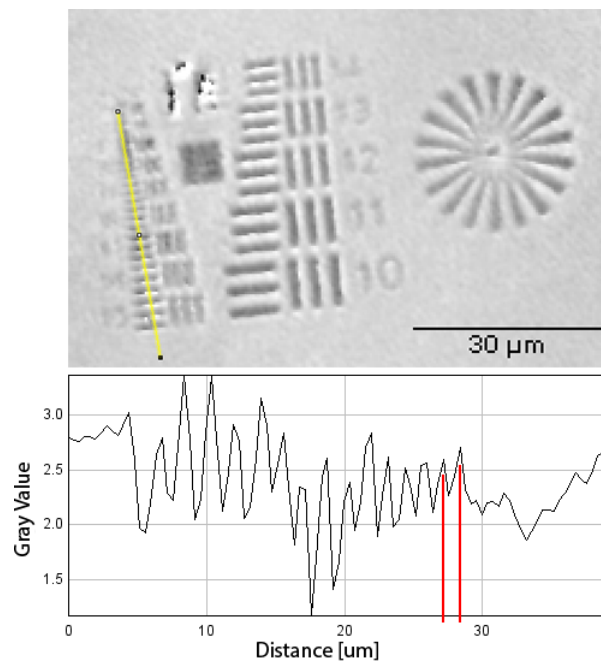
Testování probíhalo při osvětlení 547 (10) nm v závislosti na objektivu různé numerické apertury (0,1, 0,3 a 0,5). Výsledky jsou vidět na obrázcích 3.5 až 3.7. Každý obrázek obsahuje snímek USAF testu navázané vyrovnané fáze a graf profilu. Snímek byl vždy ořezán a kontrastně upraven, žlutá úsečka v něm značí profil zobrazený v grafu pod každým snímkem. Dvě červené úsečky v grafu označují vzdálenost dvou maxim, která byla ještě rozlišitelná a pro která byla změřena vzdálenost a stanoveno laterální rozlišení. Hodnota laterálního rozlišení uvedená v závorce za hodnotou změřenou uvádí tabelovanou vzdálenost dvou čar.



Obrázek 3.5: USAF. Vzdálenost dvou rozlišitelných bodů: a) $3,62 \mu\text{m}$ ($4,125 \mu\text{m}$), b) $3,56 \mu\text{m}$ ($3,716 \mu\text{m}$). Teoretická hodnota: $3,34 \mu\text{m}$. $NA = 0,1$.

Na obr. 3.5 a) je vidět USAF test při použití objektivu s $NA = 0,1$. Zobrazený profil ukazuje rozlišitelnost dvou bodů v celém rozsahu jedné sady, proto byl ještě změřen profil viditelný na obr. 3.5 b). Na tomto obrázku lze ještě rozlišit dva body v největší čtverečku. V prvním případě (obr. 3.5 a)) je vzdálenost dvou bodů $3,62 \mu\text{m}$ ($4,125 \mu\text{m}$), v případě druhém (obr. 3.5 b)) je tato vzdálenost rovna hodnotě $3,56 \mu\text{m}$ ($3,716 \mu\text{m}$).

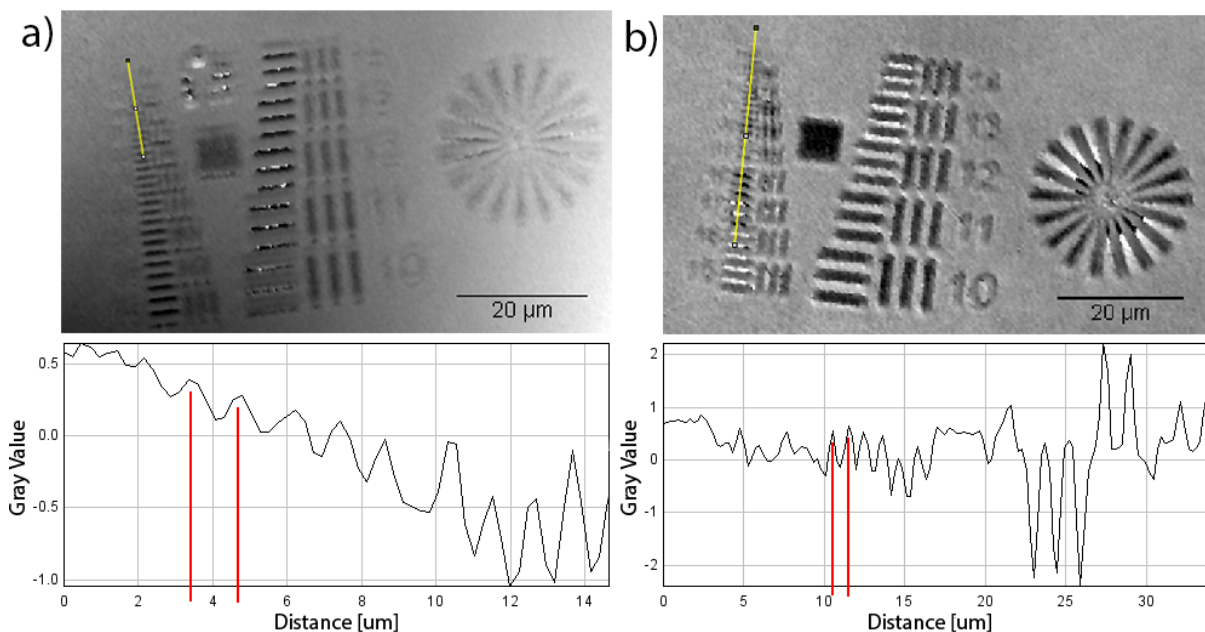
3. TESTOVÁNÍ



Obrázek 3.6: USAF. Vzdálenost dvou rozlišitelných bodů: $1,22 \mu\text{m}$ ($1,453 \mu\text{m}$). Teoretická hodnota: $1,11 \mu\text{m}$. $\text{NA} = 0,3$.

Obr. 3.6 ukazuje USAF test při použití objektivu s $\text{NA} = 0,3$. Zde jsou poslední dva rozlišitelné body zřetelné. Jejich vzdálenost je $1,22 \mu\text{m}$ ($1,453 \mu\text{m}$).

Obrázek 3.7 ukazuje dva různé USAF testy při použití objektivu s $\text{NA} = 0,5$. První USAF test je stejný jako v předešlých případech, druhý USAF test byl příliš malý na to, aby byl měřen na objektivu s menším zvětšením a proto byl změřen pouze na tomto objektivu. První USAF test ukazuje vzdálenost dvou rozlišitelných bodů $1,20 \mu\text{m}$ ($1,062 \mu\text{m}$), druhý pak vzdálenost $0,99 \mu\text{m}$ ($1,062 \mu\text{m}$).



Obrázek 3.7: Dva rozdílné USAF testy. Vzdálenost dvou rozlišitelných bodů: a) $1,20 \mu\text{m}$ ($1,062 \mu\text{m}$), b) $0,99 \mu\text{m}$ ($1,062 \mu\text{m}$). Teoretická hodnota: $0,667 \mu\text{m}$. $\text{NA} = 0,5$.

Nejlepšího laterálního rozlišení se tedy dosáhlo použitím objektivu s $NA = 0,5$. Velikost tohoto rozlišení činila $0,99 \mu\text{m}$ ($1,062 \mu\text{m}$). Nepodařilo se tedy dosáhnout teoretické hodnoty 667 nm pro $NA = 0,5$ vypočítané v kap. 2.1.

Bohužel objektiv Nikon LU Plan Fluor 100x/0,95 ze seznamu v kap. 1.3 nebyl v době měření laterálního rozlišení instalován, nebylo tedy možné změřit laterální rozlišení i pro tento objektiv, které by mělo teoreticky dosáhnout hodnoty 351 nm .

V závěru vypracovávání této práce (4.1) byl zjištěn nesoulad měřítek v laterálním směru u AFM a RDHM. Tento nesoulad se pravděpodobně dotkl také výsledků laterálního rozlišení měřených metodou určení vzdálenosti dvou proužků. Pokud by byla chyba na straně RDHM, pak změřené hodnoty jsou ve skutečnosti o něco větší (RDHM ukazuje hodnoty o něco menší). Hodnoty zjištěné pomocí tabelovaných hodnot (uvedené v závorkách) tímto nesouladem ovlivněny nebyly.

3.2. Osová intenzitní odezva

Osová intenzitní odezva mikroskopu popisuje schopnost tvorby optických řezů a potlačení okolního prostředí včetně nežádoucích interferencí na optických prvcích. Tato vlastnost byla teoreticky rozebrána v kapitole 2.2, následující kapitola se věnuje metodice měření a postupu získání charakteristických průběhů zmíněných odezev.

Metodika testování spočívala ve změření intenzity dopadající na CCD čip v závislosti na rozostření vzorku (zrcátka) v objektové rovině, díky čemuž docházelo i ke změně vzájemné délky větví. Jinak řečeno, pohyboval se vzorek (zrcátko) ve schématu na obr. 1.2. K tomu nám posloužil vestavěný nástroj v programu CCHM, který vždy posunul zrcátko o předem nastavený krok a snímek (stačilo pouze amplitudu) uložil. Takto program proměřil celý předem nastavený rozsah měření.

Poté se jednotlivé snímky amplitud nechaly načíst do programu ImageJ. Zde byla vybrána oblast 30×30 pixelů, ze které se z každého snímku nechala vypočítat průměrná hodnota amplitudy. Velikost oblasti byla zvolena tak, aby zde bylo dostatečné množství hodnot (900), ale aby zároveň oblast nebyla příliš velká. Při zpracování byly zkoušeny různé velikosti oblastí, avšak bylo zjištěno, že při výběrů 100 a více pixelů se už hodnoty průměrů prakticky neměnily. Poté se vypočtená průměrná hodnota amplitud umocnila dle vztahu 2.4 a získané intenzity se v závislosti na poloze vykreslily do grafu.

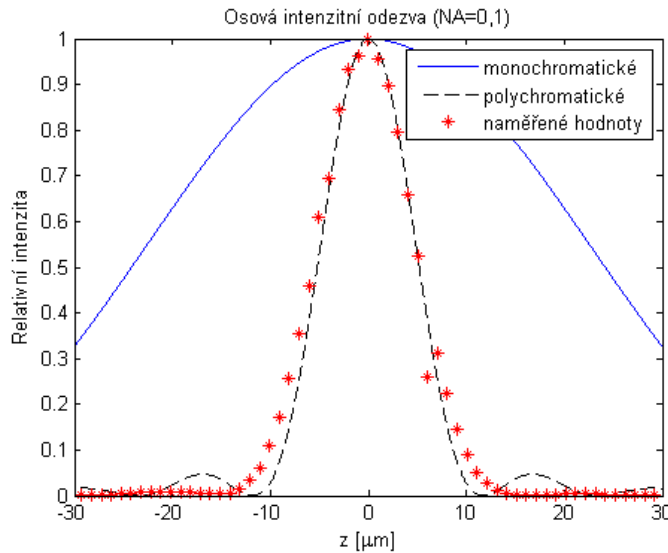
Numerická apertura objektivu

Jak lze ze vztahu 2.5 vidět, osová intenzitní odezva závisí výrazně na numerické apertuře objektivu. Závislost na tomto parametru byla proměřena pro objektivy s numerickou aperturou 0,1 (obr. 3.8), 0,3 (obr. 3.9) a 0,5 (obr. 3.10). Přerušovaná černá čára v grafech znamená vždy teoretickou hodnotu. Modrá plná pak značí teoretickou aproximovanou hodnotu pro monochromatické osvětlení (pro porovnání).

Z grafu na obr. 3.8 je vidět souhlasný průběh osové intenzitní odezvy mikroskopu s teoretickou hodnotou. Pološířka teoretické hodnoty je $10,42 \mu\text{m}$. Dále si lze všimnout, že změřené hodnoty odpovídají teoretické křivce pro polychromatické osvětlení a že se ani vzdáleně nepřibližují aproximované křivce. To ukazuje na velkou citlivost osové intenzitní odezvy na pološířce osvětlení pro objektivy s malou numerickou aperturou.

Dále si lze na obr. 3.9 a), kde je zobrazena osová intenzitní odezva pro objektiv s $NA = 0,3$, všimnout značného zúžení píku osové intenzitní odezvy oproti průběhu na obr. 3.8 - pološířka $3,79 \mu\text{m}$ oproti $10,42 \mu\text{m}$. To poukazuje na silnou závislost osové intenzitní odezvy na numerické apertuře objektivu, jak předpokládá teorie. Změřené hodnoty

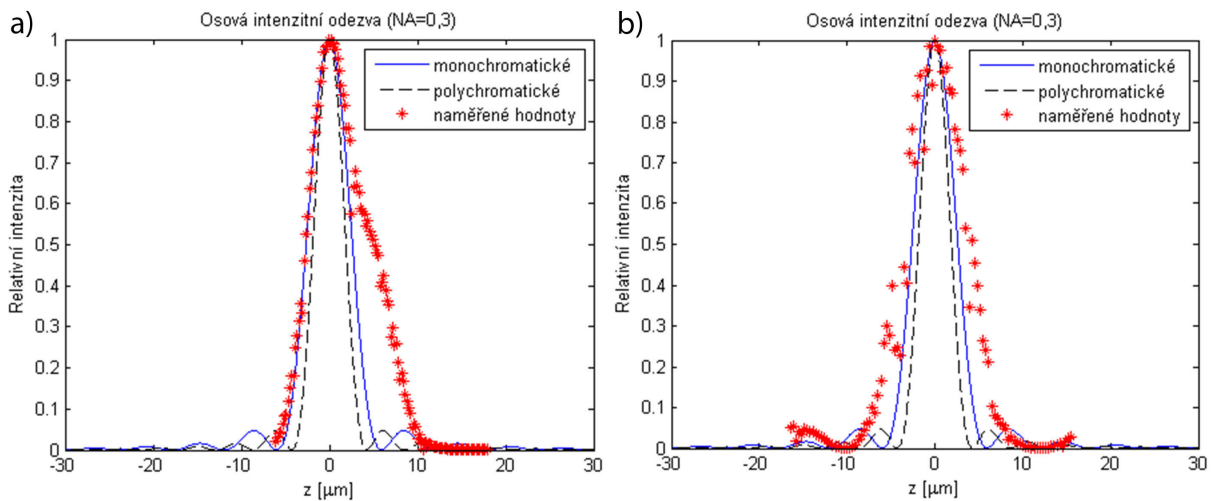
3. TESTOVÁNÍ



Obrázek 3.8: Osová intenzitní odezva. $NA = 0,1$, $\delta_{poly} = 10,42 \mu\text{m}$, $\lambda = 547 (10) \text{ nm}$.

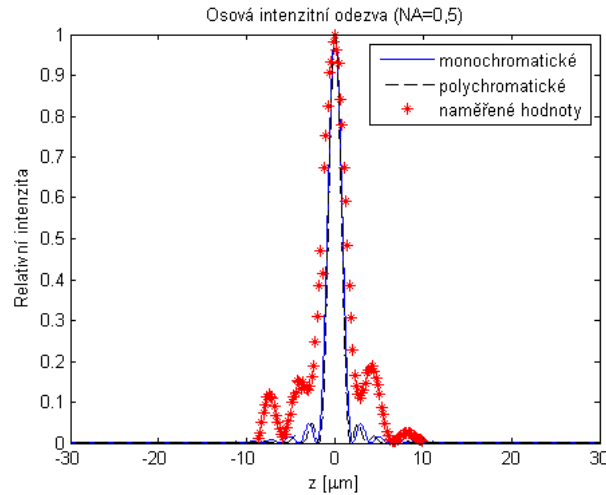
se opět velmi přiblížily teoretickým hodnotám. Mírné rozšíření průběhu na pravé straně grafu v obr. 3.9 a) je pravděpodobně způsobeno špatným naladěním mikroskopu. Při správném naladěním mikroskopu by mělo být dobře zaostřené zrcátko v objektové větvi a zároveň by měly být sladěny délky větví. V tomto měření byla pravděpodobně dobře sladěna délka větví, avšak zrcátko bylo rozostřené (nebo naopak). Při měření potom docházelo k rozladování vzájemné délky větví a k zaostřování zrcátka (nebo naopak). Zaostřené zrcátko zde poté způsobilo zmíněný malý pík.

Obr. 3.9 b) je opět osová intenzitní odezva pro $NA = 0,3$, akorát bez již zmíněného píku.



Obrázek 3.9: Osová intenzitní odezva. $NA = 0,3$, $\delta_{poly} = 3,79 \mu\text{m}$, $\lambda = 547 (10) \text{ nm}$.

Obr. 3.10 ukazuje osovou intenzitní odezvu pro $NA = 0,5$. Oproti předešlým odezvám je tato ještě mnohem užší, s pološířkou $1,60 \mu\text{m}$. Na obrázku si lze všimnout, že první minima odezvy neklesají až k nule, ale mají určitou nenulovou hodnotu. To je způsobeno tím, že vztah pro teoretickou hodnotu 2.5 je odvozen za předpokladu malých numerických apertur, což numerická apertura 0,5 není. V tomto případě tedy nelze očekávat úplnou



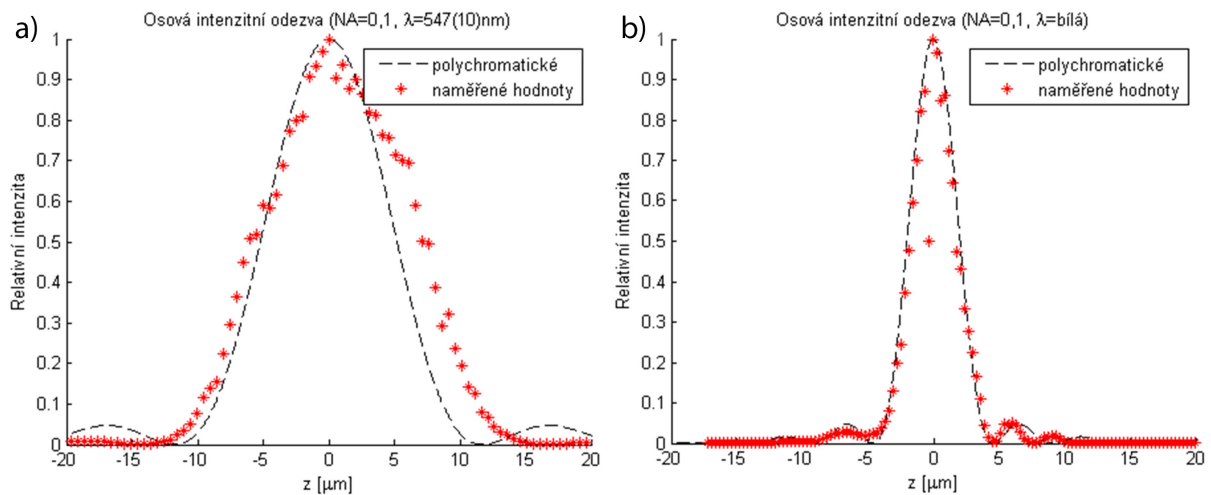
Obrázek 3.10: Osová intenzitní odezva. $NA = 0,5$, $\delta_{poly} = 1,60 \mu\text{m}$, $\lambda = 547 (10) \text{ nm}$.

shodu obou průběhů (teoretického a změřeného), ale je možné si všimnout skoro shodné pološířky teoretické a změřené odezvy.

Předešlá měření tedy potvrzují fakt, že pološířka osové intenzitní odezvy silně závisí na numerické apertuře použitého objektivu a RDHM dokonce velmi přesně splňuje teoretické průběhy.

Časová koherence

Dalším z měřených parametrů osové intenzitní odezvy byla závislost na časové koherenci osvětlení. Této závislosti docílíme použitím interferenčního filtru s různou pološířkou propustnosti. Původně bylo v plánu změřit závislost na vícero pološířkách, ale z důvodů zmíněných v kap. 3.3.3 byla tato závislost změřena pouze pro osvětlení $547 (10) \text{ nm}$ a pro bílé světlo se spektrem na obr. 1.1. Tyto závislosti byly proměřeny na objektivěch s $NA = 0,1$ a $NA = 0,5$. Všechny tyto závislosti jsou na obrázcích 3.11 a 3.12.

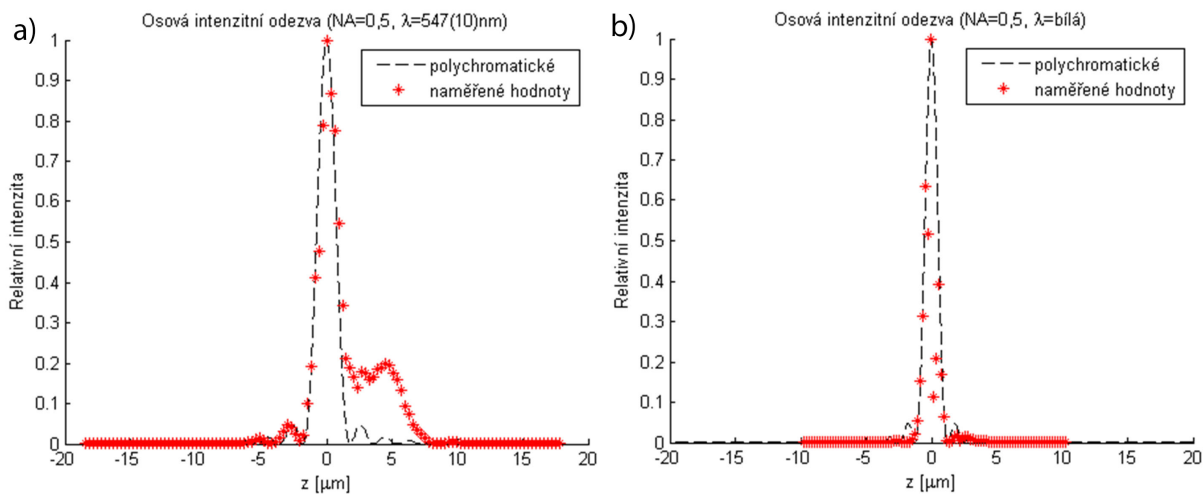


Obrázek 3.11: Osová intenzitní odezva. $NA = 0,1$. a) $\delta = 10,42 \mu\text{m}$, $\lambda = 547 (10) \text{ nm}$. b) $\delta = 4,05 \mu\text{m}$, $\lambda = \text{bílá}$. Křivka polychromatické funkce je vykreslena pro $\lambda = 547 (30) \text{ nm}$, která nejlépe odpovídala naměřeným hodnotám a pro kterou je taktéž vypočítána pološířka odezvy.

3. TESTOVÁNÍ

Obr. 3.11 a) je odezva pro stejné parametry jako odezva na obr. 3.8. Jelikož byl mezitím vyměněn dělič svazků, bylo nutné tuto odezvu změřit znovu, aby byly výsledky na této závislosti porovnatelné. Na obr. 3.11 a) si lze opět všimnout mírného píku vysvětleného v předešlé kapitole u obr. 3.9 a).

Obr. 3.11 b) ukazuje průběh osové intenzitní odezvy při použití celého spektra halogenové výbojky a objektivu s $NA = 0,1$. Z grafu je zřejmé značné zúžení pološířky odezvy. Do teoretické polychromatické funkce byly dosazeny parametry takové, aby co nejvíce odpovídaly změřeným hodnotám. Tento průběh je vykreslen pro osvětlení 547 (30) nm. Použitím tohoto interferenčního filtru bychom měli tedy získat stejný průběh osové intenzitní odezvy. Pološířka odezvy při použití bílého světla se poté zúžila z 10,42 μm na 4,05 μm .



Obrázek 3.12: Osová intenzitní odezva. $NA = 0,5$. a) $\delta = 1,60 \mu\text{m}$, $\lambda = 547(10) \text{ nm}$. b) $\delta = 1,10 \mu\text{m}$, $\lambda = \text{bílá}$. Křivka polychromatické funkce je vykreslena pro $\lambda = 547(50) \text{ nm}$, která nejlépe odpovídala naměřeným hodnotám a pro kterou je také vypočítána pološířka odezvy.

Obr. 3.12 a) ukazuje osovou intenzitní odezvu pro $NA = 0,5$. I přesto, že má tato odezva stejné parametry jako odezva na obr. 3.10, bylo z již dříve zmíněných důvodů nutné proměřit odezvu znovu. Lze si opět všimnout značného píku způsobeného dříve popsaným způsobem.

V obr. 3.12 b) byl stejně jako v předešlém případě při použití bílého světla vykreslen průběh pro polychromatické osvětlení, akorát s tím rozdílem, že zde se změřeným hodnotám nejvíce podobalo osvětlení 547 (50) nm. Pološířka této odezvy poté činila pouhých 1,10 μm , což je méně než 1,6 μm v předešlém případě při použití stejné NA a osvětlení 547 (10) nm.

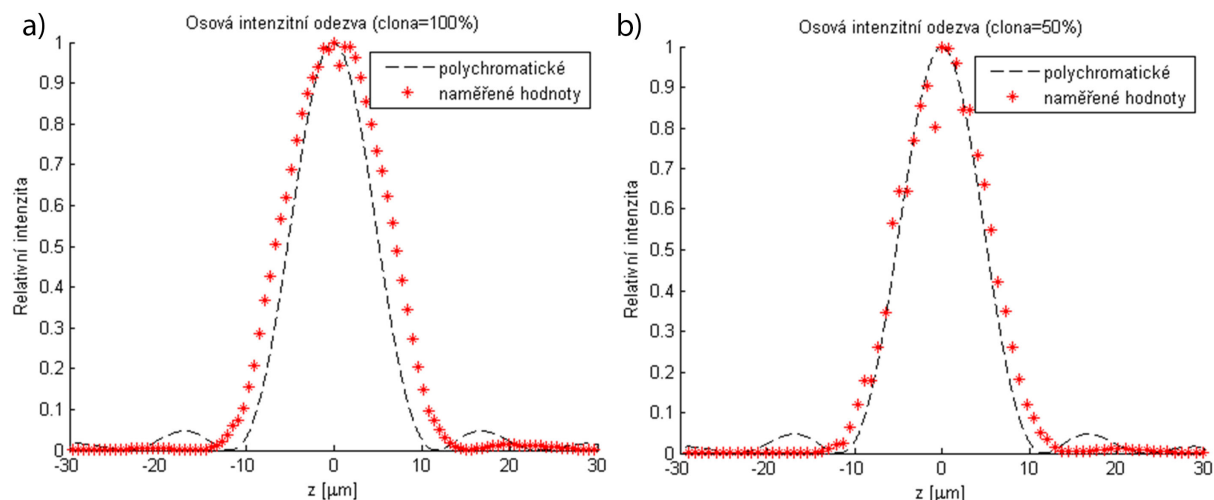
Předešlá měření nám opět ukázala zúžení pološířky osové intenzitní odezvy při použití časově méně koherentního osvětlení. V kombinaci s vyšší numerickou aperturou došlo k zúžení pološířky odezvy až na hodnotu 1,10 μm .

Prostorová koherence

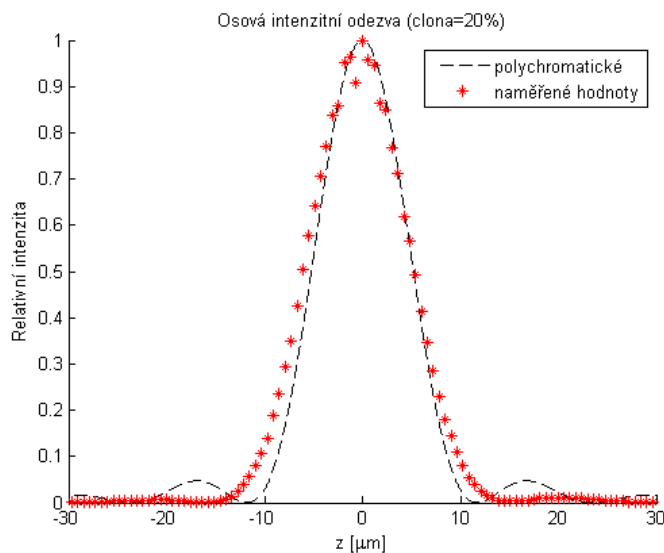
Další parametrem osové intenzitní odezvy byla závislost na prostorové koherenci světla. Ta se ovlivňovala změnou velikosti aperturní clony. Clona je v základním režimu otevřená, a jejím přivíráním docílíme vyšší prostorové koherence (budeme získávat bodovější zdroj). Závislost byla změřena pro clonu, která byla otevřená ze 100 %, 50 % a z 20 %.

50% otevření clony znamená, že se její plocha zmenšila 4x, zmenšení na 20 % znamená 25 násobné zmenšení její plochy.

Obrázky 3.13 a 3.14 ukazují průběhy osové intenzitní odezvy pro různé přivření clony. Všechna měření byla provedena pro parametry $NA = 0,1$ a $\lambda = 547(10)$ nm, pro které byla vykreslena i teoretická křivka (která byla ve všech případech stejná).



Obrázek 3.13: Osová intenzitní odezva. a) Clona = 100 %. b) Clona = 50 %



Obrázek 3.14: Osová intenzitní odezva. Clona = 20 %.

Změřené hodnoty v obr. 3.13 b) a 3.14, tedy pro clony otevřené z 50% a 20%, jsou prakticky stejné. U obr. 3.13 a), tedy pro clonu otevřenou ze 100% se získá nejméně koherentního osvětlení, je vidět větší pološířka osvětlení. Tento výsledek nesouhlasí s teorií, která říká, že u méně koherentního osvětlení by mělo dojít k zúžení pološířky osové intenzitní odezvy. Tento nesouhlas s teorií nelze momentálně vysvětlit a závislost na tomto parametru bude muset být změřena znovu s cílem zjistit, proč k takovému výsledku došlo.

3. TESTOVÁNÍ

3.3. Zjištěné nedostatky během testování

Během měření a testování RDHM bylo nalezeno mnoho nedostatků, které znemožňovaly měření v tomto módu, neúměrně zpomalovaly práci nebo jinak znepříjemňovaly měření. Tyto nedostatky byly nahlášeny a odstraněny, což umožnilo kvalitnější a rychlejší měření v budoucnu.

3.3.1. Softwarové chyby a nedostatky

Příliš velký rozsah skenování při autojustáži

U seřizování délek větví (autojustáži) s objektivem Nikon LU Plan Fluor 100x/0.95 byl zjištěn softwarový nedostatek, který neúměrně prodlužoval práci. Minimální velikost rozsahu skenování byla softwarově nastavena na $100\text{ }\mu\text{m}$. Teoretická hodnota pološířky osově intenzitní odezvy při použití zmíněného objektivu a osvětlení $547(10)\text{ nm}$ je $0,13\text{ }\mu\text{m}$. Bylo tedy nutno zvolit velikost rychlého kroku maximálně $0,10\text{ }\mu\text{m}$, nejlépe ještě méně. Z předešlých měření ale byla známa vzájemná poloha větví s přesností v rozsahu $10\text{ }\mu\text{m}$. Bylo tedy nutno vyčkat na 1000 měření, ačkoliv bylo jisté, že v 90 % skenovaného rozsahu hledaná hodnota není. Jelikož změření jedné hodnoty trvá přibližně 1 s, bylo nutno vyčkat u tohoto hledání o 15 minut delší dobu než bylo nutné. Tento nedostatek nebyl nikdy v předešlé době zjištěn, jelikož se zmíněný objektiv v transmisním módu nepoužívá. Popsaný nedostatek byl nahlášen a odstraněn. Nyní je minimální velikost rozsahu skenování nastavena na $10\text{ }\mu\text{m}$ (původně bylo $100\text{ }\mu\text{m}$).

Chyba počtu hodnot při měření z-stacku

Při měření průběhu osově intenzitní odezvy byla zjištěna softwarová chyba. Po zadání velikosti rozsahu měření o velikosti např. $100\text{ }\mu\text{m}$ (včetně krajních hodnot) s krokem $1\text{ }\mu\text{m}$, mikroskop ukazoval, že bude změřeno 100 hodnot, což taky bylo. Ačkoliv se to na první pohled nezdá, změřených hodnot by mělo být ve skutečnosti 101. Mikroskop tedy vždy měřil o jednu hodnotu méně. V rámci měření 100 hodnot je relativní chyba pouze 1% , avšak při zmenšování počtu hodnot měření se relativní i absolutní chyba zvětšují.

Po nahlášení této chyby bylo zjištěno, že mikroskop neměřil poslední hodnotu. Tato chyba byla následně odstraněna.

Relativní ostření

V průběhu měření bylo zjištěno, že při změně objektivu se objektiv v objektové větvi posune v ose z na přednastavenou pozici. Tato vlastnost je implementována kvůli transmisnímu módu a v reflexním módu nemá tato funkce opodstatnění. Protože jsou ale profily v programu CCHM rozděleny na transmisní a reflexní, lze nastavit tuto hodnotu pro reflexní mód na pozici 0. Tento nedostatek je zde zmíněn, jelikož při měření určitých vzorků nebylo možné vzorek zaostřit, a to právě kvůli nenulové poloze relativního ostření. V jiných případech může být tato vlastnost přinejmenším matoucí.

3.3.2. Technické chyby a nedostatky

Stabilita piezoelektrických posuvů

Při detailních dlouhých měřeních je nutné dávat si pozor na rozladování mikroskopu, pravděpodobně způsobené piezoelektrickými posuvy. Nelze tedy práci přerušit a pokračovat v ní později v domněnání, že je mikroskop stále řádně naladěn.

3.3.3. Návrhy na vylepšení

Návrh filtrů

Jelikož RDHM obsahoval pouze jediný interferenční filtr, byly v rámci této práce navrženy k zakoupení interferenční filtry, které by rozšiřovaly možností použitého osvětlení a s tím spojené vlastnosti. Na těchto interferenčních filtrech měla být změřena závislost osově intenzitní odezvy a osového rozlišení. Bohužel při dodání filtrů a jejich instalaci se zjistilo, že výrobce zvětšil objímky těchto filtrů a do mikroskopu už tedy nešly nainstalovat. Filtry se tedy musely upravit, ale už se nestihly včas nainstalovat a nemohly být změřeny.

Držák reflexních vzorků

Při uchycení vzorků bylo často nutné používat lepící hmotu, která přilepila vzorek k plíšku položenému na stolku (vzorky totiž musejí být umístěny strukturou dolů). Tohle uchycení bylo nevhodné především při zachování kolmosti struktury na optickou osu. Bylo by lepší, kdyby šel na stolek položit držák, který by měl zespodu vhodný systém na uchycení vzorků.

Druhý zdroj osvětlení

Multimodální holografický mikroskop obsahuje pouze jeden zdroj osvětlení. Světlo se pak do mikroskopu zavádí pro transmísni mód v horní části mikroskopu, pro reflexní mód v části dolní. Je tedy nutno mít dva optické kabely, z nichž jenom jeden může být připojený ke zdroji. Bylo by vhodné mít pro každý mód svůj zdroj, už jenom proto, že se při manipulaci s optickými kabely ničí jejich koncovky.

Navíc se na koncovku optického kabelu musí přidělovat hliníkový kroužek, pomocí kterého se kabel uchycuje ke zdroji. Kroužek je jenom jeden a jeho předělávání dále zdržuje práci.

3. TESTOVÁNÍ

4. Referenční metoda - AFM

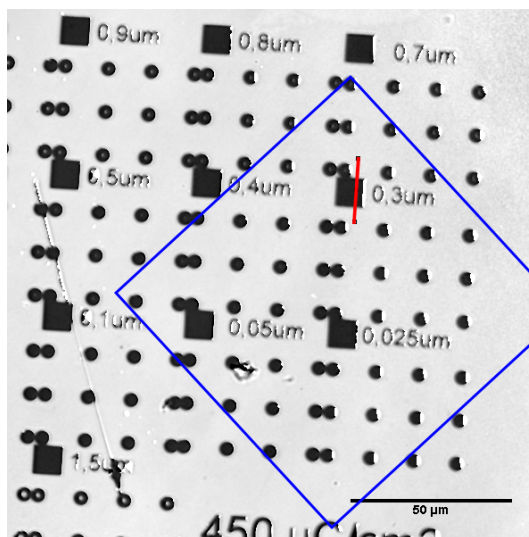
Jako referenční metoda posloužil mikroskop atomárních sil (AFM - atomic force microscopy), verze Nanosurf easyScan 2, umístěná v laboratoři A2/127 FSI VUT.

AFM je mikroskopická metoda sloužící k zobrazování povrchů objektů ve třech dimenzích. Tato technika slouží k měření sil mezi atomy, a to velice malým a úzkým hrotem, který rastruje povrch řádek po řádku.

Měřený vzorek představovala struktura ze 170 nm vrstvy polymethylmetakrylátu (PMMA), ve které byly vytvořené prstence o různých průměrech (obr. 4.1). Byly porovnávány schopnosti určit výšku v osovém a délku v laterálním směru.

4.1. Měření a srovnání

Hned ze začátku měření na AFM se ukázal jeho velký nedostatek vůči RDHM, a to rozsah jeho měření, který byl zde omezen na $100 \times 100 \mu\text{m}$. Nebylo tedy možné změřit rozsah stejný jako na RDHM. Tento poměr snímatelých ploch, včetně struktury zmíněného vzorku, je vidět na obr. 4.1.

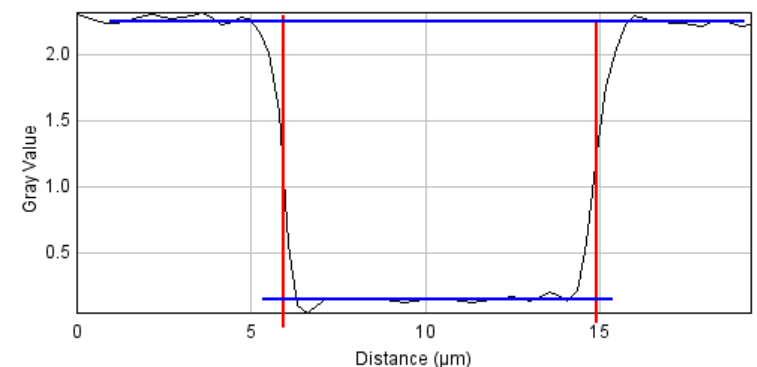


Obrázek 4.1: RDHM - měřená struktura. Modrý obdélník značí zorné pole AFM, červená úsečka značí profil pro měření rozměrů struktury.

Jako první byla porovnávána schopnost změřit rozměry struktury velkých rozměrů. Na obrázku 4.1 je vyznačen profil měření na čtverečku neznámých rozměrů (červená úsečka), na obrázku 4.2 je pak vidět tento profil s vyznačenými hranami, které posloužily k určení rozměrů.

Na RDHM vyšla šířka čtverečku $9 \mu\text{m}$, výška vypočítaná z profilu na obr. 4.2 pak $91,4 \text{ nm}$. Výška vypočítaná přesnější metodou popsanou v kap. 1.4.4 vyšla $92,37 \pm 1,47 \text{ nm}$.

4. REFERENČNÍ METODA - AFM

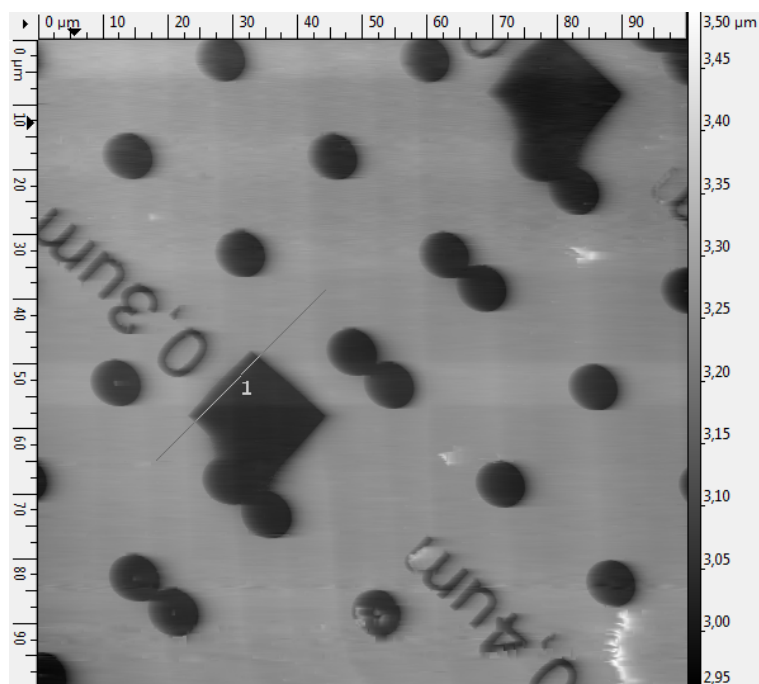


Obrázek 4.2: RDHM - profil povrchu.

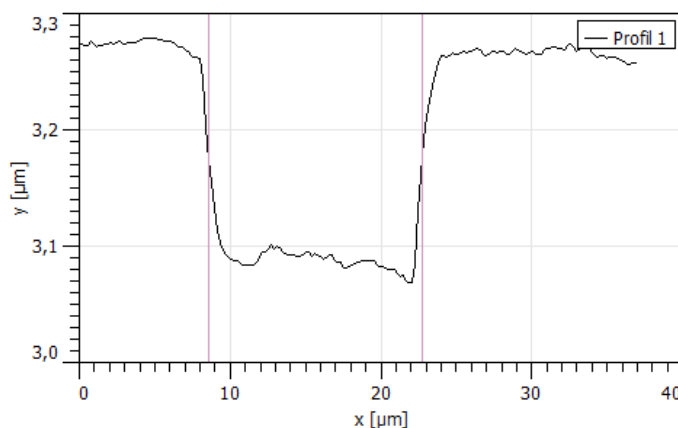
Jak bylo později zjištěno, výška změřená pomocí RDHM nebyla správná, a to i přesto, že mikroskop takovou hodnotu změřil. V práci [2] je popsána nevýhoda RDHM, a to taková, že pokud výškový rozdíl dvou ploch přesáhne hodnotu poloviny vlnové délky (polovinu fáze), může dojít ke špatnému změření výšky. V případě RDHM, kdy změna výšky vzorku ovlivní fázi dvojnásobně, je nutno ke zjištění hraničního rozdílu výšek podělit vlnovou délku čtyřmi, místo dvěma. Při použití světla o vlnové délce 547 nm je hraniční rozdíl výšek $547 \div 4 = 136,75$ nm, což je méně, než udávaná hodnota výšky struktury 170 nm. Tato hraniční hodnota byla tedy překonána. Dle [2] je tedy nutné k výpočtu použít doplněk poloviny fáze. Po přepočtu na vlnovou délku to tedy je $(547 \div 2) - 92,37 \text{ nm} = 181,13 \text{ nm}$. Výška struktury změřená pomocí RDHM je tedy po opravě rovna hodnotě 181,13 nm.

Následně byla změřena šířka a výška čtverečku na AFM. Snímek získaný z AFM i s vyznačeným profilem je vidět na obr. 4.3.

Výsledný profil i s vybranými hranami ke změření šířky čtverečku jsou poté vidět na obr. 4.4.



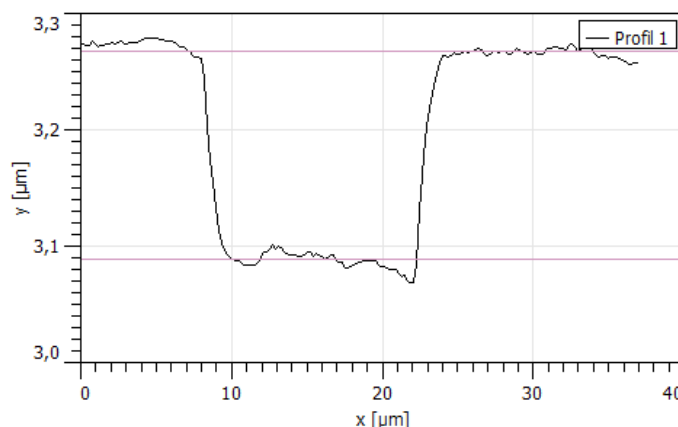
Obrázek 4.3: AFM - měřená struktura s vyznačeným profilem.



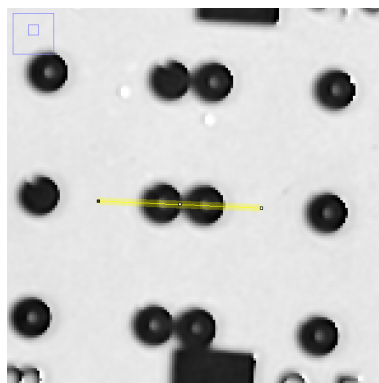
Obrázek 4.4: AFM - profil povrchu s vyznačenými hranami pro měření šířky.

Šířka čtverečku změřená na AFM byla $14,7\ \mu\text{m}$, což se velice liší od hodnoty udávané RDHM ($9\ \mu\text{m}$). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben následně zjištěným nesouladem laterálních měřítek AFM a RDHM. Průmět zorného pole AFM na obrázku 4.1 je tedy taky ovlivněn - ve skutečnosti by měl být menší. Na nalezení příčiny a opravy se bude pracovat.

Již zmíněný profil, akorát s vybranými hranami pro měření výšky čtverečku, je vidět na obr. 4.5.



Obrázek 4.5: AFM - profil povrchu s vyznačenými hranami pro měření výšky.

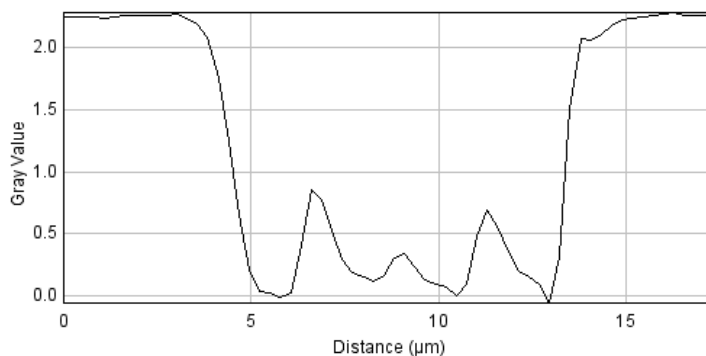


Obrázek 4.6: RDHM - měření vnitřních průměrů.

4. REFERENČNÍ METODA - AFM

Výška čtverečku změřená na AFM vyšla 178,7 nm. Tato hodnota je velice blízká hodnotě změřené na RDHM (181,13 nm) a výšce udávané při výrobě vzorku (170 nm).

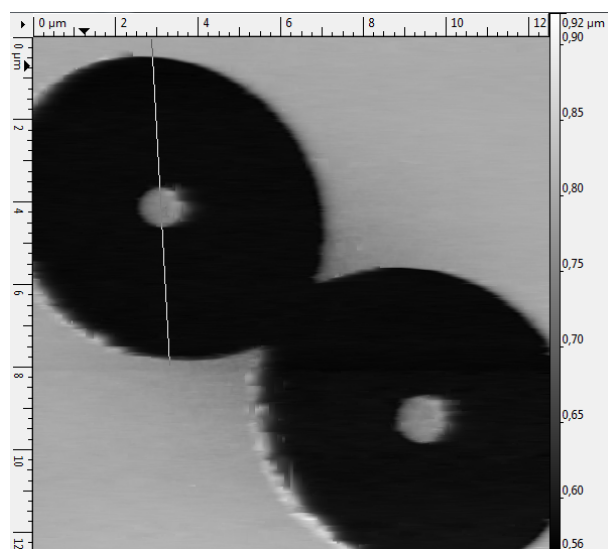
Dále byl pomocí RDHM změřen vnitřní průměr prstenců, zobrazených na obr. 4.6. Levý vnitřní prstenec by měl mít dle údajů uvedených na vzorku průměr 1 μm , pravý 0,9 μm .



Obrázek 4.7: RDHM - profil vnitřních průměrů prstenců.

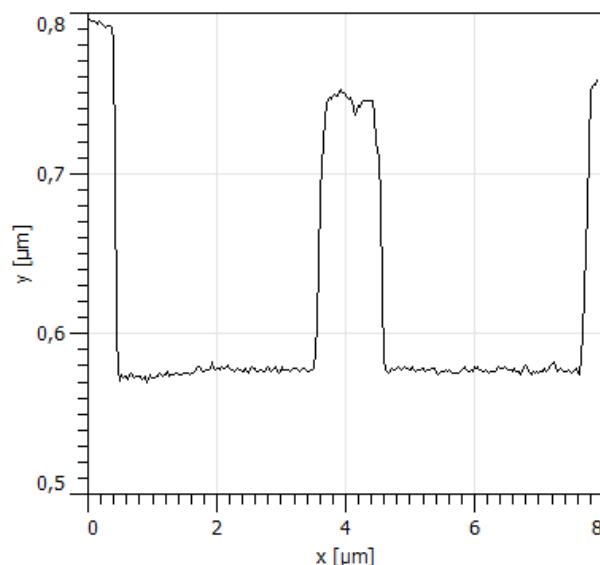
Obr. 4.7 ukazuje průběhy těchto profilů změřených pomocí RDHM. Jak je vidět, laterální rozlišení nám nedovoluje určit velikost průměrů. Hrany v profilu nejsou ostré a průměr by se dal odhadnout pouze s velkou nepřesností.

Snímek stejných prstenců z AFM je vidět na obr. 4.8. Levý horní prstenec odpovídá průměru 0,9 μm , dolní pravý průměru 1 μm . V obrázku je také vyznačen měřený profil levého horního prstence. Nutno podotknout, že tyto prstence byly na AFM změřeny dodatečně s větším rozlišením.



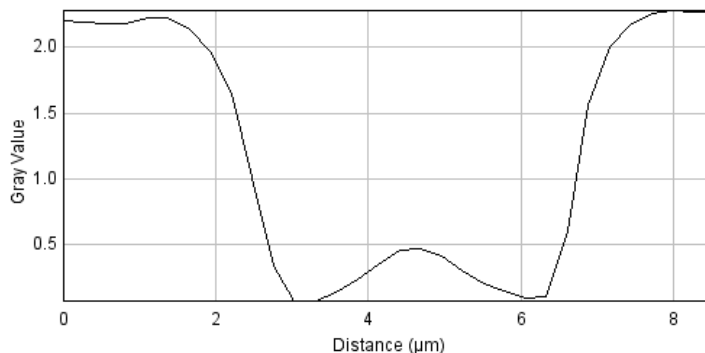
Obrázek 4.8: AFM - měření vnitřních průměrů.

Výsledný profil vnitřního prstence z AFM je vidět na obr. 4.9. Hrany jsou zde ostré a lze z nich změřit vnitřní průměry. Navíc lze z ostrosti hran a minimální hodnoty šumu usoudit, že tohle stále nebyla hranice rozlišitelnosti AFM a pokud bychom chtěli, měli bychom tyto prstence změřené ještě s vyšším rozlišením. Větší z průměrů vyšel na AFM 1,13 μm , menší 0,94 μm . Tyto hodnoty se velmi blíží hodnotám uvedeným na vzorku (1,00 μm a 0,90 μm).



Obrázek 4.9: AFM - profil vnitřních průměrů prstenců.

Dále bylo na RDHM vyzkoušeno, jak malý vnitřní průměr prstence je RDHM vůbec schopen detekovat. Profil prstence s vnitřním průměrem $0,4\ \mu\text{m}$ je zobrazen na obr. 4.10. Z něj je zřejmé, že je RDHM schopen ještě říct, zda-li má prstenec nenulový vnitřní průměr. U rozměru $0,3\ \mu\text{m}$ už RDHM nebyl schopen detekovat vnitřní průměr vůbec.

Obrázek 4.10: RDHM - hranice detekce vnitřního průměru. Velikost vnitřního průměru $= 0,4\ \mu\text{m}$

4.2. Výhody a nevýhody RDHM a AFM

Hlavní výhodou RDHM oproti AFM je rychlost měření. RDHM stačí seřadit podle postupu 1.4.1 a pak už jen ukládat snímky povrchu. Oproti tomu AFM musí rastrovat povrch, řádek po řádku, což mu trvá značnou dobu.

Dalším omezením AFM je velikost rozsahu rastrování. Ta je omezena na $100 \times 100\ \mu\text{m}$, kdežto u RDHM je při použití objektivu se zvětšením 20x rozsah $165 \times 165\ \mu\text{m}$, u objektivů s menším zvětšením pak ještě větší.

Další nepříjemnou záležitostí u této verze AFM byla nemožnost pohybovat vzorkem do stran. To se muselo provádět ručně (pohybovat se vzorkem prstem). U RDHM stačí ovládat piezoelektrický posuv na ovladači a lze se dostat do jakékoli části vzorku, aniž by se mikroskop rozladil.

4. REFERENČNÍ METODA - AFM

Spojení předešlých nevýhod AFM způsobuje, že je nutné čekat dlouhou dobu na rastr vzorku. Pokud je rastrovací hrot mimo vzorek, je nutné vzorek ručně posunout a opět čekat na rastr vzorku, poté zaměřit požadovanou měřenou strukturu a provést rastrování ještě jednou.

Nespornou výhodou AFM je celkové rozlišení. RDHM se laterálním rozlišením nemůže mikroskopu AFM ani zdaleka rovnat. Osové rozlišení je už srovnatelné, ale to ztrácí význam, pokud povrch netvoří spojitá vrstva o rozměrech alespoň $1 \times 1 \mu\text{m}$. Pokud jsou struktury menší, ztrácí se i výhoda osového rozlišení.

RDHM je tedy vhodnější na struktury s alespoň mikrometrickými laterálními rozměry, například pro měření drsností, které nejsou příliš malé a splňují tuto podmínku. Pro měření detailů je už nutno použít AFM.

Závěr

Tato práce se zabývala holografickou mikroskopií. Hlavním cílem bylo především seznámit se s touto technikou a následně otestovat Multimodální holografický mikroskop, čímž jsou myšleny jeho charakteristické odezvy, rozlišení a technické nedostatky. Nakonec se porovnaly jeho výhody a nevýhody s referenční metodou.

V prvé řadě byly popsány nesporné výhody nekoherentní mimoosové holografie. Bylo vytvořeno schéma pro reflexní mód, které doposud neexistovalo, a byl vytvořen a sepsán postup naladění mikroskopu, jelikož na něm neustále probíhají úpravy a dostupný návod už byl zastaralý a neodpovídal dnešnímu stavu.

Dále bylo teoreticky popsáno rozlišení a osová intenzitní odezva mikroskopu. Obě tyto vlastnosti byly pak následně změřeny v závislosti na různých parametrech.

Osové rozlišení bylo změřeno v závislosti na délce expozice kamery, pro které vycházela delší doba expozice ve prospěch osovému rozlišení. To bylo způsobeno především tím, že při krátkých dobách expozice vzrůstalo množství šumu. Závislost na numerické apertuře objektivu se sice podařilo změřit, ale výsledky nebyly vypovídající, neboť jeden objektiv nevykazoval stabilní hodnoty a zbylé dva se lišily v rámci chyby. Dalším z měřených parametrů závislosti osového rozlišení byl počet snímků k průměrování v programu CCHM. Zde byly hodnoty přesné a výsledky ukazují, že nezáleží na počtu snímků k průměrování. Celkově veškerá tato měření přinesla výsledky, které ukazují, jaké parametry nepoužít k zajištění nejlepšího osového rozlišení, z čehož se vyřazovací metodou dalo odvodit, jaké parametry použít. Ty byly poté použity ke změření nejlepšího osového rozlišení. Z výsledků tohoto měření vzešlo, že osově rozlišení nezáleží až tak na použitých parametrech, jak na přesnosti naladění mikroskopu.

Laterální rozlišení bylo posléze testováno pomocí USAF testu. Testování probíhalo v závislosti na numerické apertuře objektivu. Ve všech případech bylo laterální rozlišení o něco horší, než předpovídá teorie, avšak i přesto byly změřené hodnoty velmi blízké teoretickému rozlišení.

Osová intenzitní odezva byla změřena v závislosti na velikosti numerické apertury a časové a prostorové koherenci. V případě numerické apertury došlo k zúžení pološířky odezvy s narůstající numerickou aperturou. V případě časové koherence vyšly výsledky opět podle teorie, a to tak, že při zmenšující se časové koherenci světla dochází k zúžení osově intenzitní odezvy a tedy i optického řezu. V případě prostorové koherence se změřené průběhy neshodly s teorií, a tento nesoulad se bude následně zkoumat.

Následně byl RDHM porovnán s mikroskopem atomárních sil. Z tohoto srovnání vyšlo, že práce s RDHM je rychlejší, pohodlnější a v rámci určitých rozměrů měřeného vzorku také vhodnější. Pokud dojde na detaily pod $1\text{ }\mu\text{m}$, projeví se omezení laterálního rozlišení a RDHM už není schopen vykazovat správné výsledky. Pro vzorky s většími rozměry je tedy vhodné použít RDHM, pro detailní měření malých vzorků je nutné použití AFM.

Z měření na AFM byl následně zjištěn nesoulad laterálních měřítek AFM a RDHM. Z porovnání těchto dvou mikroskopů vzešlo, že jeden z mikroskopů nezobrazuje korektně

ZÁVĚR

měřítka v laterálním směru. Všechny hodnoty v tomto směru RDHM udával o něco menší, než ve skutečnosti byly. Tento nesoulad se taktéž dotkl měření laterálního rozlišení, kde byla část výsledků zkreslena. Ostatních měření se tato chyba nedotkla. Na nalezení příčiny a opravě se bude pracovat.

Poslední část testování zahrnovala sepsání chyb a nedostatků, se kterými se bylo možné setkat v průběhu testování. Většinu tvořily nedostatky, které zbytečně neúměrně prodlužovaly práci na RDHM a něco byly chyby, které vedly k nesprávným výsledkům. Všechny tyto chyby byly nahlášeny a jsou postupně opravovány. Nakonec byl sepsán seznam navrhovaných vylepšení.

Následná práce bude spočívat především na nalezení původu zmíněných chyb a jejich odstranění.

Literatura

- [1] KOLMAN, P. Koherencí řízený holografický mikroskop. [Dizertační práce] Brno: VUT, FSI, 2010, s. 72.
- [2] LOVICAR, L. Profilometrie povrchů pomocí reflexní digitální holografické mikroskopie. [Dizertační práce] Brno: VUT, FSI, 2010, s. 76.
- [3] LOVICAR, L.; KOMRSKA, J.; CHMELÍK, R. Quantitative-phase-contrast imaging of a two-level surface described as a 2D linear filtering process. *OPTICS EXPRESS*. 2010, roč. 18, č. 20, s. 20585–20594. ISSN 1094-4087.
- [4] KOLMAN, P.; CHMELÍK, R. Coherence-controlled holographic microscope. *OPTICS EXPRESS*. 2010, roč. 18, č. 21, s. 21990–22003. ISSN 1094-4087.
- [5] Nejlepší spolupráce roku mezi firmami a výzkumnou sférou. [online]. [Cit. 2014-05-17]. Dostupné z: <http://www.spolupraceroku.cz/>.
- [6] SLABÝ, T.; KOLMAN, P.; DOSTÁL, Z.; ANTOŠ, M.; LOŠŤÁK, M.; CHMELÍK, R. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *OPTICS EXPRESS*. 2013, roč. 21, č. 12, s. 14747–14762. ISSN 1094-4087.
- [7] Lyncée tec. [online]. [Cit. 2014-05-17]. Dostupné z: <http://www.lynceetec.com/>.
- [8] Phase Holographic Imaging. [online]. [Cit. 2014-05-22]. Dostupné z: <http://www.phiab.se/>.
- [9] CHMELÍK, R. Korelační mikroskopie, alternativní metoda vícekanálového konfokálního zobrazení. *Brno: VUTUM*. 2002, s. 34.
- [10] CHMELÍK, R. Three-dimensional scalar imaging in high-aperture low-coherence interference and holographic microscopes. *Journal of Modern Optics*. 2006, roč. 53, č. 18, s. 2673–2689. ISSN 0950-0340.
- [11] CHMELÍK, R., HARNA, Z. Surface profilometry by a parallel-mode confocal microscope. *Optical Engineering*. 2002, roč. 41, č. 4, s. 744 (s.). ISSN 0091-3286.
- [12] CHMELÍK, R., LOVICAR, L., HARNA, Z. Surface profilometry by a holographic confocal microscopy. *Optica Applicata*. 2003, roč. 33, č. 2- 3, s. 381 (s.). ISSN 0078-5466.
- [13] Objectives for biological microscopes. [online]. [Cit. 2014-05-17]. Dostupné z: http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/content/download/5167/47848/version/4/file/CFI60_2CE-MSSH-8.pdf.