Laboratorium	ZAAWANSOWANE TECHNIKI OPTYKI BIOMEDYCZNEJ
5	*Teoria odwzorowania mikroskopowego według Abbego oraz filtracja przestrzenna*

Opracowanie: dr inż. Igor Buzalewicz

Zagadnienie wstępne:

- *Transformacja Fouriera i jej zastosowanie w optyce;*
- *Widmo Fouriera/ widma dyfrakcyjne;*
- *Filtracja, rodzaje filtrów przestrzennych;*
- *Teoria odwzorowania Abbego oraz zdolność rozdzielcza obrazowania;*
- *Zasada Babineta,*

Cel ćwiczenia:

- *zapoznanie się z teorią odwzorowania Abbego, filtracją przestrzenną, ograniczoną dyfrakcyjnie zdolnością rozdzielczą, możliwością formowania obrazów optycznych przez układy optyczne, techniką mikroskopii ciemnego pola, zasadą Babineta;*
- *zapoznanie się z konstrukcją mikroskopu optycznego, mikroskopy ciemnego-pola*
- *zapoznanie się z ilością rzędów dyfrakcji (elementarnych fal płaskich ugiętych na przedmiocie) odwzorowywanych przez układ optyczny wpływających na możliwość utworzenia obrazu przedmiotu;*

Literatura:

- *J. Nowak, M. Zając, Optyka - Kurs elementarny, Oficyna Wydawnicza PWr, 1998 (http://www.dbc.wroc.pl/dlibra/docmetadata?id=206&from=publication)*
- ***E. Hecht, Optyka, PWN, 2016***

UWAGA: W trakcie konfiguracji układów pomiarowych Studenci są zobowiązani do zachowania szczególnej ostrożności podczas bezpośredniego kontaktu ze wszystkimi elementami optycznymi w celu ich zabezpieczenia przed uszkodzeniem (m.in. należy sprawdzić stabilność zamocowania elementów). Nie należy dotykać powierzchni elementów optycznych powodując ich zabrudzenie.

W razie niespełnienia tych wymagań Student może zostać usunięty z laboratorium, a ćwiczenie laboratoryjne będzie musiało być odrobione.

Studenci są odpowiedzialni materialnie za uszkodzenie lub zniszczenie elementów optycznych z własnej winy.

Studenci są zobowiązani sprawdzić (przed i po wykonaniu ćwiczenia), czy liczba powierzonych elementów jest taka sama.

1 WPROWADZENIE

Transformacja Fourier i odwrotna transformacja Fouriera

W ogólnym przypadku dwuwymiarowej funkcji *f(x,y)* definicję ciągłego przekształcenia lub też transformaty Fouriera przedstawić można w następujący sposób:

$$F(f_x, f_y) = \Im\{f(x,y)\} = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} f(x,y)\exp\{-i2\pi(xf_x + yf_y)\}dxdy$$

gdzie wielkości f_x, f_y określają częstości przestrzenne, których wymiar jest równy m^{-1}, natomiast wyrażenie $F(f_x, f_y)$ przedstawia transformatę Fouriera, a jej moduł widmo Fouriera funkcji *f(x,y)*.

Z kolei odwrotną transformatę Fouriera opisuje zależność:

$$f(x,y) = \Im^{-1}\{F(f_x, f_y)\} = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} F(f_x, f_y)\exp\{i2\pi(xf_x + yf_y)\}df_x df_y$$

Dostatecznymi warunkami realizowalności transformacji Fouriera są:

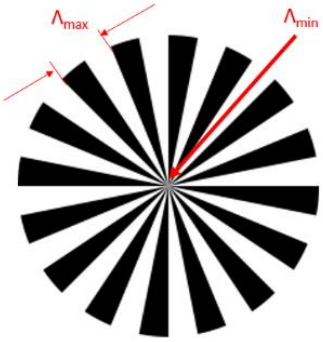
- **bezwzględna całkowalność funkcji podcałkowej,**
- **skończona liczba punktów i ekstremów,**
- **brak skoków do nieskończoności.**

Pojęcie częstości przestrzennych

Jak to już było wspomniane powyżej, transformata Fouriera może zostać wykorzystana do analizy harmonicznej badanego sygnału. Jest ona często stosowana do analizowania przebiegów czasowych sygnałów elektrycznych, lecz również biomedycznych np. EKG. Pozwala na rozłożenie niekiedy skomplikowanych sygnałów na znacznie prostsze sygnały harmoniczne. W przypadku przebiegów czasowych pozwala na określenie częstotliwości czasowych [s^{-1}] oraz amplitud składowych harmonicznych tych sygnałów, których suma będzie równoważna wypadkowemu sygnałowi, który został zarejestrowany. W przypadku optyki biomedycznej, badanymi sygnałami są dwuwymiarowe (2D) rozkłady przestrzenne, zatem w tym przypadku nasz sygnał nie opisuje przebiegu czasowego tzn. nie jest funkcją czasu, lecz współrzędnych przestrzennych (x,y). Analizowanym sygnałem może być rozkład przestrzenny natężenia światła w dowolnej 2D płaszczyźnie np. obraz optyczny, rozkład przestrzenny właściwości optycznych np. rozkład 2D współczynnika transmisji, profil powierzchni etc. Jednym z przykładów analizowanych sygnałów może być gwiazda Siemensa przedstawiona na rysunku obok. Jest to przedmiot strefowy, posiadający obszary o współczynniku transmisji równym 1 lub 0, które powtarzają się okresowo. W związku z tym możliwe jest wyznaczenie okresu przestrzennego takiego obiektu, jednakże w tym przypadku widzimy, iż okres ten będzie się zmniejszał w kierunku centrum gwiazdy. Oznacza to, iż gwiazda jest obiektem periodycznym o zmiennym okresie przestrzennym. Odwrotność okresu

Koncepcja okresowego/periodycznego przedmiotu optycznego

Λ- okres przestrzenny



f_x, f_y- częstości przestrzenne

$$f_{x,y} = \frac{1}{\Lambda_{x,y}}[m^{-1}]$$

przestrzennego będzie w tym przypadku również określać częstość przestrzenną, która na obrzeżach gwiazdy będzie mniejsza niż w jej centrum.

UWAGA: Należy zwrócić uwagę, iż **częstość przestrzenna w żadnej mierze nie jest równoznaczna z częstotliwością fali świetlnej**. Częstości przestrzenne wyrażone w m^{-1} odnoszą się do 2D rozkładów przestrzennych analizowanego sygnału np. natężenia światła, współczynnika transmisji/absorpcji, grubości etc. Z kolei częstotliwość fali świetlnej wyrażona w [Hz]=[s^{-1}] jest związana ze zmianą czasową amplitudy fali świetlnej.

Analiza harmoniczna

Jak już wspomnieliśmy transformacja Fouriera jest wykorzystywana w analizie harmonicznej badanych sygnałów. W celu demonstracji na czym polega ten proces, przenalizujmy rozkład przestrzenny grubości danej powierzchni, dla prostoty rozważmy sygnał 1D opisujący rozkład grubość w funkcji tylko jednej współrzędnej przestrzennej. W ogólnym przypadku może być on opisany funkcją piłokształtną (A). Jest to funkcja nieharmoniczna, ale okresowa. W wyniku transformacji Fouriera tej funkcji otrzymamy rozkład tej funkcji na znacznie prostsze funkcje harmoniczne sinusoidalne lub kosinusoidalne o różnych częstościach przestrzennych oraz amplitudach (B, C). Jeżeli te wszystkie składowe harmoniczne dodamy, wówczas będziemy w stanie zsyntetyzować z nich nasz wyjściowy sygnał piłokształtny.

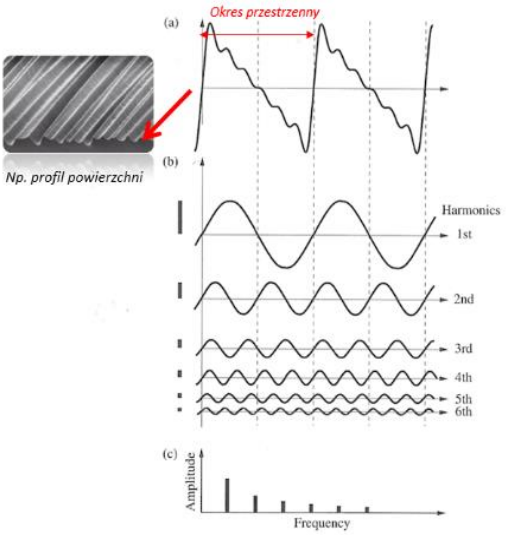


Figure 7.27 (a) An approximation of a saw-tooth wave. Ordinarily such a wave would be composed of thousands of sine components and have straight edges that meet at sharp points. (b) The six harmonic waves, with different amplitudes and fequencies, that constitue this wiggly saw tooth. (c) The frequency spectrum.

E. Hecht, „Optyka", rozdz.10.2.6, PWN 2012

Wynika to w bezpośredni sposób z twierdzenia Fouriera, które mówi, iż f*unkcja nieharmoniczna f(x) mająca okres przestrzenny Λ może być zsyntezowana z sumy funkcji harmonicznych, których okresy przestrzenne są całkowitymi podzielnikami Λ tj. Λ, Λ /2, Λ /3 itp.*

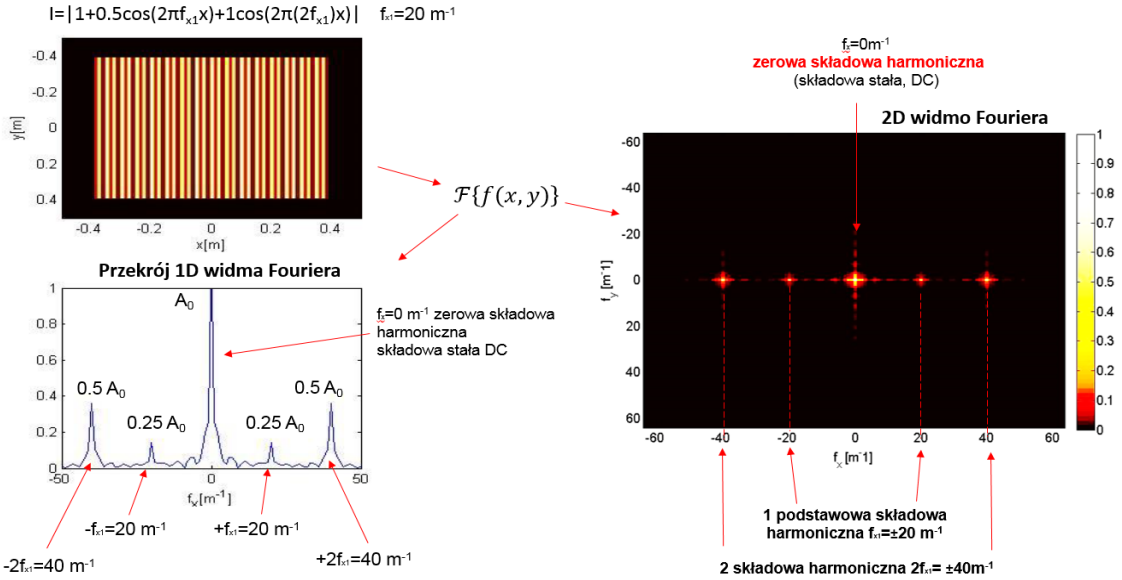
$$f(x) = C_0 + C_1 cos\left(\frac{2\pi}{\Lambda}x + \varepsilon_1\right) + C_1 cos\left(\frac{2\pi}{\Lambda/2}x + \varepsilon_2\right) + \ldots$$

składowa stała — poszczególne składowe harmoniczne

$f_x = \frac{1}{\Lambda}[m^{-1}]$ częstość przestrzenna

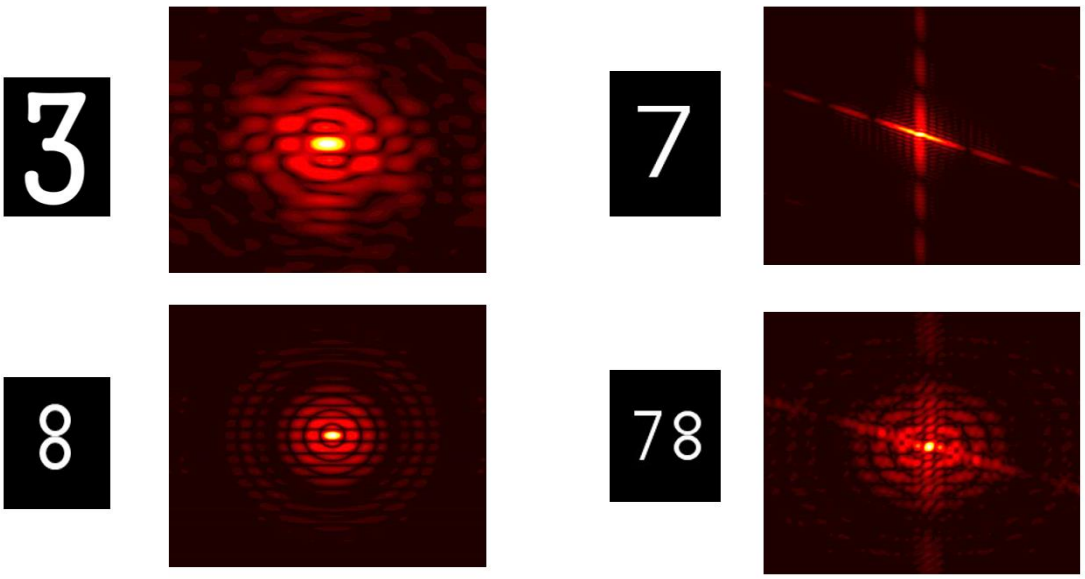
$\omega_x = 2\pi f_x\ [rad * m^{-1}]$ kątowa częstość przestrzenna

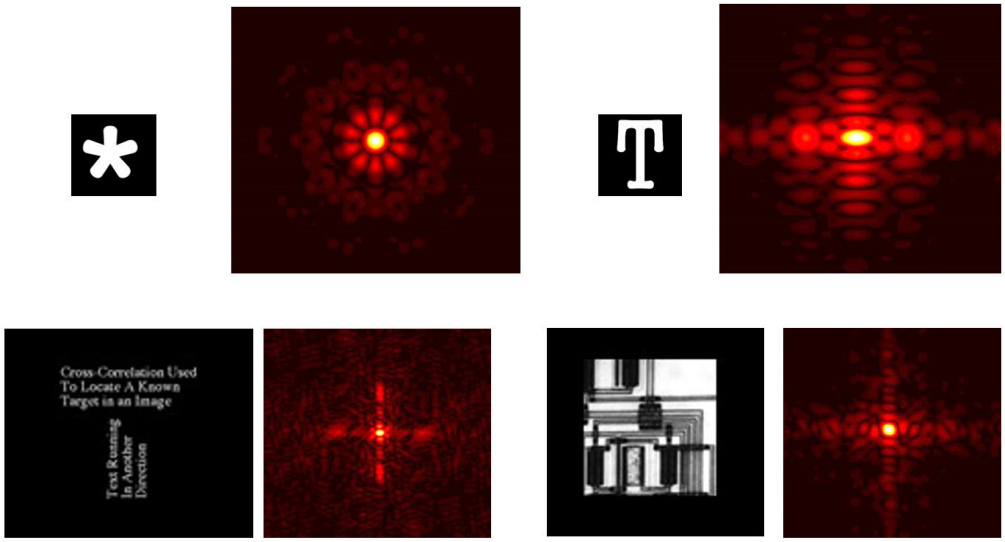
Oznacza to, iż biorąc dużą ilość funkcji harmonicznych o różnych okresach przestrzennych/częstościach przestrzennych i amplitudach możliwe są złożenia bardzo skomplikowanych zaburzeń nieharmonicznych. Poniżej został przedstawiony przykład analizy harmonicznej funkcji dwuwymiarowej, która opisuje 2D rozkład przestrzenny prążków interferencyjnych, który zawiera dwie składowe harmoniczne o dwóch częstościach przestrzennych f_{x1}, $2f_{x1}$.



Twierdzenie Fouriera prowadzi jednak również do dodatkowych konkluzji, jeżeli pod uwagę weźmiemy fakt, iż składowe harmoniczne, czyli funkcje sinusoidalne lub kosinusoidalne w optyce dość często są stosowane do opisu siatek dyfrakcyjnych. W tym kontekście możemy stwierdzić, że *dowolnie skomplikowany sygnał 2D opisujący funkcję przedmiotową lub ogólnie rozkład przestrzennych jakiejś wielkości np. natężenia światła, może być rozłożony na sumę siatek dyfrakcyjnych (składowych harmonicznych) o określonych częstościach przestrzennych i amplitudach*.

Poniżej przedstawione zostały przykładowe moduły 2D transformacje Fouriera (widma Fouriera) różnych sygnałów 2D.





W dalszej części zostaną przedstawione różne interpretacje fizyczne transformacji Fouriera w optyce, które na tym etapie zostaną jedynie zasygnalizowane, ponieważ będą temat dalszych zajęć laboratoryjnych.

Jeżeli odwołamy się do zjawiska dyfrakcji światła na np. przesłonach otworowych, siatkach dyfrakcyjnych itp., wówczas możliwe będzie wykazanie jeszcze jednej roli jaką w optyce pełni transformacja Fouriera. Odwołując się do optyki falowej, a szczególnie skalarnej teorii dyfrakcji [1], widzimy, iż transformacja Fourier jest obecna w całkach dyfrakcyjnych opisujących zjawisko dyfrakcji światła. W przypadku dyfrakcji dalekiego pola/ dyfrakcji Fraunhofera całka dyfrakcyjna ma postać bezpośredniej transformacji Fouriera funkcji przedmiotowej opisującej właściwości obiektu uginającego światło. Oznacza to, iż moduł 2D transformacji Fouriera/ widmo Fouriera możemy uważać za widmo dyfrakcyjne Fraunhofera, które opisuje rozkład przestrzenny natężenia światła ugiętego na obiekcie oświetlonym poosiową falą płaską. W tym przypadku widzimy, iż zjawisko dyfrakcji światła jest jednoznaczne z procesem analizy harmonicznej badanego sygnału, gdzie światło ulega dyfrakcji na wszystkich składowych harmonicznych (elementarnych siatkach dyfrakcyjnych), na które możemy rozłożyć funkcję przedmiotową.

Odwrotna transformacja Fouriera

Biorąc pod uwagę fakt, iż transformacja Fouriera – analiza harmoniczna prowadzi do rozłożenia sygnału na składowe harmoniczne, wówczas logicznym jest, iż odwrotna transformacja Fouriera odnosi się co procesu odwrotnego. Jeżeli mamy określony zbiór składowych harmonicznych (siatek dyfrakcyjnych) wówczas odwrotna transformacja prowadzi w bezpośredni sposób do odtworzenia sygnału będącego sumą tych składowych. Znając widmo Fouriera (moduł transformaty Fouriera) dzięki odwrotnej transformacji Fouriera uzyskamy sygnał początkowy – będący sygnałem wejściowym dla analizy harmonicznej.

Jeszcze inne znaczenie odwrotnej transformacji Fouriera związane jest z szczególną postacią jądra tej transformacji całkowej tzn. $exp\{+2\pi i(xf_x + yf_y)\}$, które ma taką samą postać analityczną jak fala płaska o jednostkowej amplitudzie i rozchodząca się w kierunkach opisanych przez częstości przestrzenne. W związku, z tym odwrotną transformację Fouriera można zatem traktować, jako ciągły, ze względu na całkowanie po (f_x,f_y), zbiór fal płaskich o

[1] I.Wilk, P.Wilk, „Optyka Fizyczna cz.1 Dyfrakcja światła”, Oficyna PWR, 1995 , rozdz.3-4
https://dbc.wroc.pl/dlibra/publication/148/edition/212?language=pl

amplitudach $F(f_x,f_y)$ i różnych wartościach dla różnych częstości przestrzennych oraz członach fazowych $\exp(2\pi i(xf_x+yf_y))$, będących szczególnym przypadkiem zapisu zespolonego fali płaskiej w płaszczyźnie prostopadłej do osi z.

Prowadzi to do oczywistej konkluzji, iż dowolne zaburzenie U(x,y,z=0) w płaszczyźnie (x,y) jest zatem odpowiednią superpozycją całkową (złożeniem) zbioru fal płaskich, z których każda wychodząc z płaszczyzny (x,y) rozchodzi się dalej w innym kierunku określonym przez kosinusy kierunkowe związane z jej częstościami przestrzennymi:

$$cos\alpha = \lambda f_x \quad cos\beta = \lambda f_y \quad cos\gamma = \lambda f_z = \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}$$

Tym samym transformację Fouriera, możemy uważać za transformację prowadzącą do rozłożenia dowolnego zaburzenia optycznego na zbiór fal płaskich o różnych amplitudach oraz częstościach przestrzennych:

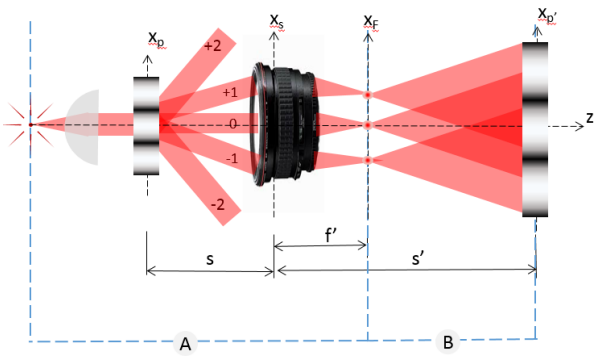
$$A(f_x, f_y, z=0) = A\left(\frac{cos\alpha}{\lambda}, \frac{cos\beta}{\lambda}, z=0\right) = \iint_{-\infty}^{+\infty} U(x,y,z=0)\ exp\{-2\pi i(xf_x + yf_y)\}dxdy =$$

$$= \iint_{-\infty}^{+\infty} U(x,y,z=0)\ exp\left\{-2\pi i\left(x\frac{cos\alpha}{\lambda} + y\frac{cos\beta}{\lambda}\right)\right\}dxdy$$

nazywamy widmem kątowym zaburzenia U(x,y,z=0) na dowolnej płaszczyźnie (x,y), które określa amplitudy, a pośrednio również energię, składowych fal płaskich tego zaburzenia biegnących w kierunkach określonych przez kosinusy kierunkowe oraz częstości przestrzenne.

1.2 Teoria odwzorowania Abbego

Odwołując się do teorii tworzenia obrazu w mikroskopie według Abbego (patrz rysunek poniżej), proces ten możemy podzielić na dwa etapy.



Proces odwzorowania optycznego według Abbego jest dwuetapowy:

A **Proces analizy harmonicznej** – utworzenia obrazu dyfrakcyjnego odwzorowywanego obiektu (jego widma Fouriera) w obrazowej płaszczyźnie ogniskowej obiektywu.

B **Proces syntezy obrazu** – utworzenia obrazu geometrycznego-tożsamościowego odwzorowywanego obiektu przez sferyczne fale świetlne wygenerowane przez punktowe źródła światła tworzące widmo Fouriera obiektu w płaszczyźnie obrazu.

W pierwszym z nich, gdy skolimowana wiązka świetlna, którą możemy przybliżyć falą płaską, padając na przedmiot ulega na nim dyfrakcji i tworzy szereg fal płaskich o różnych amplitudach i rozchodzących się pod różnymi kątami $(\alpha = cos^{-1}(\lambda f_x), \beta = cos^{-1}(\lambda f_y))$ zależnymi od częstości przestrzennych *fx, fy* funkcji przedmiotowej opisującej obiekt.

Widzimy zatem, iż w tym etapie mamy do czynienia z analizą harmoniczną zaburzenia optycznego w płaszczyźnie przedmiotowej, czyli jego rozkładem na poszczególne składowe harmoniczne widma Fouriera – reprezentujące składowe fale płaskie ugięte na przedmiocie. Tym samym w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu powstaje specyficzny rozkład przestrzenny punktowych źródeł światła charakterystyczny dla danego przedmiotu. Z kolei w drugim etapie teorii Abbego, zachodzi synteza obrazu, który powstaje w wyniku superpozycji sferycznych fal świetlnych wyemitowanych przez punktowe źródła światła zlokalizowane w płaszczyźnie Fouriera. Fale te nakładają się w płaszczyźnie obrazowej obiektywu formując geometryczny obraz pośredni przedmiotu. Jeżeli płaszczyzna Fouriera pokrywa się z płaszczyzną ogniskowa przedmiotową okularu, wówczas będzie ona realizowała odwrotną transformację Fouriera, która umożliwia utworzenie obrazu przedmiotu na podstawie jego widma Fouriera. Oczywistym się staje, iż w świetle tej teorii zniekształcenie obrazu w stosunku do obiektu, tłumaczyć możemy skończonymi rozmiarami obiektywu. Skończona średnica apertury obiektywu sprawia, iż część fal ugiętych na przedmiocie nie dociera do obiektywu, a tym samym zostaje wyeliminowana z widma fourierowskiego, co w konsekwencji sprawia, że fale te nie biorą udziału w syntezie obrazu. Prowadzi to do utraty części informacji na temat obiektu zawartych w falach ugiętych o wysokich częstościach przestrzennych.

Wszelkie modyfikacje widma Fouriera, polegające na eliminacji poszczególnych składowych częstotliwościowych tego widma, będą również prowadziły do modyfikacji obrazu tego przedmiotu. Proces ten określamy mianem **filtracji przestrzennej** widma Fouriera obiektu.

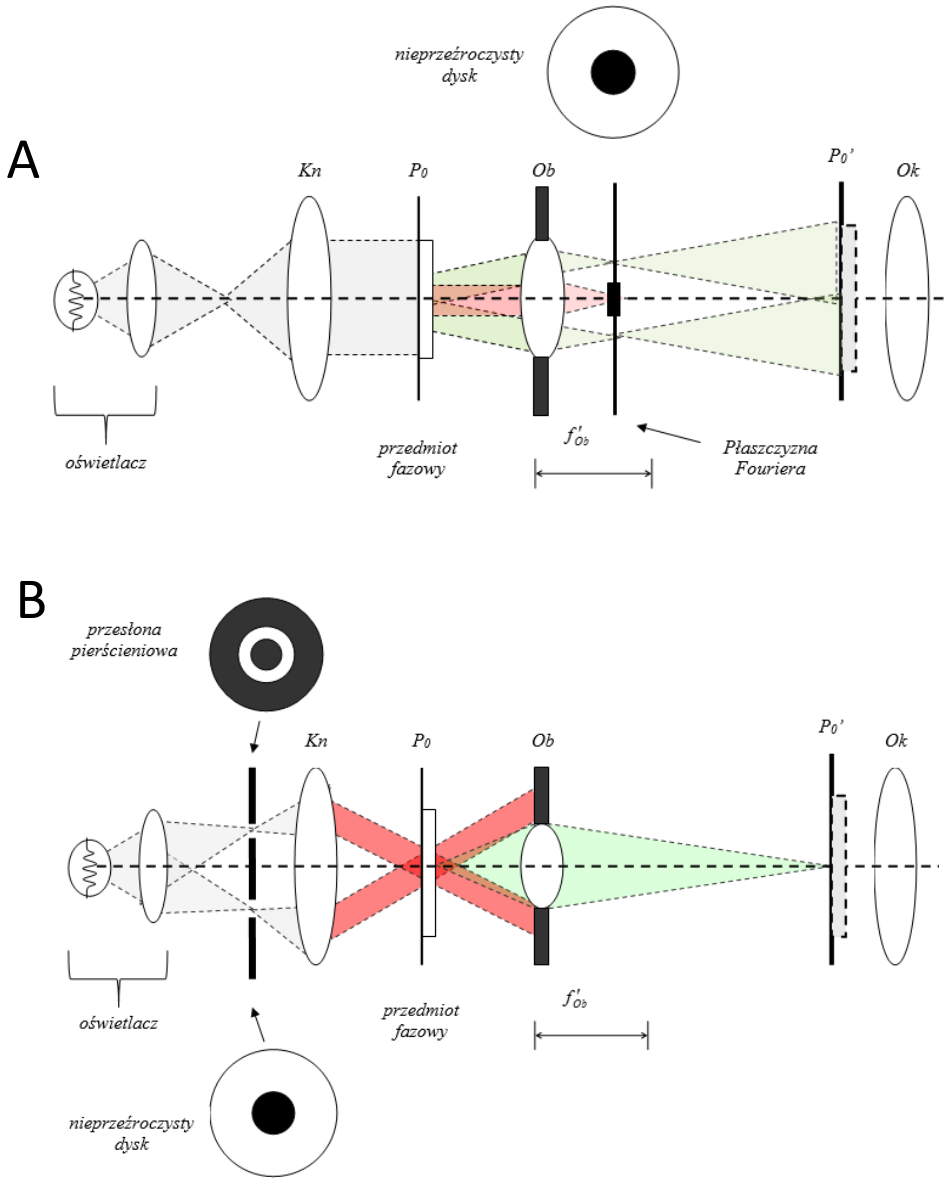
Poniżej znajduje się rysunek przedstawiający wpływ filtracji przestrzennej na rekonstrukcję obrazu obiektu testowego, który może demonstrować zniekształcenie obrazu odwzorowywanego przez uogólniony układ optyczny. Obiekt, na który pada światło, ugina wiązki świetlne pod różnymi kątami. Jeżeli wiązkę ugiętą przedstawimy w postaci superpozycji fal płaskich rozchodzących się w kierunkach określonych przez poszczególne częstości przestrzenne związane z funkcją transmitancji amplitudowo-fazowej tego obiektu, wówczas skończone rozmiary poprzeczne układu optycznego będą prowadziły do eliminacji fal, które nie trafią do obiektywu, a tym samym nie będą odwzorowywane przez układ optyczny. Wówczas utworzony przez ten układ obraz będzie różnił się od obrazowanego przedmiotu, będzie zniekształcony, ponieważ eliminacja części fal jest równoznaczna z utratą części informacji na temat przedmiotu uginającego światło niesionej przez te fale świetlne, które odnoszą się do struktur przedmiotu np. zmian współczynnika transmisji o wyższych częstościach przestrzennych.

W rozpatrywanym na rysunku poniżej przypadku, odwzorowywanym przedmiotem jest rozkład przestrzenny prążków interferencyjnych o dwóch częstościach przestrzennych. Filtracja przestrzenna, czyli eliminacja maksimów w płaszczyźnie Fouriera odpowiadających poszczególnym częstościom przestrzennym prowadzi do zniekształcenia obrazu utworzonego przez uogólniony układ optyczny. W przypadku, gdy w płaszczyźnie Fouriera nieodfiltrowane zostanie jedynie maksimum odpowiadające zerowej częstości przestrzennej tj. światłu nieugiętemu, wówczas uzyskany obraz odpowiada wiązce transmitowanej przez ten obiekt.

1.3 Mikroskopia ciemnego pola, jak przykład wykorzystania filtracji przestrzennej

Mikroskopia ciemnego pola jest jedną z technik obrazowania optycznego opierającą się na filtracji przestrzennej. W przypadku obiektów czysto-fazowych lub fazowo-amplitudowych, z jakimi mamy dość często do czynienia w przypadku mikroskopii, padająca fala świetlna ulega modulacji fazowej związanej ze geometrią przestrzenną obiektu oraz przestrzennym rozkładem współczynnika załamania światła lub lokalnych niejednorodności struktury obiektu lub też modulacji amplitudowej związanej z pochłanianiem energii wiązki przez centra absorbujące. W przypadku komórek biologicznych, które możemy traktować za obiektyw czysto-fazowe, natężenie wiązki transmitowanej jest znacznie większe niż natężenie wiązek

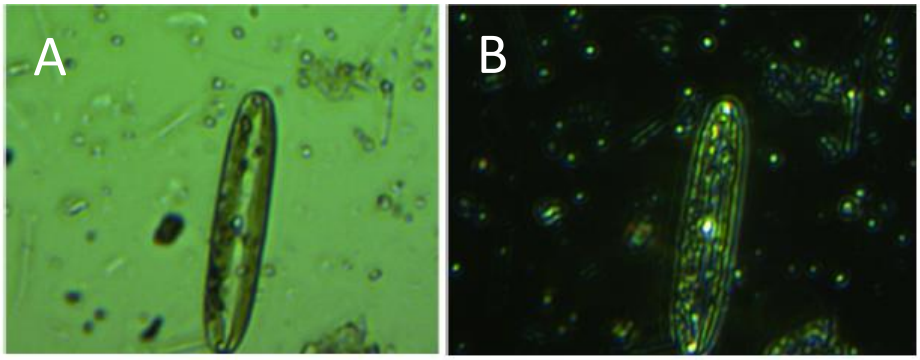
ugiętych na przedmiocie, które niosą informację o obiekcie. Prowadzi to do utworzenia mało kontrastowych oraz mało rozdzielczych obrazów tych struktur. W celu lepszego zobrazowania kształtu lub geometrii przestrzennej badanych obiektów stosuje się właśnie technikę ciemnego pola. Polega ona na realizacji w układzie optycznym, filtracji przestrzennej wiązki zerowego - rzędu ugięcia, nieugiętą i rozchodzącą się wzdłuż osi optycznej, która nie będzie brała udziału w syntezie obrazu, a tym samym pozwala na uzyskanie wysokokontrastowego obrazu odwzorowywanego obiektu. W formowaniu się obrazu będą brały udział jedynie pozaosiowe wiązki ugięte na przedmiocie i charakteryzujące się znacznie mniejszym natężeniem niż wiązka nieugięta. Filtrację realizuje się w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu, czyli w płaszczyźnie Fouriera, umieszczając nieprzeźroczysty dysk w centrum tej płaszczyzny (patrz rysunek A poniżej).



Konfiguracja mikroskopu ciemnego pola: (A) oparta na filtracji przestrzennej, (B) oparta na poza osiowym oświetleniu próbki

Dysk ten pozwala na odfiltrowanie maksimum widma Fouriera odpowiadającego zerowej częstości przestrzennej. Podobny efekt można uzyskać poprzez pozaosiowe oświetlenie preparatu, umieszczając w układzie oświetlającym preparat dodatkową przesłonę pierścieniową, lub dysk (patrz rysunek B powyżej). W tym przypadku wiązka nieugięta na

przedmiocie i dalej rozchodząca się w tym samym kierunku będzie eliminowana przez oprawę obiektywu. Widzimy, iż chociaż w tym przypadku nie mamy do czynienia z „fizyczną” filtracją realizowaną w płaszczyźnie Fouriera, to jednak efekt takiego sposobu oświetlenia przedmiotu będzie analogiczny jak w poprzednim przypadku. Poniżej zostały przedstawione obrazy porównujące technikę jasnego i ciemnego pola.

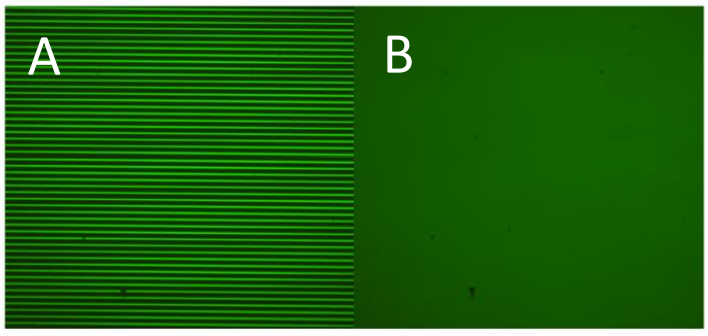


Obrazy okrzemki uwtorzone techniką: (A) jasnego pola i (B) ciemnego pola.

1.4 Zdolność rozdzielcza a dyfrakcja światła

W świetle teorii odwzorowania Abbego, brak tożsamości obrazu w stosunku do przedmiotu możemy tłumaczyć niezdolnością układu optycznego do przeniesienia informacji o przedmiocie zawartych we wszystkich falach ugiętych na nim do widma Fouriera utworzonego przez obiektyw. Możemy to tłumaczyć skończonymi rozmiarami obiektywu. Skończona średnica przesłony aperturowej lub źrenicy układu optycznego sprawia, iż część fal ugiętych na przedmiocie nie dociera do układu, a tym samym zostaje wyeliminowana z widma fourierowskiego. W konsekwencji, fale wyemitowane przez punktowe źródła światła zlokalizowane w płaszczyźnie Fouriera i reprezentujące właśnie te fale ugięte nie biorą udziału w syntezie obrazu. Prowadzi to do utraty części informacji na temat obiektu zawartych w falach ugiętych na strukturach dyfrakcyjnych o wysokich częstościach przestrzennych.

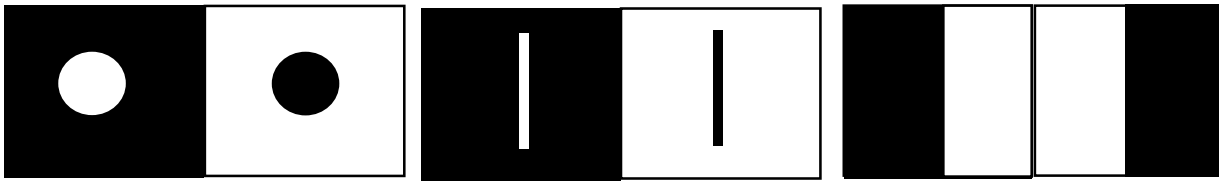
Interferencja pomiędzy wiązką 0-rzędu dyfrakcji, czyli wiązką, która nie uległa w ogóle dyfrakcji na przedmiocie i nie zmieniła swojego kierunku, a wiązkami wyższych rzędów dyfrakcji odpowiada za kontrast obrazu oraz określa zakres przenoszonych przez układ częstości przestrzennych struktury dyfrakcyjnej przedmiotu, które mogą być zawarte w obrazie. Jeżeli układ optyczny będzie odwzorowywał jedynie wiązkę 0-rzędu dyfrakcji (nieugiętą)- odpowiadają zerowej częstości przestrzennej, wówczas w procesie syntezy obrazu w ogóle nie będzie miała miejsca interferencja i nie powstanie obraz przedmiotu, nie możemy wówczas również w ogóle mówić o zdolności rozdzielczej układu optycznego.



(A) Obraz siatki dyfrakcyjnej utworzonej bez filtracji przestrzennej, (B) Obraz siatki po odfiltrowaniu wiązek ugiętych i pozostawieniu wiązki zerowego rzędu ugięcia.

1.5 Twierdzenie Babineta

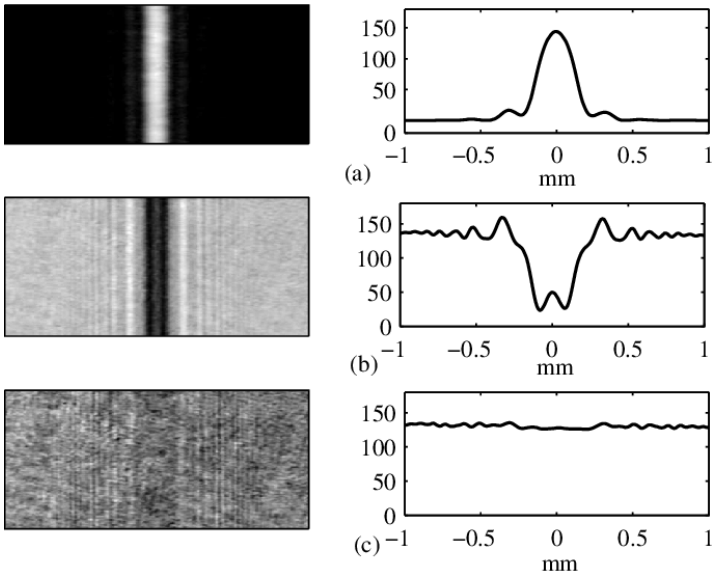
Odnosi się ono do ekranów/obiektów lub przesłon dopełniających się np. przesłony kołowej oraz nieprzeźroczystego dysku, dopełniających siatek dyfrakcyjnych lub szczelin (patrz poniżej).



Jeżeli światło wyemitowane przez źródło światła będzie propagować w wolnej przestrzeni, wówczas na ekranie zarejestrujemy charakterystyczny dla niego rozkład natężenia światła/ zaburzenie optyczne $U_0(x,y)$. Następnie jeżeli pomiędzy źródłem światła a ekranem umieścimy początkowo przesłonę z otworem prostokątnym, wówczas na ekranie zarejestrujemy jej widmo dyfrakcyjne $U_P(x,y)$. Jeżeli następnie umieścimy nieprzeźroczysty prostokąt, komplementarny z otworem przesłony, wówczas na ekranie będziemy rejestrować inny rozkład przestrzenny światła ugiętego $U_D(x,y)$. Zgodnie z twierdzeniem Babineta w przypadku ekranów/obiektów komplementarnych spełnione będzie równanie:

$$U_P(x,y)+ U_D(x,y)= U_0(x,y)$$

Eksperymentalną weryfikację tego twierdzenia możemy zobaczyć poniżej.

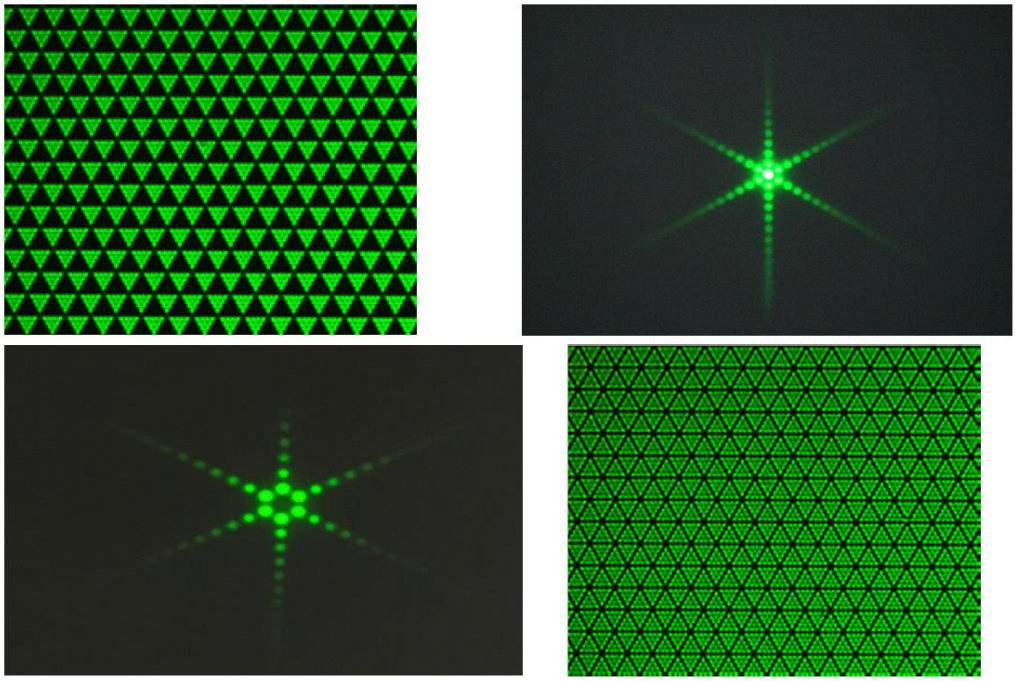


Przykład twierdzenia Babineta: (a) widmo dyfrakcyjne oraz profil natężenia światłą ugiętego na przesłonie prostokątnej o szerokości 0.24mm, (b) widmo dyfrakcyjne oraz profil natężenia światłą ugiętego na nieprzeźroczystym prostokącie o szerokości 0.24mm, (c) suma widm dyfrakcyjnych obiektów dopełniających [2]

Widzimy, iż rozkłady natężenia światła ugiętego dla obiektów komplementarnych dopełniają się, tzn. ich suma jest stała w całym obszarze. Rozkłady te różnią się jedynie w centralnej części widma. Oznacza to, iż jeżeli w centrum widma Fouriera umieścimy nieprzeźroczysty dysk, który odfiltruje centralną część widma dyfrakcyjnego- maksimum dla zerowej częstości

[2] Journal of the Optical Society of America A 26(3):540-7, DOI: 10.1364/JOSAA.26.000540.

przestrzennej, wówczas rejestrowane obrazy obiektów komplementarnych będą identyczne (patrz przykład poniżej).



Eliminacja centralnego maksimum widma Fouriera sprawia, że nie ma żadnych różnic pomiędzy ciemnymi i jasnymi trójkątami w obrazie obiektu testowego. W tym przypadku odfiltrowana została składowa harmoniczna odpowiadająca zerowej częstości przestrzennej, która reprezentuje fale, które przeszły przez obiekt bez zmiany kierunku propagacji, nie uległy dyfrakcji.

2 UKŁAD POMIAROWY

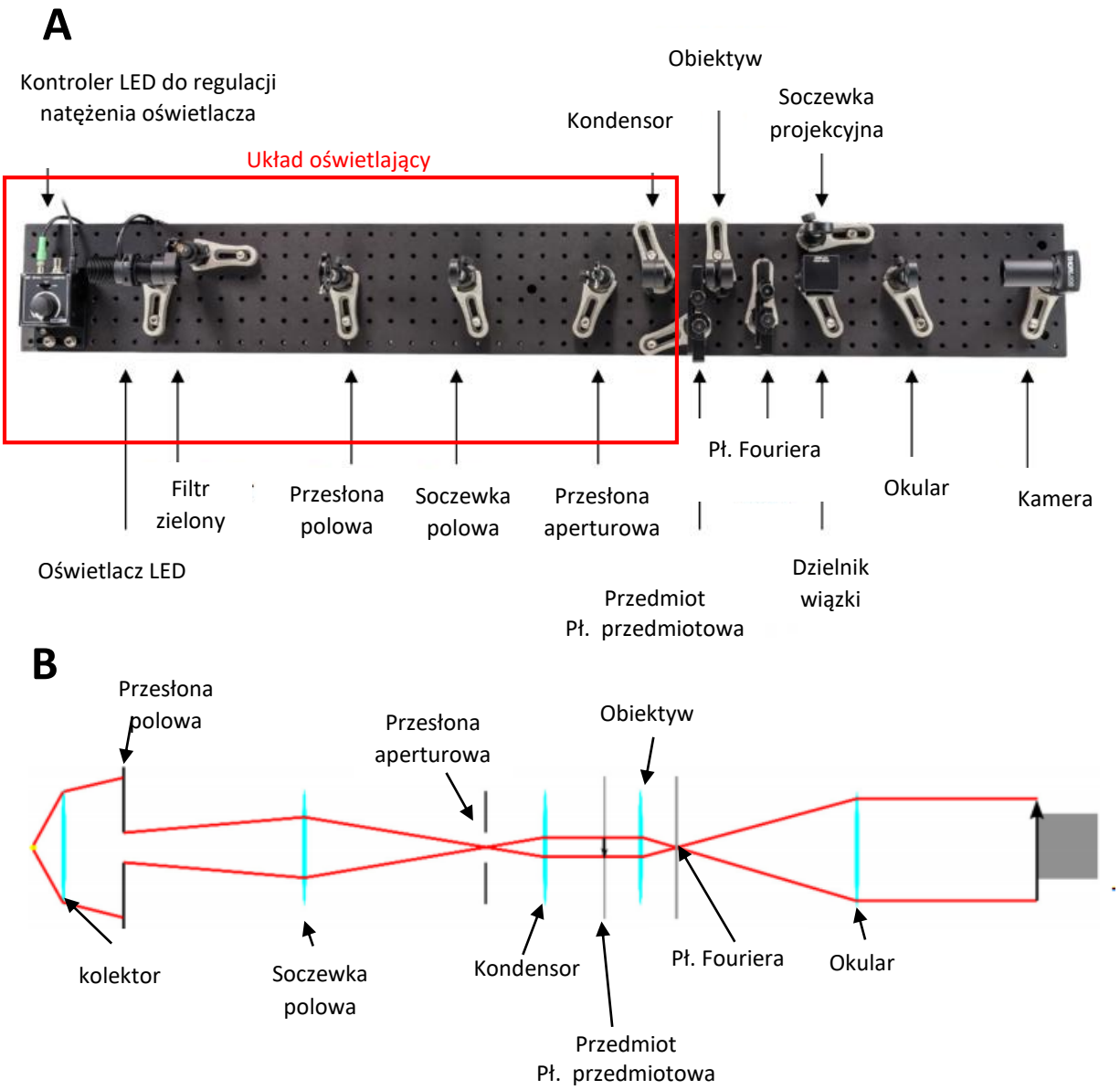
Poniżej opisane zostały zadania konstrukcyjne oraz pomiarowe, które Studenci mają wykonać w trakcie realizowanych zajęć laboratoryjnych.

2.1 Wykorzystywany układ mikroskopii optycznej

Poniżej przedstawiony został układ, z którego Studenci będą korzystać w trakcie zajęć laboratoryjnych, wraz z wykazem wszystkich wykorzystanych w nim elementów. Zestawiony układ mikroskopu jest układem 4F, tzn. odległości pomiędzy płaszczyzną przedmiotową a obiektywem, obiektywem i płaszczyzną Fouriera, płaszczyzną Fouriera i okularem, oraz okularem i płaszczyzną obrazu są równe odległości ogniskowej obiektywu oraz okularu. Takie zestawienie układu optycznego umożliwia dokładną realizację optycznej i odwrotnej transformacji Fouriera.

Układ oświetlający składa się z oświetlacza LED wyposażonego w soczewkę kolimującą, zielonego filtra, przesłon: polowej i aperturowej, soczewki polowej (kolektora) oraz kondensora. Układ ten jest przykładem oświetlacza Kohlera. Służy on oświetleniu przedmiotu, do regulacji pola widzenia oraz natężenia rejestrowanego obrazu.

Wprowadzony do układu dzielnik wiązki oraz dodatkowa soczewka projekcyjna pozwala na bezpośrednią obserwację wizualną powiększonego widma Fouriera na ekranie.



(A) Konfiguracja układu mikroskopowego, (B) Bieg promieni w układzie optycznym.

UWAGA: W trakcie realizacji pomiarów należy zachować ostrożność i nie dotykać, trącać, poszczególnych elementów układu, żeby nie doprowadzić do rozjustowania układu.

Poniżej opisane zostaną najważniejsze elementy układu optycznego wykorzystywanego w trakcie zajęć laboratoryjnych:

- **Soczewka kolektora** (kolektor) umieszczona jest bezpośrednio w oświetlaczu LED w celu zapewnienia jak najlepszej równoległości wiązki generowanej przez diodę LED. Umożliwia to największy wzrost natężenia na najmniejszej możliwej powierzchni.

- **Układ oświetlający** składa się z oświetlacza LED oraz soczewki polowej i kondensora, które umieszczone są w takiej odległości, że ognisko obrazowe soczewki polowej pokrywa się z ogniskiem przedmiotowym kondensora. Oznacza to, iż tworzą one układ teleskopowy Keplera o powiększeniu poprzecznym równym 3. Ponieważ teleskop jest odwrócony, więc w płaszczyźnie przedmiotowej generuje on 3-krotnie pomniejszony obraz źródła światła w płaszczyźnie przedmiotowej. Układ ten jest również wyposażony w przesłonę polową i aperturową, których rola zostanie opisana poniżej.

- **Układ obrazujący** składa się z obiektywu oraz okularu, które odpowiedzialne są za uzyskanie powiększonego, ostrego obrazu przedmiotu w płaszczyźnie matrycy kamery. Płaszczyzna przedmiotowa jest zlokalizowana w płaszczyźnie ogniskowej przedmiotowej obiektywu, zatem płaszczyzna Fouriera oraz widmo Fouriera przedmiotu, będą zlokalizowane w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu. Jeżeli płaszczyzna ogniskowa obrazowa obiektywu pokrywa się z płaszczyzną ogniskową okularu wówczas możliwe jest uzyskanie maksymalnego powiększenia poprzecznego równego 5. Taka konfiguracja określana jest mianem mikroskopu z korekcją nieskończoności. Przedmiot znajduje się w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu, wiec wiązki światła ugiętego na nim po przejściu przez obiektyw są falami płaskimi, więc niezależnie od położenia okularu od obiektywu będzie on w stanie zogniskować je i utworzyć obraz na powierzchni matrycy kamery.

- **Soczewka projekcyjna** służy do projekcji widma Fouriera na ekranie. Zastosowanie dzielnika wiązki pozwala na obserwację obrazu widma utworzonego przez soczewkę projekcyjną prostopadle do kierunku osi optycznej układu mikroskopowego. Płaszczyzna Fouriera pokrywa się z płaszczyzną ogniskową obiektywu, zatem powiększenie obrazu widma Fouriera na ekranie będzie uzależnione od równania soczewkowego spełnionego przez soczewkę projekcyjną i będzie odpowiadało stosunkowi odległości obrazowej i przedmiotowej. Oznacza to, iż jedynie w pewnej odległości ekranu od soczewki projekcyjnej, możliwa będzie obserwacja ostrego obrazu widma Fouriera na ekranie**. W trakcie pomiarów należy eksperymentalnie dobrać odległość ekranu od soczewki projekcyjnej, w której uzyskujemy ostry obraz widma Fouriera na ekranie.**

- **Filtr zielony** zastosowany jest w celu ograniczenia rozmycia maksimów dyfrakcyjnych powstałych w wyniku dyfrakcji światła na niewielkich strukturach. W przypadku światła białego kąty ugięcia dla poszczególnych długości fali będą się różnić, co będzie prowadziło do poszerzenia rozmiarów poprzecznych maksimów w widmie Fouriera. Ograniczenie rozmiarów tych maksimów znacznie ułatwia realizację filtracji przestrzennej w płaszczyźnie Fouriera.

- **Przesłona polowa** jest wykorzystywana do regulacji rozmiarów oświetlonego przez światło obszaru w płaszczyźnie przedmiotowej. Układ teleskopowy Keplera jest tak zlokalizowany, aby w płaszczyźnie przedmiotu powstawał ostry obraz przesłony polowej. Zmieniając średnicę przesłony polowej wpływa na natężenie maksimów w widmie Fouriera.

- **Przesłona aperturowa** służy do regulacji natężenia wiązki świetlnej wychodzącej z kondensora. Zwiększenie jej średnicy prowadzi do zwiększenia natężenia w płaszczyźnie przedmiotowej. Przesłona aperturowa kondensora oraz obudowa obiektywu pełniąca również rolę przesłony aperturowej obiektywu są reprezentowane w płaszczyźnie Fouriera, gdyż ich obrazy ograniczają rozmiary przestrzennego widma Fouriera przedmiotu. Widmo Fouriera składa się zatem z widma Fouriera przedmiotu

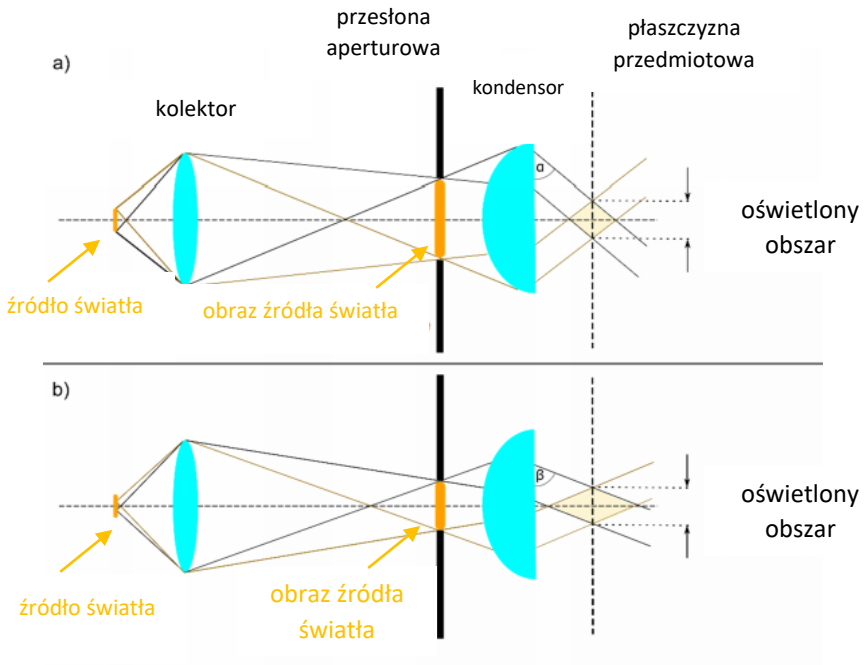
ograniczonego przestrzennie przez obraz wypadkowej przesłony aperturowej. W naszym przypadku promienie aperturowe są w największym stopniu ograniczane przez przesłonę aperturową kondensora, wiec to ona będzie reprezentowana w płaszczyźnie Fouriera. Rozmiar przesłony aperturowej wpływać będzie na rozmiary maksimów widma Fouriera.

2.2 Oświetlacz Köhlera oraz przesłona polowa i aperturowa

Jeśli ktoś chce uzyskać obraz optyczny obiektu za pomocą mikroskopu, na ogół ma problem z tym, iż samo źródło światła ma pewne skończone rozmiary poprzeczne i pewną geometrię przestrzenną (np. żarnik wolframowy, moduł diod LED), co prowadzi do nierównomiernego oświetlenia obiektu w płaszczyźnie przedmiotowej, może to narazić obiekt na lokalne zwiększenie temperatury, co jest szczególnie niekorzystne w przypadku wszelkiego rodzaju próbek biologicznych, oraz wpływa na rozproszenie światła. Taki sposób oświetlenia realizuje oświetlacz krytyczny, w którym obraz źródła światła powstaje w płaszczyźnie przedmiotu. Oświetlacz Köhlera pozwala na eliminację tych niedogodności i jest dziś powszechnie stosowany w mikroskopii optycznej. System oświetlenia składa się zasadniczo z soczewki kolektora dla źródła światła, kondensora i dwóch przesłon: aperturowej i polowej. Oświetlacza Köhlera tworzy obraz źródła oświetlającego w płaszczyźnie przesłony aperturowej (źrenicy wejściowej) układu.

Przesłona aperturowa

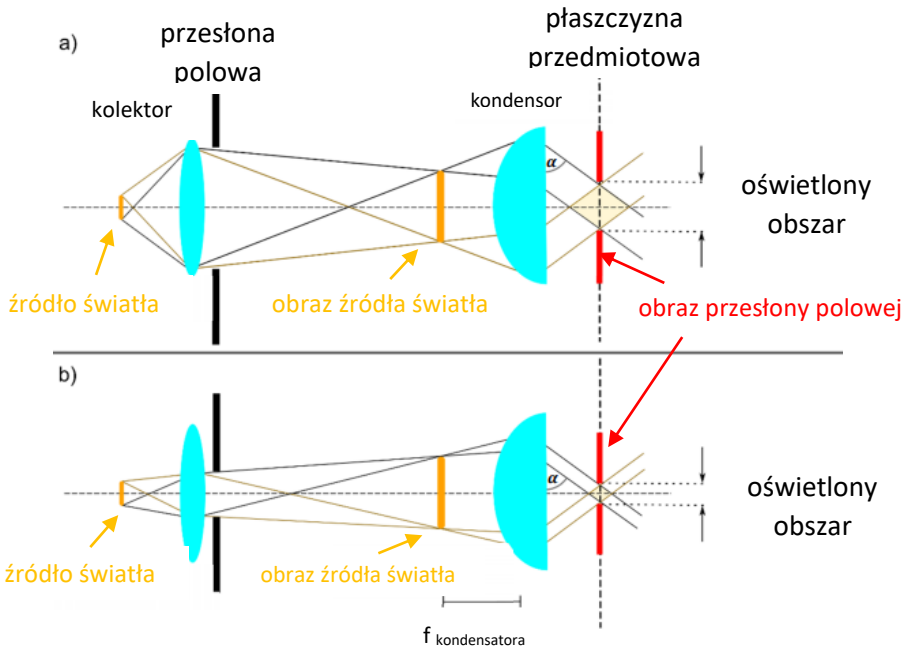
W oświetlaczu Köhlera, zastosowanym w analizowanym układzie, soczewka kolektora (polowa) odwzorowuje źródło światła w płaszczyźnie przysłon aperturowej, czyli w płaszczyźnie ogniskowej przedmiotowej soczewki kondensora (patrz rysunek poniżej). Oznacza to, iż w tym przypadku do oświetlenia przedmiotu wykorzystujemy obraz źródła, a nie samo źródło światła, które musiałoby być wtedy umieszczone w płaszczyźnie ogniskowej kondensora. Nie mamy zatem do czynienia z ryzykiem lokalnego podgrzania przedmiotu. Dzięki zmianie średnicy przesłony aperturowej można regulować kąt pod jakim skrajny promień aperturowy będzie przechodził przez aperturę obiektywu. Należy zwrócić uwagę, że zmiana tego kąta, w żaden sposób nie wpływa na rozmiary oświetlonego obszaru przedmiotu, czyli nie wpływa na pole widzenia układu optycznego.



Zwiększenie lub zmniejszenie średnicy tej przesłony prowadzi do zwiększenia lub zmniejszenia natężenia odwzorowywanych przez układ mikroskopowy wiązek świetlnych, gdyż przesłona ta reguluje rozmiary poprzeczne obrazu źródła światła. Im mniejszy jest obszar obrazu źródła, tym mniejsze jest natężenia światła wpadającego do obiektywu. Ograniczając przestrzennie obraz źródła światła do płaszczyzny przedmiotowej dociera mniejsza ilość światła, co wpływa na natężenie wypadkowego obrazu utworzonego przez układ optyczny.

Przesłona polowa

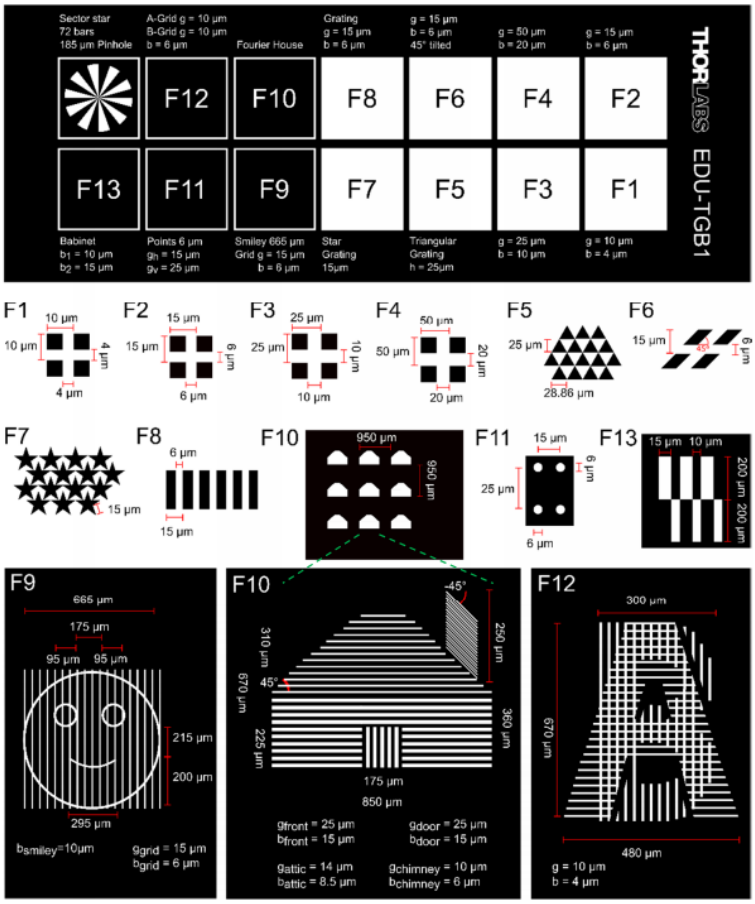
Przesłona polowa jest z umieszczana pomiędzy kolektorem a przesłoną aperturową , tak aby soczewka kondensora odwzorowywała obraz tej przesłony w płaszczyźnie przedmiotowej. Rozmiar oświetlonego obszaru w płaszczyźnie przedmiotowej może być wówczas regulowany poprzez zmianę średnicy przesłony polowej. Jednocześnie nie wpływa ona w żaden sposób na kąt promieni marginalnych, najbardziej skrajnych promieni przechodzących przez kondensor i określających jego aperturę numeryczną. Ten sam efekt możliwy jest do osiągniecia umieszczając przesłonę bezpośrednio w płaszczyźnie przedmiotowej, ale ze względów praktycznych zazwyczaj stosuje się opisaną powyżej technikę projekcji obrazu tej przesłony w płaszczyźnie przedmiotowej.



Oświetlony obszar płaszczyzny przedmiotowej jest proporcjonalny do rozmiarów poprzecznych otworu przesłony polowej, jednak nie wpływa w żaden sposób na aperturę numeryczną kondensora, gdyż odpowiada za to jedynie przesłona aperturowa. Do klasycznego oświetlacza można dodać dodatkową soczewkę, zwaną soczewką polową, jak w układzie stosowanym w pomiarach. Ta dodatkowa soczewka umieszczona między przesłoną polową a przesłoną aperturową pozwala na bardziej efektywne skupienie wiązki świetlnej w oświetlaczu oraz umożliwia zwiększenie wartości natężenia światła na jednostkę powierzchni w płaszczyźnie przedmiotowej.

2.3 Wykorzystywane przedmioty oraz filtry przestrzenne

W trakcie zajęć Studenci jako przedmioty odwzorowywane przez układ optyczny będą wykorzystywać zestaw obiektów EDU-TGB1 firmy Thorlabs (patrz rysunek poniżej) zawierający 14 różnych obiektów (od F1 do F14) uginających światło.



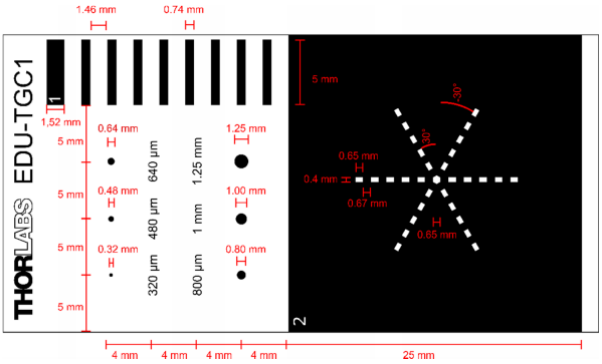
W trakcie zajęć należy umieścić szkiełko z tymi obiektami w statywie przedmiotowym, pod nadzorem Prowadzącego. Należy zwrócić uwagę, którą stroną są umieszczane te obiekty, gdyż tylko w jednej pozycji układ będzie w stanie utworzyć ostry obraz przedmiotu.

Do realizacji filtracji przestrzennej w płaszczyźnie Fouriera należy umieścić:

- przesłonę irysową,

- regulowaną szczelinę z śrubą mikrometryczną w obrotowej oprawie,

- szkiełko EDU- TGC1 z naniesionymi nieprzezroczystymi dyskami w zależności od symetrii widma przedmiotu.



- preparat mikroskopowy z okrzemkami lub inny udostępniony przez Prowadzącego.

- slajdy przedstawiające widma Fouriera do demonstracji odwrotnej transformacji Fouriera.

3. ZADANIA POMIAROWE

3.1 Zbadanie wpływu przesłony polowej i aperturowej

W statywie przedmiotowym należy umieścić test przedmiotowy EDU-TGB1 oraz w polu widzenia umieścić obiekt F9 lub F10. Należy zmieniać rozmiary najpierw przesłony aperturowej, a następnie przesłony polowej. Dla każdego ustawienia średnicy przesłon należy zarejestrować obraz przedmiotu utworzony przez układ optyczny, który będzie demonstrować wpływ każdej z tych przesłon z osobna na obraz optyczny. Należy również zaobserwować wpływ rozmiaru przesłony aperturowej na widmo Fouriera przedmiotu. W sprawozdaniu należy umieścić odpowiednio obrazy zarejestrowane dla różnych średnic przesłon oraz komentarze, czy uzyskane obserwacje potwierdzają się ze spodziewanymi oczekiwaniami.

3.2 Obserwacja widm Fouriera

W statywie przedmiotowym należy umieścić test przedmiotowy EDU-TGB1 i zarejestrować widma Fouriera na ekranie dla wszystkich obiektów znajdujących się na teście. Następnie należy skomentować wszystkie widma tzn. ich rozkład przestrzenny w odniesieniu do struktury przestrzennej wszystkich analizowanych obiektów.

3.3 Ograniczona dyfrakcyjnie zdolność rozdzielcza

W tym zadaniu należy eksperymentalnie zweryfikować fakt, iż układ optyczny jest w stanie utworzyć obraz optyczny przedmiotu, jeżeli będzie odwzorowywał oprócz zerowego rządu ugięcia przynajmniej pierwszy rząd dyfrakcji. Oznacza to, iż dla widm Fouriera znajdujących się w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu muszą być obecne, oprócz maksimum zerowego rzędu ugięcia, odpowiadającemu zerowej częstości przestrzennej, przynajmniej maksima +/- pierwszego rzędu ugięcia. Pomiary należy wykonać na obiektach F8, F9, F10 znajdujących się na teście przedmiotowym EDU-TGB1. W płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu, będącej płaszczyzną Fouriera, należy umieścić przesłonę irysową, tak, żeby na jej powierzchni uzyskać maksima o najmniejszych rozmiarach poprzecznych. Zmniejszając jej średnicę należy odfiltrowywać kolejne maksima dyfrakcyjne i rejestrować obraz widma Fouriera oraz obrazów optycznych tych przedmiotów rejestrowanych przez kamerę.

3.4 Filtracja przestrzenna widm Fouriera i jej wpływ na końcowy obraz optyczny

- Jako obiekt należy wybrać gwiazdę Siemensa (pole F14) i zarejestrować, jego obraz oraz widmo. Następnie należy zmniejszać średnicę przesłony irysowej znajdującej się w płaszczyźnie Fouriera. Należy zarejestrować serię 3 obrazów gwiazdy oraz widm Fouriera oraz wyjaśnić różnice w obrazach optycznych. Następnie wymień przesłonę irysową na obrotową szczelinę z regulowaną szerokością i przeprowadź filtrację maksimów w widmie Fouriera w kierunku poziomym lub pionowym. Należy wyjaśnić, z czego wynikają różnice w uzyskanych obrazach w stosunku z przypadkiem, gdzie filtracja była przeprowadzana przez przesłonę irysową.

- Następnie, jako obiekt należy wybrać kolejno przedmioty z pól F2, F6, F7, F9, F10, F11, F12. Filtracji przestrzennej należy dokonać za pomocą szczeliny z regulowaną szerokością

w oprawie obrotowej. Szczelinę należy ustawić w kierunku pionowym, poziomym oraz skośnym i zarejestrować obrazy utworzone przez układ optyczny oraz widma Fouriera: początkowe oraz odfiltrowane. Należy wyjaśnić jak odfiltrowanie odpowiednich fragmentów widma Fouriera wpływa na obecność w obrazie odpowiednich struktur, cech obiektu testowego.

3.5 Eksperymentalna weryfikacja twierdzenia Babineta

Jako przedmiot należy wykorzystać kolejno obiekt z pola F9 i F13. W płaszczyźnie Fouriera należy umieścić w obecności Prowadzącego szkiełko EDU- TGC1 z naniesionymi nieprzeźroczystymi testami w statywie z regulacją położenia. Dla dwóch analizowanych obiektów należy odfiltrować maksimum zerowego rzędu ugięcia oraz zarejestrować końcowe obrazy optyczne. Należy wyjaśnić różnicę w obrazach utworzonych po odfiltrowaniu oraz w obecności maksimum zerowego rzędu w widmie Fouriera. Czy uzyskane wyniki potwierdzają twierdzenie Babineta?

3.6 Demonstracja techniki mikroskopii ciemnego pola

Jako przedmiot należy wykorzystać preparat mikroskopowy okrzemek. Należy dobrać rozmiary nieprzeźroczystego dysku z szkiełka EDU- TGC1 w celu odfiltrowania maksimum zerowego rzędu ugięcia. Należy zarejestrować końcowe obrazy przed i po filtracji. Studenci powinni wyjaśnić różnice w obrazach, z czego wynikają i jak są one wykorzystywane w tej technice mikroskopowej.

3.7 Demonstracja odwrotnej transformacji Fouriera

W celu demonstracji odwrotnej transformacji Fouriera w płaszczyźnie przedmiotowej należy umieścić slajdy przedstawiające widmo Fouriera nieznany obiektów. W tym przypadku obiektyw zrealizuje odwrotną transformację Fouriera, czy odtworzy w swojej płaszczyźnie ogniskowej obrazowej strukturę przestrzenną nieznanego przedmiotu. Wykorzystanie soczewki projekcyjnej pozwoli na obserwację powiększonego obrazu tego przedmiotu na powierzchni ekranu. Z kolei kamera zarejestruje obraz widma Fouriera, które zostało zlokalizowane w płaszczyźnie przedmiotowej. Obraz zarejestrowane przez kamerę oraz obraz utworzony na ekranie należy umieścić w sprawozdaniu. Dodatkowo, uzyskane wyniki powinny zostać skomentowane przez Studentów.

4 OPRACOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

W ramach opracowania wyników, w sprawozdaniu należy umieścić wszystkie obrazy, przeanalizować i skomentować wszystkie zadania pomiarowe (3.1-3.7) oraz odpowiedzieć na postawione pytania. We wnioskach należy się odnieść do podstaw fizycznych badanego zjawiska, ich przyczyn/efektów oraz techniki obrazowania, jak również wynikających z nich różnic w obserwowanych obrazach.