

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Física

Departament d'Òptica, i Optometria i Ciències de la Visió,
Facultat de Física



HOLOGRAFÍA EN LINEA MEDIANTE MULTIPLEXADO EN LONGITUD DE ONDA. APLICACIÓN A MICROSCOPIA SIN LENTES

por

Martin Sanz Sabater

Programa de
Doctorado en Física

bajo la supervisión de
Vicente Micó Serrano y
Javier García Monreal

Valencia, Diciembre de 2019

Dr. Vicente Micó Serrano, Profesor Contratado Doctor del Departament d' Òptica i Optometria i Ciències de la Visió de la Facultat de Física de la Universitat de València, y Dr. Javier García Monreal, Catedrático del Departament d' Òptica i Optometria i Ciències de la Visió de la Facultat de Física de la Universitat de València,

CERTIFICAN

que la presente memoria, titulada “Holografía en línea mediante multiplexado en longitud de onda. Aplicación a microscopia sin lentes”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por el alumno Martín Sanz Sabater, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Física de la Universitat de València.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Valencia, 20 de Diciembre de 2019

Fdo:

Fdo:

Dr. Vicente Micó Serrano

Dr. Javier García Monreal

*A mi hijo Hugo, a mis padres y hermanos, y a
las personas que me han acompañado durante
tanto tiempo.*

A mis directores que son mucho más que eso.

*A mis amigos de siempre, a los de la
universidad y a los que viven al otro
lado del Mediterráneo.*

*“No se ofusque con este terror tecnológico que ha construido.
La posibilidad de destruir un planeta es algo insignificante
comparado con el poder de la Fuerza.” — Darth Vader*

Esta tesis doctoral está basada en los siguientes trabajos de investigación:

- [1] Martín Sanz, José Ángel Picazo-Bueno, Javier García, and Vicente Micó, "Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm," *Opt. Express* 23(16), 21352 (2015).
- [2] Martín Sanz, José Ángel Picazo-Bueno, Luis Granero, Javier García, and Vicente Micó, "Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy," *Sci. Rep.* 7, 43291 (2017).
- [3] Martín Sanz, José Ángel Picazo-Bueno, Luis Granero, Javier García, and Vicente Micó, "Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy," *Opt. Lasers Eng.* 110, 341–347 (2018).
- [4] Martín Sanz, José Ángel Picazo-Bueno, Javier García, and Vicente Micó, "Dual-mode holographic microscopy imaging platform," *Lab. Chip* 18(7), 1105–1112 (2018).
- [5] Martín Sanz, Maciej Trusiak, Javier García, and Vicente Micó, "Variable zoom digital in-line holographic microscopy," *Opt. Lasers Eng.* 112, (2020).

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Objetivos generales y estructura.....	5
2. Holografía.....	7
2.1. Holografía analógica	7
2.1.1. El holograma de Gabor	12
2.1.2. El holograma de Leith-Upatnieks	14
2.1.3. Propagación del campo electromagnético	18
2.1.4. Aumento geométrico del proceso holográfico	19
2.2. Holografía digital.....	21
2.2.1. Muestreo	22
2.2.2. Métodos numéricos de propagación	25
2.2.3. Algoritmos de recuperación de fase	28
2.2.4. Configuraciones típicas de holografía digital.....	31
2.2.5. Multiplexación en holografía digital	34
3. Resumen de publicaciones.....	39
3.1. Publicación 1: “Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm”.....	39
3.2. Publicación 2: “Compact, cost-effective and field portable microscope prototype based on MISHELF microscopy”	45
3.3. Publicación 3: “Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy”	52
3.4. Publicación 4: “Dual-mode holographic microscopy imaging platform”	59
3.5. Publicación 5: “Variable zoom digital in-line holographic microscopy”	67
4. Conclusiones.....	75
4.1. Perspectivas de futuro.....	78
5. Agradecimientos	81
6. Anexo: Compendio de publicaciones.....	83
6.1. Publicación 1.....	83
6.2. Publicación 2.....	97
6.3. Publicación 3.....	109
6.4. Publicación 4.....	116
6.5. Publicación 5.....	124
7. Bibliografía.....	130

1. Introducción

La holografía es una técnica fotográfica, o de registro de la luz, relativamente novedosa con respecto a otras técnicas de registro de imagen, ya que no fue hasta 1948 cuando Dennis Gabor propone el concepto de la generación de hologramas [1–3]. La holografía implementada por Gabor pretendía mejorar la resolución de las imágenes en microscopía electrónica mediante la eliminación de lentes en el sistema experimental. El microscopio electrónico mejoraba en mucho los mejores microscopios ópticos de la época y estaba cerca de resolver estructuras atómicas. La motivación de Gabor no fue otra que la de perfeccionar dicha técnica mediante la eliminación de la aberración esférica de las lentes magnéticas del microscopio.

Gabor se preguntó: “¿por qué no tomar una mala imagen electrónica, pero que contenga la información ‘total’ de la misma, reconstruirla y corregirla mediante métodos ópticos?”, y así surgió la holografía. Dicha técnica propuesta por Gabor está basada en dos pasos, primero el registro del holograma entre el haz de electrones objeto (onda objeto) y un “fondo coherente” (onda de referencia) con una placa fotosensible, y como segundo paso, la reconstrucción del holograma que genera la imagen de la escena grabada cuando se ilumina con luz visible y que podría ser corregido por métodos ópticos convencionales. Por tanto, son las interferencias en la etapa de registro y la difracción en la etapa de reconstrucción los principios existentes detrás de la holografía de Gabor.

Sin embargo, para poder conseguir interferencias con buen contraste, es necesario una fuente de iluminación de elevada coherencia como lo es la radiación láser no existente en los tiempos en los que Gabor ideó su experimento. Por tanto, el primer holograma fue concebido en el año 1948 utilizando una lámpara de mercurio con un filtro espacial (pinhole de 3 micras de diámetro) con el fin de aumentar la coherencia de la iluminación. Este es el caso del conocido holograma con los nombres de Huygens, Young y Fresnel que se incluye en la Figura 1.

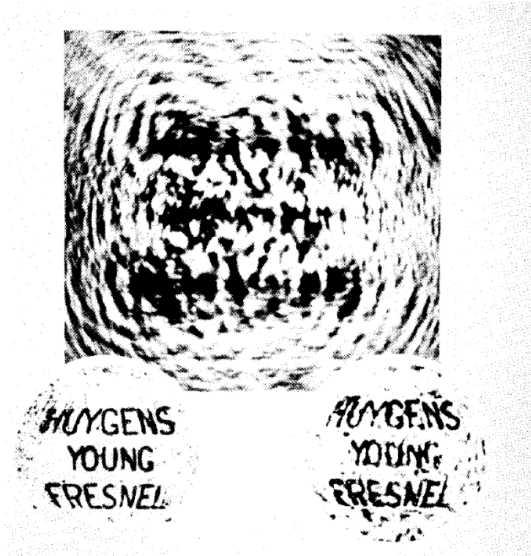


Figura 1. Una de las primeras reconstrucciones holográficas por Gabor en 1948 [1].

En años posteriores, el interés en la holografía aumenta, y las mejoras en las técnicas holográficas se suceden debido a la investigación creciente en este campo [4–9]. Además, la invención del láser en 1960, proporciona una fuente de luz coherente que mejora notablemente el contraste de los hologramas generados, ayudando a nuevas investigaciones en la holografía. Emmett Leith y Juris Upatnieks [10–12], en 1962, mejoran la configuración propuesta por Gabor, dando lugar a la holografía fuera de eje (off-axis), en la cual, el haz de referencia viene con cierto ángulo con respecto a la propagación de la difracción del objeto. La holografía fuera de eje, mejora con respecto a la holografía en eje, principalmente en dos aspectos que eliminan el ruido sobre la imagen reconstruida, el primero es la separación del orden cero en el holograma [13–15], y la segunda, es la separación de la imagen virtual [9].

La holografía analógica avanzaba también en los materiales utilizados para el registro de los hologramas, como películas fotográficas de alta resolución y fotopolímeros [16], por ejemplo. Y también, cristales fotorrefractivos [17,18] como el LiNbO_3 , que cambian localmente su índice de refracción, de acuerdo con la intensidad luminosa que reciben. Dichos cambios de índice son reversibles, permitiendo utilizarse para fines tales como almacenamiento de información óptica, procesado o dispositivos de visualización.

Las aplicaciones de la holografía se extienden a la ingeniería e industria, mezclándose con la interferometría dando lugar a la interferometría holográfica [19–21], donde se pueden comparar las interferencias entre frentes de onda separados en tiempo, en espacio o en longitud de onda. Así, se pueden analizar de forma no destructiva y

fructífera, cambios en la forma de objetos sometidos a vibraciones [22–24], cambios de temperatura [25–27], o cambios de presión [28–30], con la precisión que permite la interferometría [31–33], pero con mayor facilidad de la que permite la interferometría clásica.

La microscopía holográfica supone un nuevo campo de fructífera aplicación de la holografía [34]. Cuando se utilizan lentes en la microscopía convencional, la profundidad de foco es muy pequeña, con lo que podemos observar básicamente una sección plana de la muestra, teniendo en la imagen objetos enfocados, y también, objetos desenfocados que están en diferentes planos al de observación. Una gran ventaja que aporta la holografía es la capacidad de grabar un volumen en un solo holograma [35], permitiendo después seleccionar el plano de enfoque, evitando la pérdida de información que sucede en la microscopía convencional.

Otro gran avance de la holografía sucede cuando los ordenadores empiezan a formar parte habitual de los laboratorios de investigación, y se dan los primeros pasos para entrar en la era digital. Cuando se emplea el término *digital* en la holografía, normalmente se refiere a que la captura del holograma se hace mediante un sensor cuyo resultado acaba siendo una secuencia de bits, por ello, la generación de hologramas mediante cálculos realizados por un ordenador (CGH, del inglés, Computer-Generated Holograms) [36–38] no se considera holografía digital, si bien existe relación entre ambas ramas. Así pues, a partir de 1965, se empiezan a sugerir algoritmos y técnicas para generar hologramas calculados digitalmente [39–43], donde posteriormente se transfieren a una transparencia mediante algún tipo de impresión. Conocida la teoría de la difracción, se modelaba matemáticamente el objeto a representar, y se le aplicaban los métodos matemáticos de propagación para obtener el holograma. A partir de aquí, el primer problema con el que se encuentra la generación de hologramas por ordenador es la parte de computación, pues precisa discretizar el holograma, y por tanto, elegir el número de puntos de cálculo que tendrá dicho holograma [44], pues cuanto mayor sea, mejor calidad tendrá la reconstrucción de la imagen, pero por contrapartida, mayor será el tiempo de cálculo. El segundo problema es la impresión del holograma en la transparencia, pues de forma habitual, no es posible imprimir sobre el material cualquier valor de amplitud y fase [45]. Esto afecta al primer problema, o bien, modificando el algoritmo para que su resultado no pueda tener valores no imprimibles, o bien, realizando alguna codificación *a posteriori* de los valores, cambiándolos a aquellos que sí puedan realizarse en la transparencia. La codificación más sencilla y que permiten gran cantidad de tipos de dispositivos de impresión es la codificación binaria [46–48], con transparencia 100% u opacidad completa, es decir, se parte de un soporte transparente, sobre el cual se imprimen rectángulos opacos. El tamaño mínimo del rectángulo impreso capaz de crear el dispositivo de impresión era relativamente

grande, de forma que el holograma impreso era de un gran tamaño, y posteriormente era reducido por técnicas fotográficas, para ser manejable.

La propagación de la radiación electromagnética visible está perfectamente descrita en la teoría de la difracción y, por tanto, puede ser calculada mediante métodos numéricos empleando un ordenador. Joseph Goodman demuestra por primera vez en 1967 que puede reconstruirse numéricamente un holograma [49], para ello, utiliza una superficie fotosensible donde se produce un holograma óptico y fue muestreado en una matriz de 256x256 píxeles, con ocho niveles de gris para cada valor de píxel. La configuración utilizada fue la holografía de Fourier, de forma que, para obtener la reconstrucción de la imagen debía realizarse la transformada de Fourier 2D y obtener el módulo del resultado. Dicho cálculo empleó unos cinco minutos de tiempo aproximadamente. Así se convirtió el segundo paso de la holografía, la reconstrucción, a forma digital.

Pero sin duda alguna, el gran salto a la holografía digital, viene dado por la aparición de sensores de estado sólido, dando la posibilidad de realizar el proceso de captura completamente en información digital [50–52], eliminando los costosos procesos físicos y químicos en la captura analógica, y también en los procesos de captura optoelectrónicos. Hasta este momento, las capturas mediante los procesos físicos y químicos iban evolucionando hacia su digitalización, donde se podía sustituir las placas de registro por otros elementos, como, por ejemplo, los tubos de las cámaras de video.

Pero no solamente mejora la facilidad en la captura, sino que, además, se puede visualizar el holograma capturado casi instantáneamente mediante una pantalla, dando paso a aplicaciones de tiempo real, capturas secuenciales de forma muy sencilla y otras ventajas. También surgen cuestiones nuevas a resolver, como, por ejemplo, el tamaño de píxel del sensor, la distancia de separación entre píxeles y número total de píxeles del sensor, temas que se investigan y para los que se sugieren distintas configuraciones de captura según las aplicaciones.

Las novedades digitales en la holografía se reflejaron en la microscopía holográfica digital sin lentes (LHM, del inglés, Lensless Holographic Microscopy), que se ha convertido en una herramienta muy útil en su aplicación a distintos campos como, por ejemplo, pueden ser la biología [53], realización de tests en el punto de atención al paciente [54], telemedicina [55] y opto-fluídica [56–58]. Esta versión de la holografía clásica de Gabor [1], llamada comúnmente microscopía holográfica digital en línea [59–61] (DIHM, del inglés, Digital In-line Holographic Microscopy) se realiza digitalmente en lo que respecta al segundo paso, la reconstrucción, y a diferencia de sus inicios, en los que se usaba una fuente convencional de luz puntual (típicamente usando un *pinhole*) para realizar el registro del holograma, se han demostrado buenos

resultados con distintas fuentes de luz como láseres de Helio-Neon [62], LEDs [63,64], diodos superluminiscentes [65,66] o diodos láser creando fuentes puntuales utilizando lentes GRIN [67–69] o fibras ópticas [70–72].

La holografía de configuración en-línea presenta la imagen gemela como principal problema [73], que aparece como una imagen desenfocada sobre el resultado de la propagación al plano del objeto. En esta disposición típica de la holografía se puede eliminar el efecto de la imagen gemela mediante dos estrategias diferentes: *phase-shift* [74–76] basado en el registro de la variación de fase entre la difracción del objeto y el haz de referencia, y *phase-retrieval* [77–86] que requiere el registro de distintos hologramas, siendo estos cambios producidos por diversos medios, tales como el desplazamiento de la cámara, el cambio de la longitud de onda de la fuente o desenfoques producidos por un SLM.

En cualquiera de los dos casos (*phase-shift* y *phase-retrieval*), para obtener la información de fase del objeto, se precisa de una cantidad mínima de dos o tres hologramas capturados en distintos instantes de tiempo, suponiendo esto una limitación en la captura de procesos biológicos dinámicos. Cabe destacar las propuestas de Waller et al. [86], basada en la Ecuación de Transporte de Intensidad (TIE, del inglés, Transport-of-Intensity Equation), y la de Noom et al. [87], basada en la diferencia de la difracción dependiendo de la longitud de onda, obtienen toda la información necesaria en una sola captura de una cámara a color, y en los algoritmos iterativos tales como el creado por Gerchberg y Saxton [88].

1.1. Objetivos generales y estructura

Esta tesis, que pertenece a la categoría de “Tesis por compendio de publicaciones”, se enmarca de lleno en la holografía digital, tanto en captura como en la reconstrucción de los hologramas, para realizar unos desarrollos novedosos tanto a nivel de hardware como de procesamiento de los hologramas capturados con idea de mejorar, o aportar, un pequeño paso más a la mejora de las técnicas de captura y procesamiento de la holografía digital. Además, aplicamos a la microscopía los conceptos teóricos tratados, y lo haremos sin el uso de lentes en el proceso de reconstrucción. Para ello, presentaremos un algoritmo de procesamiento iterativo de rápida convergencia dando como resultado imágenes de fase, sin pérdida de resolución, mejora del ruido coherente por promedio de distintos hologramas, y minimización de la imagen virtual. Como entrada a dicho algoritmo se usa principalmente del multiplexado en longitud de onda con el fin de obtener en un único holograma toda la información necesaria (o redundante) con la que aplicar las técnicas propuestas.

Por tanto, la presente memoria se ha estructurado del siguiente modo. Comenzaremos con una introducción básica a la holografía (Sección 2), desde sus inicios clásicos hasta su vertiente digital. Dicha introducción finaliza con un apartado de multiplexado en holografía, aspecto éste considerado básico dentro de la presente tesis. Una vez presentado el marco teórico relacionado con el presente trabajo, abordaremos (Sección 3) la presentación resumida de los artículos incluidos en la presente tesis analizando las principales características de las técnicas propuestas y que desembocan en las conclusiones y perspectivas de futuro (Sección 4). La Sección 6 incluye los artículos incluidos en la presente memoria y finalmente (Sección 7) se ha incluido la bibliografía más importante relacionada con el presente trabajo.

Cabe mencionar que el orden de la presentación de los artículos en esta tesis no corresponde al orden temporal de las fechas de publicación de los mismos, pues el artículo 4 ("Dual-mode holographic microscopy imaging platform") fue publicado antes que el artículo 3 ("Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy"), pero esta alteración da un mejor entendimiento a la evolución del algoritmo presentado y a sus cambios necesarios en los elementos ópticos utilizados en su aplicación.

Todos los artículos presentados constan de una parte de investigación teórica, que da como resultado unas técnicas aplicables, y finalmente, una validación experimental para corroborar las expectativas formuladas al inicio de cada artículo.

2. Holografía

2.1. Holografía analógica

En 1948, Dennis Gabor presenta la técnica que hoy se conoce como holografía [1]. En este trabajo, y en los inmediatamente posteriores [2–4], muestra una novedosa técnica con la idea de mejorar los microscopios electrónicos, y que consistía en capturar la información completa de la luz (amplitud y fase). Para poder recoger la información de fase de la luz, utiliza una referencia con la cual se generan interferencias y así poder registrar la fase a través de la modulación de la intensidad.

Partiendo de una fuente de luz coherente, necesaria para poder detectar amplitud y fase de las ondas en el medio de registro, tenemos en cuenta dos frentes de onda mutuamente coherentes para que se generen interferencias entre ellos (Figura 2).

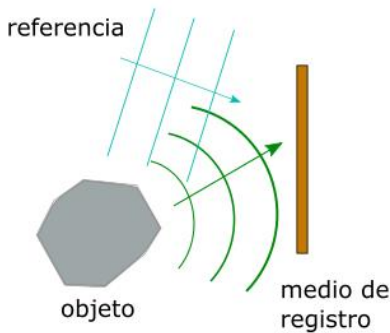


Figura 2. Registro de interferencias

Usaremos la notación siguiente para el frente de onda que proviene del objeto en el plano del medio de registro:

$$a(x, y) = |a(x, y)| e^{-j\phi(x, y)} \quad (1)$$

siendo éste el de interés para detectar y reconstruir posteriormente, y la representación del frente de onda de referencia es:

$$A(x, y) = |A(x, y)| e^{-j\psi(x, y)} \quad (2)$$

por tanto, la intensidad de la suma de ambas resulta ser

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |A(x, y) + a(x, y)|^2 = \\ &= |A(x, y)|^2 + |a(x, y)|^2 + A^*(x, y)a(x, y) + A(x, y)a^*(x, y) \end{aligned} \quad (3)$$

O escrito de otro modo:

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |A(x, y)|^2 + |a(x, y)|^2 + \\ &+ 2|A(x, y)| |a(x, y)| \cos(\psi(x, y) - \phi(x, y)) \end{aligned} \quad (4)$$

Viendo la ecuación (4), podemos ver que tiene tres términos, aunque nos interesa especialmente sólo uno de ellos, el último, que depende del módulo de la amplitud del objeto que queremos reconstruir y que contiene la fase del objeto. Dado que la referencia también está presente en la ecuación, ésta deberá cumplir unas determinadas características para permitir la reconstrucción del objeto a partir del holograma.

Para la grabación del holograma, se requiere un material que tenga una respuesta lineal a la intensidad recibida, y aunque para la realización de esta tesis siempre se han utilizado sensores electrónicos (cuya respuesta, dentro de un rango de intensidad, también es lineal), durante el capítulo de introducción hablaremos de placas fotográficas como los medios de registro y la formulación mostrada se referirá a ellas, pues la holografía se desarrolló con estos medios y es conveniente para la explicación.

Asumiendo que el haz de referencia de la ecuación (2), tiene una intensidad $|A(x, y)|^2$ constante en todo el plano XY, podemos escribir la transmitancia de la amplitud en la placa como:

$$t_A(x, y) = t_b + \beta'(|a|^2 + A^*a + Aa^*) \quad (5)$$

siendo t_b un fondo constante dado por la onda de referencia y β' la pendiente dada por las características del medio de registro. En la ecuación (5), se ha omitido por simplicidad la dependencia con respecto x e y , aunque tanto a como A dependen de ellos.

Con la ecuación (5) finaliza el primer paso propuesto por Denis Gabor [1], en el que se realiza el registro del holograma, con el cual tenemos incluida toda la información del objeto $a(x, y)$, tanto de fase, como de amplitud.

Como segundo paso, tenemos la reconstrucción de esta información. Para ello iluminamos la transparencia con un haz coherente $B(x, y)$. Así pues, la luz transmitida a través de la transparencia queda:

$$B(x, y) t_A(x, y) = t_b B + \beta' a a^* B + \beta' A^* B a + \beta' A B a^* \quad (6)$$

Para el análisis posterior de cada uno de los términos los nombraremos de la siguiente forma:

$$U_1(x, y) = t_b B \quad (7)$$

$$U_2(x, y) = \beta' a a^* B \quad (8)$$

$$U_3(x, y) = \beta' A^* B a \quad (9)$$

$$U_4(x, y) = \beta' A B a^* \quad (10)$$

Observando el tercer término correspondiente a la ecuación (9), queda simplificado si como haz de reconstrucción $B(x, y)$ usamos exactamente una réplica de la referencia original $A(x, y)$ siendo

$$U_3(x, y) = \beta' A^* B a = \beta' |A|^2 a(x, y) \quad (11)$$

y, puesto que, la intensidad del haz de referencia es uniforme, de la ecuación (11), obtenemos un duplicado exacto del frente de ondas original $a(x, y)$ multiplicado por una constante.

De la misma forma, si ahora observamos el cuarto término, definido en la ecuación (10), podemos realizar algo similar a la ecuación (11), pero para ello, usaremos un haz de reconstrucción $B(x, y)$ que será el conjugado del haz de referencia, simplificándose de la siguiente forma:

$$U_4(x, y) = \beta' A B a^* = \beta' |A|^2 a^*(x, y) \quad (12)$$

Como se ha visto, en este caso, en la reconstrucción, el cuarto término será proporcional al conjugado del haz proveniente del objeto.

Hay que señalar, que en cualquiera de los dos casos vistos en las ecuaciones (11) y (12), la reconstrucción tiene tres términos más que pueden ser considerados como ruido en la reconstrucción.

Si tomamos una fuente coherente como referencia de la iluminación, y asumimos como objeto el más simple posible, un punto, el frente de onda incidente en la placa de registro sería una onda esférica:

$$a(x, y) = a_0 e^{jk\sqrt{z_0^2+(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}} \quad (13)$$

Mostrado también en la Figura 3, donde vemos el objeto puntual situado sobre el plano XY, con $z=0$, y el medio de registro separado una distancia z_0 con respecto al objeto. a_0 será en general complejo, para tener en cuenta fases iniciales, independientes de la fase esférica.

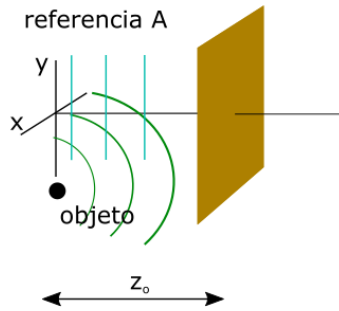


Figura 3. Registro del objeto puntual

Si sustituimos la ecuación (13) en la ecuación (11), donde el haz de reconstrucción es exactamente igual que el haz de grabación obtendremos para el tercer término:

$$U_3(x, y) = \beta' |A|^2 a(x, y) = \beta' |A|^2 a_0 e^{jk\sqrt{z_0^2+(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}} \quad (14)$$

también queda representado en la Figura 4, siendo este el caso en el que reconstruimos la denominada imagen virtual

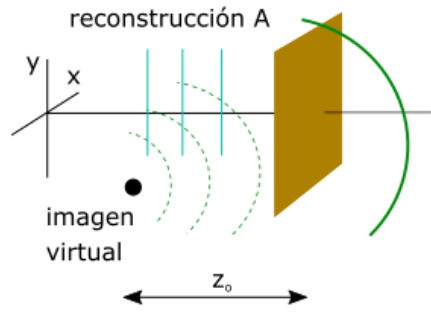


Figura 4. Generación de la imagen virtual

Por otra parte, cuando el haz de reconstrucción es el conjugado del haz usado para su registro, nos encontramos que la onda esférica, transmitida a través de la placa con el holograma, converge hacia un punto situado a la parte derecha del holograma como se muestra en la Figura 5, formando la denominada imagen real.

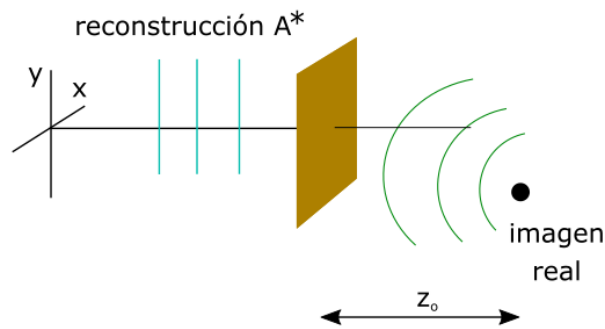


Figura 5. Generación de la imagen real

Su formulación matemática la podemos ver usando la combinación de la ecuación (12) y la ecuación (13) dando como resultado para el cuarto término:

$$U_4(x, y) = \beta' |A|^2 = \beta' |A|^2 a_0^* e^{-jk \sqrt{z_0^2 + (x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}} \quad (15)$$

vemos que la onda reconstruida es la conjugada del haz objeto, incluyendo la constante a_0 y la onda esférica. En un ejemplo tan simple como el mostrado en la Figura 3 no es relevante, pero en el caso de que el objeto tenga una amplitud compleja podría ser importante, y señalamos que, en el campo de la microscopía, las muestras vivas, suelen ser objetos que modifican la amplitud y la fase del haz que las atraviesa.

2.1.1. El holograma de Gabor

Según el trabajo inicial de Dennis Gabor [1] y los trabajos inmediatamente posteriores [2,4], para poder registrar un holograma, el objeto debe cumplir unos requisitos, en particular, que la transmitancia del objeto consista en pequeñas variaciones con respecto a un valor medio.

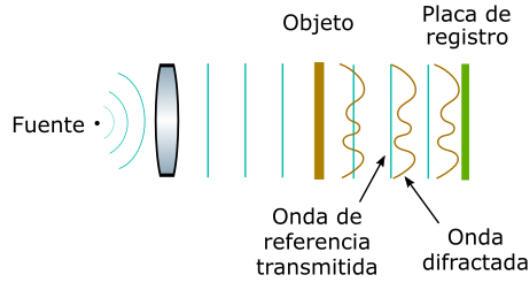


Figura 6. Registro del holograma de Gabor

Como primer paso, se registra el holograma en la placa como se ve en la Figura 6, iluminando el objeto con una fuente de luz coherente y un haz colimado que incide perpendicularmente al plano del objeto, donde la luz transmitida consiste principalmente en una onda plana uniforme debida a la transmitancia media y una onda débil difractada en el objeto debido a las variaciones en la transmitancia. La ecuación de la intensidad resultante es muy similar a la ecuación (3) con la salvedad de que ahora el haz de referencia es plano y constante y no tiene dependencia con las variables x e y .

El segundo paso, la reconstrucción, va a tener como inicio la ecuación (5), a partir de la cual, añadimos el nuevo haz de reconstrucción que es igual que el usado para el registro del holograma, es decir, un haz coherente plano y constante en el plano XY. Detallando la ecuación (5) en cada uno de sus términos con los nuevos parámetros comentados nos quedamos con

$$U_1(x, y) = t_b A \quad (16)$$

$$U_2(x, y) = \beta' A |a(x, y)|^2 \quad (17)$$

$$U_3(x, y) = \beta' |A|^2 a(x, y) \quad (18)$$

$$U_4(x, y) = \beta' |A|^2 a^*(x, y) \quad (19)$$

El primer término, U_1 de la ecuación (16), es luz transmitida que pasa directamente a través del holograma, que se atenúa, pero no se difracta.

El segundo término, U_2 de la ecuación (17), puede ser descartado siempre y cuando se cumpla que el objeto tiene una alta transmitancia y sus variaciones son mucho menores que la transmitancia media del objeto. Corresponde con la difracción de un patrón de intensidad (sin fase), por lo que se difracta débilmente. Ésta es la mayor limitación del holograma de Gabor, pues si el término U_2 no es despreciable, incluso llegar a ser el término con mayor contribución, y anular los otros términos. Y como ejemplo, podremos realizar un holograma de Gabor de unas letras con un fondo transparente, pero no de unas letras transparentes sobre un fondo opaco.

El tercer término, U_3 de la ecuación (18), es proporcional a la onda proveniente del objeto, con lo cual, corresponde al objeto original en su plano original, previo al holograma, dando lugar a la imagen virtual, como se muestra también en la Figura 7.

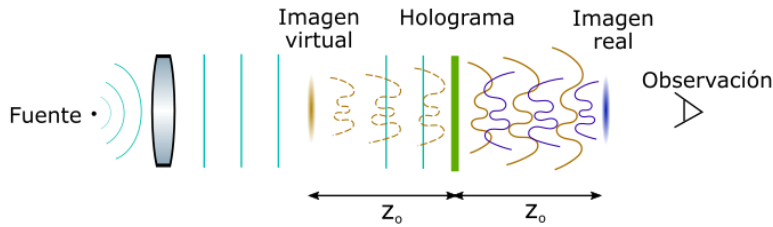


Figura 7. Formación de las imágenes gemelas con un holograma de Gabor.

De forma muy similar, el término U_4 de la ecuación (19), genera la imagen real a una distancia z_0 situado a la derecha del holograma. Así que, en cualquier holograma de Gabor existen dos imágenes gemelas separadas entre sí una distancia $2z_0$, que hará de ello otra limitación de este tipo de hologramas.

Dado que el holograma de Gabor se registra en línea, tanto el haz de referencia como el haz difractado del objeto comparten el mismo eje, cuando la imagen real se enfoca, se puede observar una imagen desenfocada sobre ella que corresponde a la imagen virtual. Del mismo modo, cuando se observa la imagen virtual del holograma, simultáneamente se ve una imagen desenfocada que corresponde, en este caso, a la imagen real. Esta limitación no es tanto por la existencia de ambas imágenes, sino por la imposibilidad de separarlas.

2.1.2. El holograma de Leith-Upatnieks

La aparición de la holografía atrajo a multitud de investigadores. Esta nueva técnica ofrecía muchas posibilidades, aunque también mostraba algunas limitaciones. Parte de las nuevas investigaciones se centraron en mejorar los problemas que presentaba el holograma de Gabor. Hay que recordar que, en aquel momento, todavía no existía el láser, pero ello no frenó el interés en la holografía.

Ya en 1962, con la reciente invención de los láseres, fueron Emmett Leith y Juris Upatnieks los que crearon una nueva forma de registrar el holograma [10], llamado holograma de Leith-Upatnieks, o también holograma fuera de eje (*off-axis hologram*), cuya novedad, frente al holograma de Gabor, consiste en modificar la forma de registrarlo. En este caso, la referencia no es parte de la luz que atraviesa el objeto, sino que se introduce la referencia con una ligera inclinación junto con la luz difractada del objeto como se aprecia en la Figura 8.

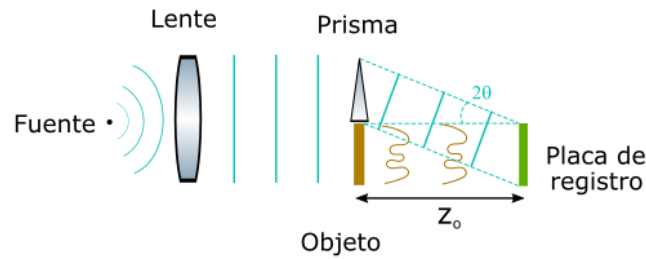


Figura 8. Registro de un holograma de Leith-Upatnieks empleando ya un láser

Ahora, en el medio de registro del holograma, tenemos la superposición de dos ondas, la primera que proviene del objeto y la segunda que, sin atravesar el objeto, viene fuera de eje con una cierta inclinación. Por tanto, la amplitud en el medio de registro será

$$U(x, y) = A e^{-j2\pi\alpha y} + |a(x, y)| e^{-j\phi(x, y)} \quad (20)$$

donde la frecuencia espacial α de la onda plana de viene dada por:

$$\alpha = \frac{\sin 2\theta}{\lambda} \quad (21)$$

Y si calculamos la intensidad de la ecuación (20) tendremos como resultado una expresión en la que vemos dependencia de la amplitud y de la fase del objeto, modulando la amplitud y la fase de la portadora α

$$I(x, y) = |A|^2 + |a(x, y)|^2 + 2|A| |a(x, y)| \cos(2\pi\alpha y - \phi(x, y)) \quad (22)$$

Posteriormente volveremos sobre la portadora α , para ver el ángulo mínimo del haz de referencia con el que podremos reconstruir el objeto sin ambigüedades.

Si para la reconstrucción aplicamos una onda plana uniforme de amplitud B que incide en dirección normal al holograma, podemos calcularla y mostrar cada uno de sus términos separadamente para analizarlos detenidamente:

$$U_1(x, y) = B t_b \quad (23)$$

$$U_2(x, y) = \beta' B |a(x, y)|^2 \quad (24)$$

$$U_3(x, y) = \beta' B A^* a(x, y) e^{j2\pi\alpha y} \quad (25)$$

$$U_4(x, y) = \beta' B A a^*(x, y) e^{-j2\pi\alpha y} \quad (26)$$

El primer término, U_1 , es constante, simplemente proporcional a la luz incidente, un haz que atraviesa el holograma y se propaga a lo largo del mismo eje.

El segundo término, U_2 , presenta una variación espacial en el plano XY, pero al ser una distribución de amplitud sin variaciones de fase se propaga próximo al eje de incidencia del haz de reconstrucción. El ancho de banda de este término suele ser relativamente pequeño en comparación a la frecuencia de la portadora α , y eso provoca que puedan separarse fácilmente las imágenes.

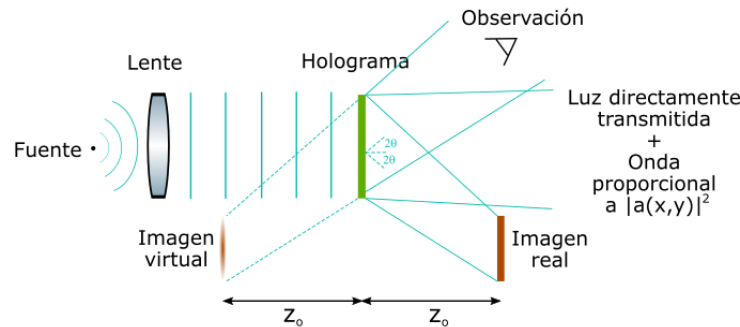


Figura 9. Reconstrucción de las imágenes de un holograma de Leith-Upatnieks

El término U_3 , muestra una onda que es proporcional a aquella que provenía del objeto en el momento de ser registrada, lo cual significa que este término genera una imagen virtual a una distancia z_0 a la izquierda del holograma, tal y como aparece en la Figura 9. Pero además, en la ecuación (25), también observamos la componente $e^{j2\pi\alpha y}$ que indica que la imagen es desviada un ángulo 2θ con respecto al eje óptico.

De forma similar, el término U_4 de la ecuación (26), es proporcional a la onda $a^*(x, y)$, con lo que generará la imagen real a una distancia z_0 a la derecha del holograma. También, igual que el término U_3 , existe la componente de fase lineal $e^{-j2\pi\alpha y}$ que indica que la imagen será desplazada del eje óptico con un ángulo de -2θ .

Para el caso de la reconstrucción se ha usado un haz constante plano con incidencia normal al holograma. Este haz de reconstrucción, si lo comparamos con el haz de referencia usado de la Figura 8, vemos que son distintos, y que tampoco es igual al conjugado del haz de referencia.

Finalmente, con el holograma de Leith-Upatnieks vemos que siguen formándose las imágenes gemelas (real y virtual), que en determinados casos no es deseable, pero la diferencia con respecto al holograma de Gabor reside en que, bajo determinadas condiciones, la imagen virtual, la imagen real y el resto de ondas pueden estar separadas y pueden recuperarse sin solapamiento. Para evitar el solapamiento, necesitamos que la portadora incidente con un ángulo de 2θ sea mayor que un determinado $2\theta_{min}$. Para encontrar este mínimo, es suficiente determinar la frecuencia de la portadora α para la cual los espectros de frecuencia espacial de los términos U_3 y U_4 , de las ecuaciones (25) y (26) respectivamente, no se solapen con los espectros de los términos U_1 y U_2 de las ecuaciones (23) y (24). Esto permitiría realizar un filtrado espacial en el dominio de Fourier para recuperar un único término. Así que definimos la transformada de Fourier de la onda que proviene del objeto como:

$$G_a(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{a(x, y)\} \quad (27)$$

para usarla al realizar la transformada de Fourier de la ecuación ecuaciones (23), (24), (25) y (26) quedando:

$$G_1(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U_1(x, y)\} = Bt_b\delta(f_x, f_y) \quad (28)$$

$$G_2(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U_2(x, y)\} = \beta'BG_a(f_x, f_y) \odot G_a(f_x, f_y) \quad (29)$$

$$G_3(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U_3(x, y)\} = \beta'BA^*G_a(f_x, f_y - \alpha) \quad (30)$$

$$G_4(f_x, f_y) = \mathcal{F}\{U_4(x, y)\} = \beta'BAG_a^*(-f_x, -f_y - \alpha) \quad (31)$$

De la ecuación (29), aclaramos que el símbolo \otimes significa la operación correlación.

Teniendo en cuenta que G_a de la ecuación (27), tiene el mismo ancho de banda que el objeto, ya que solamente se diferencian en la distancia propagada que es una función puramente de fase, suponemos que G_a (y por tanto el objeto) no tiene frecuencias mayores que B ciclos/mm.

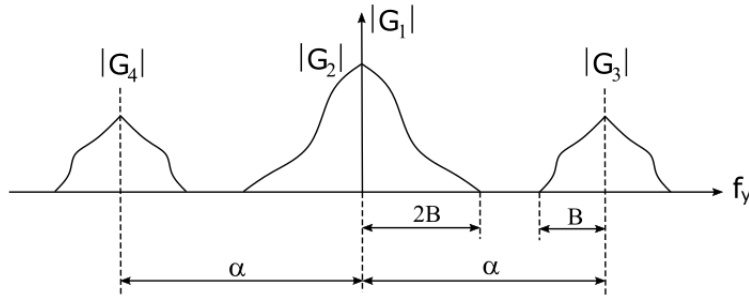


Figura 10. Espectro de un holograma de Leith-Upatnieks

Por simplicidad y mayor facilidad de representación, en la Figura 10 se muestra solo un eje de frecuencias espaciales.

De los términos calculados anteriormente, vemos que el primer término G_1 , corresponde a una delta ubicada en el origen dado que es solo un fondo de luz transmitida. El término G_2 , es proporcional a la autocorrelación de $|G_a|$, por tanto, su frecuencia máxima alcanza a ser $2B$.

Por último, el término $|G_3|$, que es proporcional a $|G_a|$, tiene una frecuencia máxima de B , aunque está desplazado, centrado en la frecuencia $(0, \alpha)$. El término $|G_4|$, de forma similar al G_3 , es proporcional a la versión reflejada de $|G_a|$, centrado en la frecuencia $(0, -\alpha)$.

Observando la Figura 10 se puede comprobar gráficamente que los términos $|G_3|$ y $|G_4|$ pueden ser separados del término G_2 siempre y cuando se cumpla que:

$$\alpha \geq 3B \quad (32)$$

que combinado con la ecuación (21), quedaría

$$\sin(2\theta) \geq 3B\lambda \quad (33)$$

y despejando el ángulo obtenemos

$$2\theta_{min} = \sin^{-1}(3B\lambda) \quad (34)$$

2.1.3. Propagación del campo electromagnético

La amplitud del campo electromagnético (EM), en el caso de una única polarización, puede ser representada escalarmente. La ecuación escalar de tres dimensiones de Helmholtz para un medio lineal homogéneo e isotrópico se puede resolver por el método de *espectro angular* o por el método de *convolución* (ver [89] para consultar una explicación extensa) entre otros métodos.

En el método de *espectro angular*, el campo EM inicial y su propagación se trata en el dominio frecuencial. Definimos la función A como la transformada de Fourier de dos dimensiones de U :

$$A(\alpha, \beta, z) = \mathcal{F}\{U(x, y, z)\} = \iint U(x, y, z) e^{-j(\alpha x + \beta y)} dx dy \quad (35)$$

donde α y β son frecuencias espaciales, y la propagación de la luz en cualquier plano con z constante viene dada por:

$$A(\alpha, \beta, z) = A(\alpha, \beta, 0) \cdot G(\alpha, \beta, z) \quad (36)$$

siendo G la función de transferencia que refleja el desfase de cada componente en ondas planas del objeto según se propagan:

$$G(\alpha, \beta, z) = e^{j\sqrt{(k^2 - \alpha^2 - \beta^2)}z} \quad (37)$$

Por tanto, de las ecuaciones (35), (36) y (37) podemos calcular $U(x, y, z)$ en cualquier plano z a partir de $U(x, y, 0)$ según vemos en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} U(x, y, z) &= \mathcal{F}^{-1}\{A(\alpha, \beta, z)\} = \mathcal{F}^{-1}\{A(\alpha, \beta, 0) \cdot G(\alpha, \beta, z)\} = \\ &= \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{U(x, y, 0)\} \cdot G(\alpha, \beta, z)\} \end{aligned} \quad (38)$$

Para el método de *convolución* se utiliza la respuesta impulsional asociada a la función de transferencia óptica G de la ecuación (37), y se obtiene mediante su transformada de Fourier inversa [90]:

$$g(x, y, z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint G(\alpha, \beta, z) \cdot e^{(j\alpha x + j\beta y)} d\alpha d\beta = \frac{1}{2\pi} \frac{e^{jkr}}{r} \frac{z}{r} \left(\frac{1}{r} - jk \right) \quad (39)$$

siendo $r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$

Puesto que tenemos definido el campo EM inicial y la respuesta impulsional de la difracción en el dominio espacial (ecuación (39)), podemos obtener el valor del campo EM en cualquier plano z mediante la convolución entre ambos:

$$U(x, y, z) = U(x, y, 0) * g(x, y, z) \quad (40)$$

Pese a que no estamos tratando todavía ningún ejemplo numérico, es conocido que la operación convolución es computacionalmente costosa, y en multitud de casos se hace uso de las propiedades de la transformada de Fourier, para calcularse. Por tanto, podemos expresar la ecuación (40) como:

$$U(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{U(x, y, 0)\} \cdot \mathcal{F}\{g(x, y, z)\}\} \quad (41)$$

Comparando las ecuaciones (38) y (41) vemos que existe gran similitud entre ellas, pero las diferencias serán muy importantes en su aplicación numérica cuando entremos en la holografía digital.

2.1.4. Aumento geométrico del proceso holográfico

Como se ha hablado anteriormente, el proceso holográfico consta de dos partes, la parte del registro del holograma y la parte de la reconstrucción. Si realizamos el proceso completo, pero con variaciones entre el registro del holograma y su posterior reconstrucción (Figura 11), podemos conseguir un objeto reconstruido de distintas dimensiones [91,92], aumentado o reducido, con respecto al objeto original. Pero, además, se puede introducir otro cambio que también afecta al aumento, que consiste en registrar el holograma utilizando una longitud de onda, y reconstruirlo con otra longitud de onda distinta.

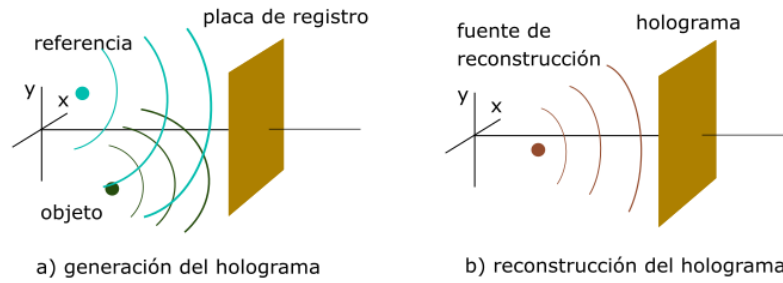


Figura 11. Generación y reconstrucción del holograma en dos pasos

Las distintas configuraciones posibles son muchas, pero de todas ellas, nos vamos a centrar únicamente en la que hemos utilizado en los experimentos que constituyen esta tesis. Dicha configuración consiste en una fuente puntual de luz cercana como referencia para la generación del holograma, y un haz plano como fuente para la reconstrucción, ambos de la misma longitud de onda.

El aumento geométrico β'_{geom} , será distinto dependiendo de la configuración de objeto y fuente de luz, dado simplemente por la proyección geométrica del objeto. Para ilustrar el concepto, usaremos un sencillo ejemplo en el que consideramos una fuente puntual situada a una distancia q de la placa de registro del holograma y un objeto puntual separado axialmente de la fuente por una distancia p (Figura 12).

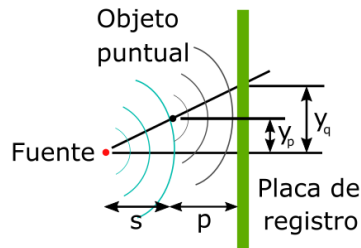


Figura 12. Disposición de registro del holograma

Además de la separación en horizontal, existe también una separación y_p paralela a la placa de registro, que genera una plaza zonal en la placa de registro cuyo centro dista del eje óptico una distancia y_q determinando el aumento geométrico. La relación entre y_q e y_p es el aumento geométrico y estas distancias pueden calcularse fácilmente por semejanza entre triángulos:

$$\beta'_{geom} = \frac{y_q}{y_p} = \frac{(s + p)}{s} \quad (42)$$

dónde observamos que y_q sería igual a y_p cuando la distancia del objeto al medio de registro p es igual a cero y tendríamos $\beta'_{geom} = 1$, y que manteniendo constante y_p , el valor de y_q aumenta según vamos alejando el medio de registro del objeto (que significa aumentar el valor p , y por tanto, también aumenta β'_{geom}). Si por el contrario, mantenemos constante la distancia p entre el medio de registro y el objeto, y también mantenemos fija la posición del objeto y_q , al mover la fuente variamos la distancia s , que según más lejos esté la fuente del objeto, menor será el aumento registrado, y viceversa. En el caso en el que la fuente la distanciásemos infinitamente del objeto, el aumento registrado sería igual a uno.

Cómo ya habíamos comentado anteriormente, el proceso de reconstrucción, lo realizaremos numéricamente, usando un haz plano de la misma longitud de onda, en cuyo caso vemos que el proceso digital de reconstrucción no crea aumento.

2.2. Holografía digital

La revolución digital causada por la sustitución de la electrónica analógica en favor de la electrónica digital, con un inicio en la década de 1950-1960, afecta también a la ciencia, dando paso al cálculo por ordenador de multitud de problemas. La potencia de cálculo de los ordenadores crece exponencialmente a medida que pasa el tiempo, mientras que su precio disminuye, y por tanto, su presencia en la investigación aumenta rápidamente.

La holografía no es ajena a la revolución digital, y aunque su esencia no cambia, la forma de realizarse en los laboratorios y sus aplicaciones posteriores sí varían en múltiples aspectos. La Holografía Digital (DH, por sus iniciales en inglés, Digital Holography), es el término utilizado en distintos contextos, y en algunos de ellos incluye cualquier proceso holográfico en el cual se usa un elemento digital.

Por un lado, tenemos la llamada CDH (Computer-Generated Digital Holography), que se refiere a la generación de un holograma por métodos numéricos. Con estos métodos, estamos cambiando sólo el primer paso de la holografía, el paso del registro del holograma. Si existe el modelo matemático de un objeto, tanto si existe físicamente como si no existe, podemos generar su holograma con la ayuda de un ordenador [37], para posteriormente plasmarlo en una placa fotográfica y reconstruirlo ópticamente.

Por otro lado, en este trabajo, utilizaremos el término DH muy concretamente para referirnos a la generación óptica del holograma, adquirido electrónicamente y reconstruyendo la imagen por métodos numéricos [49]. En este caso, es el segundo paso de la holografía el que se realiza digitalmente al completo. No hay que olvidar, que aunque la generación del holograma se realiza ópticamente, éste se registra electrónicamente, por tanto, se deben tener en cuenta algunos aspectos del muestreo.

2.2.1. Muestreo

El método de registro en la holografía digital es un sensor con un número limitado de píxeles y un tamaño de píxel que típicamente oscila entre $1\ \mu\text{m}$ y $6\ \mu\text{m}$, y evitar el *aliasing* (frecuencias espurias debidas al muestreo) en la imagen del holograma entra dentro del compromiso de la disposición de los elementos del experimento junto con el tamaño del campo que queremos visualizar, el aumento y otros.

Es evidente, que, gracias a la tecnología existente hoy en día, podemos ver en tiempo real el holograma capturado por la cámara mientras movemos los elementos del experimento, y ésta es la mejor manera de ver cómo nos están afectando fenómenos como el *aliasing*. Sin embargo, podemos realizar unos cálculos rápidos en la planificación, utilizando un experimento teórico muy sencillo.

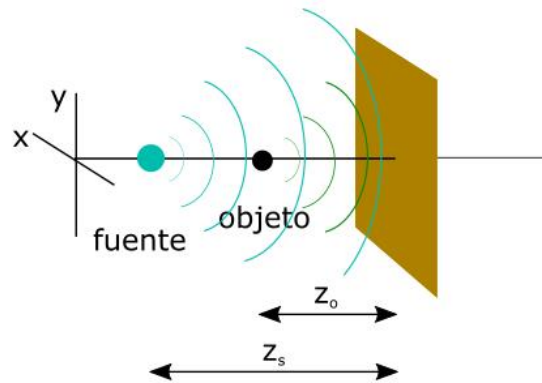


Figura 13. Fuente puntual en línea con objeto puntual

Si consideramos una fuente de luz puntual situada a una distancia z_s del sensor, y un objeto puntual situado en la línea perpendicular al sensor desde la fuente (Figura 13), separados una distancia z_o respecto del sensor, registraremos la interferencia entre dos ondas esféricas. Por la naturaleza del sensor, que es una matriz de píxeles,

y la simetría rotacional del problema que resulta en la generación de una placa zonal de Fresnel sobre el plano del sensor, nos centraremos en las interferencias generadas sobre el eje Y (valores para $x=0$) y para simplificar los cálculos, utilizaremos la aproximación paraxial de la onda esférica:

$$\text{Suma de campos} = \frac{1}{z_o} e^{j\frac{\pi}{\lambda} \frac{1}{z_o} y^2} e^{j\frac{2\pi}{\lambda} z_o} + \frac{1}{z_s} e^{j\frac{\pi}{\lambda} \frac{1}{z_s} y^2} e^{j\frac{2\pi}{\lambda} z_s} \quad (43)$$

Utilizando la ecuación (43), queremos saber las posiciones de los máximos de intensidad sobre el eje Y cuya separación determinará la frecuencia del patrón de interferencias. Los máximos sucederán cuando la fase de una onda coincida con la otra más un número entero multiplicado por 2π , quedando:

$$\frac{\pi}{\lambda} \frac{1}{z_o} y^2 + \frac{2\pi}{\lambda} z_o + 2\pi m = \frac{\pi}{\lambda} \frac{1}{z_s} y^2 + \frac{2\pi}{\lambda} z_s \quad \text{con} \quad m \in \mathbb{N} \quad (44)$$

Realizando algunas operaciones, simplificamos la ecuación en:

$$\frac{y^2}{\lambda} \left(\frac{1}{z_o} - \frac{1}{z_s} \right) = \frac{2(z_s - z_o)}{\lambda} - 2m \quad (45)$$

dónde finalmente despejamos la incógnita y :

$$y = \sqrt{2 \frac{z_s z_o}{z_s - z_o} ((z_s - z_o) - m\lambda)} \quad (46)$$

Teniendo en cuenta los parámetros del sensor de la cámara (Figura 14), podemos calcular la posición de los máximos que entran dentro del sensor, que cumplen $y < h/2$.

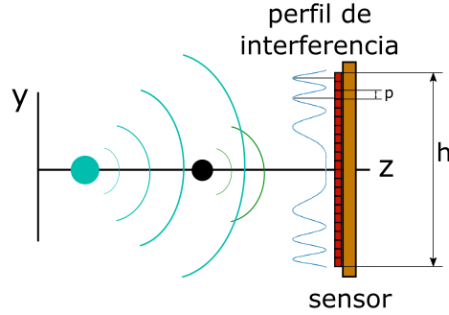


Figura 14. Interferencias de intensidad sobre el sensor de la cámara

Utilizando la ecuación (46) podemos calcular el valor de m cuando $y = h/2$:

$$m = \frac{z_s - z_o}{\lambda} \left(1 - \frac{h^2}{8 z_s z_o} \right) \quad (47)$$

Con la información de las ecuaciones (46) y (47), podemos saber cuáles son los dos máximos más cercanos al borde del sensor, que son exactamente los que tienen menor separación entre ellos, y los llamamos y_1 y y_2 . Dichos máximos de intensidad podrán ser detectados sin existencia de *aliasing* cuando caigan en dos píxeles no adyacentes, por tanto, la distancia mínima necesaria entre ellos será de dos píxeles:

$$y_1 - y_2 > 2p \quad (48)$$

donde p es el tamaño del píxel.

Si usamos la configuración de la Figura 13, por ejemplo, con el sensor industrial de la marca Sony, modelo IMX392 [93], cuyo número de píxeles es 1920x1200, y el tamaño de cada uno de dichos píxeles es $3.45\mu\text{m} \times 3.45\mu\text{m}$, siendo el lado más largo del sensor 6.62 mm. Utilizando un láser verde de 532 nm acoplado a fibra, cuya salida se sitúa a 15 mm del sensor y un objeto puntual situado a 12 mm del sensor, los máximos estarán situados en las posiciones determinadas por la ecuación (46). Teniendo en cuenta que los valores de y superiores a la mitad del tamaño del sensor no nos interesan, podemos calcular las posiciones de los máximos contiguos más cercanos al límite del sensor. Sustituyendo todos los valores del ejemplo en la ecuación (47), y obtenemos los valores para $m = 5468$ y $m = 5469$, que utilizados en la ecuación (46) nos da unos valores en milímetros de $y = 3.305$ e $y = 3.2953$, su diferencia es $\Delta y = 9.67\mu\text{m}$, que cumple con el requisito de la ecuación (48), por lo tanto no tendremos *aliasing* en este montaje.

2.2.2. Métodos numéricos de propagación

La propagación del campo EM definida en el apartado 2.1.3, es aplicable a la holografía digital, teniendo en cuenta que se deben discretizar los valores de x , y a las cuales llamaremos x_m , y_m . La forma más sencilla de hacerlo es tomar cada punto de la señal digital como una unidad de superficie cuadrada del tamaño del píxel.

Para el caso de propagación de *espectro angular*, utilizaríamos la ecuación (38), que discretizaríamos, quedando:

$$U(x_m, y_m, z) = IFFT2\{FFT2\{U(x_m, y_m, 0)\} \cdot G(\alpha_m, \beta_m, z)\} \quad (49)$$

Aparte de la discretización de los valores x e y , se cambia la transformada de Fourier por una transformada discreta, que habitualmente se ejecutará en un ordenador con el algoritmo de la FFT (Fast Fourier Transform). El prefijo I indica transformada inversa, mientras que el sufijo 2 indica FFT bidimensional.

Como se ha mencionado, una forma muy evidente de discretizar el espacio continuo es utilizar el tamaño de píxel del sensor como unidad básica. Si usamos el ejemplo del sensor IMX392, cada píxel será equivalente a una superficie cuadrada de $3.45\mu\text{m}$ x $3.45\mu\text{m}$, y tendríamos una superficie total del sensor de 1920×1200 píxeles que resultaría en 6.62mm x 4.14mm . Utilizando un láser de 532 nm , que según la ecuación (37), define la función de transferencia a una distancia de 2.5 mm como la que podemos ver en la Figura 15. Debido a que el sensor tiene un mayor número de píxeles en horizontal que en vertical, la fase de la función de transferencia presenta una forma elíptica ya que se define directamente en el dominio frecuencial.

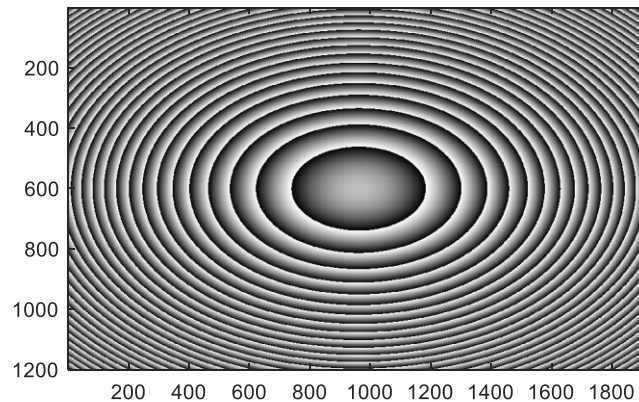


Figura 15. Fase de la función de transferencia para una propagación a 2.5 mm

Dicha función de transferencia tiene límite en frecuencia de $1/\lambda$ y su variación de fase es más rápida a medida que se aleja del centro, lo cual significa que se debe tener en cuenta si está bien muestreada (o calculada) para no producir errores en el resultado.

Si deseamos crear un objeto circular de 0.5 milímetros de diámetro, éste tendría un radio de 72 píxeles, que podría estar centrado en una imagen de 1920x1200 píxeles correspondientes a dicho sensor (Figura 16). Ahora, según la propagación por espectro angular, para conocer el resultado de la difracción de un haz plano incidente sobre el objeto circular, a una distancia de 2.5 mm, tenemos que calcular el filtrado del objeto con la función de transferencia.

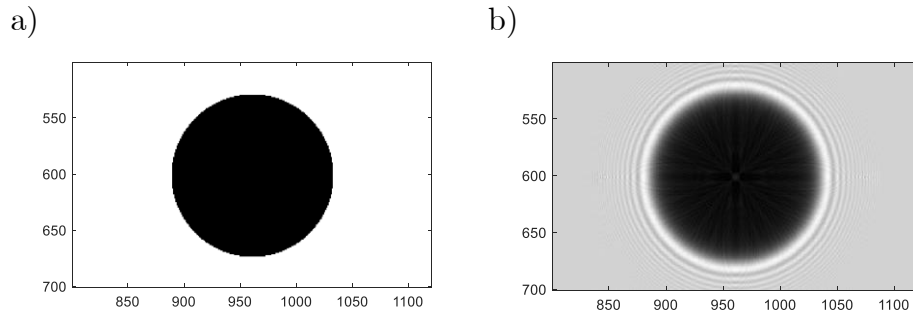


Figura 16. a) Objeto circular de 0.5 milímetros de diámetro, y b) Resultado en valor absoluto de la difracción con un haz plano de 532 nm a una distancia de 2.5 mm

Para el caso del método de *convolución*, la discretización se hace en el dominio espacial tanto del objeto como de la respuesta impulsional que se usa para la convolución, y la ecuación (41) queda:

$$\begin{aligned}
 U(x_m, y_m, z) &= U(x_m, y_m, 0) * g(x_m, y_m, z) = \\
 &= IFFT2\{FFT2\{U(x_m, y_m, 0)\} \cdot FFT2\{g(x_m, y_m, z)\}\}
 \end{aligned}
 \tag{50}$$

Al hacer uso de las propiedades de la Transformada de Fourier, no hay que olvidar que la convolución se convierte en convolución cíclica cuando se muestrean las señales y se usa la Transformada Discreta de Fourier, por tanto, será necesario ampliar la matriz de la respuesta impulsional discretizada rellenando de ceros dicha ampliación hasta conseguir un tamaño que doble su tamaño original.

Como el caso anterior, la definición de $g(x, y, z)$, definida en la ecuación (39), tiene su variación es más rápida según nos alejamos del centro, con un periodo mínimo

de λ . Luego, es necesario, asegurarnos que en la discretización no se produce *aliasing*. Tomaremos su aproximación paraxial:

$$g(x, y, z) = \frac{1}{2\pi} \frac{e^{jkr}}{r} \frac{z}{r} \left(\frac{1}{r} - jk \right) \approx \frac{e^{jkz}}{j\lambda z} e^{\frac{jk(x^2+y^2)}{2z}} \quad (51)$$

$$\text{siendo } r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$$

La variación que se produce sobre un plano con z constante va a depender exclusivamente de la variación en x e y , que por simplicidad, usaremos solo la variación en x , tomando el valor de $y = 0$, y comprobaremos que los valores de fase de dos puntos consecutivos no se diferencian en más de π radianes. Extrayendo de la ecuación (51), la fase que es variable nos queda:

$$e^{\frac{j\pi x^2}{\lambda z}} = e^{j\varphi} \quad (52)$$

Donde discretizamos para valores de x :

$$\varphi(n) = \frac{\pi}{\lambda z} n^2 (\Delta x)^2 \quad \text{con } n \in \mathbb{N} \quad (53)$$

Buscando el valor máximo de x , siendo N el número de píxeles en dicha dirección, lo encontraremos para un valor $n = N/2$:

$$\begin{aligned} \varphi\left(\frac{N}{2}\right) - \varphi\left(\frac{N}{2} - 1\right) &< \pi \Rightarrow \\ \frac{\pi}{\lambda z} (\Delta x)^2 \left(\frac{N^2}{4} - \frac{N^2}{4} + N - 1 \right) &< \pi \Rightarrow \\ z &\geq \frac{N}{\lambda} (\Delta x)^2 \end{aligned} \quad (54)$$

Análogamente podemos encontrar que para el correcto muestreo de la función de transferencia en el método de propagación de *espectro angular* obtendríamos:

$$z \leq \frac{N}{\lambda} (\Delta x)^2 \quad (55)$$

Por lo que usaremos el método de propagación de *espectro angular* para distancias cortas y el método de propagación de *convolución* para distancias largas, dadas por los parámetros del montaje y el resultado de las ecuaciones (54) y (55).

2.2.3. Algoritmos de recuperación de fase

Podemos dividir estos algoritmos en dos grandes grupos, aquellos que utilizan la holografía como método subyacente y aquellos que no precisan partir de un holograma.

La microscopia holográfica utiliza un interferómetro como base y un sensor para el registro del holograma. La recuperación de amplitud y fase en una configuración fuera de eje (*off-axis*) puede realizarse mediante el filtrado en Fourier [94] mientras que en configuración en-eje (*on-axis*) puede obtenerse mediante el uso del proceso de *phase-shifting* [95,96]. Pero en las dos últimas décadas otros métodos de recuperación de fase se han propuesto debido al creciente interés en obtener imágenes de fase cuantitativas.

Zicha et al. [97,98] propusieron el método Digitally Recorded Interference Microscopy with Automatic Phase Shifting (DRIMAPS) que combina la interferometría *phase-shifting*, automatizando el movimiento motorizado de prismas ópticos para variar la fase de la referencia, junto con microscopía para obtener imágenes de fase en biología siendo aplicada al estudio de motilidad, crecimiento y dispersión celular.

Spiral Phase Contrast Microscopy (SPCM) es un método que propone un montaje similar al del microscopio de Zernike al que se le añade un filtro de fase en espiral que produce un realce de los bordes de la muestra y puede ser utilizado para extraer información sobre su topografía [99]. Además, si se obtienen una serie de imágenes con una diferente rotación del filtro de fase en espiral se puede obtener la información completa de la fase de la muestra [100,101].

Fourier Phase Microscopy (FPM) combina la microscopia de contraste de fase con la interferometría *phase-shifting* [102]. Adicionalmente, se puede reducir el ruido utilizando fuentes parcialmente coherentes, siendo utilizado para el estudio de la dinámica celular en largos periodos de tiempo [103–105]. Sin embargo, FPM tiene la limitación por el uso del *phase-shifting* que no permite grabaciones de fenómenos muy rápidos (de la escala de milisegundos) como las fluctuaciones de la membrana celular.

Una alternativa, *Hilbert Phase Microscopy* (HPM) aplica matemáticamente la transformada de Hilbert al holograma capturado fuera de eje (*off-axis*) utilizando un interferómetro Mach-Zehnder consiguiendo extraer el retardo de la fase introducido

por la muestra [106–108]. Esta técnica precisa de un solo holograma por lo que es capaz de medir fenómenos muy rápidos ya que está limitado únicamente por la velocidad de adquisición del sensor. Por el contrario, HPM sufre inestabilidades de longitud de camino óptico en ambas ramas debido a cambios mecánicos y/o térmicos.

Diffraction Phase Microscopy (DPM) es una combinación de las principales ventajas de FPM y HPM, se consigue la recuperación de fase con alta estabilidad en distintas escalas temporales siendo necesario un único holograma [109–111]. La técnica DPM ha sido combinada también con fluorescencia [112], microscopía confocal [113] y transformada de Fourier de la luz dispersada [114,115], dando lugar a múltiples configuraciones y aplicaciones.

Y uno de los más recientes métodos propuestos *Spatial Light Interference Microscopy* (SLIM), combina la microscopía de contraste de fase con la holografía de Gabor [116]. SLIM crea un ciclo entero de phase-shifting mediante el uso de un SLM (*Spatial Light Modulator*), obteniendo hologramas con un cambio de fase de la referencia a $0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$, que se combinan para producir una imagen de fase cuantitativa de campo completo.

Sin embargo, no es necesario partir de un holograma para conseguir recuperar la fase de una distribución de intensidad. Uno de los trabajos iniciales de recuperación de fase fue ideado por R.W. Gerchberg y W.O. Saxton en 1972 [88], que se utiliza para obtener la fase del campo de entrada conocidas las amplitudes en dos planos, en el de entrada y en el de salida, mediante un algoritmo iterativo. La idea general de este algoritmo está mostrada en la Figura 17, y consiste en obtener una nueva estimación de la fase de entrada en cada iteración mediante la propagación de ida y de vuelta entre los dos planos.

Partiendo en de la entrada, se usa la amplitud conocida $E_{in}(x, y)$ y una fase aleatoria inicial $\varphi_0(x, y)$, que para inicio de cualquier iteración denotamos como $E_{in}(x, y)e^{j\varphi_m(x, y)}$ siendo m el número de la iteración. Posteriormente, se calcula el campo en el plano de salida, siendo el resultado de propagar a través del sistema óptico dicho campo de entrada, que denominamos $B_m(u, v)e^{j\Phi_m(u, v)}$. Dado que en el plano de salida conocemos la amplitud del campo, podemos usarla para tener un resultado combinando el campo conocido con la fase calculada, de forma que obtendríamos $E_{out}(u, v)e^{j\Phi_m(u, v)}$.

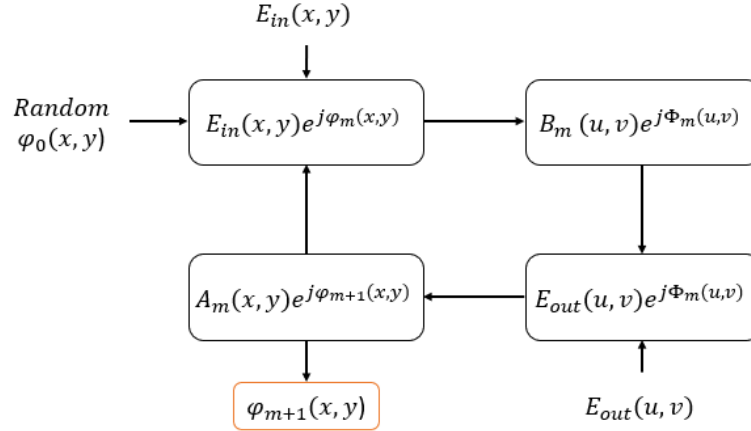


Figura 17. Diagrama del algoritmo de Gerchberg-Saxton

Después, se realiza el camino inverso, calculando el campo de entrada a través del campo de entrada, de forma que obtendríamos $A_m(x, y)e^{j\phi_{m+1}(x, y)}$. La fase obtenida al final de esta iteración puede ser el resultado final si se ha conseguido la convergencia. En caso de continuar con las iteraciones se sustituiría la amplitud del campo de entrada con aquella ya conocida $E_{in}(x, y)$ y se volvería a iniciar el bucle hasta que se consigue la convergencia en el resultado. La convergencia de este algoritmo fue probada [117], y asegura que la estimación de la fase en cada iteración es, al menos, tan buena como la previamente calculada.

Otro método, *Quantitative Optical Phase Microscopy* (QOPM) propuesto por Barty et al. [118], obtiene la distribución de fase mediante el análisis de como la propagación del haz se ve afectada por la muestra. En un típico microscopio por transmisión se obtienen varias imágenes (en foco y desenfocadas) moviendo la muestra axialmente a lo largo del eje Z mediante un motor paso a paso. Estas imágenes se usan como entrada de un algoritmo determinista basado en la TIE (*Transport Intensity Equation*) [83,119].

2.2.4. Configuraciones típicas de holografía digital

Por simplicidad, solamente nos referiremos a algunas de las configuraciones más comunes usadas en la holografía digital sin lentes.

Configuración de holografía digital en eje (Digital In-line Holography)

La LHM viene de la implementación digital de la invención de Gabor, vista anteriormente en el apartado 1.2, donde una fuente de luz coherente ilumina la muestra y el frente de onda difractado es capturado por un sensor de estado sólido en lugar de una placa de registro (Figura 18), y posteriormente poder reconstruir la imagen del objeto mediante métodos numéricos.

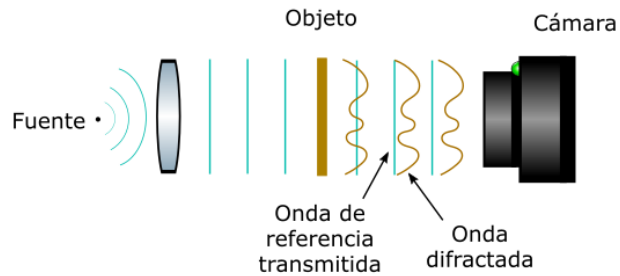


Figura 18. Holografía digital de Gabor

En algún caso, se emplea el término holografía digital en eje solamente en los casos en los que la onda referencia se introduce en línea con el eje óptico pero posterior al objeto (Figura 19), que es una posible solución cuando el objeto utilizado no tiene suficiente transparencia como para que el haz de referencia lo atraviese y se generen interferencias. Aun así, en este trabajo nos referiremos a holografía digital en-línea en ambos casos, tanto si la referencia viene directamente atravesando el objeto como si es introducida separadamente.

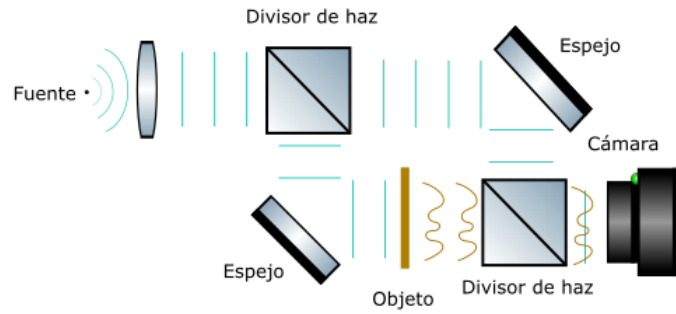


Figura 19. Holografía digital en-línea con referencia introducida después del objeto

La LHM se utiliza típicamente en dos configuraciones extremas [120], esquematizadas en la Figura 20. En la primera configuración, la muestra se sitúa cerca de la fuente puntual de iluminación y, en comparación, lejos del sensor digital [121–126]. Así conseguimos un factor aumento que típicamente será de 5X a 20X, debido a la proyección geométrica del patrón de difracción de la muestra sobre el plano del sensor, y obtenemos un campo de visión y límite de resolución similar a un montaje con lentes DHM de apertura numérica media (en un rango de 0.4 a 0.5).

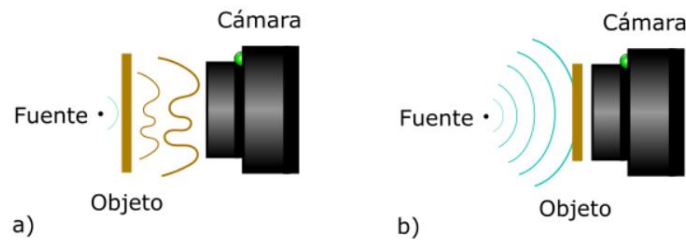


Figura 20. a) Configuración de gran aumento
b) Configuración de poco aumento

La segunda configuración, la fuente de iluminación se sitúa lejos de la muestra, mientras que ésta se encuentra casi en contacto con el sensor [127–132], donde no existe aumento geométrico apreciable pero mejora considerablemente la extensión del campo de visión ya que se utiliza toda el área del sensor. El límite de resolución alcanzado es típico de sistemas de baja apertura numérica (en un rango de 0.2 – 0.3) principalmente limitado por el tamaño del pixel. Muchas veces nos referimos a este tipo de configuración como *On-chip Microscopy*.

Configuración de holografía digital fuera de eje (Digital off-line holography)

La holografía fuera de eje consiste en la configuración del registro del holograma según la realización del holograma de Leith-Upatnieks [50], visto en el apartado 1.3.

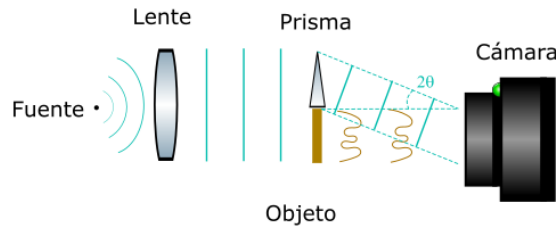


Figura 21. Holografía digital fuera de eje

Con este método conseguimos separar la imagen virtual de la imagen real, haciendo que al reconstruir quede en el centro la referencia, y en los laterales la imagen real y la virtual, una a cada lado. Dado que la reconstrucción se realiza por métodos numéricos, es posible realizar la reconstrucción con un haz con ángulo de forma que la imagen del objeto quede centrada.

Configuración de holografía digital de Fourier sin lentes

En esta configuración, la fuente de luz que interfiere con la luz difractada del objeto tiene origen en el mismo plano donde se sitúa el objeto.

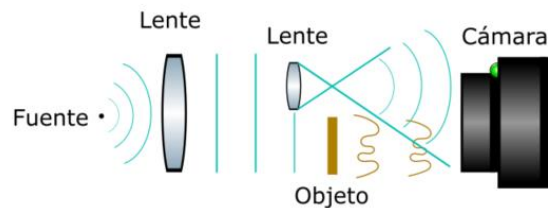


Figura 22. Holografía de Fourier

En la Figura 22, se representa una de las formas en las que se puede realizar un holograma de Fourier sin lentes, dónde se utiliza un haz de luz colimado para iluminar el objeto, y parte de ese haz, que no atraviesa el objeto, atraviesa una lente para focalizar en el mismo plano donde situamos el objeto [133]. Cada punto del

objeto se convierte en una intensidad sinusoidal con frecuencia dada por la posición del punto objeto. Puede reconstruirse con una simple transformada de Fourier.

2.2.5. Multiplexación en holografía digital

Definimos la multiplexación como la técnica para combinar varias señales transmitidas o procesadas a través de un único sistema. Este concepto fue inventado en el ámbito de las telecomunicaciones, cuando Jean Mourice Émilie Baudot [134] pensó en un mejor aprovechamiento de los telégrafos (teletipos), ya que pasaban gran parte del tiempo en estado de espera y sólo actuaban durante el poco tiempo en el que recibían un símbolo. Este primer uso compartido del canal fue realizado por multiplexación en tiempo.

En la holografía también se pensó en un mejor aprovechamiento de los medios disponibles, donde la primera aplicación de la multiplexación fue el uso de la placa de registro para almacenar la información de más de un holograma. Estas primeras técnicas de multiplexado holográfico hacían uso de las propiedades espacio-frecuenciales [135–140] y la polarización [141,142] permitiendo posteriormente la reconstrucción de cada uno de ellos de forma independiente. Hay que reseñar que en estos primeros montajes experimentales también se hacía uso de la multiplexación temporal, entendiéndola como que era necesario reemplazar el objeto y realizar algunos cambios en el sistema óptico para registrar el nuevo holograma.

La multiplexación toma especial relevancia en el ámbito de la mejora del límite de resolución de los objetos reconstruidos a partir de los hologramas. Para ello, conviene utilizar la teoría de la información, donde, en un paso muy inicial, la capacidad de información de un sistema en bits fue definida por Hartley [143] como:

$$N = \log_2 m \tag{56}$$

donde m es el número total de estados posibles de un mensaje y N es el número de bits necesarios para representarlos.

Si consideramos un sistema óptico como un sistema de comunicaciones, puesto que de una señal de entrada que atraviesa un canal obtenemos una señal de salida, podemos utilizar el concepto definido por Shannon [144], que define la capacidad temporal de un sistema de comunicaciones, estableciendo el número de muestras necesarias para definir dicho sistema haciendo uso del teorema del muestreo:

$$M = 2TB_T + 1 \tag{57}$$

siendo M el número de muestras, T es lapso de tiempo durante el que se transmite la señal y B_T es el ancho de banda temporal del canal de transmisión.

Si la señal detectada tiene una potencia promedio s y un ruido con potencia n , la capacidad de información queda definida como:

$$N = (2TB_T + 1) \log \left(1 + \frac{s}{n} \right) \quad (58)$$

Se sucedieron los avances en la definición teórica de los sistemas ópticos [145–147] que relacionaban la resolución de un sistema con los grados de libertad de la imagen. Fue en 1966 cuando Lukosz [148,149] plantea el teorema de la invariancia que establece que “independientemente del ancho de banda del sistema formador de imágenes, el número de grados de libertad del campo ondulatorio que el sistema puede transmitir es invariante” donde los grados de libertad corresponden a la longitud de onda, polarización, ancho de banda temporal, tiempo, etc.

Posteriormente, la ley de invariancia fue extendida por Cox y Sheppard [150] combinando todos los estudios anteriores dando lugar a que la capacidad de información de un sistema óptico viene dada por:

$$N = (2L_x B_x + 1)(2L_y B_y + 1)(2L_z B_z + 1)(2TB_T + 1) \log \left(1 + \frac{s}{n} \right) \quad (59)$$

donde L_x L_y son las extensiones del campo objeto transmitido en las direcciones x e y respectivamente, B_x B_y son las anchuras de banda de la función de transferencia del sistema, L_z es la profundidad de campo del sistema, B_z es el ancho de banda espacial en la dirección z , T es el tiempo de observación y B_T es el ancho de banda temporal del sistema óptico.

La conclusión más importante derivada a partir de la ecuación (59) es que no es el ancho de banda espacial de un sistema el que es constante, sino la capacidad de información que el sistema óptico puede transmitir. Por tanto, podemos cambiar el dominio en el que la información es transmitida o multiplexada, a expensas de reducir la cantidad de información que se puede transmitir en un determinado grado de libertad y con el fin de expandir la de otro resultando en un aprovechamiento máximo de la capacidad de información del sistema.

En los sistemas ópticos encontramos dos tipos de multiplexado ampliamente usados. Por un lado, el multiplexado temporal hace referencia a objetos restringidos temporalmente, es decir, objetos cuya transmitancia en amplitud no varía o lo hace muy lentamente de tal modo que se puede asumir como constante al menos durante

el tiempo de observación o tiempo en el que se implementa la técnica. En este tipo de objetos, es posible transmitir diferentes paquetes de información adicional del objeto (adicional en el sentido de más allá de la transmitida normalmente por el sistema óptico) sucesivamente en el tiempo porque el objeto no varía. Un claro ejemplo lo tenemos en la transmisión de información espacio-frecuencial adicional a la transmitida a través de la pupila del sistema con el fin de, una vez recolocada, obtener una imagen del objeto que presente resolución mejorada [151–155].

Por otro lado, la multiplexación espacial es de las más utilizadas, que además de los trabajos iniciales en el registro de hologramas sobre la misma placa, tienen aplicaciones diversas como la mejora de resolución en la reconstrucción de los hologramas [154,156], y la codificación de información múltiple en un solo holograma digital [157]. También se han realizado trabajos sobre equipamiento ya existente al que se le aplican mejoras, como la modificación de un microscopio convencional al que se le añaden módulos externos para multiplexar en espacio creando un microscopio holográfico [158].

Pero en esta tesis vamos a utilizar el multiplexado en longitud de onda. Las investigaciones sobre el guiado de la luz a través de cristales y cavidades llegaron a grandes hitos en la década de 1950-1959, en la que Narinder Singh Kapany acuñó el nombre de fibra óptica, y más tarde, Charles Kuen Kao mostraría en 1966 la primera transmisión de información utilizando frecuencias ópticas [159]. La fibra óptica es la base de las comunicaciones de gran ancho de banda desde finales de los años 70 y principios de los 80, donde la WDM (Wavelength Division Multiplexing) equivale a la modulación de frecuencia en la que las portadoras son frecuencias del espectro visible. Existen otros campos en los que se utilizan distintas longitudes de onda, y también hablamos de multiplexación en longitud de onda, cuyas bases fueron sentadas por Kartashev [160] en el caso de su aplicación a superresolución. Posteriormente Armitage, Lohmann y Paris [161] propusieron una implementación de multiplexación en longitud de onda para codificación y correlación de objetos unidimensionales. Una segunda propuesta, que era la extensión a un correlador de dos distribuciones espaciales 2D, no era puramente multiplexación en longitud de onda, ya que la característica 2D se conseguía moviendo una rendija del sistema, haciendo uso de la multiplexación temporal también. Las demostraciones ópticas llevadas a cabo en el laboratorio por Bartlett [162] de la transmisión de señales incluían las partes móviles necesarias para la multiplexación temporal. Friesem et al. [163] sugirieron algunos montajes ópticos que permitían el envío en paralelo de imágenes 2D a través de una única fibra óptica multimodo. Evoluciones de estos sistemas ópticos se han dado a lo largo del tiempo, en los que se ha conseguido sustituir la fibra multimodo por una monomodo [164,165].

Las aplicaciones actuales en las que se utiliza la multiplexación en longitud de onda son muy diversas, pues aparte de las ya nombradas para la transmisión, se puede utilizar para el procesado de imágenes [166] dadas las ventajas del procesado en paralelo que permiten los sistemas ópticos, obtención del índice de refracción de un objeto [167] gracias a la iluminación simultánea directa y por reflexión con múltiples fuentes de distinta longitud de onda. Otras aplicaciones, como la detección de objetos, se basan en el hecho de poder estimar en una imagen convencional la profundidad de un objeto de la escena por su variación de escala y cierto conocimiento previo de las dimensiones, pero también existen sistemas ópticos [168] que correlacionan la escena con el objeto buscado dando resultados en distintas longitudes de onda que permiten conocer su profundidad. También orientado a mejorar la resolución en sistemas ópticos aplicados a la microscopia, Calabuig et al. [169,170] propusieron un nuevo método apodado SESRIM (del inglés Single-Exposure Superresolved Interferometric Microscopy) en el que conseguían superresolución de única exposición iluminando el objeto con diferentes haces láser de diferente longitud de onda e inclinación, por lo que la transmisión de contenido espacio-frecuencial extra se realizaba en la coherencia de la iluminación para, posteriormente ser recuperado y reposicionado a su lugar original del espectro del objeto. Un sistema parecido también fue implementado por Granero et al. Pero en el campo de la microscopia holográfica sin lentes [171].

3. Resumen de publicaciones

3.1. Publicación 1: “Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm”

En esta publicación ([1] de las publicaciones incluidas en esta tesis) mostramos un diseño nombrado MISHELF (del inglés, Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel), en el cual adquirimos una imagen a color RGB (Figura 23) para que sea el punto de entrada de un algoritmo iterativo de multiplexado en longitud de onda y de convergencia rápida con el que obtenemos la amplitud y fase del objeto mejorando la calidad señal/ruido y mitigando los efectos de la imagen virtual sin perder la resolución dada por la menor de las longitudes de onda utilizadas.

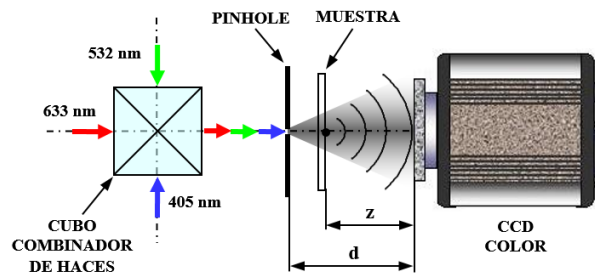


Figura 23. Esquemático del montaje MISHELF

El montaje del experimento realizado en el laboratorio (Figura 24) consta de tres láseres, cuyas longitudes de onda son 405 nm (diodo láser violeta de 50 mW), 532 nm (diodo verde de 50 mW) y 632.8 nm (láser de He-Ne de 35 mW). Todos ellos se combinan utilizando divisores de haz dicróicos, para después difractarse al atravesar un *pinhole* de 1 μm de diámetro. El *pinhole* genera una onda esférica divergente con aperturas numéricas de 0.63, 0.53 y 0.4 respectivamente para las longitudes de onda RGB.

Martín Sanz, José Angel Picazo-Bueno, Javier García, and Vicente Micó, "Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm," Opt. Express 23(16), 21352 (2015).
doi: 10.1364/OE.23.021352

Al tratarse de una aplicación a microscopia, se requiere un factor aumento del objeto de entre 5x y 20x. Por tanto, la muestra se sitúa cerca del *pinhole* en comparación a la distancia al CCD. Finalmente, se utiliza una cámara a color (AVT 1394 Stingray F-145C, 1388 × 1038 píxeles, 6.45 x 6.45 μm de tamaño de pixel) para capturar simultáneamente los tres hologramas generados. Nótese además que el aumento es necesario para evitar el límite de muestreo (apartado 2.2.1) que, no solo viene impuesto por el tamaño de pixel del sensor empleado, sino por la restricción adicional introducida por el multiplexado en longitud de onda que define un tamaño de pixel efectivo más grande que el real al separar los diferentes canales.

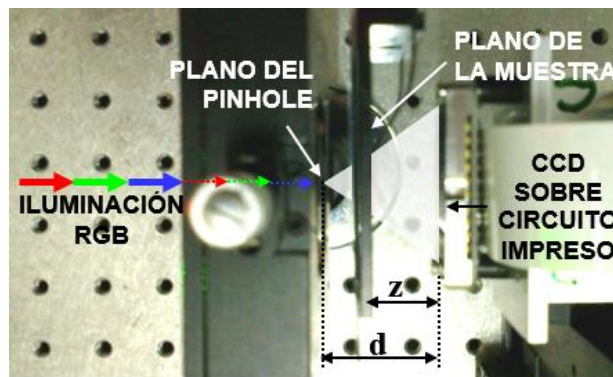


Figura 24. Fotografía cenital del montaje experimental en el laboratorio.

El algoritmo MISHELF (Figura 25) comienza con los tres hologramas (de cada una de las longitudes de onda, recogidos por cada uno de los canales de la cámara RGB) capturados, de los que sólo conocemos la intensidad. Se ecualiza cada uno de los hologramas para tener una luminosidad similar en todas las partes de la imagen, y calculamos la amplitud de cada uno de ellos. Realizamos la propagación numérica hasta el plano objeto de cada uno de los hologramas, teniendo en cuenta que la refracción depende de la longitud de onda, y que ello provoca que la distancia de propagación numérica hasta la imagen en foco es ligeramente diferente para cada uno de los canales. Con las imágenes de los objetos calculados, realizamos la mezcla ponderada de los espectros en el dominio de frecuencia espacial, obteniendo un único objeto.

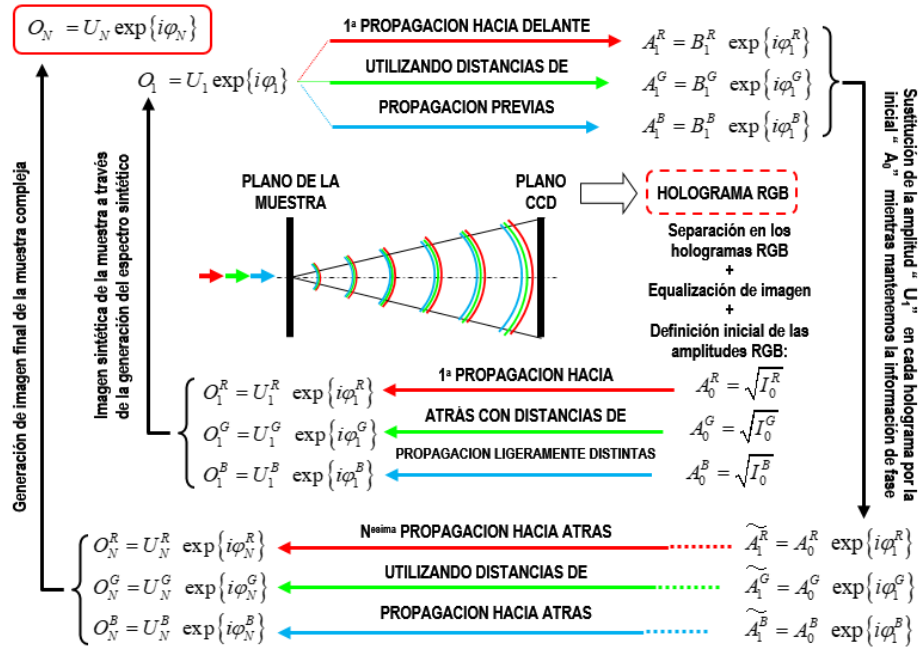


Figura 25. Diagrama de flujo del algoritmo MISHELF.

En dicha mezcla ponderada se tiene en cuenta que la frecuencia de corte es menor para el objeto calculado con la longitud de onda R, algo mayor para la longitud de onda G, y la mayor de todas las frecuencias de corte corresponde a la B. Así conseguimos que el nuevo objeto creado de la mezcla de todos tenga la misma resolución que la obtenida por la longitud de onda B (mejor resolución posible por difracción), y no perderla como ocurre con un promedio de los objetos en el dominio espacial. La mezcla citada se torna como principio del ciclo iterativo de propagación hacia el plano de registro del holograma y vuelta al plano objeto.

De este modo, el objeto único creado se propaga numéricamente hasta el plano del holograma con cada una de las longitudes de onda utilizadas en el experimento, y mientras mantenemos las fases respectivas, sustituimos las amplitudes por las amplitudes de los hologramas capturados (y ecualizados). En ese instante, se propaga de nuevo al plano objeto (cada uno de los hologramas). De nuevo tenemos tres objetos calculados, que corresponden a cada una de las longitudes de onda, y otra vez sintetizamos un nuevo objeto usando una suma ponderada de sus transformadas de Fourier. En este punto hemos cerrado el bucle del algoritmo, pudiendo realizar tantas iteraciones como se deseen, y dando como resultado una imagen del objeto con amplitud y fase, sintetizada en el plano de la muestra utilizando tres hologramas. Todo este algoritmo contribuye a la eliminación de la imagen gemela y a la mejora de la calidad de la imagen en cuanto a contraste, halos y ruido en general.

Para la validación experimental se han utilizado dos tipos de muestras, por un lado, un test de resolución USAF, que es un objeto de amplitud puramente, y por otro unas muestras de semen de verraco que, principalmente, podemos considerar como una muestra pura de fase.

En el primer experimento, el aumento lo calculamos según la ecuación (42) y reescribiendo según la nomenclatura de la Figura 24:

$$\beta'_{geom} = \frac{y_q}{y_p} = \frac{d}{d - z} \quad (60)$$

y teniendo en cuenta que las distancias aproximadas son $z = 24 \text{ mm}$ y $d = 25.2 \text{ mm}$ obtenemos un aumento de $\beta'_{geom} \cong 21X$.

Con el experimento realizado con el test de resolución podemos comprobar cómo no se pierde resolución utilizando este nuevo método en comparación con la propagación del holograma obtenido con la longitud de onda de 405 nm (apartado 2.2.5). En la Figura 26 (a), podemos ver que utilizando el holograma del canal B está resuelto el grupo 8-elemento 5 que corresponde a $2.46 \mu\text{m}$, al igual que también permanece resuelto en la imagen (b) después de haber aplicado el procesado, pero además, se ha mejorado netamente el contraste y el ruido coherente ha disminuido.

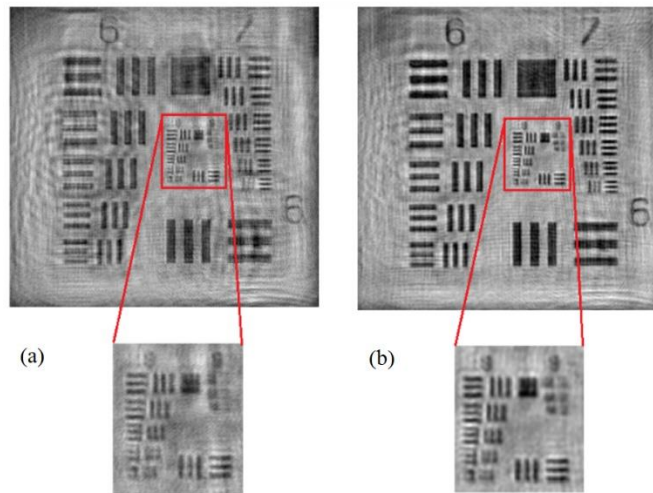


Figura 26. Imágenes del test USAF: (a) Propagación LHM convencional con canal B, y parte central en detalle, (b) imagen final después de dos iteraciones del algoritmo, y parte central en detalle.

Otro punto importante es la eliminación (o al menos mitigación) de la imagen virtual conseguida por el procesado MISHELF, y para comprobarlo utilizamos el holograma generado con la longitud de onda B y el último objeto sintetizado por el algoritmo. En el caso del holograma B lo propagamos hasta donde se encuentra la imagen virtual. En el caso del objeto sintetizado, se propaga también hasta donde debería estar la imagen virtual teniendo en cuenta que éste objeto también tiene información de fase. Y en la Figura 27, podemos observar el resultado de ambas propagaciones en el que queda patente la existencia de imagen gemelar procedente del canal B (Figura 27 a) mientras que solo existe objeto desenfocado procedente del método propuesto (Figura 27 b).

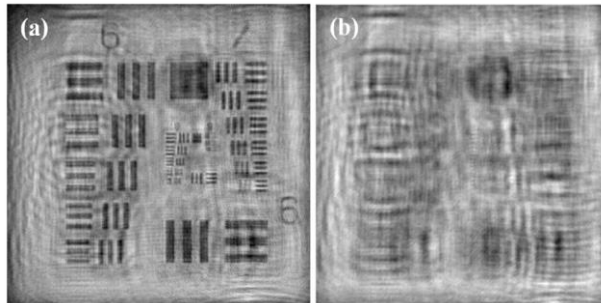


Figura 27. Imagen gemela: (a) imagen del canal B y (b) imagen final de MISHELF propagada hasta el plano de la imagen gemela.

Una segunda validación se ha realizado con muestras biológicas (semen de verraco) y se ha podido comprobar la mejora en la reducción de ruido sin pérdida de resolución con respecto a la máxima resolución dada por el canal B. Teniendo en cuenta que las distancias aproximadas eran de $z = 14 \text{ mm}$ y $d = 15 \text{ mm}$ se obtuvo un aumento de $\beta'_{geom} \cong 15X$. Pero más importante en el caso de muestra principalmente de fase, es que la fase recuperada se relaciona directamente con variaciones bien de índice de refracción o bien de relieve o bien como combinación de ambas. Por tanto, mejorando la calidad de la distribución de fase recuperada, mejoramos la visualización 3D de la muestra. En nuestro caso, la variación de fase es atribuible a variaciones de índice de refracción pues se trata de una muestra esencialmente plana puesto que está encapsulada entre porta y cubre de microscopio. En la Figura 28 mostramos una visualización cuantitativa 3D del espesor de las células relacionado con la variación de índice introducido por las mismas: en (a) se incluye el resultado recuperado a partir del método propuesto mientras que en (b) podemos ver la imagen procedente del canal B (resultado convencional). Podemos ver la ganancia claramente la ganancia en calidad de imagen en cuanto a reducción de ruido de fase.

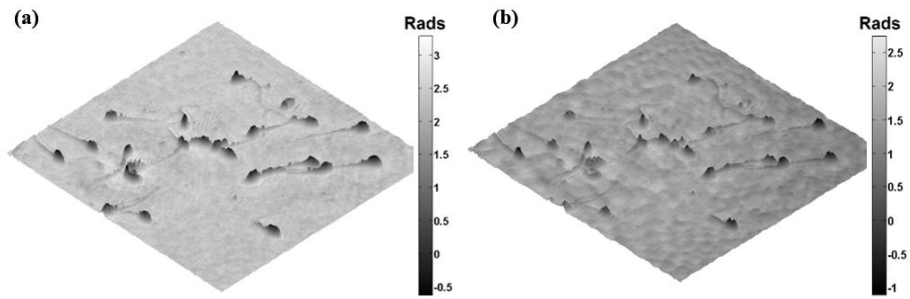


Figura 28. Representación 3D de fase: a) y b) muestran las distribuciones de fase de MISHELF y de una configuración B-LHM respectivamente.

Como conclusión podemos decir que la técnica llamada MISHELF ha mostrado imágenes mejoradas en cuanto a ruido en general y minimización de imagen gemela en particular, con un algoritmo de convergencia rápida (solo 2 ciclos completos del algoritmo) y manteniendo la mejor resolución proporcionada por la longitud de onda más pequeña, permitiendo la observación de eventos dinámicos gracias a la captura simultánea de varios hologramas con distintas longitudes de onda.

3.2. Publicación 2: “Compact, cost-effective and field portable microscope prototype based on MISHELF microscopy”

En esta sección, presentamos las principales características/novedades de la publicación número [2] de las incluidas en esta tesis. Se trata de, por una parte, la creación de un prototipo de microscopio compacto, portable y de bajo coste para la aplicación práctica de análisis de muestras vivas, y por otra parte, una generalización del artículo anterior (3) en la que vamos a utilizar unas longitudes de onda que no son las mismas que las centrales de los filtros de la cámara RGB.

El prototipo ha sido diseñado con un software CAD comercial (Rhinoceros) y fabricado usando la técnica de Modelado por Deposición Fundida (Fused Deposition Modeling with ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene)), consta de dos partes independientes, caja superior y caja inferior (Figura 29), que permiten su uso sin necesidad de tener partes móviles como bandejas deslizantes. Para analizar la muestra, se separa la caja superior, se sitúa en la zona de análisis y vuelve a encajarse la parte superior sobre la caja inferior.

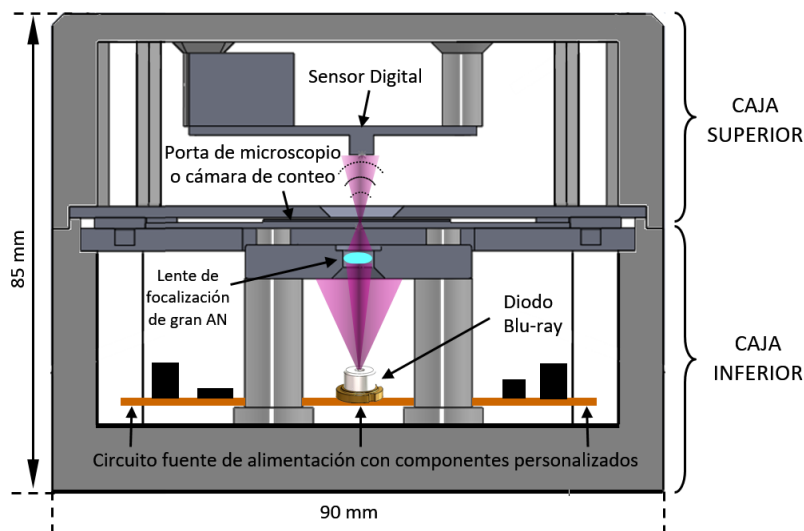


Figura 29. Diagrama del prototipo con corte transversal.

La caja superior contiene el sensor digital (cámara RGB Mightex USB3.0 SMN-C050-U, sensor tipo CMOS de 2560×1920 píxeles, $2.2 \times 2.2 \mu\text{m}$ de tamaño de pixel), con una ventana óptica que permite pasar la luz y, a su vez, lo protege de la suciedad, del polvo o de restos derivados de la manipulación de la muestra. Dicha cámara está conectada con un cable USB que sale de la caja a través de un agujero lateral y llega hasta el ordenador que realiza la captura y procesado. Para dar mayor versatilidad al sistema, la cámara puede moverse unos pocos milímetros en altura para poder ajustar los parámetros geométricos de aumento y resolución.

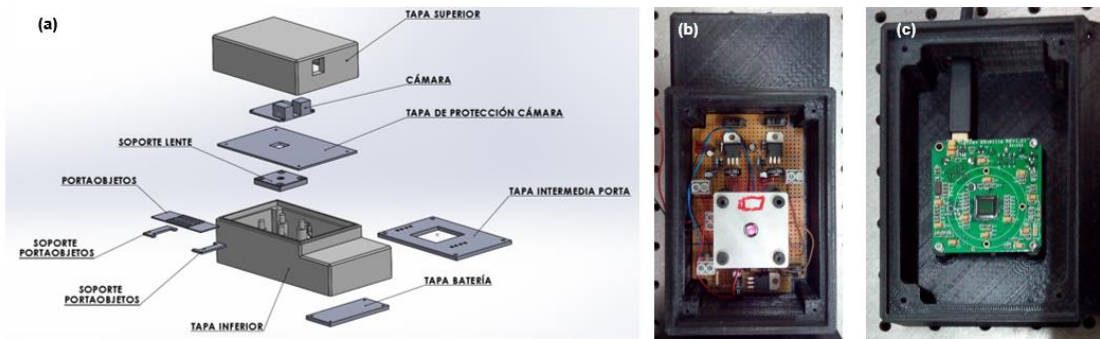


Figura 30. (a) Diseño de los principales componentes, (b) Fotografía de la caja inferior fabricada, (c) Fotografía de la caja superior fabricada.

La caja inferior (Figura 30) contiene la iluminación del sistema, que a diferencia de la publicación anterior, se ha optado por utilizar una fuente de bajo coste, de tamaño reducido e integrable en el prototipo. La fuente de luz coherente consiste en tres láseres de Infrarrojo (IR), Rojo (R) y Azul (B) de 780, 660 y 405 nm, respectivamente, dentro de un encapsulado tipo lata. Esta lata ha sido obtenida al desmontar una unidad óptica Blu-Ray de Sony (modelo KES-400AAA PS3), que contiene tres diodos láser individuales ligeramente separados (décimas de milímetros) axial y transversalmente. Cada uno de los diodos se alimenta independientemente con un circuito regulable, diseñado expresamente para el sistema, que se ha ajustado de acuerdo con la sensibilidad de la cámara en cada una de las longitudes de onda, consiguiendo una intensidad similar en todos los canales.

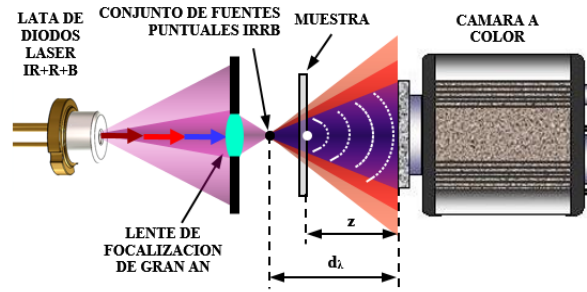


Figura 31. Diagrama esquemático del diseño.

La lente, de media/alta apertura numérica (0.6 NA), se ha separado unos 22 mm aproximadamente de la lata, permitiendo cubrir toda la lente con una iluminación homogénea, focalizando todos los haces justo antes de la muestra (con pequeñas variaciones para cada una de las longitudes de onda). Con dicha configuración, reescribiendo la ecuación (42) y fijándonos en la Figura 12 y Figura 31, la nueva nomenclatura sería:

$$\beta'_{geom} = \frac{y_q}{y_p} = \frac{d_\lambda}{d_\lambda - z} \quad (61)$$

y aplicando los valores de $(d_\lambda - z) \cong 0.5$ mm, y, $z = 7$ mm a la ecuación (61) obtenemos un aumento aproximado de $\beta'_{geom} = 15X$.

Este prototipo necesita una calibración previa a la utilización del algoritmo MISHELF. De hecho, podría decirse que se trata en realidad de dos calibraciones distintas. La primera de ellas es para obtener los hologramas generados por cada una de las longitudes de onda, y la segunda es para igualar el desplazamiento y aumento de los hologramas.

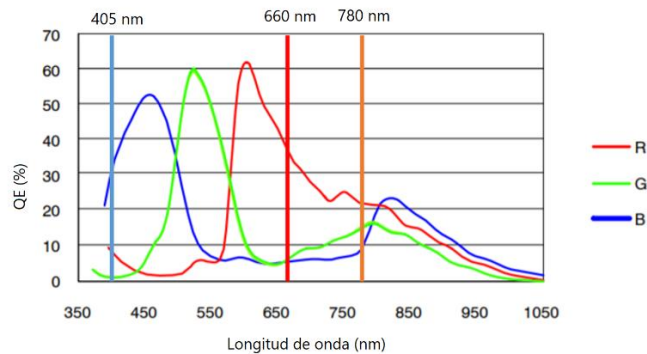


Figura 32. Características espectrales del sensor.

Como vemos en la Figura 32, las longitudes de onda de los láseres no están sintonizados con las frecuencias principales de los filtros de los canales RGB del sensor, por tanto, cuando encendemos cualquiera de las tres fuentes de luz, veremos un holograma en todos los canales de la cámara. Así pues, cuando los tres láseres están activos, en cada uno de los canales vamos a ver una mezcla de los tres hologramas generados por cada fuente de luz. Esto introduce señales espurias en cada canal que hay que eliminar para reconstruir una imagen de buena calidad.

El proceso de eliminación de dichas imágenes espurias es mediante un proceso de calibración. Primero se captura una imagen sin objeto, con cada uno de los láseres por separado para saber la contribución real (la teórica se puede sacar de la Figura 32 pero hemos preferido hacerlo experimental) que entra de cada láser en cada canal RGB de la cámara. Este procedimiento proporciona las columnas de coeficientes de la matriz representada en la ecuación (62). Después, se encienden todos los láseres a la vez y se registra una nueva imagen que tendrá todas las contribuciones. Y tercero, podemos calcular la matriz de calibración con la que obtendremos los hologramas generados por cada una de las longitudes de onda.

$$\begin{pmatrix} CH_R \\ CH_G \\ CH_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} H_R \\ H_{IR} \\ H_B \end{pmatrix} \quad (62)$$

Según sabemos, la imagen de cada canal es una mezcla de tres hologramas de distintas longitudes de onda, cumpliendo la ecuación (62). Usando las imágenes sin objeto hemos medido la intensidad de luz (en valores de escala de grises) que llega a cada canal del sensor, y calculamos los valores de la matriz B.

Es sencillo ver que la matriz C de calibración es la inversa de la matriz A, y nos permite separar los hologramas independientes generados por cada longitud de onda (ecuación (63)).

$$C = A^{-1}$$

$$\begin{pmatrix} H_R \\ H_{IR} \\ H_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{13} \\ c_{21} & c_{22} & c_{23} \\ c_{31} & c_{32} & c_{33} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} CH_R \\ CH_G \\ CH_B \end{pmatrix} \quad (63)$$

Cuando ya tenemos resuelto el problema de la sintonización de los filtros de la cámara con las longitudes de onda de las fuentes, calibramos las diferencias de aumento y desplazamiento de los tres hologramas generados. Para esta segunda calibración, utilizamos un test de resolución USAF, del cual capturamos una imagen

y separamos las interferencias en cada uno de los canales, con la matriz C de calibración, y obtenemos los tres hologramas de cada una de las fuentes de iluminación. Cada uno de los hologramas se propaga hasta el plano objeto, siendo identificable la diferencia de escala y desplazamiento.

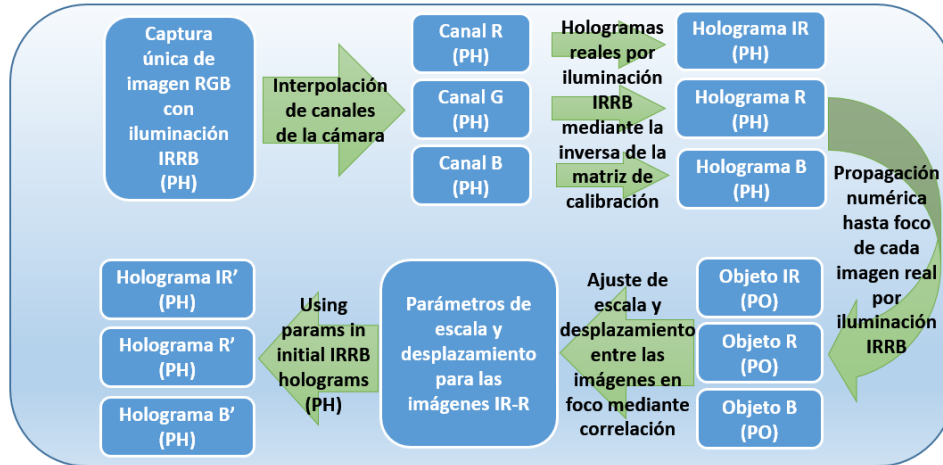


Figura 33. Diagrama de la calibración completa.

Manteniendo el objeto del láser B sin alterar, los objetos propagados IR y R se escalan a distintos tamaños para realizar la correlación con el objeto propagado B, dando resultado máximo cuando el aumento y desplazamiento coinciden. Estos resultados de escala y desplazamiento se pueden aplicar sin ningún problema sobre el holograma, previo a la propagación numérica. En la Figura 33 se puede ver un diagrama de la calibración al completo.

El prototipo se ha probado con muestras dinámicas en dos experimentos, uno con esperma vivo de cerdo y otro con microesferas. El tamaño típico de un espermatozoide de cerdo es de $6 \times 9 \mu\text{m}$ en lo que a la cabeza respecta, una longitud total de $55 \mu\text{m}$ y una anchura de cola de $2 \mu\text{m}$. Las muestras se han introducido en una cámara de conteo, de $100 \mu\text{m}$ de espesor disponible en el mercado, mediante una micropipeta.

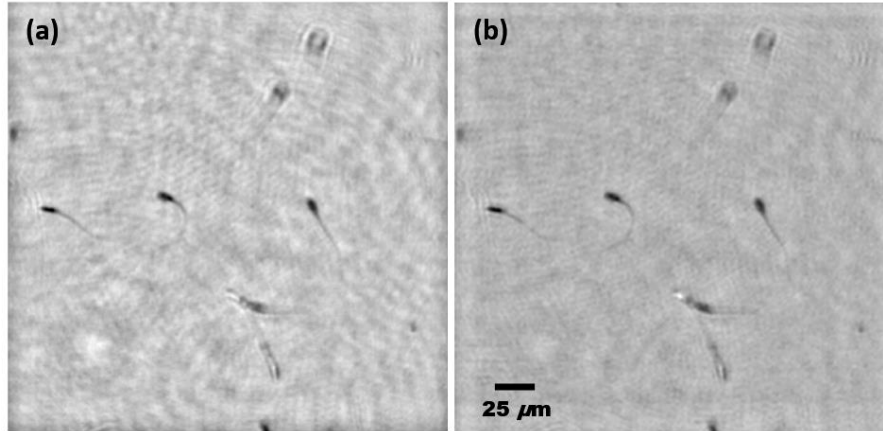


Figura 34. Resultados de MISHELF con espermatozoides vivos. Ambas imágenes representan la distribución de fase obtenida con (a) B-LHM y (b) IRRB.

Debido al movimiento rápido de las células de espermatozoides, se sustituyó la cámara Mightex por una AVT Mako G-419, de 90 imágenes por segundo a un tamaño de 1024×1024 píxeles, con tamaño de píxel de $5 \times 5 \mu\text{m}$. El resultado de aplicar la calibración y posteriormente el algoritmo MISHELF en una de las imágenes se puede ver en la Figura 34. Comparativamente, con respecto a la propagación del holograma creado con la longitud de onda de 405 nm , se ve una mejora de la SNR y un fondo más uniforme mientras conservamos el mismo detalle de resolución. La reducción del ruido hace que el final de la cola de los espermatozoides se pueda ver en el resultado del IRRB, algo que no sucede utilizando solamente la longitud B ya que queda oculto por el ruido.

Para el segundo experimento realizado, se utilizaron microesferas (Polybead® Microspheres) de poliestireno de $3.00 \pm 0.07 \mu\text{m}$ en suspensión en agua. Utilizando de nuevo la cámara Mightex se tomaron imágenes, a las cuales se le aplicaron los resultados de la calibración, para posteriormente, ser utilizadas como entrada al algoritmo MISHELF. Los resultados de dicho algoritmo se muestran en la Figura 35, donde se observan las mejoras de la calidad en cuanto SNR se refiere sin perder la resolución alcanzable con la longitud de onda más corta (405 nm).

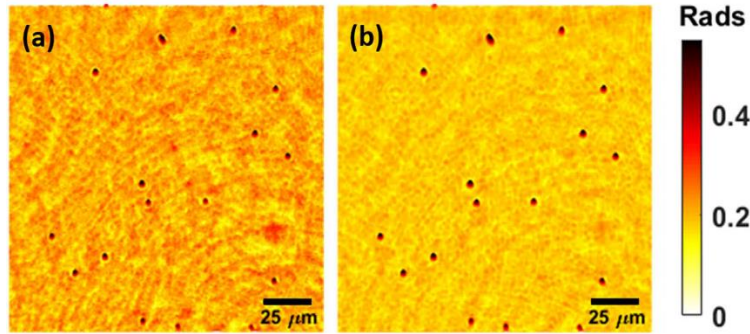


Figura 35. Resultados de MISHELF con microesferas, (a) B-LHM y (b) RIRB

Los resultados no solo se aprecian visualmente, sino que también se ven cuantitativamente, mostrándose a continuación en la Tabla 1.

Valor en radianes	B-LHM	MISHELF RIRB
Valor de fondo	0.18	0.18
Máximo valor de fase	0.59	0.59
Salto de valor de fase de las microesferas	0.41	0.41
Desviación estándar de valor de fase	0.033	0.017

Tabla 1. Resultados cuantitativos de las microesferas

Finalmente, podemos concluir que la técnica MISHELF es aplicable a montajes que no tienen sintonizadas las longitudes de onda de las fuentes de iluminación con los filtros del sensor utilizado para la captura de imágenes, siempre que se realice una calibración y se apliquen sus resultados a cada uno de los canales de la cámara. Esto permite generalizar la técnica ampliando el abanico de hardware susceptible de ser empleado. Además, se construyó un prototipo para demostrar las capacidades de este algoritmo, empleando impresión 3D y utilizando materiales disponibles en el mercado dando lugar a un sistema portable de bajo coste. La validación experimental se ha realizado con muestra dinámica (semen y microbeads) y se ha mostrado una posible aplicación práctica del mismo (análisis de muestra seminal).

3.3. Publicación 3: “Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy”

En esta sección se presenta la publicación número [3] de las incluidas en esta tesis que, en esencia, sigue la misma línea que la anterior, y aunque se ha construido un prototipo para capturar simultáneamente cuatro hologramas con cuatro longitudes de onda distintas, no se ha podido realizar a bajo coste, pues en este caso se busca una mejora usando una longitud de onda más y no ha sido posible encontrar ni fuentes de iluminación económicas ni sensores con más de tres canales a un precio razonable para un prototipo de laboratorio.

Como primer cambio destacamos la cámara utilizada, cuyo sensor, en lugar de ser el clásico RGB con un macrobloque 2x2 (dos píxeles sensibles al verde, uno al rojo y el restante al azul), pasa a ser un sensor RGBW (sensible al rojo, verde, azul y a un rango extenso de longitudes de onda).

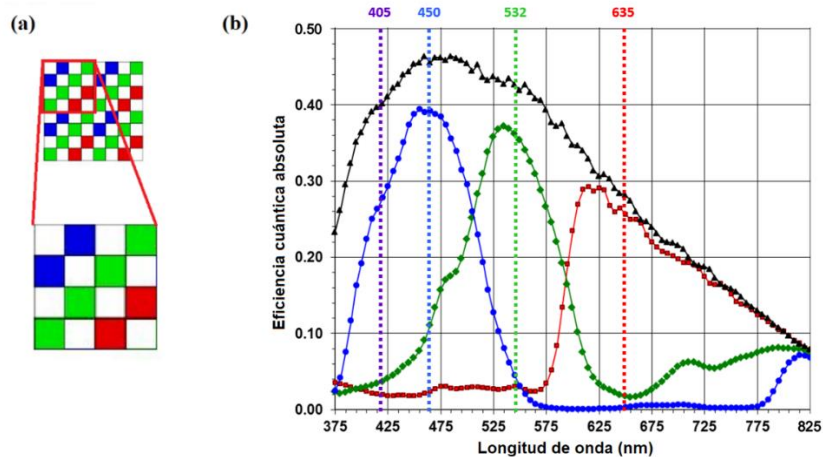


Figura 36. (a) Esquema del sensor RGBW y (b) Sensibilidad a las longitudes de onda de cada canal.

La cámara que se ha utilizado es una Viewworks VA-8MG2-C10CA0, de tamaño de pixel de $5.5 \mu\text{m}$, con un total de 3296×2474 píxeles, funcionando a 10 fps en resolución máxima. El sensor que integra esta cámara es un Kodak Truesense, que

Martín Sanz, Jose Ángel Picazo-Bueno, Luis Granero, Javier García, and Vicente Micó, "Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHELF) microscopy," *Opt. Lasers Eng.* 110, 341–347 (2018).
doi: 10.1016/j.optlaseng.2018.06.020

está formado por bloques de 4x4 píxeles (Figura 36), de los cuales, la mitad son sensibles a un amplio espectro frecuencial (canal pancromático), un cuarto son sensibles al verde y los otros dos octavos son sensibles al azul y al rojo respectivamente. Para la iluminación, necesitamos cuatro longitudes de onda, y para ello se ha utilizado una fuente de diodos acoplados a fibra óptica de la marca Blue Sky Research, modelo SpectraTec 4 STEC4, cuyas longitudes de onda son 405/450/532/635 nm. Los diodos están acoplados a una fibra monomodo, lo que provoca que la apertura numérica de sea bastante limitada (~ 0.1 rango).

Ya comentado anteriormente, se ha creado un prototipo (Figura 37) utilizando un software CAD comercial (Rhinoceors) para su diseño y fabricado usando la técnica de Modelado por Deposición Fundida (Fused Deposition Modeling with ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene)).

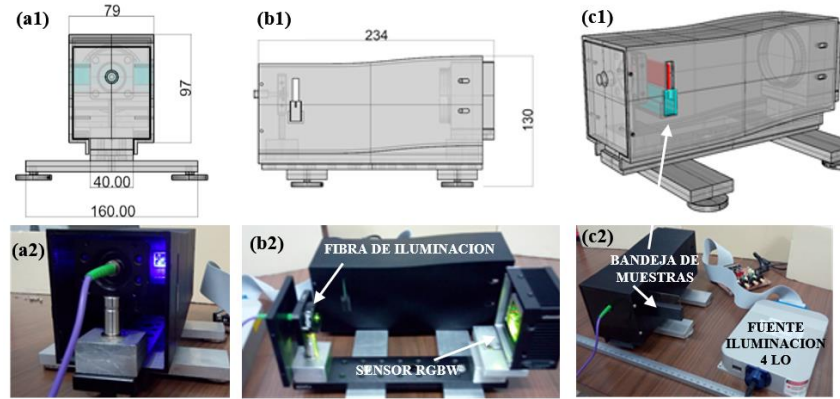


Figura 37. Diferentes vistas del prototipo en forma esquemática (primera fila) y fotografía (segunda fila), las medidas son en milímetros.

Como es apreciable en las imágenes, la cámara se sitúa en un extremo del prototipo, y la fuente de iluminación en el opuesto. La bandeja deslizable donde se coloca la muestra está emplazada cerca de la iluminación para generar aumento. La distancia entre la fuente y la muestra (z) es de aproximadamente 15 mm, y la distancia entre la muestra y la cámara (d) está en torno a 175 mm, que reescribiendo la ecuación (42) y referenciada la Figura 12, la nueva nomenclatura sería:

$$\beta'_{geom} = \frac{y_q}{y_p} = \frac{(d + z)}{z} \quad (64)$$

con lo que podemos calcular el aumento teórico $\beta'_{geom} \cong 12.6x$.

El algoritmo utilizado de nuevo es MISHELF, dividido en dos bloques, el primero es un procesado digital sobre cada uno de los canales para obtener los hologramas generados por cada una de las longitudes de onda, que serán el punto de partida del segundo bloque, que realiza el cálculo de la fase mediante un algoritmo de convergencia rápida. Si bien este primer bloque se puede realizar de forma teórica utilizando los valores de la gráfica (b) de la Figura 36, en la que podemos determinar la eficiencia de cada canal para cada una de las cuatro longitudes de onda, también podemos realizar la calibración de forma experimental. Dicha calibración se consigue sin utilizar un objeto, iluminando con cada una de las longitudes de onda independientemente, y grabando cuatro imágenes de forma secuencial. De cada una de las imágenes se obtienen cuatro canales, y la intensidad media de cada canal sirve para rellenar los valores de la matriz de la ecuación (65):

$$\begin{pmatrix} CH_R \\ CH_G \\ CH_B \\ CH_W \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} H_R \\ H_G \\ H_B \\ H_V \end{pmatrix} \Rightarrow \quad (65)$$

$$\vec{I}_{det} = M_{cal} \cdot \vec{I}_{em}$$

Cada columna de la matriz representa cuanto se activa la detección de cada canal según la longitud de onda empleada. Y una vez calculados los valores utilizamos la ecuación (66), para obtener los hologramas originales partiendo de la mezcla de los hologramas detectados.

$$\vec{I}_{em} = M_{cal}^{-1} \cdot \vec{I}_{det} \quad (66)$$

Una primera validación experimental se realizó con un test de resolución USAF, utilizando una única captura de imagen con todas las longitudes de onda activas. Si nos remitimos a la Figura 36 (b), observamos que existe poca contribución en los canales entre las distintas longitudes de onda, el canal rojo y el canal verde están muy sintonizados con los 635 nm y 532 nm respectivamente, y son muy poco sensibles a los 450 nm y 405 nm. En el caso del canal azul, se mezclan los 450 nm y 405 nm, y en el canal pancromático se mezclan todos los hologramas.

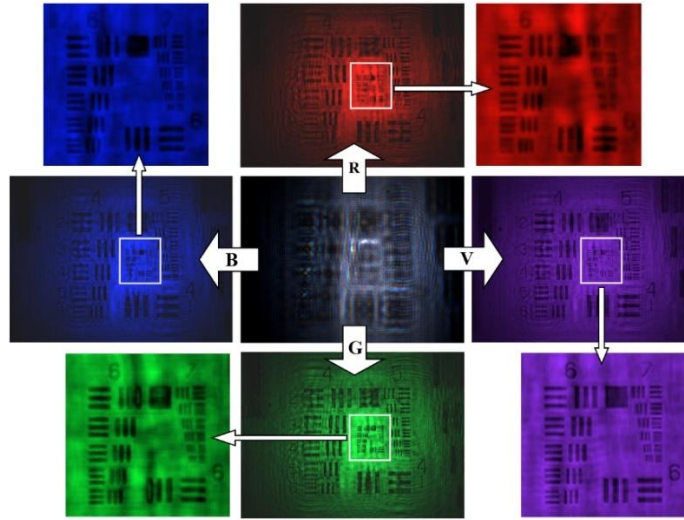


Figura 38. Holograma RGBW en el centro, en cada uno de los lados se muestran las cuatro RGBV imágenes en foco con una parte ampliada.

Capturando un holograma en una única imagen, podemos separar sus canales utilizando la interpolación cromática (*demosaicing*). Con todas las imágenes de cada canal y haciendo uso de la calibración, podemos obtener los hologramas generados por cada longitud de onda y propagarlos hasta que estén en foco (Figura 38). Estos hologramas se utilizan como entrada del algoritmo MISHELF que ya conocemos.

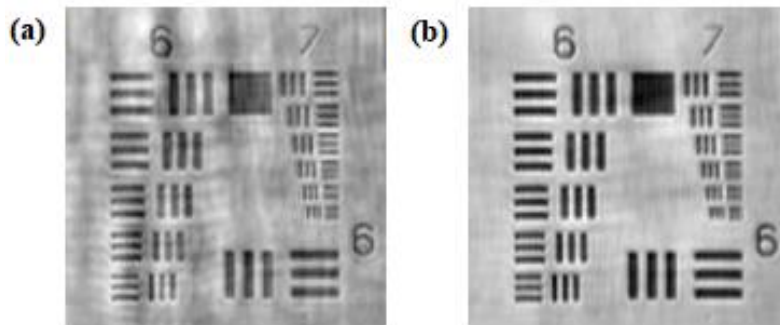


Figura 39. Parte ampliada del test de resolución, (a) con longitud de onda V, (b) con algoritmo MISHELF

Es apreciable en la Figura 39 como el algoritmo MISHELF (b) obtiene un resultado mucho más limpio en lo que al ruido se refiere con respecto a la propagación del holograma generado por la longitud de onda V (a). No obstante, esto ya fue concluido en las secciones anteriores y ahora nos vamos a centrar más en el estudio de la relación señal a ruido (SNR) puesto que se busca una mejora al respecto.

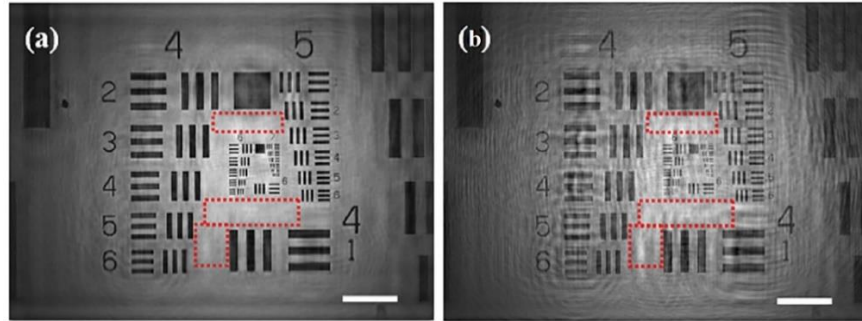


Figura 40. (a) Objeto generado con el algoritmo MISHELF, (b) objeto resultante de la propagación del holograma V. La barra de escala situada en la esquina inferior derecha corresponde a 200 μm . Los rectángulos rojos marcan las zonas en las que se ha calculado la desviación estándar del fondo.

Visualmente se aprecia la reducción de ruido entre el objeto generado con MISHELF y el objeto generado por la propagación del holograma V (Figura 40 (a) y (b), respectivamente), pero además, para obtener cuantitativamente un valor de mejora, analizamos el nivel de ruido comparando la desviación estándar normalizada de las zonas interiores de los rectángulos rojos. La media de dichos valores son 0.058 y 0.081 para el objeto RGBV y sólo V respectivamente, lo que supone una mejora de un factor 30% aproximadamente.

Una segunda validación experimental (Figura 41) se ha llevado a cabo con un conjunto estático de microesferas (90 μm de diámetro) introducidas en una cámara de conteo de 100 μm de espesor. Se puede ver la mejora progresiva cada vez que se añade una longitud de onda al algoritmo MISHELF.

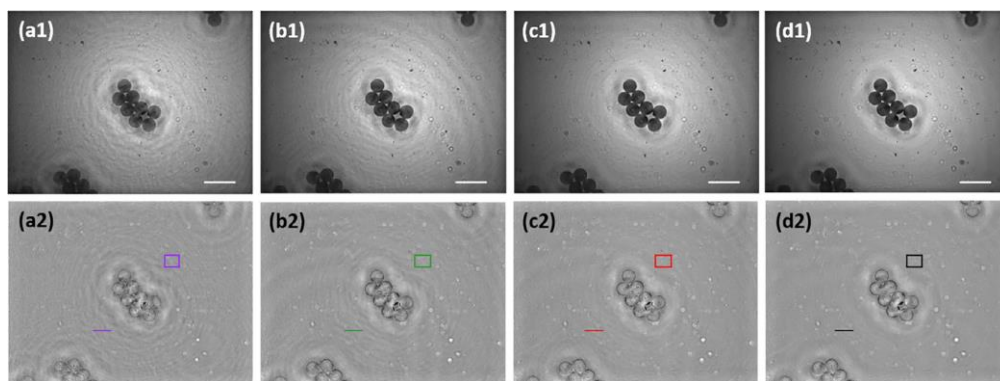


Figura 41. Resultados experimentales de las microesferas. En la fila (1) y (2) se muestran imágenes de intensidad y fase respectivamente. En las columnas, (a) sólo con iluminación V, (b) iluminación V-G, (c) iluminación V-G-R, (d) iluminación V-B-G-R. Las líneas de escala de las esquinas inferiores derecha son 200 μm .

Esta comparativa nos sirve para realizar diferentes comentarios. El primero, y más sencillo, visualmente nos permite observar la mejora en los cambios de valor del fondo de las imágenes de intensidad, cuantas más longitudes de onda se utilizan, mejor es la uniformidad del fondo. Para tener también una idea cuantitativa de las mejoras, se han utilizado fragmentos de las imágenes de fase. Por un lado, en la Figura 42 (a), se muestra una pequeña partícula de polvo adherida a un lado de la cámara de conteo, de la cual se muestra el valor de fase de una sección de dicha partícula, y podemos ver que sólo con la iluminación V, el ruido no permite resolverla.

Por otra parte, en la Figura 42 (b), se muestra la línea sobre el fondo de la Figura 41, que a medida que se suman longitudes de onda al algoritmo MISHSELF, tiene una menor oscilación y tiene una variación más suave, lo que significa que el fondo es más constante debido a la reducción de los niveles de ruido.

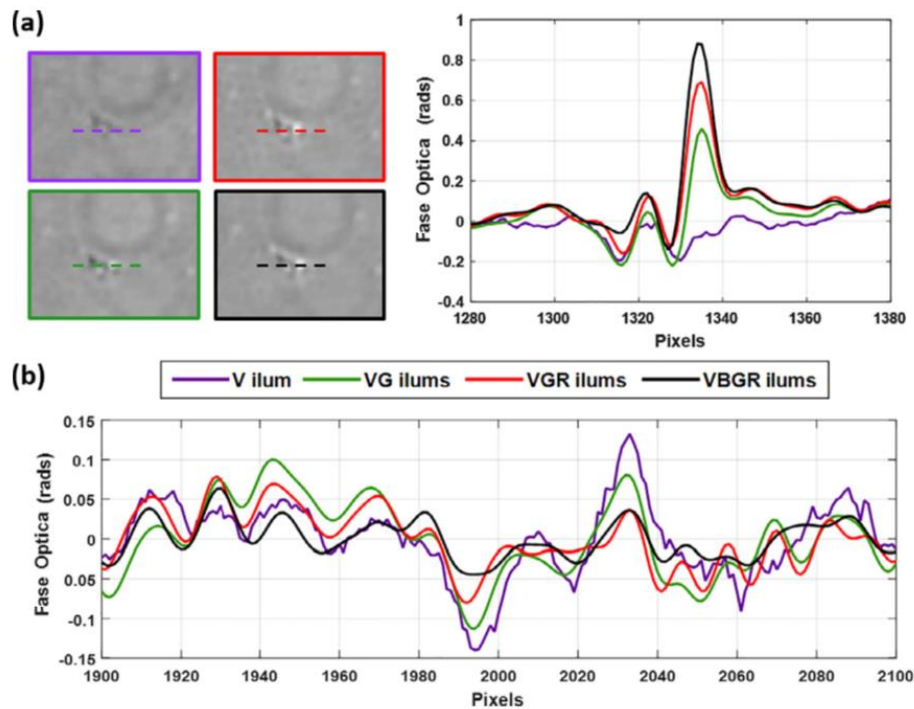


Figura 42. Extraídas de la Figura 41, (a) aumento de las ROIs rectangulares de las imágenes de fase, cuyos valores de las líneas discontinuas se muestran en gráfico de la derecha; (b) representan los valores de fase de las líneas continuas de la Figura 41.

Finalmente, y como conclusión, podemos decir que queda demostrado que el algoritmo MISHELF puede ser extendido a más longitudes de onda, mejorando los resultados a medida que se van añadiendo canales de multiplexado, siendo la tecnología del sensor la única limitación que presenta el método.

3.4. Publicación 4: “Dual-mode holographic microscopy imaging platform”

Añadimos en esta sección un resumen de la publicación [4] incluida en esta tesis. Abordaremos uno de los problemas que tiene el sistema MISHELF y que no es otro que el reducido campo de visión. Habitualmente, la combinación de los hologramas con distintas longitudes de onda del algoritmo MISHELF se realiza en un montaje con bastante aumento con el fin de evitar problemas de muestreo de los hologramas registrados. De esta forma, la resolución viene dada por la longitud de onda más corta y mejoramos la imagen reduciendo ruido y aumentando contraste. El problema es que el aumento del sistema, junto al tamaño del CCD, nos da un campo de visión reducido. Por todo ello, presentamos una variación/mejora en el montaje experimental que define una plataforma dual simultánea y de tiempo real que combina las dos configuraciones clásicas de la holografía digital sin lentes: una en la que la muestra está cercana a la fuente divergente de iluminación (como en [1]-[2]-[3]) y se introduce un aumento considerable ($\sim 5x/15x$) y otra en la que el aumento está cercano a la unidad ($\sim 1x$).

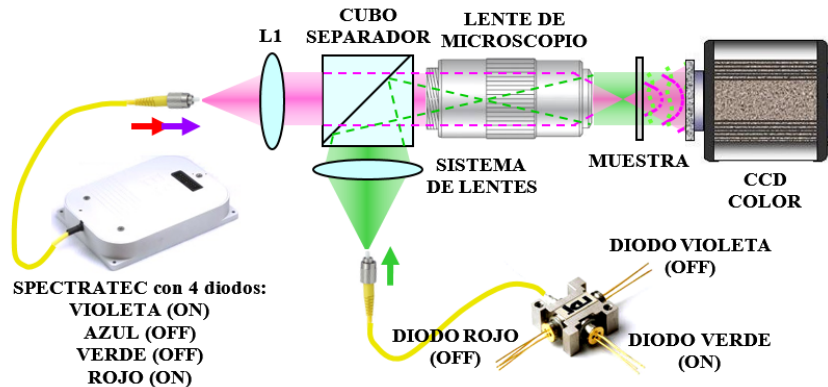


Figura 43. Esquemático del montaje dual de microscopía sin lentes.

El esquema propuesto (Figura 43) hace uso de tres longitudes de onda, aunque van a tener orígenes distintos, para ser finalmente combinados mediante un divisor de haz. Por un lado, se utilizarán dos longitudes de onda, B (450 nm) y R (635 nm), para la imagen de alta resolución (aquella con aumento mayor que 1), y por el otro, se usará G (520 nm) para la imagen de gran campo de visión (aquella con aumento $\sim 1x$).

La iluminación B y R se obtiene de la fibra óptica del dispositivo de Blue Sky Research (SpectraTec 4 STEC4-405/450/532/635 nm) que son colimados por la lente L1 (aunque esto variará en el montaje real por razones prácticas). Por el otro lado, la iluminación G (520 nm) procede de otro diodo acoplado a fibra (OSI Laser Diode, TCW RGS-400R, 450/520/638 nm), cuyo haz se hará convergente por un sistema de lentes. Ambas ramas de iluminación incidirán sobre un divisor de haz, aunque por caras distintas, y se combinarán en una misma dirección de propagación. De esta salida del divisor de haz, los haces de iluminación entran a un objetivo de microscopio (Mitutoyo M Plan Apo 10x, 0.28 NA) y el resultado es diferente para cada rama: la rama BR que viene colimada se convierte en divergente para proporcionar aumento (HR-LDHM, del inglés, High-Resolution Lensless Digital Holographic Microscopy) y la rama G que viene convergente, focalizando en el plano de Fourier del objetivo, se transforma en colimada para dar un gran campo de visión (WF-LDHM, del inglés, Wide Field Lensless Digital Holographic Microscopy). Esta iluminación dual incidirá sobre la muestra, que se sitúa justo después de la focalización de los haces BR y a una distancia un poco mayor está el sensor CMOS (cámara a color sin carcasa Mightex USB3.0, 2560 x 1920 pixeles, 2.2 μm de tamaño de pixel, con una velocidad de captura máxima de 14 fps).

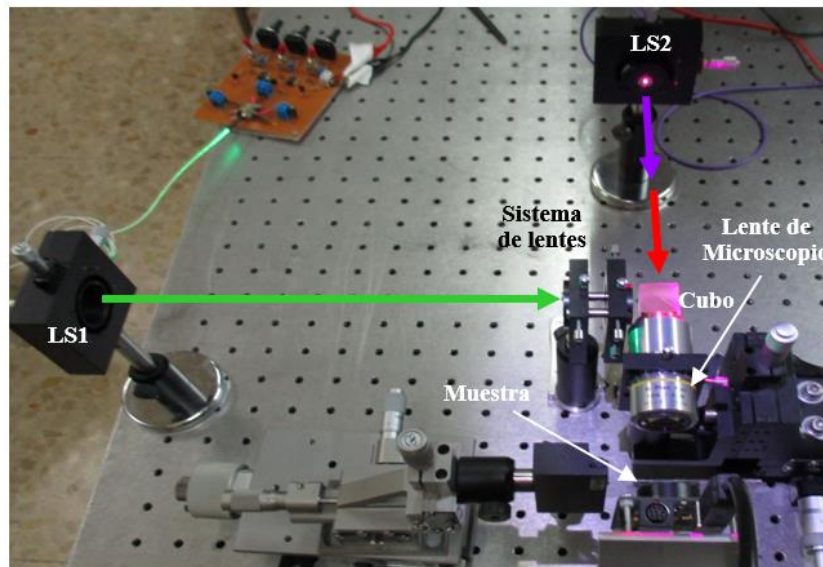


Figura 44. Fotografía del montaje dual en el laboratorio.

En el sistema real montado en el laboratorio (Figura 44), por conveniencia, se ha eliminado la lente colimadora de la rama BR, alejando lo suficiente la fuente de iluminación, de forma que los haces llegan al divisor de haz cubriendo toda su superficie, con muy poca curvatura y con intensidad muy uniforme. Lo mismo sucede con la rama G, que la fibra se ha alejado bastante del sistema de lentes, que podría sustituirse por una lente, pero no fue posible debido a la falta de lentes necesarias, para cubrir la lente con un haz de poca curvatura e intensidad uniforme.

De este montaje podemos destacar los siguientes aspectos:

- El objetivo de microscopio se utiliza para la iluminación de ambas ramas y no es posible utilizarlo para hacer imagen de la muestra, siendo además, el campo visual máximo de este montaje unos 20 mm².
- El uso de un objetivo cuya distancia de trabajo es larga (34 mm) elimina el problema de las configuraciones típicas de HR-LDHM que deben estar cerca de la fuente puntual de iluminación (fibra óptica o *pinhole*).
- De forma contraria, las configuraciones típicas de WF-LDHM precisan de tener la muestra muy cerca del sensor, dificultando la manipulación. En cambio, en nuestro montaje, la muestra se sitúa aproximadamente a un 1 cm de separación con respecto al sensor.
- El objetivo de microscopio se puede cambiar, teniendo en cuenta el compromiso entre apertura numérica (que proporciona el límite de resolución) y el diámetro del haz colimado necesario para cubrir el sensor.
- El láser G es el utilizado para WF-LDHM, que tiene mayor número de píxeles en el sensor y es lo que, en última instancia, limita la resolución en esta configuración. Por otro lado, el láser B, se utiliza para la configuración HR-LDHM, puesto que es la longitud de onda que mejor resolución proporciona.
- El algoritmo MISHELF puede funcionar sólo con dos longitudes de onda, y aunque sería preferible utilizar más, no es crítico.

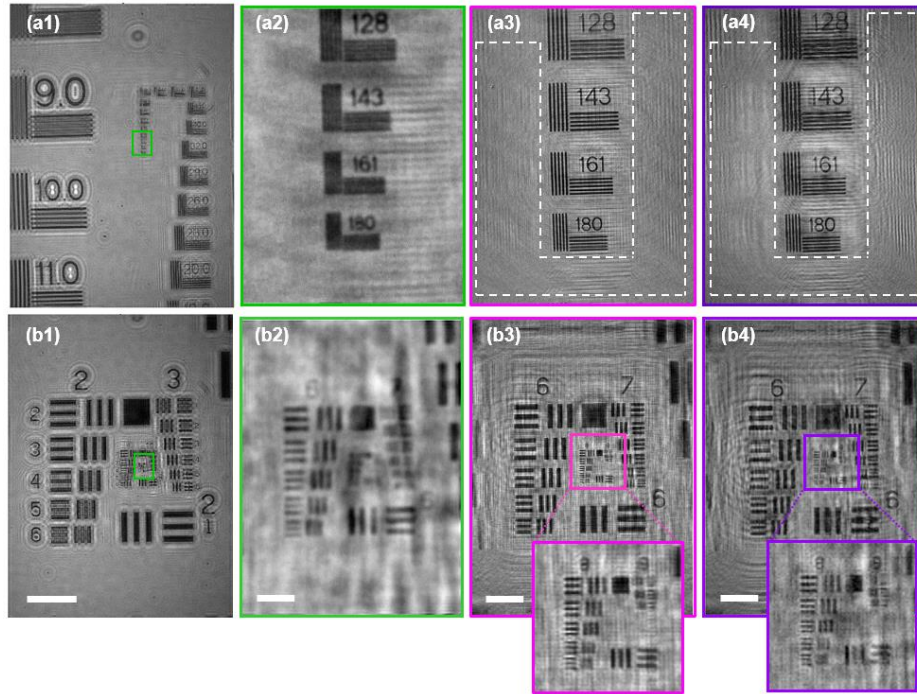


Figura 45. Resultados de objetos estáticos. Tests de resolución fila (a) NBS 1963A y fila (b) USAF 1951. La columna (1) muestra el WF generado por el láser B, en (2) vemos una ampliación de una región de (1) marcada en verde, y en (3) y (4) vemos la diferencia de la rama HR utilizando el algoritmo MISHELF y sólo con B respectivamente. Las regiones marcadas con línea discontinua en (a3) y (a4) se utilizarán para calcular la desviación estándar del ruido. Las barras de escala de la fila (b) corresponden a 1mm para la primera columna y 50 μm para las demás.

La validación experimental del sistema incluye tanto muestras estáticas como muestras dinámicas. Para el caso de las estáticas, se han utilizado dos tests de resolución diferentes, que nos sirven para poder determinar el tamaño del campo de visión amplio y medir la resolución del campo ampliado.

En la Figura 45, se muestran las imágenes experimentales de sendos tests de resolución, un NBS 1963A en la primera fila y un USAF 1951 en la segunda. En la primera columna vemos todo el campo de visión que podemos abarcar con el sistema propuesto, mientras que en las demás vemos el detalle de alta resolución. Como es esperable, cualitativamente se aprecia que la resolución de la columna (2) es peor que la de (3) y (4), y a su vez, la comparativa entre las columnas (3) y (4) nos muestra que la realizada con el algoritmo MISHELF (3) tiene menos ruido que aquella generada solo con la iluminación B (4). La mejora de la columna (3) con respecto a la (4) también se comprueba cuantitativamente cuando calculamos la

desviación estándar del fondo y obtenemos unos valores normalizados de $STD(BR) = 0.053$ y $STD(B) = 0.072$.

De estas imágenes podemos dar, de forma cuantitativa, los tamaños del campo de visión de la rama G, que son aproximadamente 4.6×6.1 mm, con una resolución límite de 128 pl/mm, que equivalen a unos $7.8 \mu\text{m}$. En la parte de la rama BR, el campo de visión es de $300 \times 400 \mu\text{m}$ y la resolución es de 575 pl/mm, que equivalen a unos $1.7 \mu\text{m}$.

Con muestras dinámicas se han realizado dos experimentos distintos, el primero con una solución acuosa con microesferas (Polybead® Microspheres) y el segundo con muestras de esperma humano vivo (facilitadas por Proiser I+D S.L.). En el experimento con microesferas se han utilizado tres tamaños distintos de éstas (3, 45 y $90 \mu\text{m}$ de diámetro), en una solución acuosa, donde las más abundantes eran las más pequeñas.

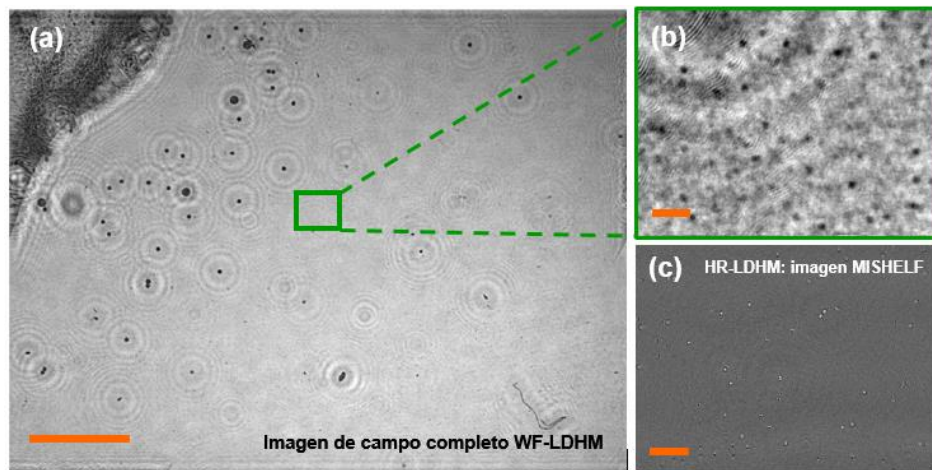


Figura 46. Resultados experimentales de las microesferas, (a) campo de visión ancho completo, (b) rectángulo verde ampliado de la imagen (a), y (c) imagen de fase de alta resolución de la misma región que (b) generado con la rama BR. La barra de escala de (a) corresponde a 1 mm, y la de (b) y (c) corresponde a $50 \mu\text{m}$.

Resultados comparativos pueden verse en la Figura 46, donde vemos la imagen de campo completo en (a), y la comparativa entre (b) y (c) que corresponden a la misma zona de la muestra, pero propagando los hologramas de la rama G y la rama BR respectivamente. Las microesferas de $45 \mu\text{m}$ y $90 \mu\text{m}$ suelen pegarse a los laterales de la cámara de conteo y se quedan estáticas.

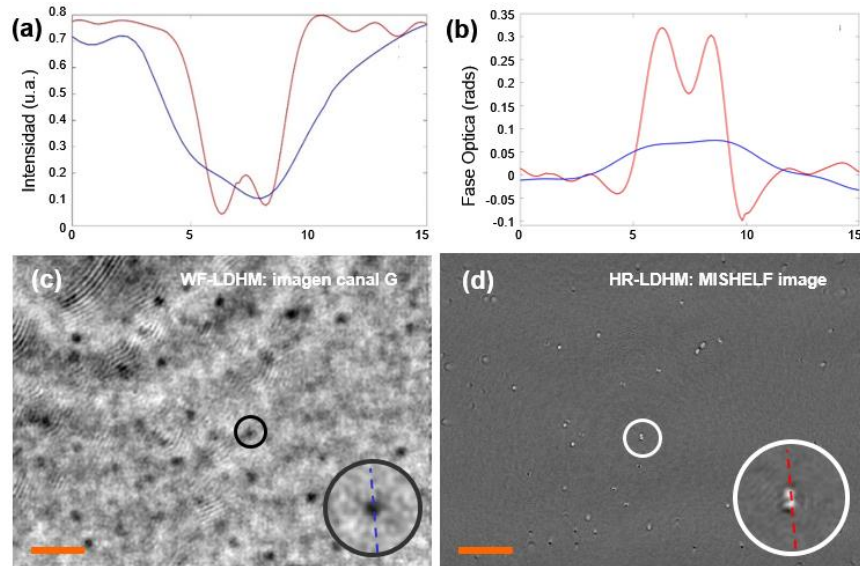


Figura 47. Resultados experimentales de las microesferas, (a) y (b) gráficos de intensidad y fase de las líneas discontinuas en (c) y (d), (c) imagen WF-LDHM de una zona del campo entero, y (d) misma zona con HR-LDHM.

Pero lo más importante es que las microesferas de $3\ \mu\text{m}$, según los cálculos teóricos, quedan por debajo del límite de resolución de la rama G, pero entran dentro de la resolución ofrecida por la rama BR. Se ofrece una visión cuantitativa de ello en la Figura 47, donde en (a) y (b) vemos el gráfico correspondiente a los valores de intensidad y fase, respectivamente, de las líneas discontinuas de (c) y (d), que muestran la misma región de la muestra pero capturadas con cada una de las ramas. Con esto queda claro que la rama HR-LDHM es capaz de resolver el conjunto de dos microesferas, mientras que la rama WF-LDHM no llega a la resolución necesaria.

El segundo experimento utiliza una cámara de conteo de $100\ \mu\text{m}$, rellena con muestras de esperma humano vivo. La longitud de la cabeza de la célula tiene una longitud y anchura de unas 4 y $5\ \mu\text{m}$ aproximadamente. La célula tiene una longitud total de $45\ \mu\text{m}$ y la cola tiene una anchura de $1\ \mu\text{m}$. La rama G proporciona una resolución que no es suficiente para determinar el espesor de las células, mientras que la rama BR con el algoritmo MISHELF pueden resolver las células.

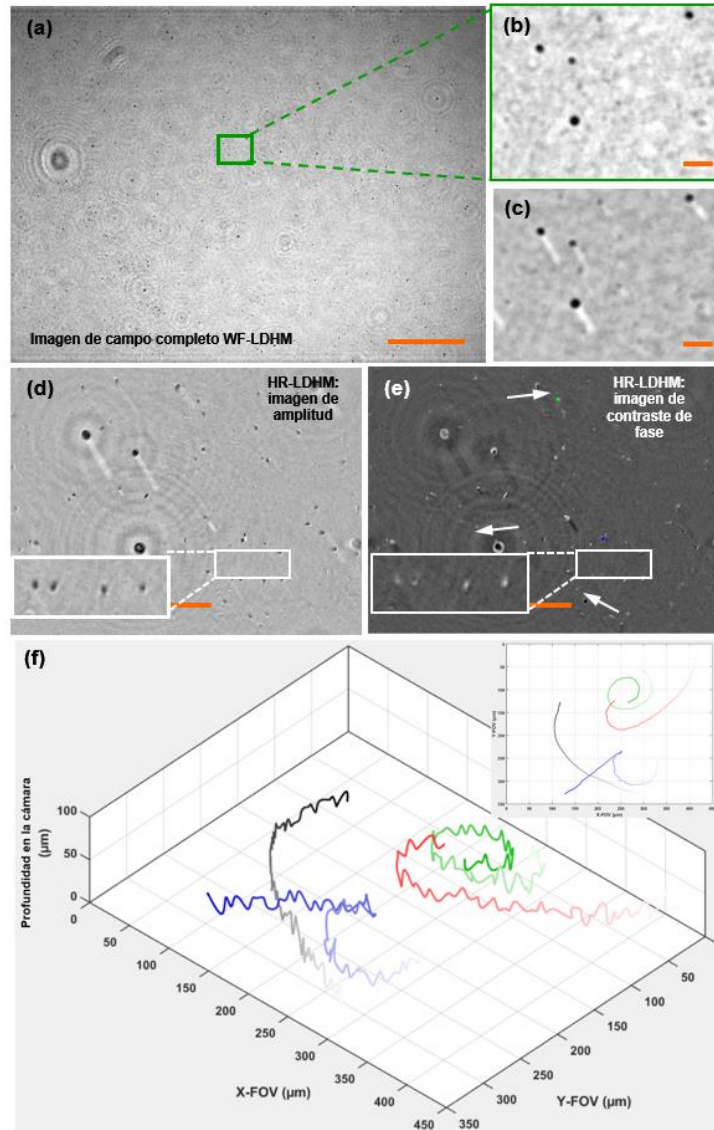


Figura 48. Resultados experimentales dinámicos de muestras vivas de espermatozoides. (a) campo entero de la rama WF-LDHM, (b) y (c) ROI del rectángulo verde en (a) antes y después de la resta de la media, respectivamente; (d) y (e) imágenes de amplitud y contraste de fase positiva, respectivamente, proporcionados por la rama HR-LDHM; (f) gráfica de las trayectorias de cuatro células marcadas con códigos de color en (e). Las barras de escala naranja corresponden a 1 mm para (a) y 50 μm para el resto.

En la Figura 48, se muestran las imágenes de la rama G en (a), (b) y (c), mientras que en (d) y (e) vemos las imágenes de la rama BR que tienen mayor resolución que las anteriores. Ya que la cámara utilizada tiene 100 μm de espesor, no es posible tener en foco todas las células en una misma imagen. Sin embargo, siguiendo distintos

criterios para amplitud y fase que pueden ser implementados numéricamente nos permite saber si una célula está enfocada, y por tanto, podemos conocer su posición axialmente, por ello, podemos determinar las trayectorias en 3D a lo largo del tiempo de las células. Finalmente, en (f) vemos el gráfico de la trayectoria de varias células de esperma dado que este sistema es válido para grabar muestras dinámicas.

Podemos concluir que se ha demostrado la utilidad de tener dos campos de visión distintos, por un lado, alcanzando gran superficie de análisis de la muestra, mientras que por la otra parte se alcanza una alta resolución permitiendo observar las partes más pequeñas de células de esperma humano. Esta versatilidad se puede conseguir con un prototipo que permite la captura simultánea de ambas ramas, pudiendo utilizarse con muestras dinámicas a tiempo real.

3.5. Publicación 5: “Variable zoom digital in-line holographic microscopy”

En la última publicación incluida en esta tesis [5], se buscaba mitigar el problema del campo de visión reducido que teníamos en la configuración típica del algoritmo MISHELF a la vez que se simplificaba el sistema experimental propuesto en la sección anterior. Si bien en esta publicación no se utilizan distintas longitudes de onda como se ha venido haciendo a lo largo de las publicaciones anteriores, mostramos lo que podríamos considerar una continuación natural de la publicación anterior: una variación de aumento continuo entre ambas configuraciones extremas sin modificaciones mecánicas en la posición de los diferentes componentes. Para realizar el cambio de aumento se ha hecho uso de una lente ajustable eléctricamente (ETL, del inglés, Electrically Tunable Lens), que modifica la posición axial de la fuente de iluminación que tiene un efecto directo en el aumento (desde $\sim 15X$ hasta $\sim 35X$ para la configuración seleccionada) y el campo de visión en un factor 5 aproximadamente.

El montaje óptico adecuado para este experimento se puede ver en la Figura 49. Como fuente de iluminación se utiliza un diodo láser acoplado a fibra (Blue Sky Research, SpectraTec 4 STEC4, 405 nm), que será colimado con una lente de 120 mm de distancia focal (lente CL, un doblete acromático de la marca QiOptiq).

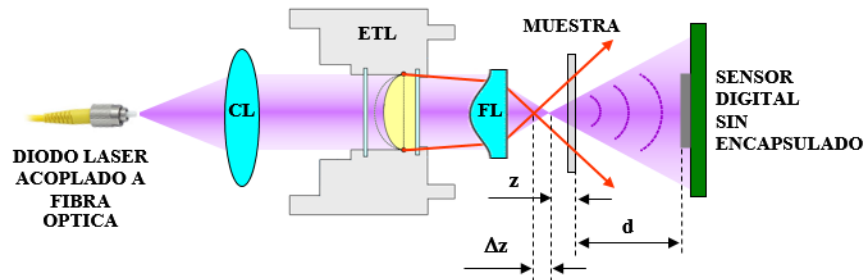


Figura 49. Montaje óptico propuesto para el aumento variable con DIHM. CL, lente colimadora; ETL, lente ajustable eléctricamente; FL, lente de focalización.

Una vez colimado, el haz de iluminación emitido por la fibra óptica pasa a través de la lente ETL (Optotune EL-10-30-C-VIS-LD-MV), que en condición de cero dioptrías, seguirá colimado hasta la lente de focalización FL (lente esférica de Thorlabs de 0.5 NA). La distancia, que es variable, entre el punto de focalización del haz y la muestra es de aproximadamente 0.5 mm. Para registrar el holograma se ha utilizado un sensor Mightex USB3.0 monocromo, sin carcasa, de 2560x1920 píxeles, de 2.2 μm de tamaño de píxel, que se sitúa a una distancia de 12.5 mm de la muestra. Los elementos de dicho montaje se han colocado sobre soportes micrométricos para tener mayor precisión en la medida de distancias. Usando todos los parámetros mencionados anteriormente, el aumento teórico del sistema puede calcularse mediante la ecuación (42) que reescrita con los parámetros de la Figura 49 sería:

$$\beta'_{geom} = \frac{y_q}{y_p} = \frac{z + d}{z} \quad (67)$$

siendo $z = 0.5\text{mm}$ y $d = 12.5\text{mm}$ obtenemos un valor de aumento $\beta'_{geom} = 26X$, y un valor de apertura numérica igual a $NA = \sin\left(\text{atan}\frac{2560*2.2e-3}{2*12.5}\right) = 0.22$, por lo que el límite de resolución será $\rho = \frac{\lambda}{NA} = 1.85\mu\text{m}$.

Este análisis es válido cuando no se aplica ningún voltaje a la ETL, el análisis anterior es válido, puesto que la lente produce 0 dioptrías de potencia y nombraremos este estado como “ETL a 0D”. Pero a la ETL se le puede aplicar un voltaje tanto positivo como negativo dando lugar a estados extremos de 6 dioptrías y -2 dioptrías, que denominaremos “ETL a 6D” y “ETL a -2D”. El voltaje positivo aumenta la potencia óptica de la ETL, y el voltaje negativo la disminuye. Cuando la potencia óptica de la ETL se incrementa, el punto focal de la fuente se aleja de la muestra disminuyendo el aumento. Este incremento de la distancia de la muestra al punto de focalización de la fuente puede calcularse mediante la fórmula (68):

$$\Delta z = \frac{f'_{FL}{}^2}{f'_{ETL} + f'_{FL}} \quad (68)$$

Siendo f'_{FL} y f'_{ETL} las distancias focales de FL y ETL, respectivamente. Cabe destacar que la ecuación (68) no es exacta, pues hemos asumido que ambas lentes (FL y ETL) son lentes delgadas situadas en la misma posición axial. Sin embargo, esta primera aproximación de valores teóricos nos resultará muy útil para el posterior análisis que se realizará mediante un test de resolución. Utilizando la ecuación (68) y aplicando el voltaje positivo máximo a la ETL, resulta tener una potencia óptica de 6D con una $f'_{ETL} = 166.67$ mm, que introduce un Δz positivo de 0.366 mm entre

la fuente y la muestra. Este incremento se traduce en una reducción del aumento, pasando de 26X a 15.4X. Obviamente, cuando el voltaje aplicado es el menor posible, siendo este negativo, la potencia de la lente pasa a ser de -2D, donde la $f_{\text{ETL}} = -500$ mm, que tendrá un Δz de -0.130 mm. Esto significa que la distancia entre muestra y fuente de luz se acorta y el aumento, en este caso pasará a ser de 34.8X aproximadamente.

Para la demostración experimental del sistema, nos valdremos de un test de resolución USAF, que nos permitirá medir cuantitativamente los resultados. Tres configuraciones de la ETL son las que utilizaremos para registrar los hologramas y comprobar los resultados, que son las anteriormente denominadas “ETL a 6D”, “ETL a 0D” y “ETL a -2D”.

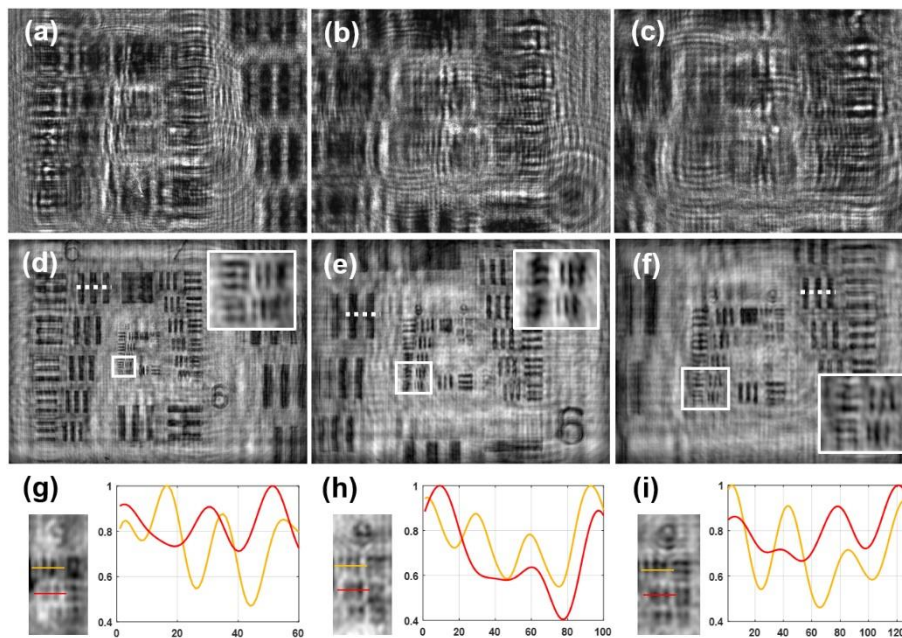


Figura 50. Validación experimental utilizando un test de: (a)-(b)-(c) son los hologramas registrados en-línea cuando aplicamos voltaje positivo-cero-negativo a la ETL; (d)-(e)-(f) son las imágenes en foco y los cuadros interiores son una ampliación de los dos últimos Elementos del Grupo 8; y (g)-(h)-(i) incluye el Grupo 9 con gráficos transversales sobre los Elementos 1 (naranja) y 2 (rojo) para mostrar el límite de resolución.

Los hologramas registrados por la cámara se pueden ver en la Figura 50, concretamente en la primera fila de imágenes, correspondientes a (a)-(b)-(c), con voltaje aplicado a la ETL positivo-cero-negativo respectivamente. En la fila central, denominadas (d)-(e)-(f), observamos los objetos reconstruidos numéricamente,

siendo apreciable la diferencia del tamaño del campo de visión. También, para comprobar el límite de resolución, se han añadido unas ampliaciones de los Elementos 5 y 6 del Grupo 8. En la última fila, las figuras (g)-(h)-(i), muestran la ampliación del Grupo 9, incluyendo unas gráficas de la intensidad normalizada para los Elementos 1 y 2 de dicho grupo. Se observa un límite de resolución horizontal distinto al vertical debido a la naturaleza del sensor que tiene mayor número de píxeles en la dirección horizontal. Las barras verticales de los Elementos 5 y 6 del Grupo 8 están claramente resueltas, y el límite de resolución lo alcanzamos en el Elemento 1 del Grupo 9 que está resuelto en los tres casos, y ya no sucede lo mismo en el Elemento 2. En las figuras (g)-(h)-(i), las gráficas en naranja muestran tres valles correspondientes a las líneas del Elemento 1 del Grupo 9, mientras las gráficas en rojo, que corresponden al Elemento 2 del Grupo 9, ya no muestran las separaciones entre cada barra. Incrementar o disminuir la distancia de la fuente de luz a la muestra no cambia la apertura numérica del sistema, solamente afecta al aumento y el campo de visión, luego el límite de resolución será el mismo para todas las configuraciones de la ETL siempre y cuando el límite por muestreo sea satisfecho. El límite definido por el Elemento 1 del Grupo 9 es de $1.95 \mu\text{m}$ (512 pl/mm) que es compatible con la predicción teórica. Los resultados de la Tabla 2 han sido calculados utilizando el Elemento 2 del Grupo 6, señalados con líneas discontinuas en la Figura 50 (d)-(e)-(f).

	6D	0D	-2D
FOV ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	360x270	218x163	159x119
Factor M	15.6X	25.9X	35.4X

Tabla 2. Resultados experimentales del campo de visión y factor de aumento con la variación del voltaje de la ETL

Los resultados teóricos de la ecuación (67) han sido representados en el gráfico (a) de la Figura 51, asumiendo una distancia entre la muestra y el sensor de $d = 12.5 \text{ mm}$. Recordamos que los valores teóricos obtenidos para diferentes valores de la ETL a 6D, 0D y -2D son 15.4X, 26X y 34.8X respectivamente. Si los comparamos con los valores reales medidos en la Tabla 2, vemos que el cálculo teórico es bastante acertado.

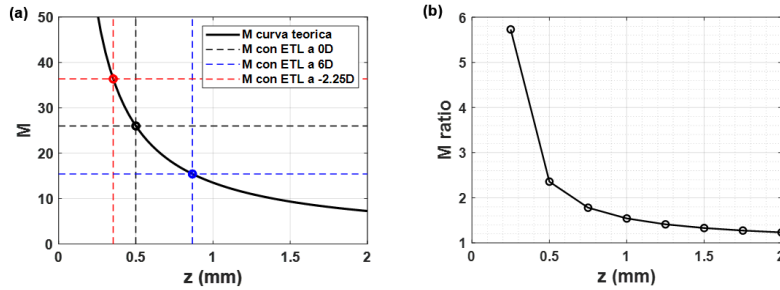


Figura 51. (a) Gráfico teórico de la curva del aumento y los puntos límite de la variación de la ETL; (b) ratio de aumento producido por la ETL. Ambas curvas están en función de la distancia z expresada en mm.

En el gráfico (b) de la Figura 51 se muestra la ratio de aumento que la ETL genera en función de la distancia z para la ETL a 0D. La ratio está definida como el coeficiente entre el aumento proporcionado entre el mínimo y el máximo de voltaje, que es, $M(-2D)/M(6D)$. Es destacable que cuanto menor es la distancia z (considerada para 0D), mayor es la ratio de aumento. Por tanto, la ETL es útil cuando la configuración es con la fuente de iluminación próxima a la muestra, mientras que resulta de poca utilidad cuando la muestra permanece muy cercana al sensor. En la configuración que hemos utilizado, la ratio M es de 2.26, lo que significa que el campo de visión cambia en un factor de $(2.26)^2$.

Una validación experimental con muestras de células de próstata se ha realizado para comprobar los efectos en la fase de la modificación del voltaje aplicado a la ETL. Las muestras utilizadas corresponden a células fijas cancerosas de próstata. En la Figura 52 (a) y Figura 52(b) se muestran las intensidades de las reconstrucciones numéricas correspondientes a la ETL a 6D y ETL a -2D, respectivamente. La zona marcada con línea discontinua señala el campo visualizado cuando el aumento es máximo.

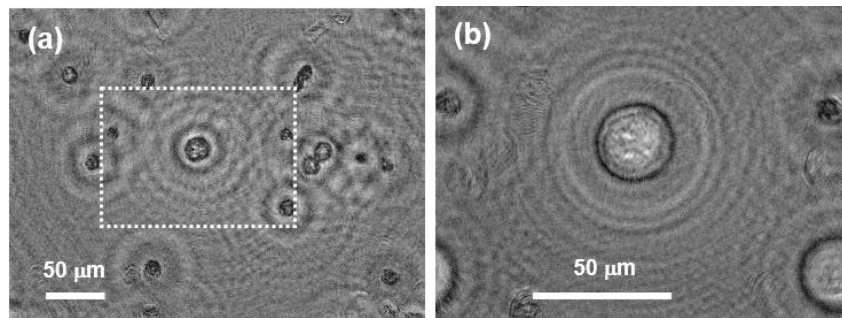


Figura 52. Validación experimental utilizando células de próstata cancerosas: (a) imagen en foco de intensidad de las células cuando la ETL está con voltaje positivo máximo (ETL a 6D) y (b) lo mismo para un voltaje mínimo (ETL a 2D).

Para comprobar los efectos no deseados de la ETL, se han tomado imágenes con la ETL a 0D y eliminándola del montaje, cuyos resultados se muestran en la Figura 53 (a) y (b) respectivamente. La célula central se representa en un mapa 3D en la Figura 53 (c) y (d), y en ellas se aprecia que la reconstrucción de fase es buena en ambos casos. Además, el hecho de que la contribución al ruido debido a la ETL es escasa se corrobora mediante el análisis de la desviación estándar en el fondo de las distribuciones de fase recuperadas. En la Figura 53 (a) y (b) se ha marcado en amarillo un rectángulo que se muestra ampliado en la Figura 53 (e) y (f), cuyos resultados son de 0.0023 rads y 0.00024 rads correspondientes a la ETL a 0D y sin el uso de la ETL, respectivamente. Dichos resultados son muy similares y concluimos que el impacto de la introducción de la ETL sobre el ruido es despreciable.

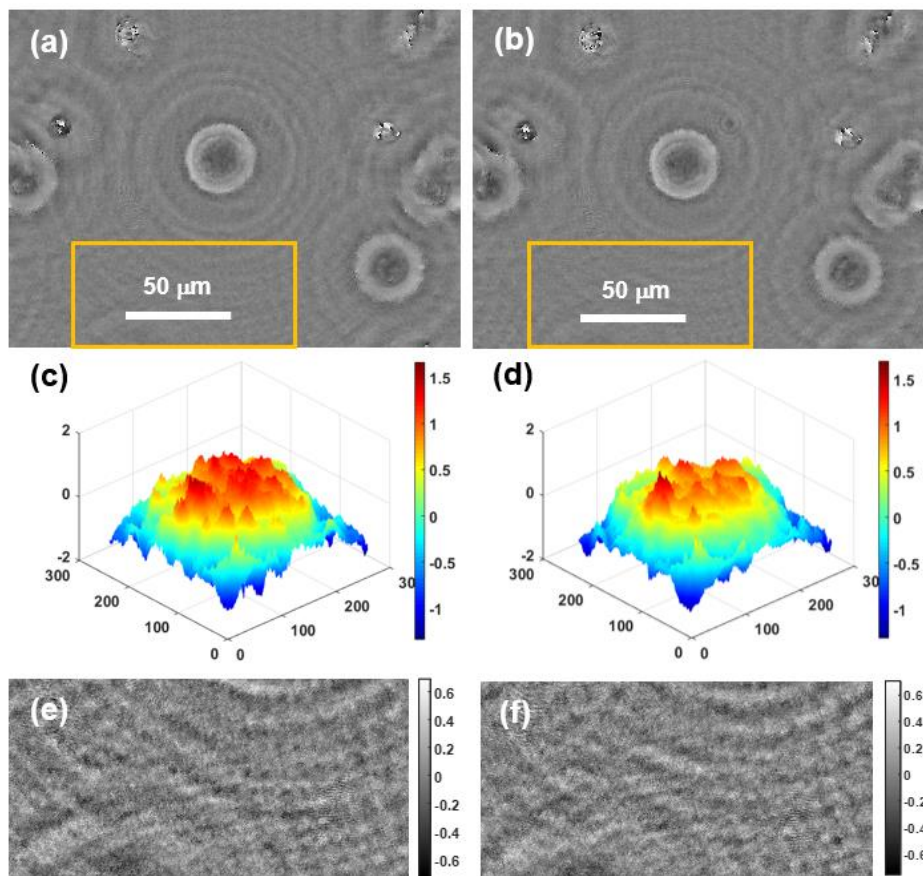


Figura 53. (a)-(b) son imágenes de fase con la ETL a 0D y sin ETL en el montaje, respectivamente; (c)-(d) son la misma comparativa mostrando una vista 3D de la célula central; y (e)-(f) son la distribución de fase del fondo marcado en los rectángulos naranja in (a)-(b), respectivamente. Las barras de escala en (c)-(d)-(e)-(f) representan la fase óptica en radianes.

Con este experimento demostramos la utilidad de una ETL para modificar el aumento evitando tener piezas móviles en el montaje. Y, aunque la ETL puede presentar aberraciones cuando se llegan a los límites del voltaje soportado, éstas se presentan sobre todo en los bordes de la lente y se ha podido comprobar que la ETL apenas añade ruido al resultado final de la recuperación de fase de la muestra.

4. Conclusiones

A lo largo del presente trabajo se ha puesto de relevancia la aplicabilidad que posee la microscopía holográfica en línea (o de Gabor) en el sector biomédico. Partiendo de las bases analógicas (o clásicas), hemos realizado un pequeño resumen de los aspectos teóricos más importantes relacionados con la holografía y relacionados con el trabajo aquí presentado hasta desembocar en técnicas de reconstrucción digital. También se han analizado los principales aspectos de fondo (propagación digital y algoritmos de recuperación de fase) necesarios para abordar las técnicas incluidas en esta memoria. Finalmente, se han incluido un par de secciones dedicadas a estado del arte en holografía y a técnicas de multiplexado en holografía por considerarse básicas como punto de partida para los métodos expuestos en la presente memoria.

Dichos métodos suponen un compendio de publicaciones basadas en novedosas técnicas en holografía en línea (o de Gabor) que pueden agruparse en dos grandes bloques: técnicas de multiplexado en longitud de onda para la mejora de la imagen recuperada de fase cuantitativa y técnicas de multiplexado (en longitud de onda y tiempo) para proporcionar campo objeto variable.

El primer bloque (referencias [1,2,3] de la lista de publicaciones) gira en torno a un nuevo algoritmo llamado MISHELF (Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel) que se basa la adquisición simultánea de varios (desde 2 hasta 4 validados en esta tesis) hologramas en línea para su posterior procesado digital. La captura simultánea hace uso del multiplexado en longitud de onda ya que diferentes fuentes coherentes de luz iluminan el objeto al mismo tiempo y un sensor que incorpora una máscara con sensibilidades espectrales diferentes (tantas como diferentes iluminaciones se hayan usado) se emplea para registrar los hologramas. Los diferentes hologramas en línea son pre-procesados y entran en un algoritmo iterativo de recuperación de fase que permite reconstruir un único objeto manteniendo la resolución proporcionada por la longitud de onda más pequeña utilizada, pero mejorando el ruido global y mitigando los efectos de la imagen virtual. Todo ello con la gran ventaja de realizar la captura de toda la información necesaria en una única exposición, pudiendo aplicarse al análisis de muestras dinámicas.

El algoritmo ha sido verificado realizándose varios experimentos con distintas configuraciones. Para el primer montaje [1] se ha buscado la configuración más sencilla posible: iluminación y detección en RGB. Para ello, se utilizó una cámara RGB estándar y las fuentes de iluminación fueron 3 láseres de laboratorio combinados y pasando finalmente a través de un *pinhole* de forma que las tres longitudes de onda provenían como fuentes puntuales de una misma localización

(mismo aumento geométrico para todos los canales). Además, el hecho de que dichas longitudes de onda estuviesen en sintonía con los filtros RGB de la máscara Bayer del sensor evitaba tener cualquier tipo de información cruzada en los hologramas. Esta configuración permitió validar la mejora de los resultados de propagación basándose únicamente en el procesado de los hologramas tal y como habían sido capturados.

Una vez comprobadas las mejoras que ofrecía el uso del algoritmo MISHELF, se optó por realizar un segundo montaje con el doble fin de tanto generalizar el método propuesto como de dar mayor flexibilidad en la selección de las longitudes de onda de las fuentes [2]. De este modo, los 3 láseres de laboratorio RGB fueron reemplazados por una lata emisora de un cabezal de PS3 que contiene 3 diodos láser en infrarrojo cercano, rojo y azul/violeta para la lectura de CD, DVD y Blu-ray, respectivamente. Estos 3 diodos coexisten en el interior de la lata emisora, pero no en el mismo punto espacial por lo que se requirió de una calibración tanto en escala como en desplazamiento de los hologramas capturados debido a la diferente localización de cada una de las fuentes de iluminación. Además, dado que el sensor sigue siendo con máscara Bayer RGB, también fue necesaria una eliminación del cruce de información en cada uno de los canales del sensor debido a la diferente sintonización entre las longitudes de onda de las fuentes y las frecuencias centrales de los filtros Bayer. Este nuevo montaje, no solo aportó flexibilidad y generalidad al concepto MISHELF, sino que también resultó viable económicamente pues se construyó un prototipo de bajo coste utilizando elementos comerciales fácilmente adquiribles que son ensamblados mediante una estructura diseñada para ser creada con una impresora 3D convencional. Así, se presentó un prototipo basado en la tecnología propuesta y orientado al sector biomédico de análisis de muestras de semen.

En el último artículo del primer bloque [3], se ha expandido el algoritmo MISHELF para el uso de un número variable de longitudes de onda (desde 2 hasta 4). Para ello, se utilizó una cámara con una máscara Bayer especial que combinaba los filtros RGBW (teniendo el filtro W una banda de paso del espectro visible) y cuatro longitudes de onda de iluminación. Los experimentos realizados con este montaje compararon el uso de una única longitud de onda con el algoritmo MISHELF utilizando dos, tres y cuatro diferentes longitudes de onda. Se demostró así, que a mayor número de longitudes de onda para la iluminación, mejor es el resultado reconstruido. Quedó demostrado asimismo que la versatilidad del algoritmo venía limitada solamente por la disponibilidad de los elementos de iluminación y captura de los montajes.

En todas las técnicas de este primer bloque, se presenta un multiplexado en longitud de onda de única exposición en la que el holograma registrado debe separarse en los diferentes canales de multiplexado. Esto implica que el tamaño de pixel efectivo de cada canal es diferente y mayor del tamaño de pixel definido por la máscara Bayer. Por tanto, se puede incurrir en limitaciones adicionales de, principalmente, resolución debido al muestreo proporcionado para cada canal. Con el fin de evitar esta pérdida de calidad de imagen debida a la limitación impuesta por el muestreo, se presentaron configuraciones experimentales donde se introdujo un aumento geométrico en el sistema que permitiese solventar ese problema. De este modo, nos situamos en un rango de aumento de entre 12X hasta 20X, por lo que la imagen final presentaba un campo objeto reducido.

Para mejorar este hándicap de las técnicas propuestas [1,2,3], el segundo bloque de métodos incluye dos referencias adicionales [4,5] en las que se actuó para proporcionar configuraciones en holografía en línea con múltiple aumento. De esta manera, se puede comenzar realizando un análisis de un campo objeto grande, pero con resolución limitada para pasar a una zona concreta del campo aumentada y con resolución mejorada.

De este modo, se presentó una evolución del concepto de MISHELF en el que se fusionan, en un único montaje experimental, un sistema de holografía en línea con aumento geométrico (campo reducido) y alta resolución con otro de aumento unidad (campo extendido) y resolución limitada [4]. Esta mezcla de configuraciones se realizó en virtud nuevamente del multiplexado en longitud de onda ya que se destinan 2 iluminaciones (RB) para el campo limitado y 1 adicional (G) para el campo extendido. De esta forma, se puede aplicar el algoritmo MISHELF con 2 iluminaciones al campo reducido con el fin de mejorar la calidad de imagen obtenida. Así, el campo limitado proporciona gran aumento y buena resolución con bajo ruido procedente de la técnica MISHELF para poder ver los pequeños detalles de muestras biológicas vivas y móviles, mientras que el campo extendido permite obtener una imagen global de la muestra que permita hacer, por ejemplo, cierto tipo de recuentos celulares y evaluar cualitativamente la muestra.

Finalmente, en el último artículo [5] se propuso la introducción de una lente ajustable eléctricamente (ETL) para modificar el campo de visión y el aumento sin necesidad de desplazar ningún elemento físico del montaje. De este modo, se puede pasar de un campo amplio a un campo reducido según lo que se pretenda analizar gracias a la capacidad de zoom derivada del uso de la ETL. Se presentó la validación de la prueba de concepto con una ETL que permitía una reducida variación de campo. No obstante, y en virtud de la existencia de ETLs con mayor capacidad de zoom, se podría pasar de una configuración de aumento unidad a otra con aumento en el

rango de 15X, dando así más flexibilidad y aplicabilidad a la técnica propuesta. En este caso no hay multiplexado en longitud de onda si bien se utiliza multiplexado temporal para variar el campo detectable. Por tanto, se pierde la capacidad de análisis de muestras dinámicas simultáneamente con 2 campos, pero se gana en flexibilidad para seleccionar la mejor configuración experimental a aplicar. La validación experimental se ha realizado con un test de calibración y muestra biológica en la que se comprobó la escasa contribución de la ETL al ruido y a la distorsión final de la imagen.

De forma general podemos concluir, por tanto, que el algoritmo MISHELF, junto con todos los montajes y los experimentos desarrollados, y descritos en los artículos técnicos que componen esta tesis, ha demostrado una gran versatilidad de uso, en lo que respecta a distintos sensores de captura y distintas longitudes de onda de iluminación, y la mejora en la reducción de ruido de los objetos reconstruidos sin pérdida de la resolución marcada por la longitud de onda más corta utilizada. Todo ello ha sido refrendado por experimentos realizados tanto con objetos estáticos (principalmente, test de resolución USAF) como con muestras biológicas vivas y dinámicas (fundamentalmente, muestra seminal y microesferas en movimiento). Además, a los últimos montajes se les ha dotado de una gran versatilidad para la captura simultánea de distintos campos objeto y de su variación sin piezas móviles.

4.1. Perspectivas de futuro

La realización de este trabajo durante estos años atrás que aquí culmina con la presentación de esta memoria de tesis doctoral no ha hecho más que poner de relevancia la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de holografía en línea con capacidades adaptadas a la aplicación concreta que se pretenda abordar. Hoy en día existen sistemas comerciales de microscopios holográficos sin lentes específicamente diseñados para determinadas aplicaciones y, por tanto, es un campo abierto y dinámico donde se van a producir nuevos desarrollos en los próximos años.

Es nuestra idea seguir trabajando en esta línea de investigación aplicada y, a tal efecto, tenemos en mente algunas posibilidades para continuar. Por ejemplo, un paso natural para el siguiente artículo sería fusionar la capacidad del algoritmo MISHELF con la flexibilidad proporcionada por la ETL. De este modo, se podría proponer alguna configuración experimental de multiplexado en longitud de onda donde la ETL proporcionase diferentes campos objeto, moviéndonos en un rango de variación pequeña con campo extenso para una iluminación y en otro de campo reducido, pero con más variación de aumento para otras longitudes de onda.

También nos planteamos la inclusión de un modulador espacial de luz (SLM) al hilo de la publicación [4] ya que, en dicho artículo, la selección del campo a ampliar es fija: se muestra la parte central del campo. Y podría pasar que el objeto o muestra de interés a ver con más detalle no esté pasando por el campo central, de modo que no sería analizado. Se podría pensar en incluir un SLM que introduzca capacidad de selección de la ventana del campo a ampliar. Se trata de un proyecto ambicioso, pero con más que notable aplicabilidad.

Finalmente, también se tienen en cartera otras posibilidades ya no relacionadas con el multiplexado en longitud de onda sino con la mejora de la imagen proporcionada en sistemas de holografía digital en línea en cuanto a resolución, eliminación de imagen virtual, reducción de ruido, etc.

5. Agradecimientos

Agradecemos al reciente doctor y profesor asociado José Ángel Picazo su inestimable ayuda para la preparación de los experimentos en nuestro laboratorio. También agradecemos al profesor Carles Soler y Francisco Blasco de Proiser I+D S.L. el habernos proporcionado las muestras de esperma de verraco. Y agradecemos al Dr. José Antonio López de la fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO) el proporcionarnos células cancerosas de próstata.

Parte de este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) bajo los proyectos FIS2013-47548-P y FIS2017-89748-P, así como por el proyecto interno Valoritza i Transfereix (clave específica 20140227) de la Universitat de València.

6. Anexo: Compendio de publicaciones

6.1. Publicación 1

Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm

Martín Sanz, José Angel Picazo-Bueno, Javier García, and Vicente Micó^a

Departamento de Óptica, Universitat de Valencia, Facultad de Física, C/Doctor Moliner 50, Burjassot, 46100, Spain
^avicente.mico@uv.es

Abstract: We report on a novel algorithm for high-resolution quantitative phase imaging in a new concept of lensless holographic microscope based on single-shot multi-wavelength illumination. This new microscope layout, reported by Noom et al. along the past year and named by us as MISHELF (initials incoming from Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel) microscopy, rises from the simultaneous illumination and recording of multiple diffraction patterns in the Fresnel domain. In combination with a novel and fast iterative phase retrieval algorithm, MISHELF microscopy is capable of high-resolution (micron range) phase-retrieved (twin image elimination) biological imaging of dynamic events. In this contribution, MISHELF microscopy is demonstrated through qualitative concept description, algorithm implementation, and experimental validation using both a synthetic object (resolution test target) and a biological sample (swine sperm sample) for the case of three (RGB) illumination wavelengths. The proposed method becomes in an alternative instrument improving the capabilities of existing lensless microscopes.

©2015 Optical Society of America

OCIS codes: (090.4220) Multiplex holography; (100.5070) Phase retrieval; (100.2000) Digital image processing; (110.0180) Microscopy; (170.3880) Medical and biological imaging.

References and links

1. W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography for biological applications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(20), 11301–11305 (2001).
2. T.-W. Su, L. Xue, and A. Ozcan, "High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**(40), 16018–16022 (2012).
3. S. K. Jericho, J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Submersible digital in-line holographic microscope," *Rev. Sci. Instrum.* **77**(4), 043706 (2006).
4. A. Greenbaum, W. Luo, T.-W. Su, Z. Göröcs, L. Xue, S. O. Isikman, A. F. Coskun, O. Mudanyali, and A. Ozcan, "Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy," *Nat. Methods* **9**(9), 889–895 (2012).
5. M. Lee, O. Yaglidere, and A. Ozcan, "Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography," *Biomed. Opt. Express* **2**(9), 2721–2730 (2011).
6. W. Bishara, H. Zhu, and A. Ozcan, "Holographic opto-fluidic microscopy," *Opt. Express* **18**(26), 27499–27510 (2010).
7. D. Gabor, "A new microscopic principle," *Nature* **161**(4098), 777–778 (1948).
8. G. L. Rogers, "Experiments in diffraction microscopy," *Proc. - R. Soc. Edinburgh, Sect. A: Math.* **63**, 193–221 (1952).
9. L. Repetto, E. Piano, and C. Pontiggia, "Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination," *Opt. Lett.* **29**(10), 1132–1134 (2004).
10. B. Perucho and V. Micó, "Wavefront hologscopy: application of digital in-line holography for the inspection of engraved marks in progressive addition lenses," *J. Biomed. Opt.* **19**(1), 016017 (2014).
11. O. Mendoza-Yero, A. Calabuig, E. Tajahuerce, J. Lancis, P. Andrés, and J. Garcia-Sucerquia, "Femtosecond digital lensless holographic microscopy to image biological samples," *Opt. Lett.* **38**(17), 3205–3207 (2013).
12. Z. Frenzt, S. Kuehn, D. Hekstra, and S. Leibler, "Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy," *Rev. Sci. Instrum.* **81**(8), 084301 (2010).
13. A. Greenbaum and A. Ozcan, "Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multi-height lensfree on-chip microscopy," *Opt. Express* **20**(3), 3129–3143 (2012).
14. M. Guizar-Sicairos and J. R. Fienup, "Understanding the twin-image problem in phase retrieval," *J. Opt. Soc. Am. A* **29**(11), 2367–2375 (2012).

#241884
(C) 2015 OSA

Received 27 May 2015; revised 21 Jul 2015; accepted 22 Jul 2015; published 6 Aug 2015
10 Aug 2015 | Vol. 23, No. 16 | DOI:10.1364/OE.23.021352 | OPTICS EXPRESS 21352

15. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," *Opt. Lett.* **22**(16), 1268–1270 (1997).
16. T. Zhang and I. Yamaguchi, "Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography," *Opt. Lett.* **23**(15), 1221–1223 (1998).
17. V. Micó, J. García, Z. Zalevsky, and B. Javidi, "Phase-shifting Gabor holography," *Opt. Lett.* **34**(10), 1492–1494 (2009).
18. V. Micó and J. García, "Common-path phase-shifting lensless holographic microscopy," *Opt. Lett.* **35**(23), 3919–3921 (2010).
19. Y. Zhang, G. Pedrini, W. Osten, and H. Tiziani, "Whole optical wave field reconstruction from double or multi in-line holograms by phase retrieval algorithm," *Opt. Express* **11**(24), 3234–3241 (2003).
20. G. Pedrini, W. Osten, and Y. Zhang, "Wave-front reconstruction from a sequence of interferograms recorded at different planes," *Opt. Lett.* **30**(8), 833–835 (2005).
21. P. Bao, F. Zhang, G. Pedrini, and W. Osten, "Phase retrieval using multiple illumination wavelengths," *Opt. Lett.* **33**(4), 309–311 (2008).
22. P. Bao, G. Situ, G. Pedrini, and W. Osten, "Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths," *Appl. Opt.* **51**(22), 5486–5494 (2012).
23. L. Camacho, V. Micó, Z. Zalevsky, and J. García, "Quantitative phase microscopy using defocusing by means of a spatial light modulator," *Opt. Express* **18**(7), 6755–6766 (2010).
24. M. R. Teague, "Deterministic phase retrieval: a Green's function solution," *J. Opt. Soc. Am.* **73**(11), 1434–1441 (1983).
25. N. Streibl, "Phase imaging by the transport equation of intensity," *Opt. Commun.* **49**(1), 6–10 (1984).
26. D. Paganin and K. Nugent, "Noninterferometric phase imaging with partially coherent light," *Phys. Rev. Lett.* **80**(12), 2586–2589 (1998).
27. M. Beleggia, M. A. Schofield, V. V. Volkov, and Y. Zhu, "On the transport of intensity technique for phase retrieval," *Ultramicroscopy* **102**(1), 37–49 (2004).
28. L. Waller, S. S. Kou, C. J. R. Sheppard, and G. Barbastathis, "Phase from chromatic aberrations," *Opt. Express* **18**(22), 22817–22825 (2010).
29. S. Witte, V. T. Tenner, D. W. E. Noom, and K. S. E. Eikema, "Lensless diffractive imaging with ultra broadband table-top sources: from infrared to extreme-ultraviolet wavelengths," *Light Sci. Appl.* **3**(3), e163 (2014).
30. D. W. E. Noom, K. S. E. Eikema, and S. Witte, "Lensless phase contrast microscopy based on multiwavelength Fresnel diffraction," *Opt. Lett.* **39**(2), 193–196 (2014).
31. D. W. E. Noom, D. E. Boonzajer Flaes, F. Labordus, K. S. E. Eikema, and S. Witte, "High-speed multi-wavelength Fresnel diffraction imaging," *Opt. Express* **22**(25), 30504–30511 (2014).
32. T. Kreis, *Handbook of Holographic Interferometry: Optical and Digital Methods* (Wiley-VCH Verlag & Co., 2005).
33. J. P. Ryle, S. McDonnell, and J. T. Sheridan, "Lensless multispectral digital in-line holographic microscope," *J. Biomed. Opt.* **16**(12), 126004 (2011).
34. J. García-Sucerquia, "Color lensless digital holographic microscopy with micrometer resolution," *Opt. Lett.* **37**(10), 1724–1726 (2012).
35. O. Mendoza-Yero, E. Tajahuerce, J. Lancis, and J. García-Sucerquia, "Diffractive digital lensless holographic microscopy with fine spectral tuning," *Opt. Lett.* **38**(12), 2107–2109 (2013).
36. A. Greenbaum, A. Feizi, N. Akbari, and A. Ozcan, "Wide-field computational color imaging using pixel super-resolved on-chip microscopy," *Opt. Express* **21**(10), 12469–12483 (2013).

1. Introduction

Lensless holographic microscopy (LHM) in the digital domain has nowadays becoming in a valuable and versatile tool for different applications ranging from biology [1–3], point-of-care testing [4], telemedicine [5] and optofluidic [6] applications, just to cite a few. LHM supposes a digital version of the Gabor's concept implemented for electron microscopy in the middle of the XX century [7] and later adapted to the optical range by Rogers [8]. Classical LHM working scheme uses a point source (typically in the form of a spatial aperture or pinhole [1,3,5,6]) of coherent (laser) light. But successful implementations have been validated using alternative illumination variations such as LEDs [9], super luminescent diodes [10] or pulsed laser radiation [11], and point sources using GRIN lenses [12] or fiber optics [13].

Aside of other restrictions (mainly, coherent noise and weak diffraction assumption [13]), Gabor's concept of holography is affected by the twin image problem as a direct consequence of the in-line configuration [14]. Essentially, a misfocused version of the twin image disturbs final image quality when imaging at the real image term. Twin image can be eliminated in Gabor-like layouts by using typically two different strategies: phase-shifting [15–18] and phase retrieval [19–28] procedures. Phase shifting is based on the relative phase variation between both interferometric beams and phase retrieval can be conducted from iterative [19–23] as well as from deterministic [24–28] algorithms. In any case [19–28], several holograms incoming from mechanical displacement of the camera [19,20] or by tuning the illumination

wavelength [21,22] or by defocusing the image using a SLM [23] or by solving deterministic equations of the propagation field [24–28] must be recorded.

Among them, in [28] Waller et al. refer to a clever method to retrieve phase distribution based on the transport of intensity equation (TIE) where the axial defocus needed between images is provided by the intrinsic chromatic aberration of imaging lenses. Using broadband illumination and conventional RGB color camera, the approach provides 3 axially slightly defocused images (one in focus, one under and other over focus) corresponding with the 3 color camera channels. These 3 intensity images are the TIE algorithm inputs. Moreover, the retrieved quantitative phase information is obtained in a single camera snap-shot meaning that it is the camera acquisition rate the limiting factor for imaging dynamic biological processes. Note that phase-shifting [15–18] as well as phase retrieval [24–27] imply the recording in time sequence of multiple (more than two) in-line images before applying the phase recovery cycle, thus preventing (at least in a factor of two) the analysis of fast dynamic events.

As a continuation of its previous work [29], Noom et al. have recently presented a quantitative phase contrast LHM method first under sequential illumination/recording mode [30] and after with high-speed capabilities [31]. Their approach is based on a similar concept than in [28] but applied in the domain of LHM: while the concept presented by Waller et al. [28] is based on a refractive principle (axial chromatic aberration), the principle proposed by Noom et al. [31] is based on the wavelength dependence of diffraction. On both cases, 3 simultaneous sample images (slightly defocused intensity images and Fresnel domain in-line holograms for the Waller et al. and Noom et al. cases, respectively) are recorded in a single snap-shot of a color camera. Noom et al. method [31] records 3 Fresnel diffraction patterns generated at the digital sensor plane by illuminating the sample with 3 simultaneous RGB wavelengths incoming from a fiber coupled source containing 3 diode lasers (636 nm, 519 nm, and 402 nm). After that, digital image processing based on numerical propagation and phase retrieval algorithm performs final phase contrast image of the inspected sample.

In this manuscript, we report on a similar hardware concept of LHM but having improved capabilities concerning quantitative phase imaging, resolution and processing time. As in the Noom et al. method [31], a trichromatic illumination source is used to record 3 simultaneous in-line holograms in a single CCD recording. Then, the holograms are digitally processed using a novel algorithm yielding in high-resolution noise-reduced quantitative phase imaging due to coherent noise averaging and twin image elimination. Moreover, the proposed algorithm provides a fast convergence to the final result in comparison with the one reported by Noom et al. [31]. We have named this new microscope layout as MISHELF, initials incoming from Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel.

The manuscript is organized as follows. Section 2 presents the experimental layout as well as a detailed description of the phase retrieval algorithm. Section 3 includes experimental validation concerning a synthetic object (resolution test target) and a biological sample (swine sperm cells). And Section 4 discusses and concludes the paper.

2. Experimental layout and digital image processing in MISHELF microscopy

2.1 Experimental layout

The proposed experimental setup is outlined at Fig. 1. Three laser illumination wavelengths at 405 nm (violet laser diode module, 50 mW optical power), 532 nm (green-diode-pumped laser module, 50mW optical power) and 632.8 nm (He–Ne laser source, 35mW optical power) are properly combined (dichroic beam splitters) before impinging onto a pinhole (stainless steel aperture, 1 μm diameter). The pinhole provides a divergent spherical point source of RGB coherent illuminations with numerical apertures (NAs) values of 0.63/0.53/0.4 for RGB wavelengths, respectively. These 3 beams illuminate the sample at a short distance ($d - z$) from the pinhole plane as it corresponds with a LHM configuration for providing a reasonable magnification factor (typically between 5X and 20X). Then, a color CCD camera (AVT 1394 Stingray F-145C, 1388×1038 pixels, $6.45 \times 6.45 \mu\text{m}$ pixel pitch) records the 3 RGB-coded Fresnel diffraction patterns in a single CCD capture. The color CCD camera is

placed at d and z distances from the pinhole and sample planes, respectively (see Fig. 1). After that, the information contained in the 3 CCD channels is digitally processed to finally obtain a high-resolution image without twin image contribution.

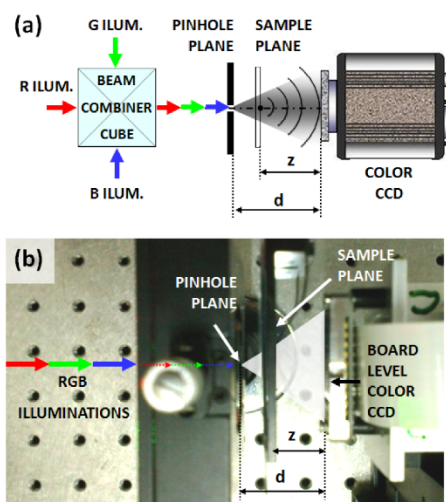


Fig. 1. Experimental setup: (a) scheme and (b) picture from the lab.

We have conducted experimental validation of our MISHELF microscope concept using 2 different configurations in the experimental layout. The first one is characterized by a low NA value and it is used to present in detail the digital image processing involved in the MISHELF algorithm. We have selected a positive United State Air Force (USAF) resolution test target to show in depth the algorithm steps. And the second implementation provides a medium NA value and it is applied to image a biological sample under quantitative phase imaging mode.

For the first experimental layout (low NA), we have forced the image to be square (1038 x 1038 pixels) just to simplify digital computing and optimize image visualization when presenting the figures. This fact does not suppose any penalty aside of deteriorating a bit the resolution limit in the reduced down image direction. The USAF test is placed at, approximately, 1.2 mm after the pinhole and at 24 mm in front of the CCD. Thus, the layout magnification factor M can be computed as the test's geometric projection into the recording device in the form of: $M = d/(d-z) \cong 21X$. Considering image (1038 pixels) and pixel (6.45 μm) sizes, the NA defined by our MISHELF microscope is $NA = 0.14$ (this is the previously referred low NA value) and the resolution limit for the shortest illumination wavelength is $R = 0.82\lambda/NA = 2.37 \mu\text{m}$.

In the second arrangement (medium NA), the experimental layout has been slightly modified reducing the distances between components in order to improve NA and hence the resolution limit. Moreover, we have considered full frame image (1388x1038 pixels) provided by the CCD. We have set $d = 15 \text{ mm}$ and $z = 14 \text{ mm}$, so that $M = 15X$, $NA = 0.30$ (for the largest CCD direction), and $R = 1.1 \mu\text{m}$ (according to that NA value and the blue wavelength). This configuration has been experimentally validated for a real biological sample, thus enabling sample's visualization using qualitative and quantitative phase imaging modalities such as phase contrast, differential interference contrast (DIC), 3D representation, spiral phase contrast, etc.

2.2 Digital image processing

Our MISHELF microscope involves a novel and fast convergence algorithm for high-resolution quantitative phase imaging. The algorithm working flow diagram is represented through Fig. 2 where we want to stress that all the variables are spatially dependent (for

instance: $A_0 = A_0(x, y)$) but we have not included the (x, y) coordinates at Fig. 2 to save space. The sample becomes illuminated with the trichromatic RGB source and one RGB hologram is recorded by the color CCD camera. This RGB hologram is then separated into its 3 elementary RGB channels providing 3 RGB color-coded holograms. After that, each hologram is subjected to an image equalization stage for improving them and consisting in 2 corrections: first, the illumination profile of each illumination beam is homogenized across the full frame to compensate the lower intensity at the borders; and second, the crosstalk resulting from the Bayer color filter array are subtracted from each channel to eliminate the contribution incoming from the other two complementary wavelengths. This image equalization stage needs to be done once and it involves basic (subtraction) digital image processing which can be easily implemented by preliminary calibration of the MISHELF microscope without sample.

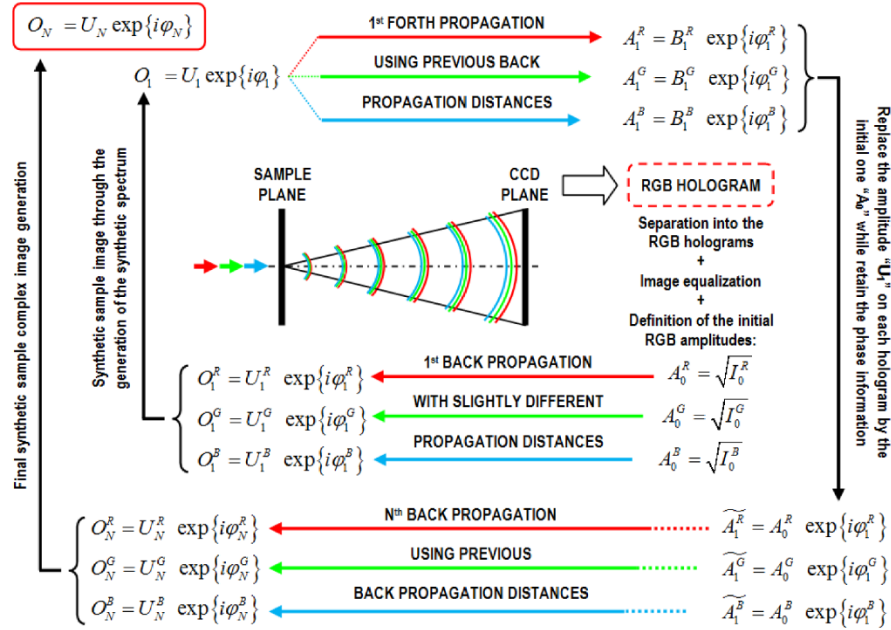


Fig. 2. Flow diagram of the MISHELF algorithm. After RGB illumination of the sample, the process starts with the recording at the CCD plane of a single RGB hologram (dashed red line frame). Then, arrows guide the way of reading (clockwise direction) until the Nth final iteration where the sample's complex information is retrieved (solid red line frame). The variables I , Δ , U , O in the chart are (x, y) -spatially dependent.

After that, the phase iteration algorithm starts with the definition of the initial amplitudes per each RGB wavelength (A_0^R, A_0^G, A_0^B) as the square root of the intensity distribution on each equalized RGB hologram (I_0^R, I_0^G, I_0^B). The 3 initial RGB amplitudes are propagated to its best focus and the resulting propagation distances are stored in the computer's memory. Since refraction is wavelength dependent (the thickness of the sample's slide slightly modifies the effective axial position of the sample because of the wavelength dependence in refractive index), the propagation distances per hologram are slightly different; so, MISHELF microscopy plays an equivalent role than a conventional LHM with only one wavelength but axially shifting the camera to record 3 in-line holograms at slightly different z distances. There are different numerical methods for digital reconstruction of the diffraction integral [32]. Among them, we have selected to solve the diffraction Rayleigh-Sommerfeld integral using convolution operation since it allows an effective and economical calculation without

any approximation. After numerically propagation to the sample plane, the 3 in-focus images of the sample (O_1^R, O_1^G, O_1^B) are then used to synthesize a single fused image (O_1).

To synthesize this fused image, we implement the following steps. First, we perform digital fast Fourier transform (FFT) of each in-focus images. Second, the global background phase for the 3 in-focus images is forced to be equal just to avoid phase cancellation when mixing their spectra. Third, the 3 spectra are then used to synthesize a new single spectrum incoming from a weighted addition of them. By weighted we mean that, because of the spatial frequency content contained on each image is different due to wavelength dependence of diffraction, the R spectrum contains a lower cutoff frequency than the G one which, in turn, is also lower than the cutoff frequency of the B spectrum. Thus, the information contained in the R spectrum is also included in the G one, and both are included in the B spectrum. So a weighted mask taken into account this fact is applied for not incurring in a low spatial frequency enhancement. And fourth, inverse FFT of the mixed spectrum recovers an improved image of the sample (O_1), improved in the sense of noise averaging due to the mixing of the 3 images into a single one.

Such improved image becomes the input of a phase retrieval algorithm. The algorithm consists in the iterative application of back and forth numerical propagations between hologram and sample planes, but taking into account two peculiarities. On one hand, the improved image O_1 is propagated 3 times taken into account the 3 propagation distances previously obtained in the first back propagation. Thus, 3 color coded holograms are generated at the CCD plane from which their phase distributions ($\varphi_1^R, \varphi_1^G, \varphi_1^B$) are retained while the amplitude ones (B_1^R, B_1^G, B_1^B) are replaced by the square root of the recorded hologram intensity (A_0^R, A_0^G, A_0^B). Then, the new complex amplitudes ($\widetilde{A}_1^R, \widetilde{A}_1^G, \widetilde{A}_1^B$) are back propagated again (each one with its corresponding propagation distance) to their in-focus planes. And on the other hand, a new single and mixed spectrum is synthesized every time that one back and forth cycle is performed, that is, a new single image O_1 is synthesized at the sample plane for each cycle in the algorithm. After a few number of iterations, a final image O_N containing complex amplitude information of the sample is obtained with improved capabilities since it contains no information about the twin image and exhibits better image quality concerning noise, halos and contrast. Moreover, the single spectrum generation process allows fast convergence in the phase retrieval algorithm since information of the 3 channels is mixed together in each iteration. All together improves quantitative phase imaging of the sample which can be visualized under several imaging modalities such as 3D views, contrast images, plotting some regions of interest for profiling, etc.

For its better understanding, Fig. 3 presents a schematic chart of the algorithm steps when using the USAF test target as input sample. The RGB recorded hologram is separated into its 3 channels allowing direct focusing of the object on each one of them (upper row). These images can be improved by implementing the image previously commented equalization stage (Fig. 3 also includes the RGB illumination profiles without USAF test). Equalized in-focus images (lower row below the central RGB hologram) are then Fourier transformed and the new mixed spectrum is synthesized using the information contained at the RGB spectra considering a weighted mask for not incurring in spatial frequency enhancement. The new synthesized spectrum is Fourier transformed back to recover an improved image of the object (left image at the lower row). This image is the input for the phase retrieval algorithm previously exposed.

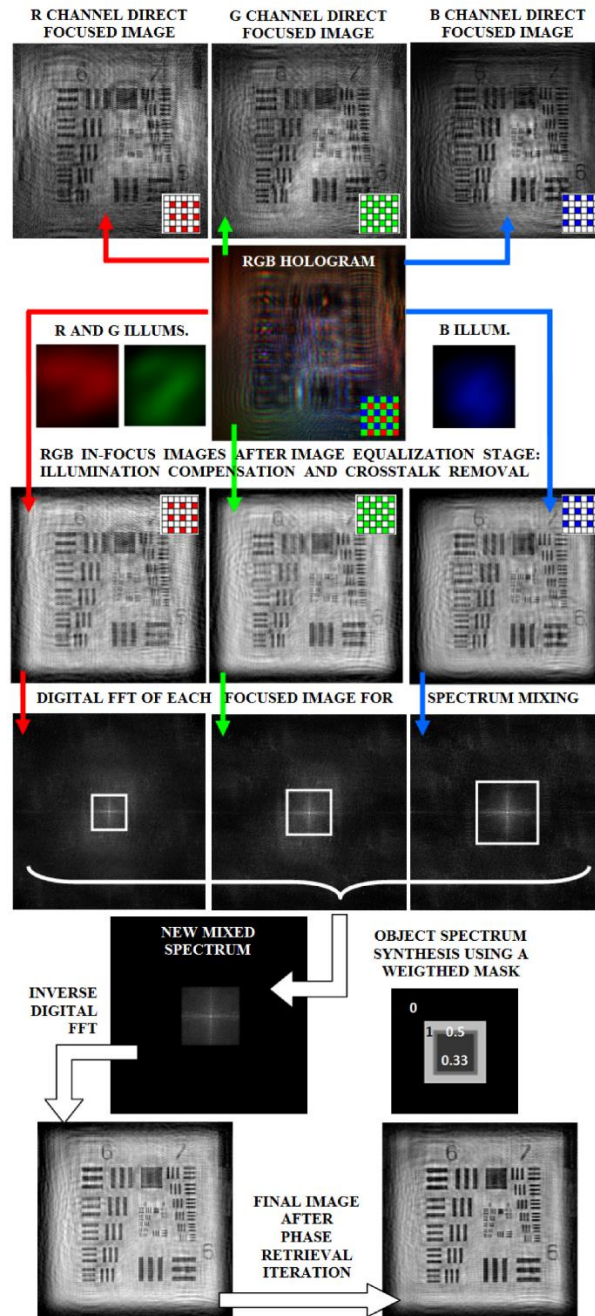


Fig. 3. Schematic chart of the proposed digital stage processing in MISHELF microscopy for the USAF test target. The included images are represented by their intensity in order to allow direct comparison among them.

3. Experimental validation

Aside of the USAF images presented in previous section, Fig. 4 shows a direct comparison of the USAF reconstructions obtained under different modalities of LHM using the low NA layout (0.14NA): (a) shows the image obtained under conventional LHM using blue illumination (B-LHM), (b) depicts the same image after image equalization stage, (c) presents the image obtained as inverse FFT after the first synthesized spectrum, and (d) shows the final image after phase retrieval with only 2 iterations (additional iterations do not improve the result). Images from (e) to (h) include a magnification of the USAF central part where the resolution limit is produced. Note that all the images included in Fig. 4 are intensity images depicted in Matlab with the same visualization power to allow direct comparison among them.

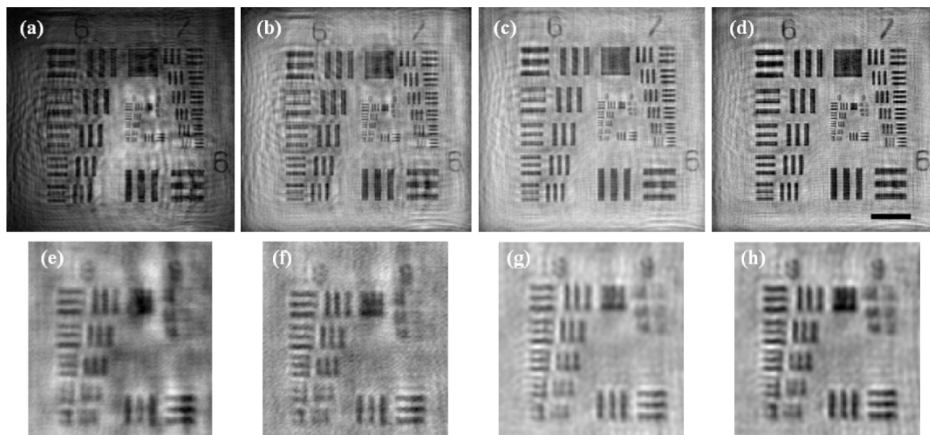


Fig. 4. Intensity image comparison for the USAF test target in the low NA setup: (a) conventional single-wavelength (blue channel) LHM, (b) same than in (a) after image equalization stage, (c) image retrieved after the first object spectrum synthesis, and (d) the final image after 2 iterations of the phase retrieval algorithm. Images in (e) to (h) are the central magnified areas of (a) to (d), respectively. Scale bar in the lower-right corner of (d) is 50 μm in length.

We can see as the resolution limit at all the images is the same and it corresponds with a value of 2.46 μm (Group 8-Element 5 as last resolved element), value which is in very good agreement with the theoretical one obtained for the B wavelength (see Section 2.1). However, image contrast is clearly enhanced and coherent noise averaged when comparing the MISHELF image with the conventional B-LHM one. Concerning the field of view (FOV), the black solid line in the lower right-corner of Fig. 4(d) has a length of 50 μm . So the total FOV width is around 280 μm . Assuming we are disregarding the borders of the image (black perimeter rectangle shown in last images of Fig. 3) due to border's diffraction effects when performing numerical propagation, the CCD useful area is around 900 pixels width. This fact means that the FOV (280 μm) is framed in 5.8 mm, approximately, defining an experimental M value of 20.7X, value that also perfectly matches with the theoretical one ($M = 21X$). Note that the magnification factor is needed to avoid that the CCD sampling in Fresnel diffraction regime may be a limiting factor in the final image resolution. Moreover, because MISHELF technique uses a color CCD, the pixel number in each channel is not the maximum available (as it happens when using monochrome sensors in LHM); so, high magnifications must be pursued.

In addition, Fig. 5 includes the images obtained for a second experiment under the same experimental conditions (0.14NA) but considering now full frame image size (1388 \times 1038 pixels). As in Fig. 4, we have compared the final recovered image by MISHELF microscopy [(c) and (d)] with the conventional single-wavelength B-LHM [(a) and (b)]. Although USAF

object does not contains phase information because it is a real amplitude object, we have included phase distributions in Figs. 5(b) and 5(d) just to qualitatively show that phase image is also improved as consequence of the proposed method. Once again, images from (e) to (h) include a magnification of the central part of the USAF. Note as, because of the rectangular detection area, the resolution limit is not now the same on both orthogonal directions. Now, the last resolved element (Group 9-Element 2) in the largest CCD direction defines a resolution limit of $1.74 \mu\text{m}$. This value is again in good agreement with the theoretical prediction because, now, we have 1388 pixels defining a NA value of 0.185NA and yielding in a resolution limit of $1.79 \mu\text{m}$. Obviously, the NA value for the shortest direction is not changed (0.14NA) and the last resolved element is again the same one (Group 8-Element 5) than in the previous experiment.

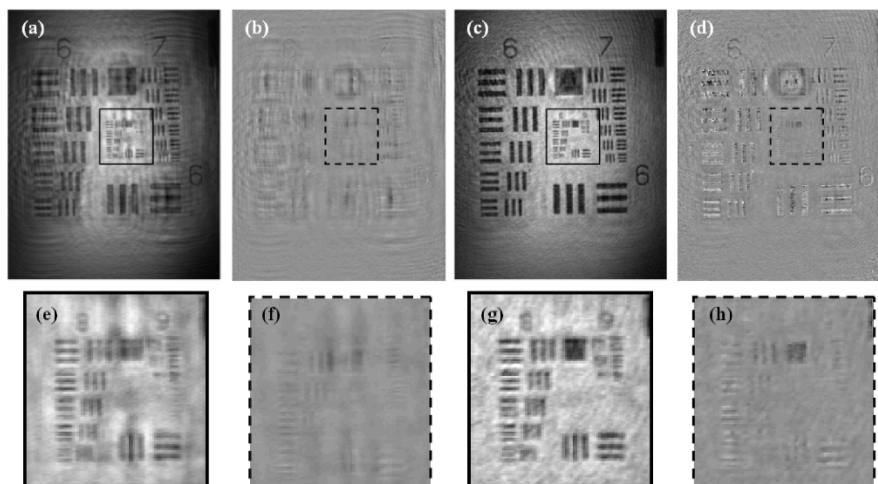


Fig. 5. Intensity and phase image comparison for the USAF test target in the low NA setup with full frame recording area: (a) and (b) are the intensity and phase images using conventional single-wavelength (blue channel) LHM, respectively, and (c) and (d) are the intensity and phase images retrieved after 2 iterations of the phase retrieval algorithm, respectively. Images in (c) to (h) are the central magnified areas of (a) to (d), respectively.

To clearly show that twin image is eliminated due to the phase retrieval algorithm, we have included two video movies corresponding with conventional B-LHM ([Visualization 1](#)) and MISHELF microscopy ([Visualization 2](#)). The first frame at both videos corresponds with and in-focus image of the USAF test and then digital propagation to the twin image plane (last frame of the movies) is applied. Figure 6 presents the propagated images to the plane where the twin image is located. One can see as conventional B-LHM contains twin image contribution while MISHELF microscopy eliminates the twin image (no USAF image in the last movie frame).

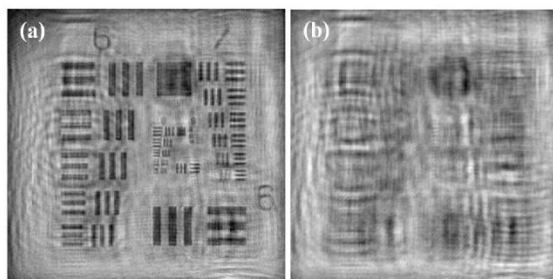


Fig. 6. Twin image removal validation: (a) B channel image (see [Visualization 1](#)) and (b) final image provided by MISHELF microscopy (see [Visualization 2](#)) at the plane where twin image is located.

Now, the medium NA layout (0.3NA) is assembled and MISHELF microscope is tested for a biological sample in order to show quantitative phase imaging capabilities. The biological sample is an unstained swine sperm sample (head width of $6 \times 9 \mu\text{m}$, total length of $55 \mu\text{m}$, and a tail's width of $2 \mu\text{m}$ on the head side and below $1 \mu\text{m}$ on the end, approximately) which is dried up for fixing the sperm cells in the counting chamber. According to the theoretical values (see Section 2.1), the resolution limit is enough to resolve the sperm tails in the neck side while it is not at their end. Figure 7 show the experimental results of the MISHELF microscope in comparison with the ones obtained when using single-wavelength (blue) conventional LHM. Figures 7(a)-7(b) show, respectively, the RGB and the B-LHM holograms while images in Figs. 7(c)-7(d) present the intensity images provided by MISHELF microscope after 2 phase retrieval algorithm iterations and B-LHM, respectively. As in the USAF case, one can see as MISHELF microscopy provides a global contrast enhancement and background noise reduction along the whole image.

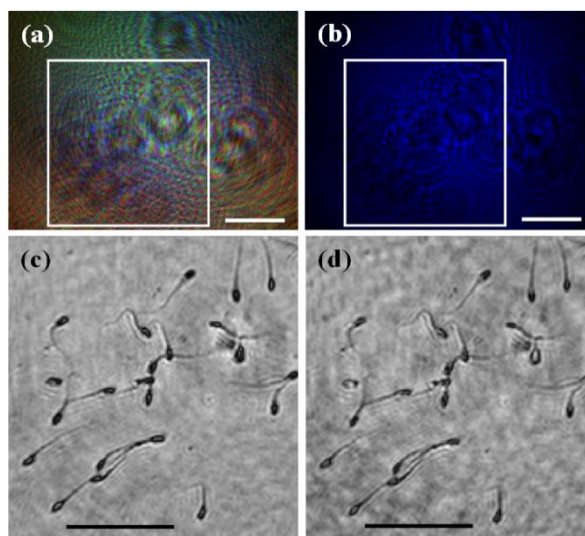


Fig. 7. Intensity biosample results: (a)-(b) are the holograms and (c)-(d) includes the final intensity images of the framed areas (solid white line squares) included in (a)-(b), respectively, for the proposed MISHELF microscope and the conventional single-wavelength (B channel) LHM case. Scale bars in the images are $100 \mu\text{m}$ in length.

Nevertheless, the biosample contains valuable phase information which provides qualitative (improved visualization modes) as well as quantitative (capability of measure

cell's profile) information about the sperm cells. Figure 8 includes a comparison of the images which can be obtained. First row presents the images in positive phase contrast modality while second row show negative phase contrast images. We have included the images obtained from MISHELF microscopy [Figs. 8(a) and 8(e)] as well as the single-wavelength conventional LHM for R-G-B illuminations [Figs. 8(d) and 8(h), 8(c) and 8(g), and 8(b) and 8(f), respectively]. One can visualize the noise reduction concerning twin image elimination, background homogeneity, coherent artifacts, spurious reflections, etc. resulting in a global image quality improvement. Moreover, resolution is not penalized since, as previously for the USAF case, MISHELF microscopy retains the resolution limit provided by the best (the lower) illumination wavelength.

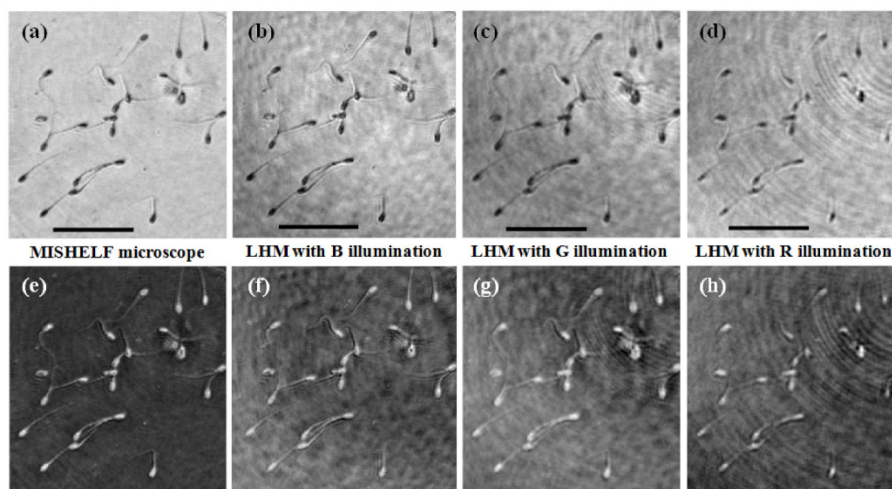


Fig. 8. Phase visualizations of the biosample: (a)-(d) and (e)-(h) are positive and negative phase contrast images, respectively obtained from MISHELF microscopy [(a) and (e)], B-LHM [(b) and (f)], G-LHM [(c) and (g)] and R-LHM [(d) and (h)]. Images in (i) and (j) represent a 3D view of the phase unwrapped distributions incoming from the MISHELF microscope and for the conventional B-LHM, respectively, where gray scale bars represents optical phase in radians. Scale bars in (a)-(d) images are 100 μm in length.

All those qualitative images are supplemented with quantitative information incoming from the 3D representation of the retrieved unwrapped phase distribution. Figure 8 presents a comparison of the biosample's 3D phase profile when considering the MISHELF microscope and the B-LHM images. We have computed the Standard Deviation (STD) of the background noise in order to compare the phase stability derived from MISHELF microscopy and conventional B-LHM. The STD values are computed at the two regions marked with dotted black line rectangles in the phase profiles included in Fig. 9. Note that no sperm cells are contained at both areas and that phase values have been normalized previous to the STD calculation, thus allowing direct comparison of the phase noise stability. We have obtained 0.028 and 0.062 rads averaged STD values for MISEHLF microscopy and B-LHM, respectively, meaning that a factor a bit higher than 2 is obtained in phase stability improvement as consequence of the proposed algorithm.

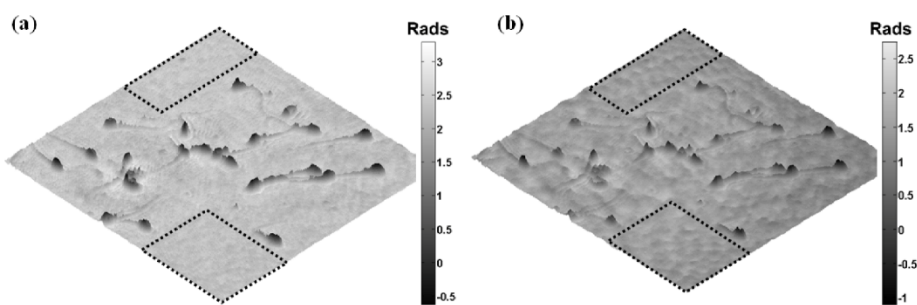


Fig. 9. Phase visualizations of the biosample: (a) and (b) represent a 3D plot of the phase unwrapped distributions incoming from the MISHELF microscope and for the conventional B-LHM, respectively. Gray scale bars represent optical phase in radians. The dotted black line rectangles are used to compare STD values of the background.

In addition, the recovered phase distribution can also be digitally manipulated to generate a wide variety of phase visualization images in a similar way than optical procedures allow. The main advantage is that the imaging synthesis is performed numerically instead of optically, that is, there is no need to change to special lenses or illumination systems in order to provide such images. Figure 10 depicts a set of digitally-processed classical images for phase visualization incoming from the complex amplitude distribution retrieved by MISHELF microscopy. We present: Fig. 10(a) the darkfield image by blocking the DC term at the Fourier plane, Fig. 10(b) and Fig. 10(c) the DIC images by subtracting two displaced images in the horizontal and vertical directions, respectively, and Fig. 10(d) a spiral phase contrast imaging by adding a spiral phase mask at the Fourier plane. One can observe that each modality enhances the visibility and contrast of different features of the biosample.

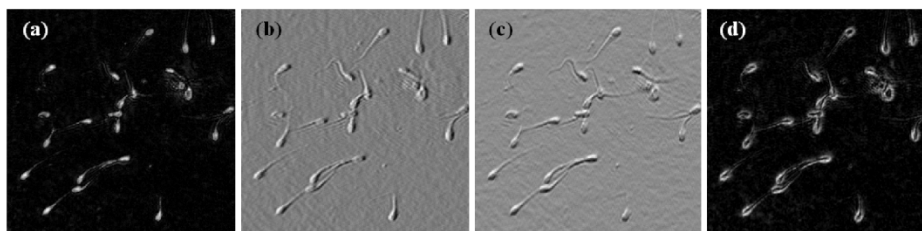


Fig. 10. Digital post-processing biosamples images from the MISHELF recovered complex amplitude distribution: (a) darkfield image, (b) and (c) DIC images in the horizontal and vertical directions, respectively, and (d) spiral phase contrast image.

Finally and aside of improving qualitative and quantitative phase image quality, the proposed new algorithm also improves convergence in the phase retrieval procedure. For instance, in [19] Zhang et al. report on a digital in-line holographic layout where 3 holograms are acquired by axially shifting the camera instead of using 3 wavelengths. According to [19], the phase distribution is retrieved after 75 iterations of the phase retrieval algorithm that performs numerical propagation between the 3 recording planes. The number of iterations is reduced until 30 [30] by using 3 wavelengths with a single and static monochrome camera. Note that nothing is stated concerning the phase retrieval algorithm [31] but that “a few iterations” are needed and that “the same reconstruction procedure” as in [30] is used. Here, we have reported on superior image quality than the previous RGB multi-wavelength Fresnel diffraction imaging incoming from a higher resolution limit (0.3NA), a significantly improved visualization of phase through multiple phase imaging modes, and a fast algorithm convergence incoming from a reduced number of iterations. The last sentence is supported by the fact that images included along this manuscript only need 2 iterations in the phase retrieval cycle for both USAF and biosample cases. A similar phase retrieval procedure but

without RGB spectrum synthesis (only considering a single wavelength) and applying known constraints about the input object (pure phase or amplitude object) needs around 15-30 iterations (depending on the object type) for twin image elimination [10]; so, the digital processing reported in this manuscript greatly improves algorithm convergence.

4. Discussion and conclusions

In this manuscript, we have provided a step forward on a recently reported LHM method based on wavelength multiplexing digital in-line holography in the Fresnel domain [31] but with improved capabilities. The technique, named here as MISHELF microscopy, is based on the simultaneous illumination of the sample with a trichromatic (RGB wavelengths) laser source and the recording of a single-shot multiplexed hologram containing information about the 3 wavelength-coded Fresnel patterns diffracted by the sample. Coherent trichromatic illumination is accomplished by combining three independent laser sources over a single illumination pinhole and simultaneous recording of the 3 Fresnel patterns is achieved by single snap-shot of a color CCD camera.

Although the use of multiple illumination wavelengths in LHM has been previously reported in the literature [33–36], their use was restricted to pseudocolor image rendering [33,34,36] and/or multispectral analysis [33,35] of the sample. In MISHELF microscopy, RGB illuminations are used for phase retrieval and quantitative phase imaging in single exposure LHM, in addition to the previously commented color imaging capabilities.

Concerning similarities with [31], MISHELF microscopy differs from and improves quantitative phase imaging in the following. First, it uses a pinhole as illumination source instead coupling the lasers to a single-mode fiber. Single-mode fibers permits low NAs in illumination (typically in the range of 0.1NA), so resolution is highly compromised by this low NA value, even more considering that the real useful NA is usually smaller than its theoretical value due to the intensity decreasing at the borders. However, medium (in the range of 0.4-0.5) NA values are easily accessible by using a pinhole for illumination, as usually is in digital in-line holography [1,3,9,34,35], thus improving the resolution of the final image. In this manuscript, the hardware has been improved allowing the definition of medium NA values (in the range of 0.3), meaning that resolution limits close to 1 micron are accessible.

Second, our novel phase retrieval algorithm converges extremely faster than others because it mixes together information incoming from the 3 RGB channels. The improvement in image quality is not only as consequence of the weighted mask (spatial-frequency enhancement or band-pass filtering must be avoided) but due to the fact of mixing 3 images into a single one. In addition, this fact results in a reduction of the processing time to a few seconds when using standard desktop computers. Note that the algorithm reported in [30,31] is not exposed in depth and converges to a final image after 30 iterations [30], meaning about 1 min of processing time on a standard desktop computer. MISHELF microscopy algorithm has demonstrated similar (if not superior) image quality retrieval with only 2 iterations.

And third, the final image presents noise reduction and improved image quality incoming from both a qualitative and a quantitative point of views. Qualitatively, MISHELF images present enhanced contrast, halos and coherent noise reduction, twin image elimination, higher background homogeneity, and reduction of coherent artifacts and spurious reflections in comparison with conventional single-wavelength LHM. And quantitatively, all those image quality enhancements derive in phase noise reduction through the definition of lower STD values.

In summary, we have reported on MISHELF microscopy from a double point of view. First, the hardware has been improved allowing the definition of medium NA values (in the range of 0.3), meaning that resolution limits close to 1 micron are accessible. And second, the software has also been improved and optimized through a novel phase retrieval algorithm based on a customized management of the information provided by the 3 illuminations at the Fourier domain. The final images obtained by our MISHELF microscope embodiment provide quantitative phase imaging improvement as well as increase the convergence of

similar algorithms through reducing the number of iterations needed to get the final image. Moreover, since the retrieved quantitative phase distribution is obtained in a single camera snap-shot, the limiting factor for imaging dynamic biological events is the camera acquisition rate thus enabling video-rate movies of the inspected samples. Experimental results have been presented validating all previous statements concerning MISHELF microscopy. The synthetic object (USAF resolution test target) case provides useful images for layout calibration and algorithm in-depth presentation. And the biological sample (swine sperm sample) shows different qualitative and quantitative phase imaging modalities.

Acknowledgments

We thank Prof. Carles Soler and Francisco Blasco from Proiser R + D S.L. for providing the swine sperm sample. Part of this work has been funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) under the project FIS2013-47548-P.

6.2. Publicación 2

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy

Received: 05 October 2016
Accepted: 20 January 2017
Published: 24 February 2017

Martín Sanz, José Ángel Picazo-Bueno, Luis Granero, Javier García & Vicente Micó

We report on a reduced cost, portable and compact prototype design of lensless holographic microscope with an illumination/detection scheme based on wavelength multiplexing, working with single hologram acquisition and using a fast convergence algorithm for image processing. All together, MISHELF (initials coming from Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel) microscopy allows the recording of three Fresnel domain diffraction patterns in a single camera snap-shot incoming from illuminating the sample with three coherent lights at once. Previous implementations have proposed an illumination/detection procedure based on a tuned (illumination wavelengths centered at the maximum sensitivity of the camera detection channels) configuration but here we report on a detuned (non-centered ones) scheme resulting in prototype miniaturization and cost reduction. Thus, MISHELF microscopy in combination with a novel and fast iterative algorithm allows high-resolution (μm range) phase-retrieved (twin image elimination) quantitative phase imaging of dynamic events (video rate recording speed). The performance of this microscope prototype is validated through experiments using both amplitude (USAF resolution test) and complex (live swine sperm cells and flowing microbeads) samples. The proposed method becomes in an alternative instrument improving some capabilities of existing lensless microscopes.

Microscopy is one of the most used imaging modalities in scientific research being, in particular, light microscopy the favorite one in biomedicine due to its inherently non-invasive nature. However, the usage of microscopes in the field-setting is limited due to several factors such as cost, size and easy-to-use meaning that the development of new medical tools/devices aimed to provide early and accurate diagnosis is nowadays considerably required. For instance, global healthcare and point-of-care diagnosis are demanding reduced-cost and portable medical devices in addition to easy-to-use by a non-trained person, high reliability and rapid response for diagnosing¹. Under this perspective, cost-effective, light-weight, compact and portable imaging devices greatly improve rapid and accurate diagnosis in the field-setting.

New developments in different optoelectronic fields such as micro-optics, solid state lasers, electronic detection devices and optical fibers, just to cite a few, have enabled cost-effective, portable and miniaturized versatile devices for biomedical applications^{2–20}, some of them working in a lensfree scheme^{2–8} while others operating as smartphones implementations^{9–15} or using conventional but miniaturized microscopes architectures^{16–20}. It is worth to note that all of them are complementary devices allowing different capabilities depending on the application they are aimed to. For instance, lensfree devices are ideal for field applications since they offer small-size and light-weight digital imaging portable platforms; miniaturized microscopes provide high resolution and magnification values with great flexibility coming from setting different objective lenses which perfectly match with disease diagnosis and clinical studies; and smartphone-based microscopes enable exceptional communication capabilities and affordability for telemedicine and remote diagnostics in resource-limited settings.

Lensfree bright field microscopy (or lensless holographic microscopy - LHM) derives from a digital implementation of the Gabor's invention of holography reported in the middle of the past century^{21–22}. Essentially, LHM proposes an extremely simple layout where a point source of coherent light illuminates the sample and the diffracted wavefront is recorded by a digital sensor²³. Typically, the point source is implemented using a spatial aperture (or pinhole) in combination with a laser beam^{5,23–24} but additional illumination procedures such as

Universidad de Valencia, Departamento de Óptica y Optometría y Ciencias de la Visión, Burjassot, C/Doctor Moliner 50, 46100, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.M. (email: vicente.mico@uv.es)

LED²⁵ and SLED²⁶ sources, pulsed laser radiation²⁷ and illumination through GRIN lenses²⁸ or fiber optics²⁹ were also successfully reported.

There are two opposite layouts with particular significance in LHM³⁰. In the first one (Gabor's like implementation), the sample is placed in close proximity with the illumination point source while the digital sensor becomes farther^{23–25,27,28}. Thus, the sample's diffraction pattern is magnified (geometric projection) at the digital sensor plane with typical magnification factors ranging from 5X to 20X depending of the layout distances thus relaxing the sampling requirements of the digital sensor. This experimental arrangement provides, after numerical reconstruction, similar images to the ones reported in conventional holographic microscopy regarding magnification, field of view (FOV) and resolution when considering objectives up to medium numerical aperture (NA) values (~ 0.4 – 0.5 NA)³¹, although superior quality images concerning resolution were also attained^{32–34}. The second implementation places the sample in close contact with the digital recording device and the illumination point source remaining further from them^{2–4,6–8,29}. In this case, no geometric magnification factor is introduced (~ 1 X range) so the resolution limit is usually restricted by the geometrical constraints of the detector and not by the diffraction limit. However, the allowable FOV becomes in the whole sensitive area of the detector. Nonetheless and although superresolution approaches can be implemented to decrease effective pixel size^{29,35–37}, it provides a modest resolution limit incoming from relatively low NA values (~ 0.2 NA range) because of the geometrical constraints imposed by the pixel characteristics. Although these two opposite experimental arrangements are frequently implemented, intermediate cases have also been reported in the literature⁵.

Regarding the drawbacks, both LHM as well as Gabor's original idea of holography suffer from several issues such as coherent noise, weak diffraction assumption and twin image problem³⁸. In that sense, coherence noise can be reduced by using partially coherent sources^{25,26,39} or by overlapping several in-line holographic recordings^{40,41}. Weak diffraction assumption (the most restrictive issue in Gabor holography since it can prevent image formation) restricts the range of samples which can be imaged by LHM but it can be circumvented by both reinserting an external reference beam (like in a Leith&Upatnieks configuration) or by applying special implementations of phase-shifting holography^{38,42}. And finally, twin image problem raises as a direct consequence of the in-line configuration and it can be avoided in LHM by using two different strategies: phase-shifting^{43,44} and phase retrieval^{45–50} algorithms. Phase shifting is based on the relative phase variation between both interferometric beams^{38,42–44} while phase retrieval can be conducted from iterative^{45–47} as well as from deterministic^{48–50} algorithms.

Twin image problem is usually addressed using several sequential recordings in time by, for instance, multi-height recording using glass cover slips of different thicknesses²⁹ or by mechanical displacement of the camera⁴⁵ or tuning the illumination wavelength⁴⁶ or defocusing the image⁴⁷. Time dependence for phase retrieval was avoided by Waller *et al.*⁵⁰ by proposing a clever method based on the transport of intensity equation (TIE) where the axial defocus between images is provided by the intrinsic chromatic aberration of imaging lenses. Thus, using broadband illumination and a single RGB color camera snap-shot, three axially slightly defocused images (one in focus, one under and other over focus) corresponding with the three color camera channels are recorded at once and enter as inputs in the TIE algorithm. Their method is ultimately limited by the camera acquisition frame rate when imaging fast dynamic biological events, thus avoiding the sequential recording of multiple mis-focused images needed in previous methods.

The concept introduced by Waller *et al.*⁵⁰ has been recently adapted to quantitative phase imaging in LHM^{51,52}. While the first is based on a refractive principle (axial chromatic aberration by refraction), the latter falls on diffractive constraints (wavelength dependence of diffraction). Thus, by illuminating the sample with three RGB color-coded simultaneous beams, three diffraction Fresnel patterns are recorded at once in a single color camera snap-shot. After demosaicing the multiplexed in-line hologram to separate the three wavelength-coded channels, digital image processing based on numerical propagation and phase retrieval algorithm finally yield in a phase contrast image of the inspected sample. In addition, a novel and fast convergence algorithm was introduced improving the capabilities of the technique (named by us as Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel-MISHSELF microscopy) concerning quantitative phase imaging, resolution and processing time⁵².

In this manuscript, we expand up MISHSELF microscopy concept by building a compact, cost-effective and field-portable microscope based on a generalized MISHSELF concept. On previous implementations^{51,52}, RGB proposed scheme is based on the fact that the illumination is tuned with the maximum spectral sensitivity of the RGB camera channels. Thus, the color-coded RGB images are directly read from the RGB camera channels since the crosstalks can be disregarded. However, compact and cost-effective RGB coherent illumination sources are not available in the market thus disabling this MISHSELF scheme as useful in the field-setting where low-cost solutions are demanded. Instead of this, inexpensive multiplexed coherent illumination is available from the laser diode source included, for instance, in some Blu-ray optical units. Within this compact and small diode can, three solid state lasers are included for reading compact discs (infrared-IR-light), digital versatile discs (red-R-illumination) and Blue-ray discs (blue-B-wavelength). Because of these three wavelengths are not tuned with the RGB maximum sensitivities of regular color cameras, each wavelength contributes at the three camera channels and direct demosaicing cannot be applied to extract the multiplexed Fresnel patterns as in the RGB implementation. Moreover, different magnified and shifted Fresnel patterns are recorded since the IRRB emitters are axially and transversally slightly shifted; so additional software capabilities must be incorporated. We have built a compact microscope prototype using this inexpensive triple laser source in addition with a modified MISHSELF algorithm to accommodate this version of MISHSELF microscopy with detuned illumination/detection scheme and scaled/shifted Fresnel patterns. All together allows MISHSELF microscopy to be generalized and stepped forward, to be implemented in a field-setting portable platform using reduced cost components (not as bench-top system within a well-controlled environment), and to be of significant importance in developing countries and environments with limited resources.

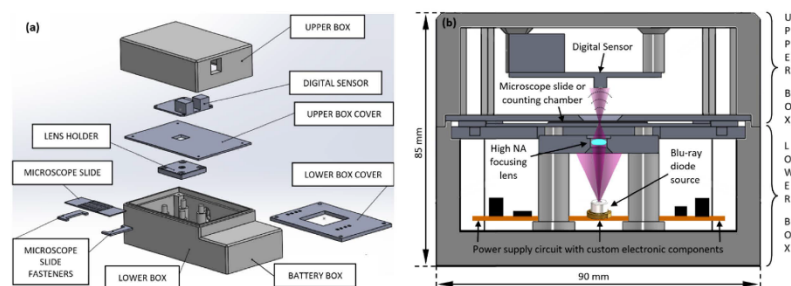


Figure 1. Prototype design. (a) explosion view of the main components and (b) assembly diagram of a central cross-section of the prototype with external dimensions.

Results

Prototype manufacturing. To demonstrate the capabilities of our imaging platform, a microscope prototype has been designed (using commercially available CAD software platform) and built (using Fused Deposition Material with ABS for most of the components and mechanization process for the rest). An exploded drawing of the different components as well as a global assembly scheme are included at Fig. 1 while the manufactured prototype is presented at Fig. 2.

Essentially, the prototype consists in two independent parts (upper and lower boxes), one for holding the camera (upper box) and the other (lower one) for the rest of the components of the layout. The idea is to have easy access to enter the sample without the use of movable trays inserted through lateral slots; thus, both boxes can be separated, the sample placed on the location aimed to, and the boxes joined again for sample analysis. The upper box has a lateral hole for extracting the USB camera cable towards the computer and a plastic cover to protect the board level camera (the cover is not visible in the pictures). This cover contains a clear optical window in front of the camera sensitive area to allow light passing. The camera can be regulated a few millimeter in height for properly accommodating its position to the geometrical parameters of the system (essentially magnification and resolution). The upper box is placed face to face with the lower one and the upper box cover remains closely but not in contact with the microscope slide. The lower box contains a customized board circuit acting as power supply of the three laser diodes.

The emission power of the three sources has been previously equalized according to the spectral sensitivity of the camera for providing comparable image intensity at the three camera channels. Potentiometers, voltage regulators, on/off switches and other electronic components integrate the customized board circuit. The high NA focusing lens is assembled onto a lens holder plate and supplemented away in height from the laser diode can using four pillars. The distance between the lens and the laser can is around 22 mm to allow beam spreading and homogenization over the whole lens diameter. The lens focuses the three laser beams into a set of three high NA slightly laterally and axially shifted point sources just below the sample. The lens can be moved up and down a few millimeters to both properly set the position of the point sources regarding the sample (see the “ d_z ” distance of the figure included at subsection “Field-portable MISHIELF microscope design: experimental layout” of the Methods) and to define a reasonable magnification factor when also considering the distance between the camera and the sample (“ z ” distance of the same figure). As example of a real configuration in the prototype, (d_z) \cong 0.5 mm and $z = 7$ mm meaning that $M \cong 15X$. Note that this value is slightly different for each illumination source due to the slightly different axial position of each point source after lens focusing.

Finally, a cover plastic plate closes the lower box (not visible in the pictures). This cover plate has an internal hole having the shape of the lens holder plate just to allow close proximity between the sample and the lens. And the sample is placed on a microscope slide which is hold to the cover plate using two fasteners with adjustable positions. In addition, the lower box contains a small lateral hole for inserting the external power supply (9 volts) and a supplementary space for the case of using power batteries.

Calibration of the prototype. Our prototype is now calibrated using a static USAF resolution test target. The USAF test case is useful to explain some significant stages of the MISHIELF algorithm presented in the Methods section. The calibration results (intensity images) are included at Figs 3 and 4. The recorded hologram using the three simultaneous illuminations (IRRB sources) is included in Fig. 3(a). Then, the RGB camera channels are obtained by demosaicing that hologram. The resulting images are included at the second column of Fig. 3 (images b1-b2-b3). But because of the detuned illumination/detection scheme, each wavelength contributes to all recording channels; so the information becomes mixed and needs to be separately recovered. The third row presents the retrieved holograms for each true illumination wavelength (images c1-c2-c3). Note as the B channel (b3) is quite similar to the true B illumination hologram (c3) since the crosstalks at the B camera channel incoming from IR and R illuminations are very weak. But this is not the case of the R and G channels where the contributions of IR and R wavelengths are quite similar in intensity at those channels. In addition, the third row also brings into light the slightly different scales (magnifications) and positions (shifts) of the in-line holograms for the

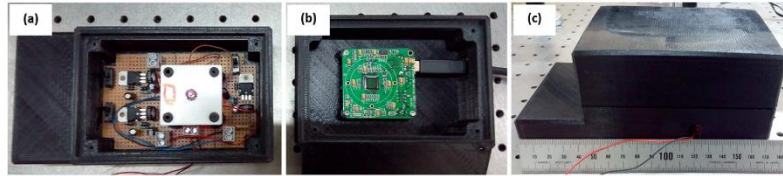


Figure 2. Manufactured prototype: pictures at the lab of (a) the lower box, (b) the upper box and (c) a global view of the prototype.

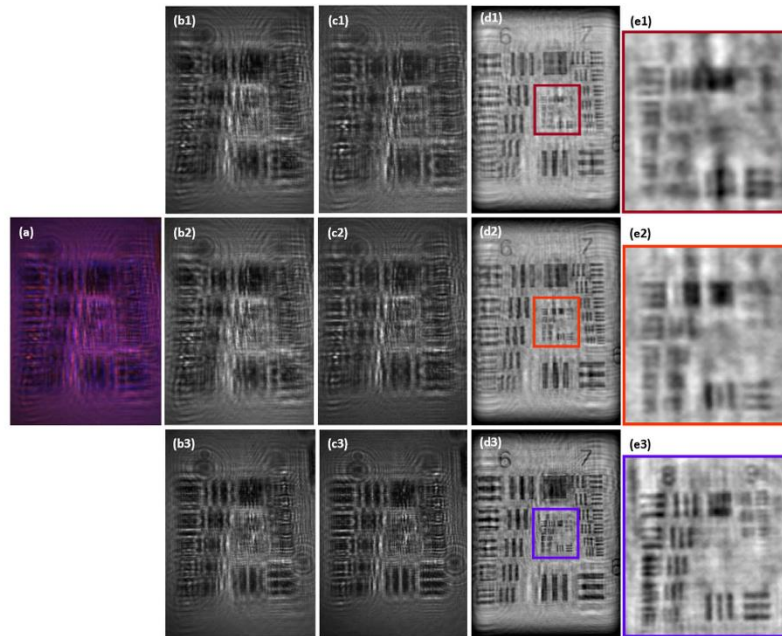


Figure 3. Results for MISHELF microscopy using detuned illumination/detection with the USAF test: calibration results of the prototype. The 1st row (a) includes the wavelength multiplexed in-line hologram while the 2nd one (b) depicts the three RGB color channels provided by the camera. The 3rd row (c) includes the retrieved holograms for each true illumination wavelength without image equalization. And the 4th (d) and 5th (e) rows present the in focus images of the test and a magnified area of the inner high resolution part, respectively.

true IRRB illuminations. In particular, we have computed a magnification factors of $M = 14.2X/15.3X/16.1X$ for IR/R/B, respectively, values that are in good agreement with the previously established theoretical one ($M \cong 15X$).

The retrieved true illumination holograms (images c1-c2-c3) are equalized considering both magnification/shift compensation and center-to-border illumination homogenization. Then, each hologram is separately brought into focus and the resulting full frame images are included in the fourth row (images d1-d2-d3) of Fig. 3 while the fifth row (images e1-e2-e3) depicts a magnification of the high resolution (central) area of the fourth row images. One can see as the resolution is improved from G8-E3 (G and E incoming from Group and Element, respectively) of the USAF resolution test target until G9-E2 corresponding with $3.1\ \mu\text{m}$ (323 lp/mm) and $1.7\ \mu\text{m}$ (575 lp/mm) for the IR and B illuminations, respectively, and for the largest camera direction. These values define a NA value of around 0.24 according to the theoretical definition ($R \sim \lambda/NA$) and for the shortest illumination wavelength.

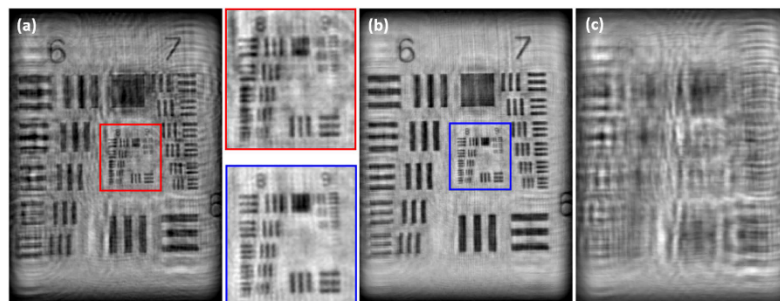


Figure 4. Results for MISHELF microscopy using detuned illumination/detection with the USAF test: final results comparison. The full frame images (and their magnified inner parts) for (a) B-LHM and (b) our IRRB scheme, and (c) the intensity distribution obtained at the twin image plane for the B-LHM case showing no presence of the twin image contribution.

Finally, these three images enter into the algorithm concerning single fused image synthesis and phase retrieval. The final result is included at Fig. 4 in comparison with the result obtained when using single B illumination wavelength. One can see as the resolution limit is maintained at both images (around $1.7\ \mu\text{m}$ under the previously stated conditions) but the IRRB image gains in background homogeneity and contrast as consequence of the noise averaging and twin image elimination. According to the USAF retrieved area, the FOV included at Fig. 4(a) and (b) is around $225 \times 300\ \mu\text{m}$, approximately. To clearly state that twin image is eliminated, Fig. 4(c) presents the intensity distribution obtained when the recovered IRRB complex amplitude is numerically propagated until the twin image plane for the B illumination case. One can see as MISHELF microscopy eliminates the twin image: the intensity distribution contains no USAF in-focus image and only the misfocused pattern obtained by numerical propagation to that plane. On the other hand, conventional B-LHM produces a twin image contribution (not included in Fig. 4) which is equal but inverted and conjugated to the one presented in Fig. 4(a).

Experiments with dynamic samples. The prototype has also been tested via two different types of dynamic samples. The first validation involves an alive swine sperm sample. The sperm cells have approximately a head's width of $6 \times 9\ \mu\text{m}$, a total length of $55\ \mu\text{m}$, and a tail's width of $2\ \mu\text{m}$ on the head side and below $1\ \mu\text{m}$ on the end. The biosample is introduced by micropipetting into a commercially available counting chamber ($100\ \mu\text{m}$ thickness). The sperm cells move along the chamber and the inspection area is around $300 \times 300\ \mu\text{m}$. Due to the fast movement of the sperm cells, we have replaced the previous camera (Mightex SMN-C050-U) by a faster one (AVT Mako G-419, 90fps at 1024×1024 pixels, 5×5 pixel pitch). Thus, the recording time for a single frame is around 10 ms and only limited by the frame rate of the camera.

Figure 5 shows the experimental results concerning the phase distribution of the sperm biosample. Images (a)-(b) are for the single B wavelength illumination case while (c)-(d) are the ones obtained with the proposed MISHELF microscopy method for positive [(a) and (c)] and negative [(b) and (d)] phase contrast visualization modes. In addition, the images at Fig. 5 are the first frames of a recording sequence of images which are separately included in video movies from Video1.mov to Video4.mov files. The total recording time was 2 seconds and the video movies are played at 12.5 fps to slowly see in detail the sperm cell's movement. From Fig. 5, one can see as the proposed approach improves the phase stability from a qualitative point of view since the background noise of the phase images is reduced as consequence of the averaging provided by the MISHELF image multiplexing. It can also be seen as the contrast (cell's visibility against background) of the cells becomes enhanced and the tails of the cells are clearly visible for all of them while they are barely resolved in most of the cells with single B illumination LHM. Finally, the obtained resolution is in concordance with the calibration experiment ($\sim 1.7\ \mu\text{m}$) since, as one can see in the images, the tails of the sperm cells are visible at the head's side ($\sim 2\ \mu\text{m}$) while they are not resolved on the other side ($< 1\ \mu\text{m}$).

As it can be seen from the previous videos, there are several sperm cells that are defocused because they are moving at different planes inside the counting chamber. All those spermatozooids can also be refocused by numerical propagation, thus selecting the axial plane where they are in focus. This information is very useful to retrieve a 3D trajectory of each sperm cell in the 3D volume defined by the thick counting chamber³³⁻⁵⁹. The result is included in Video5.mov where a set of 13 trajectories are evaluated, one per each spermatozoid moving along the FOV. Figure 6 depicts the last frame of the 3D plot containing all the extracted trajectories.

Our second experiment including a dynamic sample considers standard monodisperse polystyrene microspheres in aqueous suspension (Polybead[®] Microspheres) with a diameter of $3.00 \pm 0.07\ \mu\text{m}$ according to the theoretical specifications of the manufacturer. For this experiment, we have used the same sensor as in the USAF experiment (Mightex USB3.0 color camera). Figure 7 includes a comparison of the experimental results in 3D-plot visualization mode of the retrieved phase distributions for: (a) the single B illumination case and (b) our IRRB scheme. In order to validate these results, Fig. 7(c) includes the 3D view of the phase values retrieved by a regular Match-Zehnder interferometric configuration assembled at an optical bench in the lab. Although they are

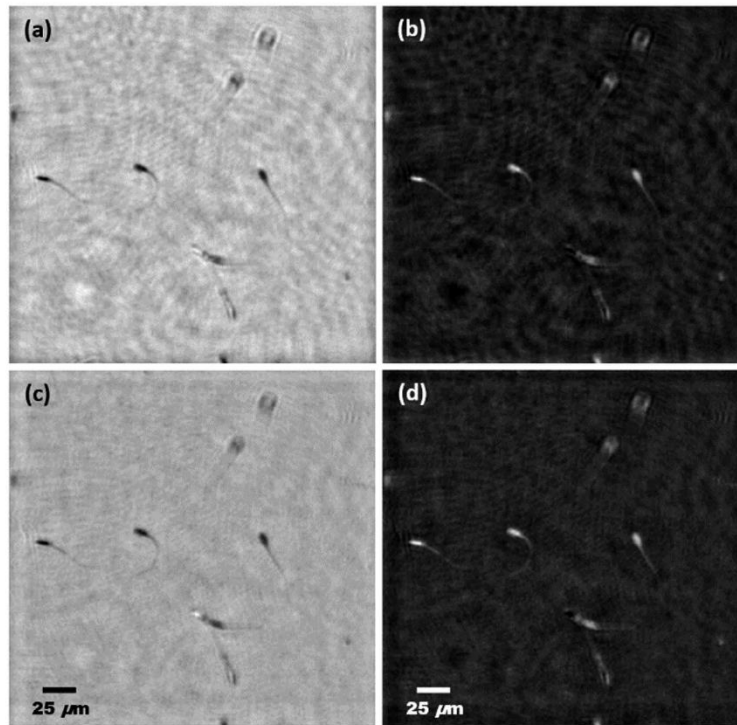


Figure 5. Results for MISHELF microscopy using detuned illumination/detection with alive sperm biosample. Images (a,b) and (c,d) represent, respectively, the phase distribution when considering B-LHM and our IRRB scheme for positive [(a) and (c)] and negative [(b) and (d)] phase contrast visualization. In addition, the whole image sequence for each case is included from Video1.mov to Video4.mov, respectively (2.4MB per video movie).

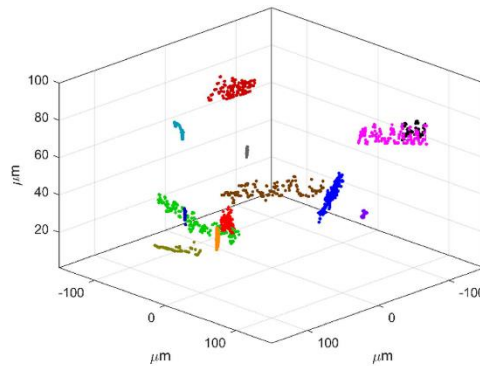


Figure 6. Results for MISHELF microscopy using detuned illumination/detection with alive sperm biosample: 3D plot of the spermatozoid trajectories. The generation of the trajectories is included in Video5 file (Video5.mov, 6.9 MB).

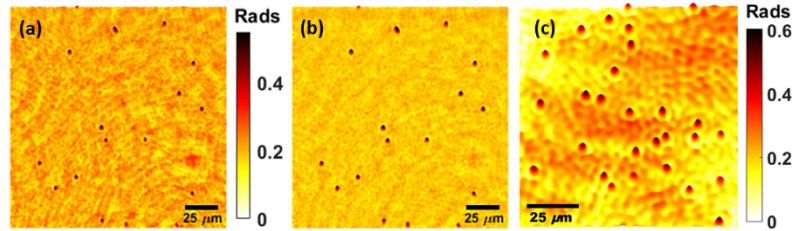


Figure 7. Results for MISHELF microscopy using detuned illumination/detection with microbeads: 3D plots of the phase distributions for (a) B-LHM, (b) our IRRB scheme and (c) a Match-Zehnder interferometric layout assembled at the lab. (a) and (b) images share the same scale bar (the one place in the middle) in rads. The whole image sequence for the lensless experiments is included in Video6 movie file (Video6.mov, 2.3 MB).

	B-LHM	IRRB MISHELF	Interferometric layout
Background value (rads)	0.18	0.18	0.20
Maximum phase value (rads)	0.59	0.59	0.60
Microbeads phase step (rads)	0.41	0.41	0.40
Background STD (rads)	0.033	0.017	0.054

Table 1. Phase values comparison for B-LHM, IRRB MISHELF microscopy and conventional Match-Zehnder interferometric configuration when using a microbeads sample.

not the same flowing microbeads included at (a) and (b), it is an image coming from the same sample in origin which is prepared analogously to the lensless experiment one; so a similar phase profile should be obtained. The interferometric layout uses a He-Ne laser to illuminate the microbeads which are imaged by a microscope lens (0.15NA Olympus UMPPlanFl) onto a CCD camera (Basler A312f, 582×782 pixels, $8.3 \mu\text{m}$ pixel size, 12 bits/pixel). When combined with a tilted reference beam, an off-axis hologram is recorded and the complex amplitude information of the microbeads can be retrieved by using conventional and widely-known operations (Fourier transform of the hologram, spatial filtering at the Fourier plane, inverse Fourier transform, aberration phase compensation and 3D plots). Note that it is a single frame image in contrast with the video recording provided for the MISHELF microscopy experiment and included in Video6.mov file. We have used a 0.15NA objective since it is the nearest lens at the lab having a similar NA value to the estimated one provided by MISHELF microscopy prototype for the shortest sensor direction and, thus, the retrieved phase values should be roughly similar. This estimation is derived from Fig. 4b where the last resolved element in the horizontal direction is around G9-E1 defining a resolution limit of $\sim 2 \mu\text{m}$ and meaning a NA value of around 0.17 when considering the shortest sensor direction (1920 pixels).

To validate the results from a quantitative point of view, we have computed the averaged background values of all the images as well as the maximum phase step introduced by the microbeads. Then, their difference will be the phase disturbance caused by the microspheres. The results are summarized in Table 1 where the phase step introduced by the microbeads shows a high concordance between the phase values provided by the proposed IRRB method and the quantitative phase information retrieved from conventional digital holographic microscopy. For completeness, the last row at Table 1 also includes the Standard Deviation (STD) values of the background. These values are also useful to show the improvement in phase stability provided by MISHELF microscopy since the background averages and fluctuates at around lower levels than for the single B illumination case.

Discussion and Conclusions

MISHELF microscopy is a powerful and versatile tool with a strong potential in biomedical applications. Although previous implementation⁵² reported on a similar background concept, it was only a proof-of-concept and preliminary validation at the lab of a specific implementation of the technique which is very far to become a commercially available and tangible reality. This manuscript provides a step forward on MISHELF microscopy since: i) it reports on the general frame of the method regarding hardware (illumination/detection scheme) and software (complete algorithm description), ii) it is not a technique running at the lab since a real portable prototype has been manufactured and characterized, and iii) it presents experimental results with not only static samples but dynamic experiments with alive samples. Those capabilities are based on relevant changes in hardware components (illumination source and focusing lens) and software (algorithm adaptation to the new detuned scheme) with respect to ref. 52, changes allowing miniaturization of the technique/device to make it a fact in the field-setting.

Thus, a new design and prototype of LHM based on wavelength multiplexing, working with single hologram acquisition and using a fast convergence algorithm for image processing is presented along this manuscript.

All together, the reported MISHELF microscopy enables single-shot improved quantitative phase imaging by twin-image elimination in LHM. This is a direct consequence of the simultaneous multiple illumination and a robust and powerful phase retrieval algorithm incoming from a single camera snap-shot as input. Our field-portable, compact and cost-effective MISHELF microscope achieves micrometric range lateral resolution over an inspection area which is comparable with the FOV provided by microscope objectives having similar NA and resolution values. However, this value can be accommodated for higher NA values until reaching the maximum theoretical NA value defined by the illumination source (0.6 NA in this prototype but a reasonable real one of ~ 0.4 NA). Additional advantages come from the compactness and weight (~ 300 grams) of the prototype. Due to its compact design and the possibility to operate without external power supply, our MISHELF microscope can be particularly interesting and useful for point-of care diagnosis or in the field-setting.

The resolution limit in LHM depends on the selected configuration (sample in close contact with the point source or with the recording device). MISHELF microscopy belongs to the Gabor's like implementation techniques meaning that no geometrical constraints of the detector (sampling theorem) affect the resolution limit because of the geometrical magnification factor introduced by the layout. Thus, the resolution limit is defined from its classical definition of $R \sim \lambda/NA$ meaning that the best resolution is achieved when considering the shorter (B illumination) wavelength (see images e1-e2-e3 at Fig. 3) and the higher NA coming from the largest sensor direction (in case it will be rectangular). Our MISHELF microscope prototype keeps the best achievable resolution incoming (B illumination) at the final image (see Fig. 4) while uses the other two illuminations for twin image elimination and quantitative phase improvement regarding contrast, noise and halos. This is accomplished by applying a fast convergence algorithm based on illuminating the sample at once with three simultaneous coherent lights (RGB at⁵² and IRRB in the proposed realization) and recording a single multiplexed hologram with a color camera at video rate speed. This wavelength multiplexing introduces a limitation at the proposed method: it is needed that the intensity distribution of the sample will contain the same spatial profile for all the illumination wavelengths to be used. In other words, the color object information is sacrificed to achieve twin image elimination and improved quantitative phase imaging. So an inherent drawback of the proposed MISHELF microscopy technique is the use of color selective samples such as, for instance, red blood cells or samples with different color-coded attached particles (fluorophores, dyes, etc.). On those cases, wavelength-dependent differences in absorption will result in different hologram intensities for each illumination wavelength or, even worst, the absence of spatial information at those highly absorptive areas. To mitigate this effect, the intensity at those penalized wavelengths can be increased to finally get a weak image from which, although it will not be useful for defining the best final resolution limit, it can be used as part of the phase retrieval algorithm to provide a good quality reconstruction. In another direction, it is possible to think in a multi-wavelength illumination source containing more than three lights (see for instance Spectra Tec X from Blue Sky Research) so the most appropriated three ones could be lighted on for the illumination thus minimizing the previous problem.

The proposed prototype supposes a proof-of-principle technology in the field setting which is oriented towards sperm analysis applications (cell motility, concentration evaluation, trajectory analysis, etc.). Aimed to this, we designed the prototype to be as much compact as possible and adapted to this specific application. As a result, a small size and robust prototype which can be the background of an improved miniaturized microscope's family in next future has been validated. Obviously, the advantages for our application field can be converted into penalizations for different ones. Although some parts of the prototype can be redesigned to accommodate specific constraints for different applications, there is a strong limitation imposed by the small distance between the sample and the sensor (an inherent limitation of the used LHM layout). This fact prevents the broad use of the system since it is not possible, for instance, to use cell culture Petri dishes for investigations on living cells. Nevertheless, the proposed prototype is fully valid and useful for its general use with regular microscope slides (with or without coverslips) and regular plates/counting chambers/microfluidic platforms/etc. of similar thickness dimensions. This fact widely extends the applicability of the proposed device to its general use with this type of slides, especially in the field setting and guided by a non-trained user.

In the validation, we have conducted experiments with both static (non-moving) and dynamic (moving) samples. Static objects (USAF resolution test) allow us to calibrate the prototype in terms of layout considerations as well as in resolution, FOV and algorithmic. Dynamic samples (as fast as the acquisition frame rate of the camera) emphasize the power and versatility of the proposed method for a wide variety of applications such as sperm monitoring and sorting⁵³⁻⁵⁶ and particle tracking⁵⁷⁻⁵⁹, just to cite the same examples where experiments are included in this manuscript. Future applications can be directed, for instance, to merge MISHELF microscopy with microfluidic platforms (holographic optofluidic lensless microscopy ref. 37) thus allowing flow cytometry, waterborne parasite analysis, etc., and also for telemedicine applications in resource limited environments.

Methods

This section introduces MISHELF microscopy by detuning the illumination and the detection, thus expanding up our previous implementation⁵² to a general framework where a given illumination wavelength contributes to more than a single recording channel. Due to this, MISHELF microscopy is optimized and generalized and a field-portable device is built in virtue of this generalization. Optimized in the sense of miniaturization, thus improving its compactness and robustness, and by using low cost elements while providing high quality images. And generalized because the overall framework of MISHELF microscopy is addressed by considering a detuned scenario between illumination and detection stages. Moreover, the selected configuration causes a slightly different magnification and lateral shift in the recorded holograms and this fact must be digitally compensated to get a high quality final image. Thus, the previously reported fast convergence algorithm is now modified to include all those changes, resulting in a more robust, powerful and complete imaging algorithm.

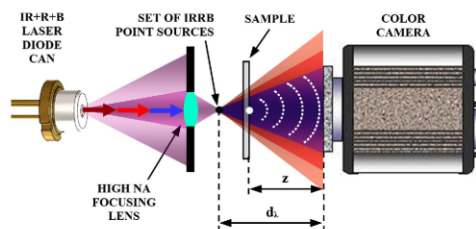


Figure 8. Layout for MISHELF microscopy with detuned illumination/detection using IRRB/RGB multiplexing.

Field-portable MISHELF microscope design: experimental layout. The experimental layout of the generalized MISHELF microscopy concept is depicted at Fig. 8. A coherent illumination source emitting in Infrared (IR)-Red (R)-Blue (B) laser lights (780–660–405 nm, respectively) and a conventional RGB digital recording device define the detuned illumination/detection scheme. This IRRB laser source is removed from a Blu-ray optical unit (Sony model KES-400AAA PS3) and consists on three individual diode lasers which are slightly separated both axially and transversally (typically by a tenths of millimeter). In order to homogenize the illumination (irregular beam shape emitted by the diodes) as well as to equalize (different divergence of the laser diodes) and increase its NA value, we use a focusing commercial-grade plastic lens of 0.6NA. This lens forms a set of three point sources which are slightly separated according to the initial separation of the sources in the laser can and the amount of chromatic (axial and transversal) aberration of the plastic lens. This fact defines a slightly different axial and transversal position for each illumination source which also causes a wavelength-dependent magnification factor in the system ($M = d_s / (d_s - z)$, being d_s the wavelength-dependent distance between each point source and the digital sensor) and also a lateral shift of the recorded holograms. These two issues must be compensated in the calibration stage to finally get a high resolution quality image.

Algorithm adaptation to field-portable MISHELF microscopy. Under these conditions (Fig. 8), the color camera (Mightex USB3.0 SMN-C050-U, CMOS sensor type, 2560×1920 pixels, $2.2 \times 2.2 \mu\text{m}$ pixel pitch) for the USAF resolution test case records the three in-line holograms but with crosstalks contributions incoming from the spectral sensitivity of the RGB camera channels at the used IRRB illumination wavelengths. A global workflow of the MISHELF microscopy algorithm adapted for this detuned illumination/detection scheme is presented in Fig. 9. Essentially, the algorithm is divided into two main blocks (upper and lower parts at Fig. 9). The first one relates with a pre-digital preparation of the holograms before entering into the second block which performs phase retrieval by applying a fast convergence algorithm. Although it is not our aim to describe in detail the algorithm, we will comment its main points in the following paragraphs.

The first block starts with the recording of the RGB in-line hologram in a single camera snap-shot: the sample becomes illuminated with the trichromatic IRRB source and one multiplexed RGB hologram is recorded by the color camera. This RGB hologram is then separated into its three elementary RGB channels where, in general, each one of the illuminations will contribute to each camera channel with different efficiency depending on the specific spectral sensitivity for that wavelength at this channel. And these cross-talks must be removed before continuing; otherwise, the quality of the reconstructed images will be restricted. To easy understand it, let us assume that crosstalks are not removed. Then, each hologram will contain information from the two holographic images (real and virtual) incoming from the useful wavelength at such channel in addition with the two holographic images incoming from the other two illuminations. On one hand, this fact reduces the dynamic range of the hologram; so contrast is penalized. And on the other hand, there is a high background fluctuation incoming from the misfocused images when focusing at the image of interest, yielding in a high disturbance at the phase distribution.

To avoid final quality image restriction, crosstalks must be removed. After demosaicing to separately extract the RGB information, the real IRRB holograms corresponding with the true illumination wavelengths are computed. This process must be applied to each in-line recorded hologram and it is performed by using device calibration, that is, defining a matrix whose coefficients are the amount of IRRB light going to each RGB channel. After that, the true IRRB holograms are brought into focus by numerical propagation allowing three in focus images of the object but with different magnifications and shifts as we have previously noticed. By using correlation operation between those in focus images, all the images are perfectly equalized in magnification and centering. The scale and shift computed factors are then applied to the true IRRB in-line holograms to remove the different magnifications and displacements caused by the three slight differently placed point sources. As result, three true IRRB in-line holograms (IRR'B holograms at Fig. 9) are obtained as they were provided by a single point source (like the pinhole used in ref. 52) with three different illumination wavelengths. In addition, illumination profile homogenization is applied to each hologram to compensate the lower intensity at the border of the images. This image equalization stage needs to be done once and it involves basic (subtraction) digital image processing which can be easily implemented before sample insertion.

After that, these three IRR'B in-line holograms enter in the second block regarding phase iteration algorithm. The process is quiet similar to the one described in ref. 52 but a few words are included here for paper comprehensiveness. The phase iteration algorithm starts with the definition of the initial amplitudes incoming from

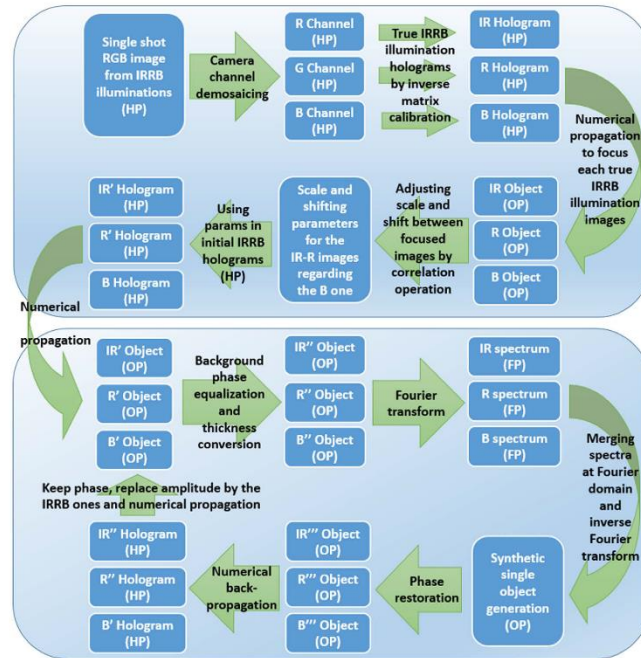


Figure 9. Block diagram of the MISHELF microscopy algorithm for detuned illumination/detection scheme. HP, OP and FP mean Hologram Plane, Object Plane and Fourier Plane, respectively.

each IR'R'B hologram as the square root of their intensity. These three IR'R'B amplitudes are propagated to its best focus (generating IR'R'B' object images at Fig. 9) and the resulting propagation distances are stored in the computer's memory. Those propagation distances are slightly different one to each other due to, on one hand, the thickness of the sample's slide slightly modifies the effective axial position of the sample because of the wavelength dependence in refractive index and, on the other hand, the wavelength dependence on the spatial phase evolution in the Fresnel regime. Regarding the different numerical methods for computing the digital reconstruction of the diffraction integral, we have selected to solve the diffraction Rayleigh-Sommerfeld integral using convolution operation since it allows an effective and economical calculation without any approximation.

These three in-focus IR'R'B' images of the object are then used to synthesize a single fused image through the following steps. First, the global background phase of the three in-focus images is forced to be equal just to avoid phase cancellation effects when mixing their spectra at the Fourier domain. Also, phase distribution is converted into thickness profile ($\Delta L = \Delta\varphi \lambda / 2\pi$, being ΔL the Optical Path Length and $\Delta\varphi$ the phase distribution) to avoid wavelength dependence in the phase distribution. This process generates the IR''R''B'' in-focus images of Fig. 9. Second, we perform digital fast Fourier transform (FFT) of each IR''R''B'' in-focus image (IRRB spectrums at Fig. 9). Third, the three spectra are then used to synthesize a new single spectrum incoming from a weighted combination of them. By weighted we mean that, since the information of the IR spectrum is fully included at the R one and both are also included at the B spectrum, the addition of the three spectra must be weighted by a mask in order to avoid low spatial frequency enhancement. And fourth, inverse FFT of the generated mixed spectrum recovers an improved image of the sample (synthetic single object generation step at Fig. 9), improved in the sense of noise averaging due to the mixing of the three images into a single one.

This synthetic single object is used to generate a new set of in-focus images (IR'''R'''B''' objects at Fig. 9) coming from a phase restoration from the single object thickness distribution by applying the inverse previously applied transformation ($\Delta\varphi = 2\pi \Delta L / \lambda$). These three new in-focus images are then numerically back propagated until the hologram plane (IR'''R'''B''' holograms at Fig. 9) taken into account the three slightly different propagation distances (one per each wavelength) previously stored at the computer's memory. And from these IR'''R'''B''' holograms, a new set of IRRB in-line holograms are generated by retaining the phase distributions while replacing the amplitude ones by the square root of the initially recorded hologram intensities (output of the first block: IR'R'B' holograms). The previous cycle starts (propagation to focus the object, thickness conversion, FFT, merging the spectra and inverse FFT, etc.) again and, after a few number of iterations (typically 2 iterations), a final image containing complex amplitude information of the sample is obtained with improved capabilities since it contains

no information about the twin image and exhibits better image quality concerning noise, halos and contrast. Moreover, the single spectrum generation process allows fast convergence in the phase retrieval algorithm since information of the three channels is mixed together in each iteration.

Swine sample preparation. The swine sample was received and ten micro liters of the swine's sample were taken and added into the oval tube which is placed at the ISASPC heated plate (a plate from PROISER R+D S.L. that keeps the optimum temperature for tubes and slides at constant temperature). The oval tube were kept for 10 min at 37 °C. After that, the semen sample were diluted with Acromax using 1/5 dilution rate (Acromax® is a diluent from Gestión Veterinaria Porcina S.L.). Three micro liters of the dilution were used to load the counting chamber having 100 microns thickness. And the stuffed counting chamber is placed into the prototype for MISHELF microscopy characterization.

References

- Zhu, H., Isikman, S. O., Mudanyali, O., Greenbaum, A. & Ozcan, A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* **13**, 51–56 (2013).
- Mudanyali, O. *et al.* Compact, Light-weight and Cost-effective Microscope based on Lensless Incoherent Holography for Telemedicine Applications. *Lab Chip* **10**, 1417–1428 (2010).
- Mudanyali, O., Oztoprak, C., Tseng, D., Erlinger, A. & Ozcan, A. Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lensfree microscopy. *Lab Chip* **10**, 2419–2423 (2010).
- Isikman, S. O. *et al.* Field-portable lensfree tomographic microscope. *Lab Chip* **11**, 2222–2230 (2011).
- Lee, M., Yaglidere, O. & Ozcan, A., Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography. *Biomed. Opt. Express* **2**, 2721–2730 (2011).
- Greenbaum, A., Akbari, N., Feizi, A., Luo, W. & Ozcan, A. Field-portable pixel super-resolution colour microscope. *PLoS ONE* **8**, e76475 (2013).
- Lee, S. A. *et al.* Imaging and Identification of Waterborne Parasites Using a Chip-Scale Microscope. *PLoS ONE* **9**, e89712 (2014).
- Pushkarsky, I. *et al.* Automated single-cell motility analysis on a chip using lensfree microscopy. *Sci. Rep.* **17**, 4717 (2014).
- Breslauer, D. N., Maamari, R. N., Switz, N. A., Lam, W. A. & Fletcher, D. A. Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Applications. *PLoS ONE* **4**, e6320 (2009).
- Tseng, D. *et al.* Lensfree microscopy on a cellphone. *Lab Chip* **10**, 1787–1792 (2010).
- Smith, Z. J. *et al.* Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications. *PLoS ONE* **6**, e17150 (2011).
- Navruz, I. *et al.* Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array. *Lab Chip* **13**, 4015–4023 (2013).
- Lee, S. A. & Yang, C. A Smartphone-Based Chip-Scale Microscope Using Ambient Illumination. *Lab Chip* **14**, 3056–3063 (2014).
- Preechaburana, P., Suska, A. & Filippini, D. Biosensing with cell phones. *Trends Biotechnol.* **32**, 351–355 (2014).
- Switz, N. A., D'Ambrosio, M. V. & Fletcher, D. A. Quantitative imaging with a mobile phone microscope. *PLoS ONE* **9**, e96906 (2014).
- Miller, A. R. *et al.* Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope. *PLoS ONE* **5**, e11890 (2010).
- Dong, S., Guo, K., Nanda, P., Shiradkar, R. & Zheng, G. FPscope: a field-portable high-resolution microscope using a cellphone lens. *Biomed. Opt. Express* **5**, 3305–3310 (2014).
- Forcucci, A. *et al.* All-plastic miniature fluorescence microscope for point-of-care readout of bead-based bioassays. *J. Biomed. Opt.* **20**, 105010 (2015).
- Phillips, Z. F. *et al.* Multi-Contrast Imaging and Digital Refocusing on a Mobile Microscope with a Domed LED Array. *PLoS ONE* **10**, e0124938 (2015).
- Jagannadh, V. K., Srinivasan, R. & Gorthi, S. S. A semi-automated, field-portable microscopy platform for clinical diagnostic applications. *AIP Advances* **5**, 084902 (2015).
- Gabor, D. A new microscopic principle. *Nature* **161**, 777–778 (1948).
- Rogers, G. L. Experiments in diffraction microscopy. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* **63A**, 193–221 (1952).
- Xu, W., Jericho, M. H., Meinertzhagen, I. A. & Kreuzer, H. J. Digital in-line holography for biological applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11301–11305 (2001).
- Jericho, S. K., Garcia-Sucerquia, J., Xu, W., Jericho, M. H. & Kreuzer, H. J. Submersible digital in-line holographic microscope. *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 043706 (2006).
- Repetto, L., Piano, E. & Pontiggia, C. Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination. *Opt. Lett.* **29**, 1132–1134 (2004).
- Perucho, B. & Micó, V. Wavefront hologscopy: application of digital in-line holography for the inspection of engraved marks in progressive addition lenses. *J. Biomed. Opt.* **19**, 016017 (2014).
- Mendoza-Yero, O. *et al.* Femtosecond digital lensless holographic microscopy to image biological samples. *Opt. Lett.* **38**, 3205–3207 (2013).
- Frentz, Z., Kuehn, S., Hekstra, D. & Leibler, S. Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **81**, 084301 (2010).
- Greenbaum A. & Ozcan, A. Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multi-height lensfree on-chip microscopy. *Opt. Express* **20**, 3129–3143 (2012).
- Greenbaum, A. *et al.* Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy. *Nat. Methods* **9**, 889–895 (2012).
- García-Sucerquia, J., Alvarez-Palacio, D. C., Jericho, M. H. & Kreuzer, H. J., Comment on Reconstruction algorithm for high-numerical-aperture holograms with diffraction-limited resolution. *Opt. Lett.* **31**, 2845–2847 (2006).
- Micó, V. & Zalevsky, Z. Superresolved digital in-line holographic microscopy for high resolution lensless biological imaging. *J. Biomed. Opt.* **15**, 046027 (2010).
- Kanka, M., Riesenber, R. & Kreuzer, H. J. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images. *Opt. Lett.* **34**, 1162–1164 (2009).
- Kanka, M., Riesenber, R., Petruck, P. & Graulig, C. High resolution (NA=0.8) in lensless in-line holographic microscopy with glass sample carriers. *Opt. Lett.* **36**, 3651–3653 (2011).
- Heng, X. *et al.* Optofluidic microscopy - a method for implementing a high resolution optical microscope on a chip. *Lab Chip* **6**, 1274–1276 (2006).
- Cui, X. *et al.* Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for Caenorhabditis elegans and cell imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10670–10675 (2008).
- Bishara, W., Su, T.-W., Coskun, A. F. & Ozcan, A. Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution. *Opt. Express* **18**, 11181–11191 (2010).

38. Micó, V., García, J., Zalevsky, Z. & Javidi, B. Phase-shifting Gabor holography. *Opt. Lett.* **34**, 1492–1494 (2009).
39. Ryle, J. P., McDonnell, S. & Sheridan, J. T. Lensless multispectral digital in-line holographic microscope. *J. Biomed. Opt.* **16**, 126004 (2011).
40. Micó, V., Ferreira, C. & García, J. Surpassing digital holography limits by lensless object scanning holography. *Opt. Express* **20**, 9382–9395 (2012).
41. Micó, V., Ferreira, C. & García, J. Lensless object scanning holography for two-dimensional mirror-like and diffuse reflective objects. *Appl. Opt.* **52**, 6390–6400 (2013).
42. Micó, V. & García, J. Common-path phase-shifting lensless holographic microscopy. *Opt. Lett.* **35**, 3919–3921 (2010).
43. Yamaguchi, I. & Zhang, T. Phase-shifting digital holography. *Opt. Lett.* **22**, 1268–1270 (1997).
44. Zhang, Y. & Yamaguchi, I. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography. *Opt. Lett.* **23**, 1221–1223 (1998).
45. Zhang, Y., Pedrini, G., Osten, W. & Tiziani, H. Whole optical wave field reconstruction from double or multi in-line holograms by phase retrieval algorithm. *Opt. Express* **11**, 3234–3241 (2003).
46. Bao, P., Situ, G., Pedrini, G. & Osten, W. Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths. *Appl. Opt.* **51**, 5486–5494 (2012).
47. Camacho, L., Micó, V., Zalevsky, Z. & García, J. Quantitative phase microscopy using defocusing by means of a spatial light modulator. *Opt. Express* **18**, 6755–6766 (2010).
48. Teague, M. R. Deterministic phase retrieval: a Green's function solution. *J. Opt. Soc. Am.* **73**, 1434–1441 (1983).
49. Streibl, N. Phase imaging by the transport equation of intensity. *Opt. Commun.* **49**, 6–10 (1984).
50. Waller, L., Kou, S. S., Sheppard, C. J. R. & Barbastathis, G. Phase from chromatic aberrations. *Opt. Express* **18**, 22817–22825 (2010).
51. Noom, D. W. E., Flaes, D. E. B., Labordus, E., Eikema, K. S. E. & Witte, S. High-speed multi-wavelength Fresnel diffraction imaging. *Opt. Express* **22**, 30504–30511 (2014).
52. Sanz, M., Picazo-Bueno, J. A., García, J. & Micó, V. Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm. *Opt. Express* **23**, 21352–21365 (2015).
53. Su, T., Xue, L. & Ozcan, A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 16018–16022 (2012).
54. Su, T. *et al.* Sperm trajectories form chiral ribbons. *Sci. Rep.* **3**, 1664 (2013).
55. Di Caprio, G. *et al.* 4D tracking of clinical seminal samples for quantitative characterization of motility parameters. *Biomed. Opt. Express* **5**, 690–700 (2014).
56. Jikeli, J. *et al.* Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes. *Nat. Comm.* **6**, 7985 (2015).
57. Cheong, F. C. *et al.* Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy. *Opt. Express* **17**, 13071–13079 (2009).
58. Langehanenberg, P. *et al.* Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy. *J. Biomed. Opt.* **14**, 014018 (2009).
59. Memmolo, P. *et al.* Recent advances in holographic 3D particle tracking. *Adv. Opt. Photon.* **7**, 713–755 (2015).

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Carles Soler and Francisco Blasco from Proiser R+D S.L. for providing the swine sperm sample and for helping in prototype manufacturing. This work has been cofunded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) under the project FIS2013-47548-P and by an internal grant of the University of Valencia (Valoritza i Transfereix, clave específica 20140227).

Author Contributions

M.S. and J.-A.P.-B. performed all the experiments, analyzed data, and assisted in image processing. M.S. also developed the power supply board for the triple laser light. L.G. design the prototype as well as supervised its manufacturing. J.G. helped in the design of experimental protocols. J.G. and V.M. supervised the project. V.M. wrote the manuscript and all authors reviewed it.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Sanz, M. *et al.* Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy. *Sci. Rep.* **7**, 43291; doi: 10.1038/srep43291 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

6.3. Publicación 3

Optics and Lasers in Engineering 110 (2018) 341–347



Contents lists available at ScienceDirect

Optics and Lasers in Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/optlaseng

Four channels multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel (MISHSELF) microscopy



Martín Sanz, Jose Ángel Picazo-Bueno, Luis Granero, Javier García, Vicente Micó*

Departamento de Óptica y de Optometría y Ciencias de la Visión. Facultad de Física. Universidad de Valencia, C/ Doctor Moliner 50, Burjassot 46100, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
 Multiplexed holography
 Phase retrieval
 Digital image processing
 Lensless microscopy
 Coherence imaging

ABSTRACT

MISHSELF microscopy [Opt. Express 23, 21352 (2015)] has been recently reported as the background technology of a new concept of compact, cost-effective and field-portable lensless microscope [Sci. Rep. 7, 43291 (2017)] based on wavelength multiplexing and a fast and robust algorithm for twin image minimization and noise reduction. In this manuscript, MISHSELF microscopy is expanded beyond its actual configuration by considering 4 illumination/detection channels while retaining its working principle concerning single-shot, twin image mitigation and noise averaging. Proof of principle validation of the proposed improvement is conducted through experiments with a resolution test target and a micro sphere sample.

1. Introduction

Lensless microscopy emerges as a discipline of digital holographic microscopy where lenses are removed from the optical layout. Lensless microscopy originally derives from a digital implementation of the Gabor's invention [1,2] where a point source of coherent light illuminates the sample and the diffracted wavefront is recorded by a digital sensor [3]. Under certain approximations [4,5], the recording process is ruled by holography and image reconstruction coming from the recorded Fresnel diffraction pattern is achieved by applying numerical methods in the digital domain [6]. Lensless microscopy has found a wide variety of applications such as, just to cite a few (the list is very large), submersible imaging [7,8], tracking particles/cells evolution [9–11], spectacle lens inspection [12,13], optofluidic approaches [14–16], and telemedicine and global health [17–19].

Nowadays, lensless microscopes have experienced a strong development because of the new achievements in optical components in the optoelectronic field as well as their price reduction. Thus, there are available solution of low cost, portable and miniaturized versatile devices for biomedical applications [8,18,20–28], some of them working in a lensfree scheme [8,18,20–23] while others operating as smartphones implementations [24–28].

Recently reported [29], MISHSELF (initials coming from Multi-Illumination Single-Holographic-Exposure Lensless Fresnel) microscopy proposes a new concept of compact, cost-effective and field-portable lensless microscope prototype based on wavelength multiplexing and a fast and robust algorithm for twin image minimization and noise reduction. MISHSELF microscopy is based on the illumination of the sam-

ple with three different wavelengths and the recording of the different Fresnel diffraction patterns. Different implementations of this technique have been reported at lab level (bench-top system within a well-controlled environment) where the process is conducted sequentially in time using three laser diode at 685, 785, and 940 nm wavelengths [30] or in a single snap-shot with RGB multiplexing in the illumination/detection stages [31,32]. MISHSELF microscopy concept has been validated as a prototype in the field-setting [29] and newly merged with wide field of view lensfree microscopy to create a novel imaging platform based on dual mode imaging in real time with different magnifications and resolution capabilities in lensless microscopy [33].

In this contribution, we report on the extension from 3 to 4 useful illuminations/detection channels in MISHSELF microscopy. This new approach retains the single-exposure working principle (useful for imaging dynamic samples) of MISHSELF microscopy while improves twin image mitigation, halo reduction and noise averaging since there are now 4 available channels with valuable information about the inspected sample. Proof of principle validation is provided in virtue of a new laboratory prototype and two different calibration samples (resolution test target and micro spheres) are used for demonstration of the proposed method. The manuscript is organized as follows. Section 2 presents the optical layout and the manufactured prototype as well as the general algorithmic/processing to be performed. Section 3 includes the experimental validation. And Section 4 concludes the paper.

2. Experimental layout

A scheme of the proposed 4-channels MISHSELF microscopy concept is presented in Fig. 1(a) while some views (front, lateral and perspec-

* Corresponding author.

E-mail address: vicente.mico@uv.es (V. Micó).<https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2018.06.020>

Received 24 April 2018; Received in revised form 4 June 2018; Accepted 29 June 2018

Available online 6 July 2018

0143-8166/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

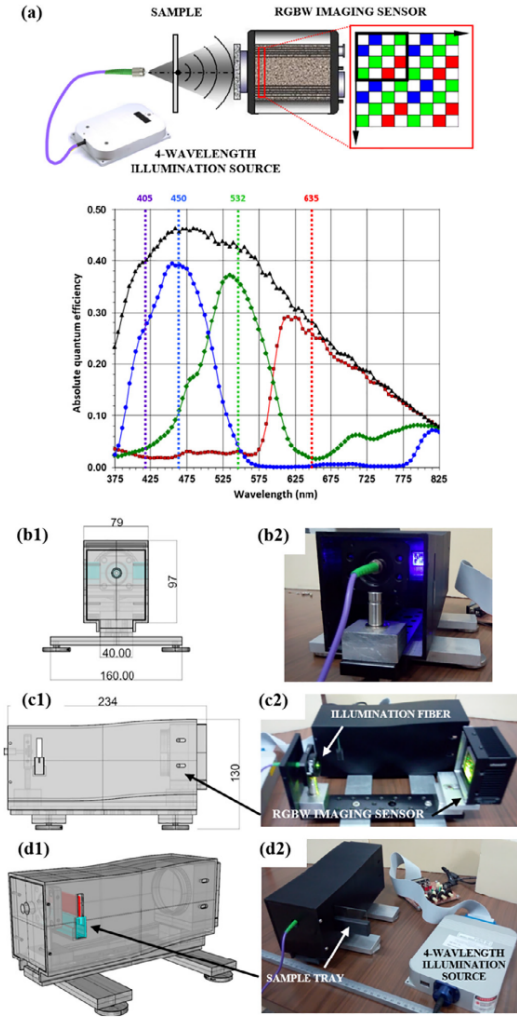


Fig. 1. (a) Optical layout of the proposed 4-channels MISHELF microscopy including the spectral sensitivity of the 4 different camera channels where black graph corresponds with the W channel; from (b) to (d) different views of the prototype concerning its design (left column) and pictures (right column). Units are in mm.

tive) of the designed (left column) and manufactured (right column) prototype are included through Figs. (b)–(d). The microscope prototype has been designed using commercially available CAD software platform and built using Fused Deposition Material with ABS for most of the components and mechanization process for the rest. As it can be seen, the illumination fiber and the imaging sensor are placed on both ends of the prototype while the sample is inserted by a lateral slot in the proximity of the illumination source using a sample tray. Approximately, the distances between source/sample (z) and sample/camera (d) are 15 and 175 mm, respectively, defining a theoretical magnification of $M = (d + z)/z \cong 12.6\times$.

To implement the 4-channels MISHELF microscopy configuration, we have used a 4 wavelength source of fiber optic coupled diodes (Blue

Sky Research, SpectraTec 4 STEC4-405/450/532/635 nm). The RGBV diodes are coupled to single mode fibers, so the numerical aperture (NA) of the illumination becomes very limited (~ 0.1 range). As imaging sensor, we have used a 4 channels RGBW camera (Viewworks VA-8MG2-C10CA0, 3296×2474 pixels, $5.5 \mu\text{m}$ pixel size, 10 fps, GigE interface). This camera contains a Kodak Truesense sensor with a color filter pattern (see Fig. 1(a)) that builds upon the standard Bayer pattern by adding panchromatic (W) pixels to the RGB pixels present on the sensor. As a result, the basic cell of the RGBW filter array is integrated by a 4×4 pixels (see Fig. 1(a)) which is replicated along the sensor area. Originally, these W pixels are aimed to increase sensitivity in the black and white, so the final image is improved in terms of luminance. The spectral sensitivity of the different filters is also included in Fig. 1(a).

But our goal is to use the 4 different sensitivities of the imaging sensor to retrieve 4 images coming from the 4 different illuminations. Because of the fact we are not using a tuned scheme for illumination/detection as it happens in Refs. [31,32], we need to extract real intensities from the detection channels. An in-depth description of the algorithm is presented in Refs. [29,32] but a few words about the new parts are included here.

In essence, MISHELF algorithm is divided in two main blocks: the first one is related with a pre-digital preparation of the holograms before entering into the second block which performs phase retrieval by applying a fast convergence algorithm [32]. The first block starts with the recording of a RGBW in-line hologram in a single snap-shot. After that, demosaicing is implemented to extract separately the RGBW information provided by the camera since we know the pixel ordination in the basic cell of the filter array (Fig. 1(a)). This procedure is needed in order to eliminate the crosstalks and to improve image quality in the reconstruction process. Thus, the real RGBV holograms corresponding with the true RGBV illuminations can be computed by two different ways. First, one can theoretically know the amount of a given wavelength entering into the different channels by looking at the spectral sensitivity graph included at Fig. 1(a). This is a rough procedure for obtaining a set of 4×4 factors regarding the contribution of each illumination wavelength into each detection channel. So, it is possible to roughly retrieve the real RGBV holograms by a weighted subtraction operation guided by this 4×4 factors. And second, the retrieval of these real RGBV holograms can be also computed using calibration. We have preferred to use calibration since it is a more precise way to know the exact contribution of the 4×4 factor's set rather read it from the graph. Calibration means that, without placing the object and fixing the intensity per each illumination source, each laser diode is sequentially turned on and 4 different images are recorded. Then, the 4 channels from each recorded image are obtained and a relative weight factor is computed from the global intensity distribution of each channel. We have selected the mean intensity value of the whole image as key metric for computing the 4×4 factor's set.

Essentially, the intensities at each camera channels (I_R, I_G, I_B, I_W) result as a combination of the 4 illumination intensities (I_1, I_2, I_3, I_4) and can be written as

$$\begin{pmatrix} I_R^{CCD} \\ I_G^{CCD} \\ I_B^{CCD} \\ I_W^{CCD} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_1 & b_1 & c_1 & d_1 \\ a_2 & b_2 & c_2 & d_2 \\ a_3 & b_3 & c_3 & d_3 \\ a_4 & b_4 & c_4 & d_4 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \\ I_4 \end{pmatrix} \Rightarrow \vec{I}_{det} = M_{cal} \cdot \vec{I}_{em} \quad (1)$$

The matrix elements (a_i, b_i, c_i, d_i) represent the detector response of each RGBW channel to the RGBV illuminations, being $i = 1, 2, 3, 4$. Those coefficients can be obtained theoretically or experimentally as previously stated and this procedure needs to be done once as preliminary calibration of the prototype. After the detector response matrix (M_{cal}) is experimentally obtained, it is possible to obtain the real intensities by computing the inverse matrix of M_{cal} in the form of

$$\vec{I}_{em} = M_{cal}^{-1} \cdot \vec{I}_{det} \quad (2)$$

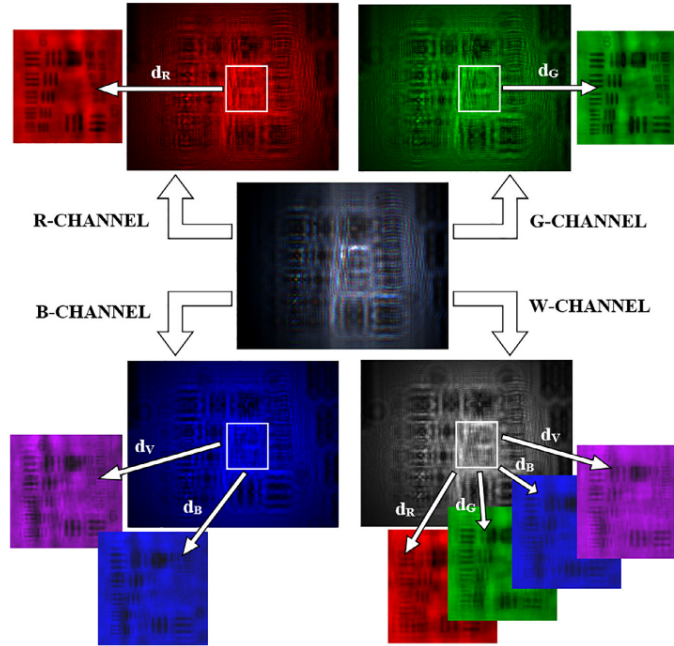


Fig. 2. Experimental results for a resolution test target. The 4 RGB channels are extracted from the RGBW hologram (placed at the center). From these RGBW hologram, different in focus test images (see the central test magnification images) are obtained by numerical propagation at different distances (d_R , d_G , d_B , and d_V). Those in focus image are coming from the different crosstalks in each RGBW channel. Images are rendered in RGBV color palette for better visualization/identification.

Table 1
Normalized values of the crosstalks obtained by camera calibration.

	R channel	G channel	B channel	W channel
R wavelength	0.601	0.055	0.002	0.676
G wavelength	0.070	0.817	0.203	0.958
B wavelength	0.042	0.150	0.863	1
V wavelength	0.059	0.064	0.496	0.844

This procedure must be performed on each in-line recorded RGBW hologram. After that, the true RGBW holograms are brought into focus by numerical propagation allowing 4 focused images of the object. Additional illumination profile homogenization can be applied to compensate the lower intensity at the image borders.

Finally, these 4 in-line holograms enter then in the second block regarding phase iteration algorithm. This second block starts with the synthesis of a single fused image according to the next steps: i) a digital fast Fourier transform (FFT) of each one of them after global background phase equalization, ii) a synthesis of a mixed spectrum incoming from a weighted addition of the 4 individual spectra (weighted by using a filter mask that takes into account the overlapping at the common spectral regions to avoid low spatial frequency enhancement), iii) and an inverse FFT of the mixed spectrum to recover an improved image of the sample (improved in the sense of noise averaging due to the mixing of the 4 images into a single one). Then, the improved image becomes the input of a phase retrieval algorithm consisting in the iterative application of back and forth numerical propagations between hologram and sample planes and taking into account that: i) every numerical propagation at the hologram plane retains the phase information and replaces the resulting amplitude by the square root of the recorded hologram intensity, and ii) a new mixed spectrum is synthesized according to the

previous description every numerical propagation until the object plane. Additional constraints can be applied depending on a priori knowledge about the input sample. Thus, phase information can be set to zero at the object plane if we know that the object is a pure amplitude one (resolution tests) or the amplitude distribution can be disregarded in case of pure phase samples. The algorithm provides a high convergence and, after a few number of iterations (typically 2 cycles), provides a final image containing complex amplitude information of the sample with improved capabilities regarding no information about the twin image and better image quality concerning noise, halos and contrast.

3. Experimental results

Experimental validation is first reported by using a USAF resolution test target and the main results are included at Figs. 2–4. Fig. 2 shows the presence of crosstalks in the different channels of the single-exposure multiplexed RGBW hologram which is included at the center. From it, 4 different in-line holograms are obtained from the RGBW channels by direct demosaicing and each one of them is then numerically propagated to get an in focus image of the test target. Fig. 2 includes the in focus central part of the test which is obtained from each RGBW hologram/channel. But the most important fact is that because of the low crosstalks at some channels, the R and G holograms only contain 1 in focus image of the test and B hologram contains 2. Obviously, the W channel contains 4 in focus images since it is spectrally sensitive to the 4 used illumination wavelengths. Table 1 includes the measured and normalized values of the crosstalks confirming this premise. Moreover, the spectral sensitivity graph included at Fig. 1(a) also qualitatively corroborate this fact. Since the contribution of non-red wavelengths in the R channel is minimal (1 order of magnitude in difference), the true R hologram can be directly derived from the R channel. Something similar

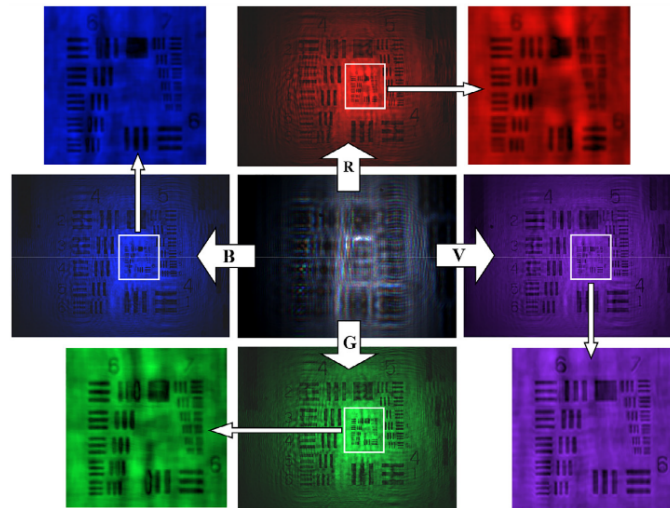


Fig. 3. Experimental results for a resolution test target. The RGBV hologram is placed at the center and the 4 RGBV in focus images are extracted in the up/down/left/right positions. The central part of the RGBV images are also magnified. Images rendered in RGBV color palette for direct visualization/identification.

happens to the G hologram/channel where the non-green wavelengths have very small crosstalks for the G spectral sensitivity of the camera. This is not the case for the B and W channels where different contributions are involved.

Thus, Fig. 2 shows the single in focus R/G images incoming from the R/G channels when numerically propagate the R/G channels a distance equal to d_R/d_G , respectively, the two in focus images derived from the B channel when considering the B/V wavelengths with propagation distances of d_B/d_V , respectively, and the 4 in focus images provided by the W channel for the 4 illumination wavelengths. Note as the image quality of the retrieved in focus images is deteriorated as the number of crosstalks increases in each camera channel since the dynamic range becomes reduced as consequence of having more wavelengths per channel.

Then, Eq. (2) is applied with the factors included in Table 1 for retrieving the real RGBV holograms. Essentially, the dimensionality of the problem is reduced from 4 to 2 illumination/channels since the R/G holograms can be directly assigned to the R/G channels as previously stated. Nevertheless, Eq. (2) is a general procedure valid for a 4×4 illumination/detection scheme. Fig. 3 includes the RGBV in focus test target images obtained after numerical propagation from the real RGBV holograms derived from Eq. (2). Again, the multiplexed single-shot RGBV hologram is at the center and the in focus RGBV images are included in Fig. 2 at the up/down/left/right positions of the central hologram and their central part is magnified for clarity. Those RGBV color images represent the result provided by conventional digital in-line holographic microscopy at different wavelengths and with different resolution limits. Note that the images included in Fig. 3 are rendered using RGBV color palette for direct identification but they are treated as gray level images in the MISHELF algorithm, so color information is lost.

Then, these 4 RGBV images are used as the input of the MISHELF algorithm for image quality improvement. Previous realizations considered 2 [33] and 3 [29,32] images but here we are using 4, so the final result becomes further improved beyond previous results. Fig. 4 presents the final image in (a) and the magnified central part in (b). Also and for comparison, the conventional result provided by single V illumination is included at Figs. 4(c)-(d). Note that these images are the same ones included at Fig. 3 and corresponding with the V channel but in gray level

and with image equalization to compensate the illumination decreasing at the borders. It is direct to realize on the global noise reduction and image contrast improvement provided by the 4-RGBV channels image concerning twin image elimination, background homogeneity, coherent artifacts, spurious reflections, etc.

In order to quantitatively measure the image quality improvement, we have analyzed background noise levels and contrast. The background noise is compared from the normalized standard deviation (STD) values at some clear areas (marked with dotted red rectangles in Figs. 4(a-c) in the test images. We have computed averaged STD values of 0.058 and 0.081 for the 4-RGBV channels and single V illumination images, respectively, meaning an improvement factor close to 30% in background noise reduction. And the contrast improvement is derived from Fig. 4(c) where a comparative plot along the vertical bars of the Group 4 – Element 1 is presented. The plot is not a single row plot but an average plot along the whole vertical bar rows to obtain an averaged comparative. The result shows an improvement factor of 40% in contrast when comparing the 4-RGBV channels plot (black line) with the single V illumination plot (blue line).

Moreover, resolution is not penalized since MISHELF microscopy retains the resolution limit provided by the best (the lower) illumination wavelength. From Figs. 4(b) and (d), the resolution limit for the largest (horizontal) CCD dimension is $4.4 \mu\text{m}$, approx., incoming from Group 7 – Element 6 of the resolution test. Also from Figs. 3(a) and (c), we have calculated a magnification factor of 12X, value that perfectly matches with the theoretical prediction.

A second experiment is performed considering a static cluster of air-immersed microspheres ($90 \mu\text{m}$ in diameter). The beads are introduced into a counting chamber of $100 \mu\text{m}$ thickness by micro pipetting and the water surrounding medium is evaporated. Fig. 5 includes the final intensity (row number 1) and phase (row number 2) results obtained by the proposed RGBV-channels technique (d column) in comparison with the results provided by conventional single V illumination (a column) as well as by the use of 2 (V and G at b column) and 3 (V, G and R at c column) illumination/detection channels. In general, it is possible to notice that image quality is improved as the number of multiplexing channels becomes increased.

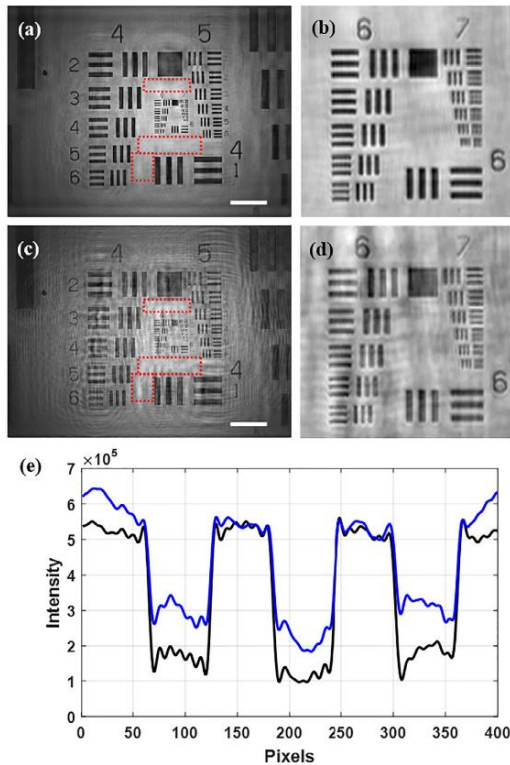


Fig. 4. Experimental results for a resolution test target: (a)-(b) final image retrieved by the proposed technique and the magnification of its central area, (c)-(d) the same derived from the use of a single V illumination wavelength, and (e) comparative intensity plot derived from the vertical bars of the Group 4 – Element 1 for the proposed method (black line) and the single V illumination (blue line). Scale bars (white lines at the lower right corners in a and c) are 200 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

And in particular, Fig. 6 includes additional analysis coming from two comparative plots corresponding with: (a) a small dust particle attached to one of the chamber's side and (b) a background plot. In the first, the color-coded rectangles included at phase images of Fig. 5 are magnified and a plot along the color-coded dashed lines is provided. The plot shows that the small particle is barely resolved using single V illumination (1 channel) and becomes to be more resolved as the number of channels is increased. And in the second plot, background noise reduction is achieved as the number of channels becomes increased. One can note that, from the single V illumination wavelength case to the 4-channels result, the plot line becomes smoother and oscillates at lower values, meaning that the background is averaged and provides lower noise levels.

4. Conclusions

In summary, we have reported on the use of 4 illumination/detection channels in MISHELF microscopy for improving far beyond its capabilities concerning twin image minimization and global noise reduction. The validation has been achieved in virtue of a microscope prototype working under single-exposure wavelength multiplexing. The portable prototype resolved details down to 4 μm (approx.) pitch and further improvement in resolution limit can be achieved by increasing the illumination NA in the line of Ref. [29]. The technique works in a single camera snap-shot and, although not demonstrated in this manuscript, it is useful for imaging dynamic events with the only limitation introduced by the camera acquisition rate.

Experimental results have been presented validating the proposed 4-channels MISHELF microscopy in comparison with previous implementations considering lower number of channels. In particular, it is noticeable the quantitative and qualitative image quality improvement provided by the MISHELF microscopy technique when passing from 3 (basic scheme in previously proposed Refs. [29,32]) to the now proposed 4 illumination/detection scheme: background phase noise is reduced by averaging and phase steps are reinforced as the number of channels becomes increased.

Although the sample is introduced in vertical (something inadvisable for studying dynamic samples unaffected from gravity effects where samples are placed in horizontal slides), it is our aim to provide proof-of-principle validation of the 4-channels extended MISHELF microscopy method. Nevertheless, it is possible to design a vertical prototype for extending the applicability range of the technique. The main drawbacks of the method come from the dynamic range restriction derived by the use of 4 simultaneous illuminations and that it is not a valid technique

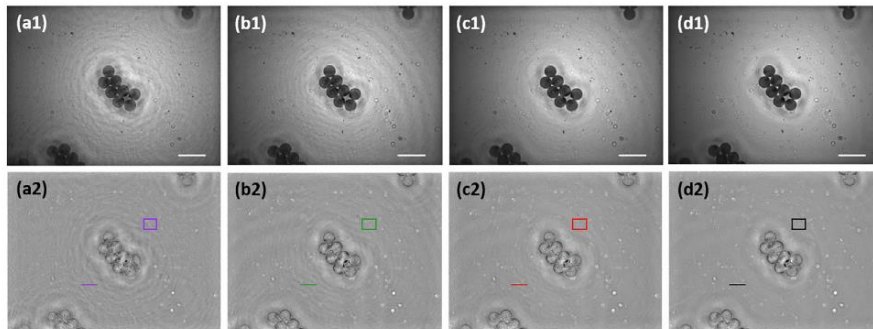


Fig. 5. Experimental results for a 90 μm micro beads. By rows, (1) and (2) include intensity and phase images, respectively. By columns, (a)-(b)-(c)-(d) are derived from the use of single V illumination, double V-G illuminations, triple V-G-R illuminations and four channels V-B-G-R illuminations, respectively. Scale bars (white lines at the lower right corners) are 200 μm .

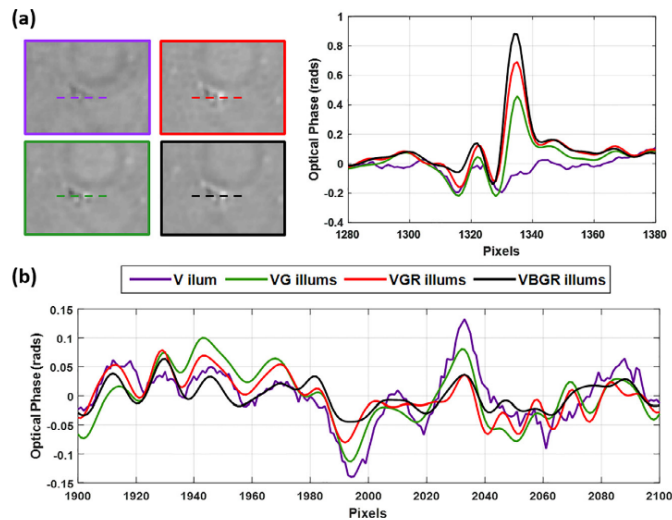


Fig. 6. Comparative plots from the retrieved phase distributions included at Fig. 5: (a) includes a magnification of the ROIs marked with color-coded rectangles in Fig. 5 and the plot along the color-coded dashed lines included in the magnified ROIs; and (b) presents the background plots along the color-coded solid lines in Fig. 5. Violet/green/red/black color-coded lines and rectangles represent V, VG, VGR and VBGR illumination/detection channels, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for color selective samples since color object information is sacrificed to achieve twin image elimination and improved quantitative phase imaging.

Acknowledgments

This work has been funded by the Spanish **Ministerio de Economía y Competitividad** and the **Fondo Europeo de Desarrollo Regional** under the project **FIS2013-47548-P**, and by an internal grant of the **University of Valencia** (Valoritza i Transfereix, clave específica 20140227).

References

[1] Gabor D. A new microscopic principle. *Nature* 1948;161:777–8. doi:10.1038/161777a0.

[2] Rogers GLXIV. Experiments in Diffraction Microscopy. *Proc R Soc Edinb Sect Math Phys Sci* 1952;63:193–221. doi:10.1017/S0080454100007093.

[3] Xu W, Jericho MH, Meinertzhagen IA, Kreuzer HJ. Digital in-line holography for biological applications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:11301–5. doi:10.1073/pnas.191361398.

[4] Takaki Y, Ohzu H. Fast numerical reconstruction technique for high-resolution hybrid holographic microscopy. *Appl Opt* 1999;38:2204. doi:10.1364/AO.38.002204.

[5] Micó V, García J, Zalevsky Z, Javidi B. Phase-shifting Gabor holography. *Opt Lett* 2009;34:1492. doi:10.1364/OL.34.001492.

[6] Kreis T. *Handbook of Holographic Interferometry: Optical and Digital Methods*. Weinheim: WILEY-VCH; 2005.

[7] Jericho SK, García-Sucrequia J, Xu W, Jericho MH, Kreuzer HJ. Submersible digital in-line holographic microscope. *Rev Sci Instrum* 2006;77:043706. doi:10.1063/1.2193827.

[8] Mudanyali O, Oztoprak C, Tseng D, Erlinger A, Ozcan A. Detection of waterborne parasites using field-portable and cost-effective lensfree microscopy. *Lab Chip* 2010;10:2419. doi:10.1039/c004829a.

[9] Xu W, Jericho MH, Kreuzer HJ, Meinertzhagen IA. Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. *Opt Lett* 2003;28:164. doi:10.1364/OL.28.000164.

[10] Frentz Z, Kuehn S, Hekstra D, Leibler S. Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy. *Rev Sci Instrum* 2010;81:084301. doi:10.1063/1.3473937.

[11] Su T-W, Xue L, Ozcan A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperm reveals rare statistics of helical trajectories. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:16018–22. doi:10.1073/pnas.1212506109.

[12] Perucho B, Micó V. Wavefront holography: application of digital in-line holography for the inspection of engraved marks in progressive addition lenses. *J Biomed Opt* 2014;19:016017. doi:10.1117/1.JBO.19.1.016017.

[13] Perucho B, Picazo-Bueno JA, Micó V. A novel marking reader for progressive addition lenses based on gabor holography. *Optom Vis Sci* 2016;93:534–42. doi:10.1097/OPX.0000000000000818.

[14] Cui X, Lee LM, Heng X, Zhong W, Sternberg PW, Psaltis D, et al. Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for Caenorhabditis elegans and cell imaging. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:10670–5. doi:10.1073/pnas.0804612105.

[15] Bishara W, Zhu H, Ozcan A. Holographic opto-fluidic microscopy. *Opt Express* 2010;18:27499. doi:10.1364/OE.18.027499.

[16] Bishara W, Isikman SO, Ozcan A. Lensfree optofluidic microscopy and tomography. *Ann Biomed Eng* 2012;40:251–62. doi:10.1007/s10439-011-0385-3.

[17] Breslauer DN, Maamari RN, Switz NA, Lam WA, Fletcher DA. Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. *PLoS ONE* 2009;4:e6320. doi:10.1371/journal.pone.0006320.

[18] Mudanyali O, Tseng D, Oh C, Isikman SO, Sencan I, Bishara W, et al. Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications. *Lab Chip* 2010;10:1417. doi:10.1039/c000453g.

[19] Zhu H, Isikman SO, Mudanyali O, Greenbaum A, Ozcan A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* 2013;13:51–67. doi:10.1039/C2LC40864C.

[20] Isikman SO, Bishara W, Sikora C, Yaglidere O, Yeah J, Ozcan A. Field-portable lens-free tomographic microscope. *Lab Chip* 2011;11:2222. doi:10.1039/c1lc20127a.

[21] Lee M, Yaglidere O, Ozcan A. Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography. *Biomed Opt Express* 2011;2:2721. doi:10.1364/BOE.2.002721.

[22] Greenbaum A, Akbari N, Feizi A, Luo W, Ozcan A. Field-portable pixel super-resolution colour microscope. *PLoS ONE* 2013;8:e6475. doi:10.1371/journal.pone.0076475.

[23] Pushkarsky I, Liu Y, Weaver W, Su T-W, Mudanyali O, Ozcan A, et al. Automated single-cell motility analysis on a chip using lensfree microscopy. *Sci Rep* 2015;4. doi:10.1038/srep04717.

[24] Miller AR, Davis GL, Oden ZM, Razavi MR, Fateh A, Ghazanfari M, et al. Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope. *PLoS ONE* 2011;5:e11890. doi:10.1371/journal.pone.0011890.

[25] Tseng D, Mudanyali O, Oztoprak C, Isikman SO, Sencan I, Yaglidere O, et al. Lensfree microscopy on a cellphone. *Lab Chip* 2010;10:1787. doi:10.1039/c003477k.

[26] Smith ZJ, Chu K, Espenson AR, Rahimzadeh M, Gryshuk A, Molinaro M, et al. Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications. *PLoS ONE* 2011;6:e17150. doi:10.1371/journal.pone.0017150.

[27] Preechaburana P, Suska A, Filippini D. Biosensing with cell phones. *Trends Biotechnol* 2014;32:351–5. doi:10.1016/j.tibtech.2014.03.007.

[28] Skandarajah A, Reber CD, Switz NA, Fletcher DA. Quantitative imaging with a mobile phone microscope. *PLoS ONE* 2014;9:e96906. doi:10.1371/journal.pone.0096906.

- [29] Sanz M, Picazo-Bueno JA, Granero L, García J, Micó V. Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on MISHELF microscopy. *Sci Rep* 2017;7:43291. doi:10.1038/srep43291.
- [30] Noom DWE, Eikema KSE, Witte S. Lensless phase contrast microscopy based on multiwavelength Fresnel diffraction. *Opt Lett* 2014;39:193. doi:10.1364/OL.39.000193.
- [31] Noom DWE, Boonzajer Flaes DE, Labordus E, Eikema KSE, Witte S. High-speed multi-wavelength Fresnel diffraction imaging. *Opt Express* 2014;22:30504. doi:10.1364/OE.22.030504.
- [32] Sanz M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm. *Opt Express* 2015;23:21352. doi:10.1364/OE.23.021352.
- [33] Sanz M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Dual-mode holographic microscopy imaging platform. *Lab Chip* 2018;18:1105–12. doi:10.1039/C7LC01304C.

6.4. Publicación 4



Lab on a Chip

PAPER

View Article Online
View Journal | View IssueCite this: *Lab Chip*, 2018, 18, 1105

Dual-mode holographic microscopy imaging platform†

M. Sanz, J. A. Picazo-Bueno, J. García and V. Micó *

We report on a novel layout capable of dual-mode imaging in real time with different magnifications and resolution capabilities in lensless microscopy. The concept is based on wavelength multiplexing for providing two illuminations with different wavefront curvatures: one is collimated, allowing a large field of view (FOV) with a poor resolution limit, and the other is divergent, to achieve a better resolution limit (micron range) over a small FOV. Moreover, our recently reported concept of MISHELF microscopy [M. Sanz, J. A. Picazo-Bueno, L. Granero, J. García and V. Micó, *Sci. Rep.*, 2017, 7, 43291] is applied to the divergent illumination case, improving the image quality by noise averaging and twin image minimization. The performance of this novel dual-mode lensless microscopy imaging platform is validated through experiments using both static amplitude (resolution test targets) and dynamic complex (flowing microbeads and live sperm cells) samples. The proposed imaging platform represents the background technology for a new generation of lensless microscopes with improved performance and capabilities.

Received 6th December 2017.
Accepted 23rd February 2018

DOI: 10.1039/c7lc01304c

rsc.li/loc

Introduction

Coherent optical microscopy is nowadays a very useful imaging modality in many scientific research areas including biophotonics and life sciences.^{1–4} Coherent optical microscopy involves a wide range of coherent imaging modalities such as optical coherence tomography,⁵ tomographic diffraction microscopy,⁶ digital holographic microscopy (DHM),⁷ quantitative phase imaging,⁸ lensless holography,⁹ and ptychography.¹⁰ Among them, DHM is a very appealing approach in biomedicine due to its inherent characteristics regarding visualization of phase samples using a non-invasive (no need for labelling), full-field (non-scanning), real-time (single-frame acquisition), non-contact (no sample damage) and static (no moving components) operating principle.^{7,11,12}

In DHM, there is an emerging imaging modality which has attracted widespread interest where imaging is performed using a lens-free configuration. This type of lensless digital holographic microscopy (LDHM) is derived from the digital implementation of Gabor's invention,^{13,14} where a point source of coherent light illuminates the sample and the diffracted wavefront is recorded using a digital sensor.¹⁵

Although other configurations are possible,^{16,17} LDHM can be implemented using two opposite layouts.⁹ On the one

hand, the sample is placed in close proximity to the point source of illumination and the digital sensor becomes farther in comparison;^{15,18–22} on the other hand, it is the illumination source that is far away while the sample is on top of the digital sensor.^{23–26} From now on, we will refer to them as high-resolution (HR) and wide-field (WF) LDHM, respectively. HR-LDHM introduces a magnification factor (typically ranging from 5× to 20×) by geometrical projection of the sample's diffraction pattern at the digital sensor plane and provides similar properties as those reported in DHM regarding the field of view (FOV) and resolution limit when considering objectives up to medium numerical aperture (NA) values (~0.4–0.5 NA). WF-LDHM defines no geometric magnification (~1× range) but the allowable FOV becomes extremely improved since the whole sensitive area of the detector is available. Nevertheless, WF-LDHM provides a modest resolution limit coming from lower NA values (~0.2 NA range) because of the geometrical constraints imposed by the detector. One can find cost-effective, compact and portable microscopes with easy-to-use, highly reliable and accurate diagnostics in field settings based on these two types of LDHM arrangements.^{27–34}

In this contribution, we merge together both HR- and WF-LDHM platforms into a single one, allowing a dual and simultaneous imaging mode without altering the intrinsic characteristics and advantages of each one of them. The combination is possible because of the wavelength multiplexing at the illumination/detection stages. On the one hand, green (G) light is used to provide a wide FOV image coming from a 1×-range magnification factor. This is accomplished by

Departamento de Óptica y Optometría y Ciencias de la Visión, Facultad de Física, Universidad de Valencia, C/Doctor Moliner 50, Burjassot, 46100, Spain.
E-mail: vicente.mico@uv.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7lc01304c

illuminating the object with a collimated beam, which covers the entire camera-sensitive area. On the other hand, blue (B) and red (R) illuminations provide a magnified image of the object and are used to apply our recently introduced concept of MISHELF microscopy.³⁴ MISHELF (initials stand for multi-illumination single-holographic-exposure lensless Fresnel) microscopy proposes a new concept of compact, cost-effective and field-portable lensless microscope prototype based on wavelength multiplexing and a fast and robust algorithm for twin image minimization and noise reduction. Previous developments^{35,36} were based on RGB illumination/detection schemes and implemented at a lab level (bench-top system within a well-controlled environment) but ref. 34 generalizes the MISHELF microscopy concept by detuning the illumination/detection schemes which is validated as a prototype in field settings. Now, we are removing G illumination from MISHELF microscopy in order to allow dual-mode imaging but BR illuminations are still capable of achieving MISHELF imaging. The proposed dual-mode lensless microscopy imaging platform generalizes LDHM while reports on the background technology for a new generation of lensless microscopes with improved performance and capabilities.

Methods

Brief MISHELF microscopy overview

Before presenting dual-mode LDHM and for completeness, we briefly summarize the MISHELF microscopy concept. MISHELF microscopy is implemented using a multi-illumination source of different coherent wavelengths with a multi-channel recording device (Fig. 1). It is a classical HR-LDHM layout where the digital sensor is placed at d and z distances from the point source and sample planes, respectively, defining the magnification factor $M = d/(d - z)$ at the recording plane. Typically, the distances are in the range of $5 < z < 10$ mm and $(d - z) \sim 0.5$ mm, thus defining magnification factors and resolution limits in the range of $\sim 10\times$ to $\sim 20\times$ and at a micron level, respectively.

The ideal case in MISHELF microscopy is defined by a tuned spectral sensitivity of the detection channels with the illuminations. This is the case defined by a customized filter array on top of a digital sensor made from a mosaic of single-pixel interference filters where the spectral sensitivity of each pixel is specifically designed to transmit each single laser illumination wavelength. Fig. 1 depicts a scheme con-

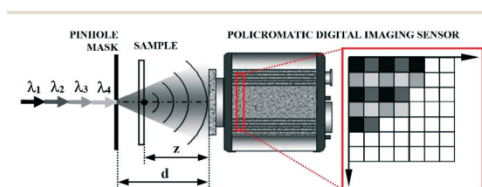


Fig. 1 Layout for tuned MISHELF microscopy with 4-channel multiplexing.

sidering 4 illumination/detection channels. However, in order to be cost-competitive, typical arrangements are implemented using Bayer filters.^{34–36}

After fixing the detection device, the next step is to properly select the illumination source. The first choice (ideal case) is to provide tuned illumination with detection channels for direct extraction of the color-coded diffraction patterns. Thus, RGB illumination was implemented using different strategies,^{35,36} although modest resolution limits as well as poor light efficiency were achieved. For this reason, a detuned implementation (general case) using a Blu-ray diode emitting simultaneously in 3 different wavelengths (IRRV) was considered.³³ It is a compact and cost-effective coherent laser source emitting at 3 wavelengths that are not tuned with the RGB maximum sensitivities of the color camera, so each wavelength enters each RGB camera channel and direct imaging demosaicing cannot be applied. Moreover, different magnifications ($M = d/(d_i - z)$) and shifted Fresnel patterns will be produced since the 3 point sources are slightly axially and transversally shifted inside the diode can.

Last but not least, digital image processing based on numerical propagation and a phase retrieval algorithm retrieves a final complex amplitude image of the inspected sample. Fig. 2 includes a block diagram of the general case of the MISHELF algorithm, where the main steps/decisions are presented. For a complete and in-depth description of the algorithm, the reader can refer to ref. 34 and 36. Fig. 2(a) includes the stage where true IRRV color-coded holograms are extracted from RGB detection channels after scale/shift

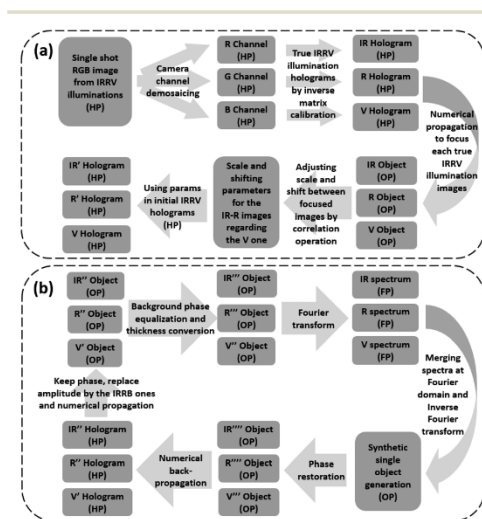


Fig. 2 Block diagram of the MISHELF microscopy algorithm for the detuned illumination/detection scheme: (a) recording and image preparation stage and (b) iterative phase retrieval block. HP, OP and FP mean hologram plane, object plane and Fourier plane, respectively.

adjustment and Fig. 2(b) depicts the phase retrieval stage. Note that the output of (a) becomes the input of (b) after numerical propagation from the hologram to the object plane.

Dual-mode lensless microscopy imaging platform

But probably the major drawback of MISHELF microscopy is the reduced FOV provided by the instrument, which is reduced in comparison with WF-LDHM configurations.^{23–26} Aiming to address this shortcoming, we present a dual-mode real-time imaging platform combining the capabilities provided by the two classical lens-free holographic configurations in microscopy.

The experimental scheme of the proposed LDHM platform is included in Fig. 3. Two illumination light paths are combined by a beam splitter (BS) cube before entering into the in-line common geometry. On the one hand, B (450 nm) and R (635 nm) illuminations are taken from a 4-wavelength source of fiber-optic coupled diodes (Blue Sky Research, SpectraTec 4 STEC4-405/450/532/635 nm) and collimated by a regular lens (L1). On the other hand, G (520 nm) illumination is provided by another fiber-optic coupled diode source (OSI Laser Diode, TCW RGBS-400R, 450/520/638 nm) and its wavefront curvature is modified by a lens system. Both illumination paths (BR and G arms) enter in parallel into a microscope lens (Mitutoyo M Plan Apo 10 \times , 0.28 NA) and as a result: i) the BR arm provides divergent beams since they enter collimated at the microscope lens, and ii) the G arm allows collimated illumination because the lens system is set to focus the G light just at the Fourier plane of the objective. This dual-mode illumination is then directed toward the sample which is placed just after the focal spots of the BR arm and a CMOS board level imaging device (Mightex USB3.0 color camera, 2560 \times 1920 pixels, 2.2 μ m pixel size, 14 fps) is placed behind the sample for the recordings. Finally, the holograms are processed using a MATLAB software platform where a customized algorithm is implemented.

At this point, some comments regarding the experimental layout proposed in Fig. 3 are relevant:

I. The microscope objective is used for illumination purposes instead of imaging. This is a typical procedure in conventional HR-LDHM systems where the laser beam is focused into the illumination pinhole. Nevertheless, it is not possible

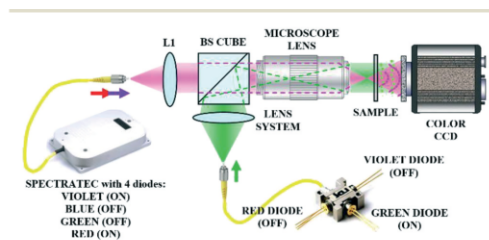


Fig. 3 Layout for the dual-mode lensless microscopy imaging platform.

to revert the configuration (a practical and common criticism in HR-LDHM layouts) since here we are providing two different FOVs, one of them with ~ 20 mm². This issue is unviable using a conventional microscope lens.

II. Moreover, the use of a long working distance objective (34 mm WD) removes an additional drawback of HR-LDHM arrangements: the close proximity between the sample and the spherical point source of illumination (pinhole or fiber optic or similar).

III. Similarly, WF-LDHM also suffers from the close proximity between the sample and the digital sensor. This fact introduces practical restrictions that are avoided in our LDHM imaging platform since the sample is placed in a ~ 1 cm range away from the sensor (the typical distance in a HR-LDHM layout). So the sample is neither in close contact with the illumination nor with the sensitive sensor area, thus improving sample manipulation and accessibility.

IV. The objective lens has been selected as a compromise between its NA value (which will finally provide the best resolution limit) and the beam diameter needed in the collimated illumination for covering the whole sensor area. Nevertheless, it can be adapted depending on the system requirements.

V. G light is selected for the wide FOV configuration leaving B and R ones for the MISHELF microscopy concept. The reason is because the proportion between G and B/R pixels in the Bayer mask is 2:1; on the one hand, the higher the number of available pixels, the better the resolution limit in the WD-LDHM layout (ultimately limited by the sampling stage); on the other hand, the shortest wavelength (B) is available for obtaining the best resolution limit in HR-LDHM.

VI. Finally, G light is removed from MISHELF microscopy, thus reducing the number of disposable channels from 3 to 2 at the phase retrieval algorithm block. This fact reduces the averaging capability provided by the MISHELF concept regarding noise, halo and contrast mitigation, but is not critical since it is still possible to work with only 2 channels (see the experimental sections).

Results

The proposed dual-mode lensless microscopy imaging platform has been experimentally validated for different samples. Fig. 4 includes a couple of pictures of the experimental layout taken at the lab where some differences between Fig. 3 and 4 concerning system dimensions are visible. Fig. 3 presents a design for minimizing the total size of the proposed platform in order to stress that the system can be built at a prototype level with reasonable small dimensions (25 \times 10 \times 5 cm in length \times width \times height, approx.) leaving aside the illumination boxes. However, Fig. 4 does not include lens L1 and the distance between the G illumination fiber and the lens system is not minimized due to practical reasons (available lenses at the lab). Nevertheless, this fact does not reduce the applicability of the proposed method.

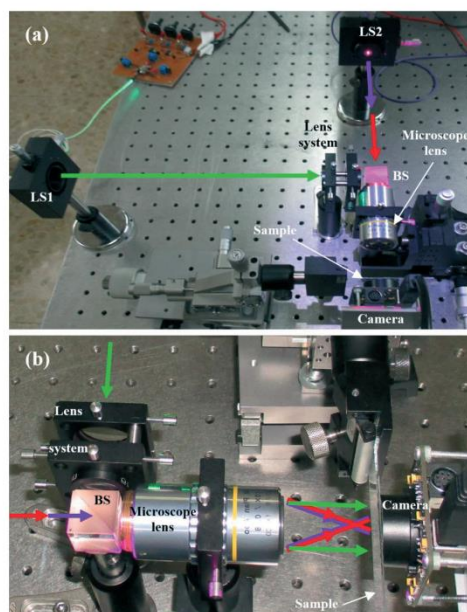


Fig. 4 Experimental layout for dual-mode lensless microscopy including illumination paths showing colored arrows for easy interpretation: (a) global view of the entire platform and (b) detail of the sample's surrounding area. LS1 and LS2 are the laser sources for the WF- and HR-LDHM cases, respectively.

Static samples

Validation with static objects contains images coming from resolution test targets which are very useful for FOV and resolution characterization. Fig. 5 presents the obtained results when considering NBS 1963A (left column) and USAF 1951 (right column) targets. From top to bottom, each column in Fig. 5 includes: (1) the ultra-wide FOV provided by the G arm, (2) a magnified image of the central area (marked with a green rectangle in (1)) corresponding to the same FOV provided by the BR arm, (3) the result coming from the BR arm after MISHELF microscopy algorithm application, and (4) and (5) the in-focus images coming from the use of B and R illuminations, respectively. In addition, the central part of the images provided by the BR arm in the USAF target case is magnified to clearly show the resolution limit.

From a qualitative point of view, the visual image quality improvement provided by the application of the MISHELF microscopy method (a3–b3) is noticeable in comparison with the images provided when considering single illuminations (a4–b4 and a5–b5). This image improvement is also quantitatively validated by computing the standard deviation (STD) values of the normalized intensity distribution at the background areas (marked with a dashed white line U-shape area) of the images at (a3–a4–a5). We have selected the NBS test

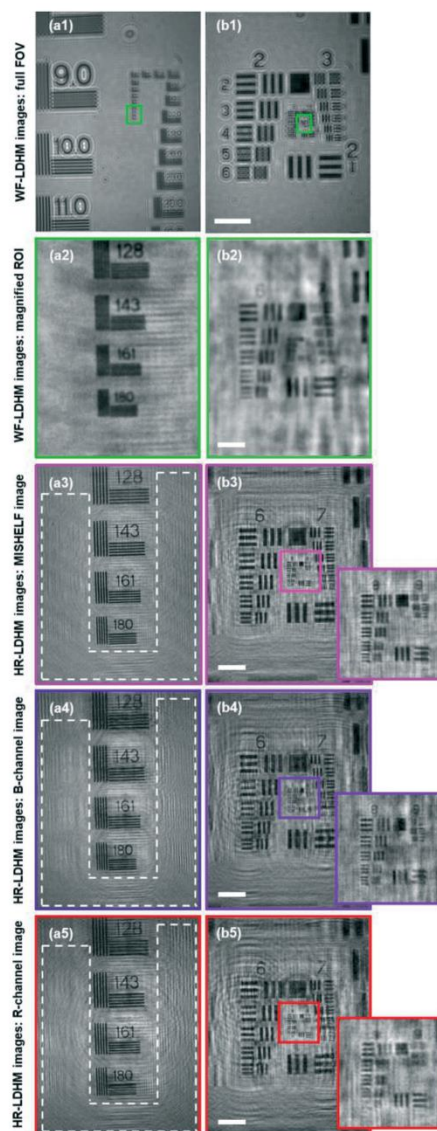


Fig. 5 Static object validation for NBS 1963A [(a) column] and USAF 1951 [(b) column] resolution targets. Inside each column: (1) shows the entire ultra-wide FOV image provided by the G arm; (2) presents the magnification of the central part (marked with a green rectangle in (1)); and (3) to (5) present the MISHELF microscopy, the B and the R channel images, respectively, coming from the BR arm where the central parts are magnified to clearly see the resolution limits. In addition, the U-shape rectangles at (a3)–(a4)–(a5) are used for STD calculations and the scale bars for the USAF images (the same values apply for the NBS case) are 1 mm for (b1) and 50 μm for the rest.

case since it has perfect blank background areas for STD evaluation. The results are $\text{STD}(\text{BR}) = 0.053$, $\text{STD}(\text{B}) = 0.072$ and $\text{STD}(\text{R}) = 0.078$. These values show that MISHELF microscopy improves the image quality in comparison with single illumination reconstructions since the background fluctuates around lower levels.

From the images included in Fig. 5 and also from a quantitative point of view, the G arm provides a FOV of around $4.6 \times 6.1 \text{ mm}^2$ with a resolution limit of 128 lp mm^{-1} (or $7.8 \mu\text{m}$ pitch) coming from the last resolved element in the tests (128 lp mm^{-1} element in the NBS and group 7-element 1 in the USAF) when considering the largest digital sensor dimension. This is a huge FOV outside the capabilities of any microscope objective and is only available for WF-LDHM techniques. For the BR arm, the FOV and resolution limit are approximately $300 \times 400 \mu\text{m}^2$ and 575 lp mm^{-1} (or $1.7 \mu\text{m}$ pitch) coming from group 9-element 2 in the USAF test case.

Dynamic experiments

In order to validate the dual-mode real-time (only limited by the acquisition rate of the imaging camera) imaging capability of the proposed lensless microscopy platform, two types of dynamic samples are considered: a solution of mixed flowing beads (Polybead® Microspheres) and a live human sperm biosample (Proiser R+D S.L.).

The microsphere sample is a mix of beads containing 3, 45 and $90 \mu\text{m}$ diameter spheres (most of them being $3 \mu\text{m}$ in diameter) in suspension at water-filled medium. The beads are introduced into a counting chamber of $100 \mu\text{m}$ thickness by micro pipetting. The results are displayed in Fig. 6 showing the first frames of the recorded video sequences (from Video S1–S5†), each one of them with a total recording time of 6 seconds. Because of the several injections, most (all but one) of the 45 and $90 \mu\text{m}$ diameter beads are obstructed and attached to the chamber's inner sides; so they are static during the recording with the exception of a single one which is falling down at the left side of the movie. But the most important are the $3 \mu\text{m}$ beads since, according to previous theoretical calculations, they are below the resolution limit provided by the G arm and above the one defined by the BR arm. So, they will not be resolved under the WF-LDHM imaging modality but will be perfectly imaged using HR-LDHM.

To clearly show this prediction, Fig. 6a includes the ultra-wide FOV image obtained after numerical propagation to the plane where the single dynamic $45 \mu\text{m}$ bead appears in focus (see Video S1†). This plane can be approximately considered at the middle of the counting chamber's depth and there are a lot of $3 \mu\text{m}$ beads flowing around it. As in the static experiments, Fig. 6b and c display the magnified ROI marked with the green rectangle in Fig. 6a (the same ROI as the one provided by the HR-LDHM imaging mode): Fig. 6b includes the direct image provided by the G arm (see Video S2†) where the flowing beads are barely detected (note that there are also a lot of static beads/artifacts) and Fig. 6c presents the same image but after subtraction of the mean image coming from the

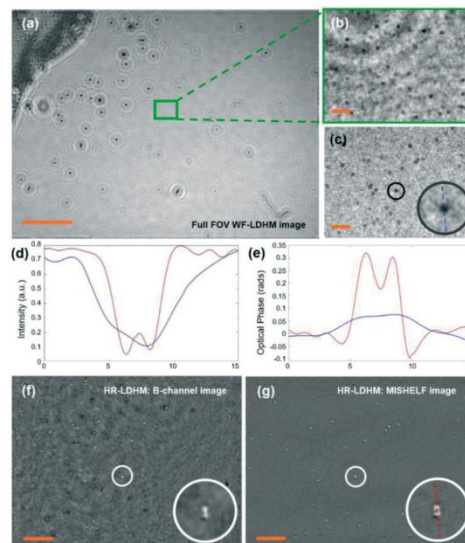


Fig. 6 Dynamic experimental results involving flowing beads: (a) entire ultra-wide FOV image; (b) and (c) green rectangle ROI presented in (a) before and after averaging image subtraction, respectively; (d) and (e) plots of the 2-bead cluster considering intensity (in arbitrary units) and phase (in rads) distributions, respectively, for G (blue plot) and BR (red plot) arms; and (f) and (g) positive phase contrast images provided by the B channel and the BR arm, respectively. The circular insets in some figures show the 2-bead cluster. Scale bars (orange lines at the lower left corners) are 1 mm for (a) and $50 \mu\text{m}$ for the rest. Video movie files: Video1.mov (3.3 MB), Video2.mov (3.9 MB), Video3.mov (5.2 MB), Video4.mov (3.5 MB) and Video5.mov (1.7 MB).†

average of all frames in the video sequence (see Video S3†). After that, the $3 \mu\text{m}$ flowing beads are perfectly identified but not resolved as it can be seen through the plots included in Fig. 6d and e. Fig. 6d and e depict the plots coming from the focused intensity and phase distributions, respectively, of 2-bead clusters in contact with each other (see the circular inset in Fig. 6c). The plots are in blue for WF-LDHM (G arm) and in red for HR-LDHM (BR arm) and have the same spatial scale. From the plots, it is clear that the G arm does not resolve the beads while the BR arm perfectly shows the spatial structure of the two beads. Note that the blue plot included in Fig. 6d directly comes from the cross section of the circular inset included in Fig. 6c.

Finally, the results coming from the HR-LDHM layout are presented in Fig. 6f and g including also the circular inset of the 2-bead cluster. Fig. 6f displays, for comparison purposes, the direct in-focus image (positive phase contrast distribution) coming from the B channel (see Video S4†), while Fig. 6g includes the same image provided by the BR arm (see Video S5†). Note that the red plot included in Fig. 6e directly comes from the cross section of the circular inset included in Fig. 6g.

The second dynamic experiment considers a live human sperm sample filling a counting chamber of 100 μm . The sperm cells have approximately a head's length and width of 4 and 5 μm , respectively, a total length of 45 μm and a tail's width below 1 μm . As in previous microbeads, these sperm cells are perfect to show the capabilities of the proposed dual-mode lensless imaging platform since they are below the resolution limit provided by the G arm while they can be imaged by the BR arm. The results are included in Fig. 7 where, again, the first frames of the recorded video sequences (from Video S6–S10[†]) are presented for: (a) the ultra-wide FOV amplitude image (see Video S6[†]), (b) and (c) the magnified ROI marked with the green rectangle in (a), including the direct image (see Video S7[†]) and the image obtained after subtracting the averaged image (see Video

S8[†]), (d) the amplitude distribution retrieved from the BR arm (see Video S9[†]) for direct comparison with (c), and (e) the positive phase contrast image provided by the BR arm (see Video S10[†]).

Since the thickness of the counting chamber is 100 μm , the sperm cells are moving inside a volume at different depths and it is not possible to bring all of them into focus within a single image. Nevertheless, different criteria in amplitude and phase distributions can be numerically implemented in order to decide whether a sperm cell (the head of the cell) is focused. Thus, a real time $XYZ-t$ position of the cell's head can be computed and stored at the computer's memory allowing 3D plots of the sperm cell trajectories in 3D space. As an example, Fig. 7e includes 4 sperm cell trajectories marked with colored dots (green, blue, red and black) in the video movie and their 3D trajectories are plotted in Fig. 7f with the corresponding color identification. In addition, Fig. 7f also includes the 2D view of the trajectories at the upper right corner to easily identify the trajectories. Note that the color degradation on each plot represents time course.

Discussion and conclusions

We have reported on a novel design of LHDM that joins together actual lens-free imaging modalities (HR- and WF-LDHM) into a single platform. The proposed LHDM concept allows a dual and simultaneous imaging mode coming from the combination of both individual imaging platforms and takes advantage of both architectures concerning a wide range of biological applications such as cytometry, quality control, monitoring and screening, point-of-care testing, diagnostic applications, telemedicine applications, particle tracking and sample sorting. The performance of the proposed LHDM imaging platform has been evaluated using static as well as dynamic samples.

Paying a bit of attention to the static images and according to theoretical predictions, the G arm should provide a FOV of $4.2 \times 5.6 \text{ mm}^2$ coming from the pixel number, the pixel size of the digital sensor and assuming a $1\times$ magnification factor. However, the obtained FOV is a bit higher (ratio of 1.09) in comparison with the theoretical value. This fact means that the experimental magnification factor equals to $1/1.09 = 0.92$, that is, a magnification smaller than 1.¹⁷ This is another advantage of the proposed dual-mode configuration since it is possible to modify the magnification of the ultra-wide FOV imaging platform by changing the wavefront curvature of the G beam. This fact can be easily implemented by proper selection of the lenses prior to the BS or by using dynamic elements such as SLMs or variable focusing lenses as in ref. 17.

Regarding the BR arm, the theoretical resolution limit (ρ) is proportional to the ratio between the illumination wavelength (λ) and the numerical aperture (NA) of the imaging system: $\rho = k\lambda/\text{NA}$, with k as a constant of proportionality whose value is usually close to 1 but depends on the

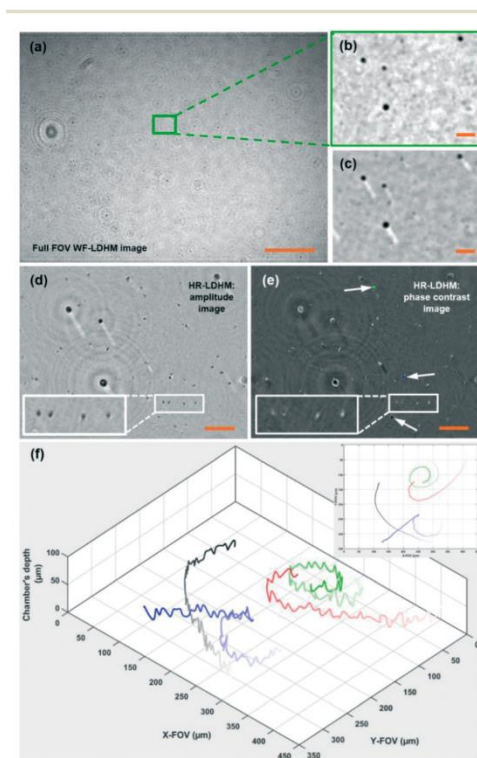


Fig. 7 Dynamic experimental results involving a live sperm sample: (a) entire ultra-wide FOV image; (b) and (c) green rectangle ROI presented in (a) before and after averaging image subtraction, respectively; (d) and (e) amplitude and positive phase contrast images, respectively, provided by the BR arm; and (f) trajectory plots of 4 sperm cells marked with color-coded dots in (e). Scale bars (orange lines at the lower right corners) are 1 mm for (a) and 50 μm for the rest. Video movie files: Video6.mov (3.9 MB), Video7.mov (1.8 MB), Video8.mov (1.8 MB), Video9.mov (1.5 MB) and Video10.mov (1.2 MB).

characteristics of the imaging system.³⁷ Assuming $k = 1$, the experimental resolution limit ($1.7 \mu\text{m}$) is derived from a NA value equal to 0.26. For the largest CMOS dimension, this NA value comes from a z distance equal to 10.3 mm. Those values are in perfect agreement with the experimental layout since, on the one hand, the BR illumination is not collimated before the objective lens, so a reduction is expected in the effective NA of the microscope lens (from 0.28 to 0.26). On the other hand, the resolution targets are placed in contact with the circular protective holder of the digital camera (see Fig. 4b), which is 10 mm in length, a value that perfectly matches with the one above.

Concerning the dynamic validation, two interesting experiments have been reported. On the one hand, flowing microbeads are widely used objects in biomedical and health science research. Microbeads are commonly used for both calibration purposes and as target samples in, for instance, microscopy techniques, fluid visualization, drug delivery, fluid flow analysis, and process troubleshooting. Our proposed LDHM imaging platform has been validated for visualization and characterization of flowing microbeads considering a total working volume of 2.35 mm^3 ($4.2 \times 5.6 \times 0.1 \text{ mm}^3$) coming from the WF-LDHM mode and ranging down in diameter to $3 \mu\text{m}$ for a reduced FOV (HR-LDHM mode). In order to validate the phase values obtained for the $3 \mu\text{m}$ beads, we have compared the results included in the plot of Fig. 6e with our previous results reported in ref. 34. MISHELF microscopy³⁴ derived a phase step for $3 \mu\text{m}$ beads equal to 0.41 rad for the case of 0.24 NA with a violet ($\lambda_1 = 405 \text{ nm}$) illumination wavelength. This phase step value was confirmed by a regular Mach-Zehnder interferometric layout.³⁴ Now, we have obtained a phase step of 0.32 rad with 0.26 NA using $\lambda_2 = 450 \text{ nm}$. Neglecting the NA variation (this will introduce some small mismatches), the phase values in the proposed layout (using λ_2) can be computed from the previous ones³⁴ (using λ_1) as: $\lambda_2 = \lambda_1 (\Delta n_2 \lambda_1) / (\Delta n_1 \lambda_2)$, with Δn_1 and Δn_2 as the refractive index variations between the polystyrene beads and the surrounding aqueous medium for λ_1 and λ_2 , respectively, and equal to $\Delta n_1 = 0.294$ and $\Delta n_2 = 0.283$. According to this formula, the phase step is equal to 0.35 rad, a phase step value that perfectly agrees with the one reported in Fig. 6e and assuming some small mismatches.

On the other hand, sperm cells are nowadays a highly attractive working field not only for research purposes but also for the analysis of male infertility and its optimization in animal husbandry. In that sense, WF-LDHM has provided cost-effective, portable and compact imaging platforms with a high throughput for sperm imaging and tracking. It is not our aim to focus on 3D sperm tracking analysis in this manuscript but just only to show an application of the proposed imaging platform where the 3D position of the cell's head can be computed in real-time, thus allowing 4D trajectory evaluation. Recent works in the field have revealed various rare locomotion and swimming patterns.^{38,39} As shown in Fig. 7, the BR arm is capable of providing 3D trajectory analysis of human sperm cells in time, so it is perfect for this application.

Nevertheless and aside from the two experimentally validated applications, the proposed dual-mode lensless microscopy imaging platform is potentially useful for all the previously reported applications as lensless imaging is nowadays becoming an appealing technology.⁴⁰⁻⁴³

As a final conclusion, the proposed LDHM imaging platform combines the advantages of the two classical LDHM configurations without adding any drawback but increasing a bit the complexity of the illumination. Optimization and minimization of the illumination stage is possible and will be our target in future works. As the experimental validation has confirmed, the proposed dual-mode lensless microscopy imaging platform provides an ultra-wide FOV useful for analyzing particles and cells above $8 \mu\text{m}$ while the reduced FOV enables sample analysis in the micron range, approximately. Nevertheless, these values can be redefined depending on some system characteristics (NA of the objective, pixel size of the camera, etc.). Dynamic samples as fast as the acquisition frame rate of the camera emphasize the power and versatility of the proposed imaging platform which can be the background technology of future generation devices in lensless microscopy.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank Proiser R+D S.L. for preparing and providing the sperm sample. This work has been funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) under the project FIS2013-47548-P.

References

- 1 M. K. Kim, *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications*, Springer, New York, 2011.
- 2 *Coherent Light Microscopy: Imaging and Quantitative Phase Analysis*, ed. P. Ferraro, A. Wax and Z. Zalevsky, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2011.
- 3 G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues*, McGraw-Hill, New York, 2011.
- 4 *Biomedical Optical Phase Microscopy and Nanoscopy*, ed. N. T. Shaked, Z. Zalevsky and L. L. Satterwhite, Academic Press, Oxford, 2012.
- 5 E. Bo, Y. Luo, S. Chen, X. Liu, N. Wang, X. Ge, X. Wang, S. Chen, S. Chen, J. Li and L. Liu, *Optica*, 2017, 4, 701.
- 6 T. Zhang, C. Godavarthi, P. C. Chaumet, G. Maire, H. Giovannini, A. Talneau, M. Allain, K. Belkebir and A. Sentenac, *Optica*, 2016, 3, 609.
- 7 M. K. Kim, *SPIE Rev.*, 2010, 1, 018005.
- 8 T. Kim, R. Zhou, L. L. Goddard and G. Popescu, *Laser Photonics Rev.*, 2016, 10, 3.
- 9 A. Greenbaum, W. Luo, T.-W. Su, Z. Göröcs, L. Xue, S. O. Isikman, A. F. Coskun, O. Mudanyali and A. Ozcan, *Nat. Methods*, 2012, 9, 889.

- 10 P. Sidorenko and O. Cohen, *Optica*, 2016, 3, 9.
- 11 P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb and C. Depeursinge, *Opt. Lett.*, 2005, 30, 468.
- 12 B. Kemper and G. von Bally, *Appl. Opt.*, 2008, 47, A52.
- 13 D. Gabor, *Nature*, 1948, 161, 777.
- 14 G. L. Rogers, *Proc. - R. Soc. Edinburgh, Sect. A: Math. Phys. Sci.*, 1952, 63, 193.
- 15 W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen and H. J. Kreuzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 11301.
- 16 M. Lee, O. Yaglidere and A. Ozcan, *Biomed. Opt. Express*, 2011, 2, 2721.
- 17 F. Perraut, M. Doménès, H. Grateau and Q. Josso, *Opt. Lett.*, 2016, 41, 5326.
- 18 S. K. Jericho, J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, M. H. Jericho and H. J. Kreuzer, *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, 77, 043706.
- 19 L. Repetto, E. Piano and C. Pontiggia, *Opt. Lett.*, 2004, 29, 1132.
- 20 Z. Frentz, S. Kuehn, D. Hekstra and S. Leibler, *Rev. Sci. Instrum.*, 2010, 81, 084301.
- 21 J. P. Ryle, S. McDonnell and J. T. Sheridan, *J. Biomed. Opt.*, 2011, 16, 126004.
- 22 O. Mendoza-Yero, M. Carbonell-Leal, J. Lancis and J. Garcia-Sucerquia, *Opt. Lett.*, 2016, 41, 1062.
- 23 A. Ozcan and U. Demirci, *Lab Chip*, 2007, 8, 98.
- 24 T. Su, S. Seo, A. Erlinger and A. Ozcan, *Cell. Mol. Bioeng.*, 2008, 1, 146.
- 25 S. A. Lee, J. Erath, G. Zheng, X. Ou, P. Willems, D. Eichinger, A. Rodriguez and C. Yang, *PLoS One*, 2014, 9, e89712.
- 26 F. Kazemzadeh and A. Wong, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 38981.
- 27 D. N. Breslauer, R. N. Maamari, N. A. Switz, W. A. Lam and D. A. Fletcher, *PLoS One*, 2009, 4, e6320.
- 28 O. Mudanyali, C. Oztoprak, D. Tseng, A. Erlinger and A. Ozcan, *Lab Chip*, 2010, 10, 2419.
- 29 S. O. Isikman, W. Bishara, U. Sikora, O. Yaglidere, J. Yeah and A. Ozcan, *Lab Chip*, 2011, 11, 2222.
- 30 I. Pushkarsky, Y. Liu, W. Weaver, T. W. Su, O. Mudanyali, A. Ozcan and D. Di Carlo, *Sci. Rep.*, 2014, 17, 4717.
- 31 N. A. Switz, M. V. D'Ambrosio and D. A. Fletcher, *PLoS One*, 2014, 9, e96906.
- 32 Z. F. Phillips, M. V. D'Ambrosio, L. Tian, J. J. Rulison, H. S. Patel, N. Sadras, A. V. Gande, N. A. Switz, D. A. Fletcher and L. Waller, *PLoS One*, 2015, 10, e0124938.
- 33 V. K. Jagannadh, R. Srinivasan and S. S. Gorthi, *AIP Adv.*, 2015, 5, 084902.
- 34 M. Sanz, J. Á. Picazo-Bueno, L. Granero, J. García and V. Micó, *Sci. Rep.*, 2017, 7, 43291.
- 35 D. W. E. Noom, D. E. B. Flaes, E. Labordus, K. S. E. Eikema and S. Witte, *Opt. Express*, 2014, 22, 30504.
- 36 M. Sanz, J. A. Picazo-Bueno, J. García and V. Micó, *Opt. Express*, 2015, 23, 21352.
- 37 L. Granero, C. Ferreira, Z. Zalevsky, J. García and V. Micó, *Opt. Lasers Eng.*, 2016, 82, 104.
- 38 T.-W. Su, L. Xue and A. Ozcan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, 109, 16018.
- 39 M. U. Daloglu and A. Ozcan, *Biol. Reprod.*, 2017, 97, 182.
- 40 S. K. Jericho, P. Klages, J. Nadeau, E. M. Dumas, M. H. Jericho and H. J. Kreuzer, *Planet. Space Sci.*, 2010, 58, 701.
- 41 J. Katz and J. Sheng, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 2010, 42, 531.
- 42 A. Ozcan and E. McLeod, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2016, 18, 77.
- 43 Y. Wu and A. Ozcan, *Methods*, 2017, DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.08.013.

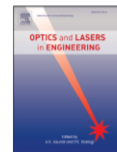
6.5. Publicación 5

Optics and Lasers in Engineering 127 (2020) 105939



Contents lists available at ScienceDirect

Optics and Lasers in Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/optlaseng

Variable zoom digital in-line holographic microscopy

Martín Sanz^a, Maciej Trusiak^b, Javier García^a, Vicente Micó^{a,*}^a Departamento de Óptica y de Optometría y Ciencias de la Visión. Facultad de Física. Universidad de Valencia. C/ Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain^b Warsaw University of Technology, Institute of Micromechanics and Photonics, 8 Sw. A. Boboli St., 02-525 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Phase retrieval
Digital image processing
Lensless microscopy
Coherence imaging
Electrically tunable lenses

ABSTRACT

We report on a novel layout providing variable zoom in digital in-line holographic microscopy (VZ-DIHM). The implementation is in virtue of an electrically tunable lens (ETL) which enables to slightly shift the illumination source axial position without mechanical movement of any system component. Magnifications ranging from $\sim 15\times$ to $\sim 35\times$ are easily achievable using the same layout and resulting in a substantial variation of the total field of view (FOV). The performance of the proposed setup is, first, validated using a resolution test target where the main parameters are analyzed (theoretically and experimentally) and, second, corroborated analyzing biological sample (prostate cancer cells) showing its application to biomedical imaging.

1. Introduction

Lensless microscopy is emerging nowadays as a vividly blossoming technology with growing interest and strong potential in biology/biomedicine where imaging is performed using a lensfree configuration [1–4]. This type of lensless digital holographic microscopy (LDHM) derives from a digital implementation of the Gabor's seminal invention [5,6] where a point source of coherent light illuminates the sample and the in-line diffracted wavefront is recorded by a digital sensor [7].

Essentially, LDHM can be implemented following two opposite layouts [1], both of them offering different capabilities and applications. One implementation places the sample in close proximity with the illumination point source and the digital sensor farther in comparison [7–14], while the opposite happens in the other [15–19]. The former is commonly known as digital in-line holographic microscopy (DIHM) and introduces a magnification factor (ranging typically from $5\times$ to $20\times$) by considering the geometrical projection of the sample's diffraction pattern at the digital sensor plane. Although higher values has been reported [20–21], it commonly provides similar properties as in classical DHM regarding field of view (FOV) and resolution limit when considering objectives up to medium numerical aperture (NA) values (~ 0.4 – 0.5 NA). The latter is known as on-chip microscopy and it defines no geometric magnification ($\sim 1\times$ range) but the allowable FOV becomes extremely huge ($\sim 25\text{ mm}^2$) since the whole detector sensitive area is available. However, it provides a modest resolution (incoming from ~ 0.2 NA range) imposed mainly by the sampling limit (pixel size) of the digital sensor.

Evolutions (in the sense of completeness) of LDHM were reported in recent years. For instance, the two opposite configurations have been merged together into a single one allowing dual and simultaneous lensless imaging mode without altering the intrinsic characteristics and advantages of each one of them [22]. The combination was possible due to the wavelength multiplexing at the illumination/detection stages: green light was used to provide a wide FOV image coming from a $1\times$ -range magnification factor and blue/red illuminations provided a magnified image of the object with higher resolution after applying MISHELF microscopy algorithm [13,14]. And magnifications lower than 1 were achieved in LDHM in an effort to match the object size with the detector area [23,24]. Thus, objects having larger sizes than the detector area can be fully imaged without adding any optical components in the layout (such as zooming lenses) by simply changing the illumination vergence (from divergent to convergent) thus preserving the setup simplicity.

In this manuscript, we present a novel implementation in digital in-line holographic microscopy (DIHM) where an electrically tunable lens (ETL) is introduced to modify the axial position of the illumination source. This shift directly impacts in the layout magnification as well as in the available FOV and a continuous variation of both parameters can be easily achieved without neither replacement nor mechanical movement of any component in the optical layout. Strong variation in the magnification factor (from $\sim 15\times$ to $\sim 35\times$, approximately) and FOV (a factor of around 5) are produced by electrically switching on/off the tunable lens utilizing its full voltage range. The ETL is used for changing the magnification thus optical imaging is still performed without lenses in a lens-free setup.

Nonetheless, ETLs have been applied in microscopy during the last decade, e.g., to improve axial scanning speed in acousto-optical

* Corresponding author.

E-mail address: vicente.mico@uv.es (V. Micó).<https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2019.105939>Received 12 August 2019; Received in revised form 22 October 2019; Accepted 6 November 2019
0143-8166/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

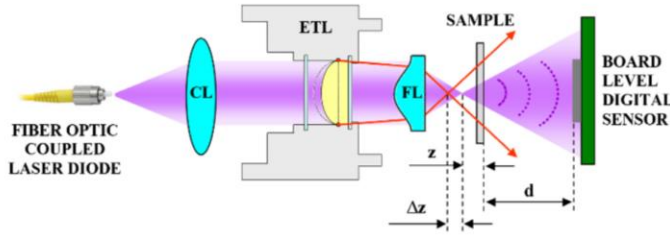


Fig. 1. Optical layout for the proposed variable magnification DIHM. CL, condenser lens; ETL, electrically tunable lens; FL, focusing lens.

deflection-based two-photon microscopy [25] or in 3D light-sheet microscopy [26]. They were also employed to provide high-speed transport-of-intensity equation quantitative phase microscopy [27], reduce the coherent disturbances in quantitative phase images in self-interference DHM [28], extend the depth of field in optical diffraction tomography [29], enable synthetic aperture super-resolved imaging without assisted reference beam for phase retrieval [30], allow phase distortion compensation in DHM [31], and ensure autofocusing stabilization in total internal reflection microscopy [32], just to cite some examples. But all those approaches yield in classical microscopy setups where objectives are used for imaging.

2. System layout description

Fig. 1 presents a scheme of the experimental layout for the proposed variable zoom DIHM (VZ-DIHM). A fiber optic coupled laser diode (Blue Sky Research, SpectraTec 4 STEC4, 405 nm) is collimated (CL, QiOptiq achromatic doublet, 120 mm focal length) and directed to a focusing lens (FL, Thorlabs aspheric lens, 0.5 NA) that provides the illumination point source needed in DIHM. The object/sample is placed at z distance ($z \cong 0.5$ mm) from the source and the digital sensor (Mightex USB3.0 monochrome camera, board level, 2560×1920 pixels, 2.2 μm pixel size) at d distance ($d \cong 12.5$ mm) from the sample. Both distances are measured by micrometric stages at the lab. Theoretically and using this geometrical parameters, the layout magnification M can be computed from

$$M = \frac{z+d}{z} \quad (1)$$

As $M = 26X$, the imaging system NA equals to $NA = \sin\{\arctan[(2.560 \times 2.2)/(2 \times 12.5)]\} = 0.22$, so the resolution limit results in $\rho = \lambda/NA = 1.85$ μm.

The ETL (Optotune EL-10-30-C-VIS-LD-MV) is placed in the collimated beam path and close to the FL. When no voltage is applied to the ETL, the previous configuration/analysis still applies. We have named it as “ETL at 0D” to notice that 0 diopters are produced by the ETL. Then, positive and negative maximum voltages are applied to the ETL which provide the positions “ETL at 6D” and “ETL at -2D”, respectively. Positive voltage increases ETL optical power and the point source is shifted away by a distance Δz from the sample. This distance can be easily calculated from

$$\Delta z = \frac{f'_{FL}{}^2}{f'_{ETL} + f'_{FL}} \quad (2)$$

being f'_{FL} and f'_{ETL} the focal lengths of FL and ETL, respectively. Eq. (2) is not exact since it assumes that both lenses (FL and TL) are thin lenses and are placed on the same axial location. But it provides a first approximation to the theoretical values. In-depth analysis and calibration are included in next section using a resolution test target but a couple of examples are commented here for clarity. Using Eq. (2) and for the positive voltage (6D optical power means that $f'_{ETL} = 166.67$ mm), Δz results in 0.366 mm approximately. However, the magnification is properly reduced as the new source-sample distance becomes increased: from 26X to 15.4X. Obviously, the contrary happens when a negative voltage (-2D

Table 1
Experimental FOV and magnification analysis when varying the ETL voltage.

	6D	0D	-2D
FOV (μm x μm)	360x270	218x163	159x119
M factor	15.6X	25.9X	35.4X

optical power means that $f'_{ETL} = -500$ mm) is applied to the ETL ($\Delta z \sim -0.130$ mm and 34.8X, approx.).

Finally, the recorded in-line holograms must be numerically processed to decisively achieve imaging conditions. In that sense, there are different numerical methods for digital reconstruction by solving the diffraction integral [33]. Among them, we have selected to compute the Rayleigh-Sommerfeld diffraction integral using convolution operation since it allows an effective and economical calculation without any approximation [34,35]. In this way, the diffraction integral can be numerically figured exactly by using three Fourier transformations through the convolution theorem, that is, $RS(x,y;d) = FT^{-1}\{FT\{U(x,y)R(x,y)\} \cdot FT\{h(x,y;d)\}\}$, being $RS(x,y)$ the propagated wave field, $U(x,y)$ the processed hologram resulting from the phase-shifting algorithm, $R(x,y)$ the reference wave, $h(x,y)$ the impulse response of free space propagation (the definition of $h(u,v;d)$ can be found in Ref. [33], page 115, Eq. 3.73), (x,y) the spatial coordinates, FT the numerical Fourier transform operation realized with the FFT algorithm, and d the propagation distance which can be easily found using different criteria [36,37]. Since usually the Fourier transformation of the impulse response is defined as $H(u,v;d) = FT\{h(x,y;d)\}$, being the spatial-frequency coordinates (u,v) , the calculation of the propagated wave field to an arbitrary distance d is simplified according to $RS(x,y;d) = FT^{-1}\{\hat{U}(u,v)H(u,v;d)\}$, where $\hat{U}(u,v)$ is the Fourier transformation of $U(x,y)$.

3. Experimental results

3.1. Setup calibration

Experimental demonstration of VZ-DIHM is provided through Fig. 2 where a USAF 1951 resolution test target is used as input object. Fig. 2 includes the 3 recorded holograms in (a)-(b)-(c) coming from positive-zero-negative voltages, respectively, as well as the 3 in-focus images in (d)-(e)-(f) after numerical propagation of the 3 in-line holograms. The total FOVs and magnification factors are included in Table 1. Both the FOVs and the magnifications are computed by considering plots along known elements in the test target [dashed white lines at Figs. 2(d) to 2(f)].

From a resolution limit point of view, we have included a magnified inset corresponding with Elements 5 and 6 of Group 8 (E5/6-G8) [Figs. 2(d) to 2(f)] as well as a magnification of the Group 9 including normalized intensity plots for Elements 1/2 [Figs. 2(g) to 2(i)]. As expected, there is a different resolution limit in horizontal and vertical directions coming from a rectangular sensor area. Vertical bars of E5/6-G8 are clearly resolved and resolution limit comes from E1-G9 for all

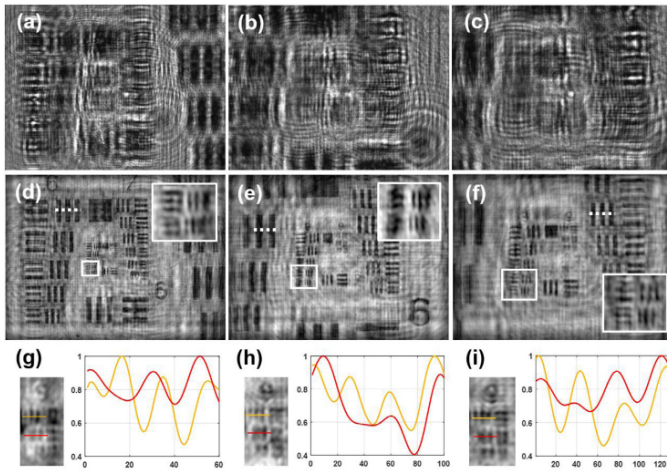


Fig. 2. Experimental validation using a resolution test target: (a)-(b)-(c) are the recorded in-line holograms when positive-zero-negative voltages are respectively applied to the ETL; these holograms are numerically focused at (d)-(e)-(f) where the insets are to magnify that the last 2 Elements of the Group 8 are resolved; and finally (g)-(h)-(i) includes the 3 elements of Group 9 where plots along the Elements 1 (orange) and 2 (red) are presented in order to clearly show that the resolution limit is the Element 1 of Group 9 on all cases.

three magnification cases. Note that we are not changing the NA of the imaging system (Δz affects M and FOV); so, in principle it should be the same because the geometrical limit imposed by the sampling criterion is not limiting the resolution in any case. Plots included at Figs. 2(g) to 2(i) clearly show the 3 valleys corresponding with E1-G9 (orange plot) while cannot be visible for E2-G9 (red plot). Thus, E1/G9 defines a resolution limit of $1.95 \mu\text{m}$ (512 lp/mm) which is in perfect agreement with the theoretical prediction.

In order to validate the results, Fig. 3(a) plots the magnification theoretical curve (Eq. (1)) as a function of the z distance and assuming that $d = 12.5 \text{ mm}$. From the plot, the theoretical magnification values for the different ETL voltages are retrieved resulting in 15.4X, 26X and 34.8X for ETL at 6D, 0D and $-2D$, respectively. Those values are in perfect agreement with the experimentally measured ones (see Table 1). In addition, Fig. 3(b) plots the magnification ratio that the ETL is generating as a function of the z distance. It is defined as the ratio between the magnifications provided by the ETL at maximum/minimum voltages, that is, $M(-2D)/M(6D)$. The curve is interesting to highlight that the shorter the z distance, the higher the magnification ratio. Then, the zoom function without mechanical movement provided by the ETL is applicable in LDHM when the source is in close proximity with the sample (DIHM implementation) while remain useless when the sample is on top of the digital sensor (on-chip microscopy arrangement). In our case, the M ratio equals to 2.26 meaning that the FOV is changed by a factor of $(2.26)^2$.

3.2. Biosample validation

Experimental validation is also provided considering a fixed prostate cancer cell bio-sample. The results are included in Fig. 4 where only numerical reconstructions are included. Thus, Figs. 4(a) and 4(b) present the intensity images for the ETL at 6D and $-2D$, respectively. Leaving aside halo effects and twin image disturbances, the zoom function of the ETL permits to optically magnify the central area (marked with a dashed white rectangle) thus allowing high quality image of the cell. In addition, Figs. 4(c)-(d) include the phase retrieved images for the cases where the ETL is set to 0D and removed from the layout, respectively.

And 3D map comparative of central cell is presented in Figs. 4(e)-(f) showing good quality phase reconstruction on both cases. This fact is also corroborated by analysing the standard deviation (STD) in the background of the retrieved phase distributions. Thus, Figs. 4(g)-(h) show the phase distribution of a clear background area (marked with

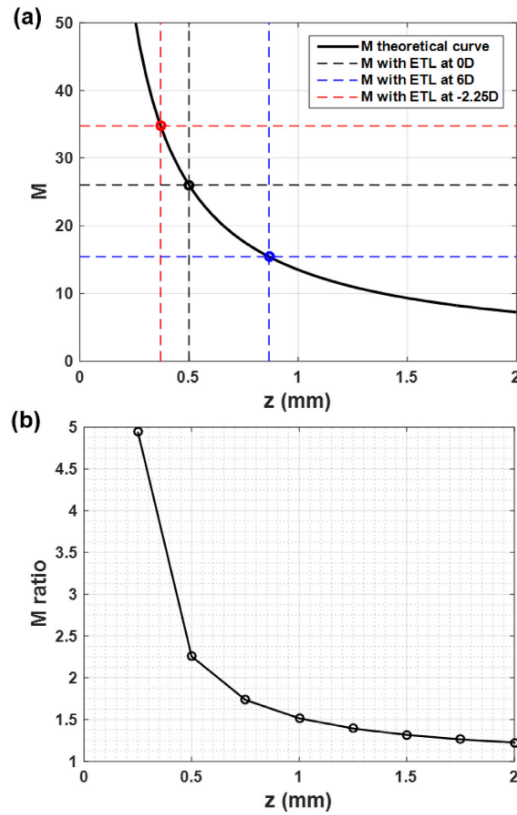


Fig. 3. (a) Theoretical plot of the magnification curve and the points caused by the ETL variation; (b) magnification ratio produced by the ETL. Both curves are plotted as a function of the z distance.

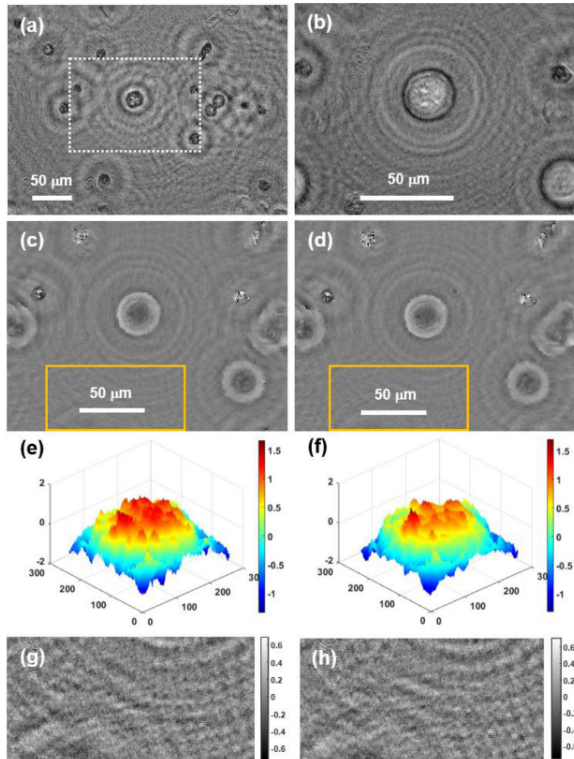


Fig. 4. Experimental validation using a prostate cancer cell bio-sample: (a)-(b) are the intensity in-focus images retrieved when the ETL is set to positive (ETL at 6D) and negative (ETL at -2D) voltages, respectively, and where the dashed line rectangle in (a) bounds the roughly same FOV than in (b) for direct comparison; (c)-(d) show the retrieved phase images with the ETL at 0 Vage and removing the ETL from the layout, respectively, for direct comparison of the case with/without ETL in the layout; (e)-(f) include the same comparative than in (c)-(d) but showing 3D views of the retrieved phase values for the central cell; and finally (g)-(h) are the background phase distributions coming from the orange rectangles in (c)-(d), respectively, used to analyze the STD of the background. Scale bars in (e)-(f)-(g)-(h) represent optical phase in radians.

orange rectangles in Figs. 4(c)-(d), respectively) from which STD values are computed resulting in 0.0023 rads and 0.00024 rads corresponding with the cases of ETL at 0D and no ETL in the layout, respectively. Those values imply no significant phase variation is induced by the inclusion of the ETL.

Finally and in order to validate the retrieved phase values with the presented variable zoom DIHM platform, a classical DHM platform based on a SMIM interferometric configuration [38] is assembled at the lab and the prostate cancer cell bio-sample is visualized in phase. Fig. 5 includes the phase images of the inspected area. Although it is not the same specific area as the one included in Fig. 4, it is the same bio-sample containing cells prepared using the same fixing conditions; so a comparable phase maps can be retrieved and compared. Fig. 5 presents different cells having different phase profiles but we have selected 4 of them (marked with coloured squares) providing similar phase values (ranging from -1 to 1.5 rads, approx.) than the ones included in Figs. 4(e) and (f). So, quantitative phase values are in perfect agreement.

4. Discussion and conclusions

Closely related with the presented VZ-DIHM approach, the use of an ETL in LDHM were previously introduced [23] but with a completely different aim: to record the image of an object having a total extension which is larger than that of the image sensor. The authors demonstrated for the first time magnifications lower than 1 in LDHM [23] where an ETL allowed to obtain magnifications ranging from 0.65 to 1.21. Here, we are applying to microscopy field where high magnifications are pursued and the possibility to select a specific sample region to provide higher magnification imaging is an extremely useful capability.

We have selected a system configuration ($z = 0.5$ mm, $d = 12.5$ mm) enabling 0.22NA, $M = 26X$, $\rho = 1.85$ μ m and $FOV = 218 \times 163$ μ m. This configuration is open and can be redefined according to the envisioned specific application. For instance, the NA can be improved by slightly reducing the d distance (for example, from 12.5 to 10 mm). Thus, the magnification will be decreased and the resolution limit and FOV will become improved. When considering these modifications, the system specifications will be really close to the ones provided by a 20X infinity corrected microscope objective. And the ETL will provide continuous zoom variation from 12X to 28X without penalizing the resolution limit because the d distance is unaltered. With the ETL used in the presented implementation, the zoom function ranges from 15X to 35X incoming from a focal tuning range of -2 to +6 diopters. However, there are nowadays new ETLs having higher variation range (for instance, the EL-16-40-TC is capable to change between -10 to +10 diopters), so higher performance will be obtained in a straightforward manner.

Maybe one of the major concerns regarding ETLs is image quality. Presented quantitative phase analysis shows comparable results when including or not the ETL in a DIHM layout. Nevertheless, the comparative included here is at an operating current of 0 mA in the ETL and aberrations can appear when the ETL voltage is increased. In that sense, Deng et al. [31] presented a study about Zernike aberrations introduced by an ETL (the same one that is used in this manuscript) when varying the driven current. They conclude that the ETL does not introduce another phase error except defocus aberration. However, they suggested that the ETL should be mounted horizontally to avoid the gravity effect in the ETL membranes which can cause coma aberration when vertical assembly is considered. Maybe this is the reason causing mismatch in the background STD phase values (1 order of magnitude in difference)

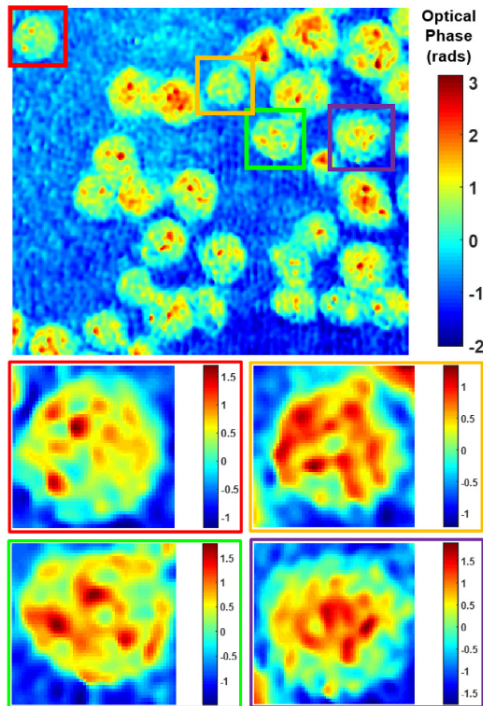


Fig. 5. Prostate cancer cells visualized in phase. Experimental results obtained using a lab-made DIHM platform based on a SMM interferometric configuration with a 20X/0.46NA objective lens.

since, in our layout, the ETL is mounted vertically. Further studies such as aberrations analysis from the image center towards image periphery and comparison for different driven currents can be performed but this is out of the scope of this paper. Nonetheless, it is reasonable to think that aberrations will increase as the driven current does it, especially when arriving to the ETL limits. In such as cases, the retrieved image quality will depend on the ETL power and will be probably deteriorated towards the borders of the image meaning that the usable FOV will be restricted to the image center. But this is not a critical drawback of the proposed approach since high quality reconstruction at high magnification will still be possible at the expenses of FOV reduction.

The proposed approach belongs to the field of lensless microscopy, more specifically to DIHM where magnification is pursued in the imaging system. DIHM is nowadays an appealing approach with huge potential mainly in the field setting where compact, robust, portable and cost-effective devices are highly demanded in many biological/ biomedical applications. Some examples are global healthcare and point-of-care diagnosis [39], continuous monitoring of cellular cultures inside an incubator at a controlled temperature and humidity [40], identification and characterization of 3D particle location within a sample volume [41], portable microscopes with rapid and accurate diagnosis in the field setting [42,43], quantification of basic cell functions such as cell-substrate adhesion, cell spreading, cell division, cell division orientation and cell death [44], in situ submersible imaging of seafloor environments and organisms [45–47], as background technology for space missions and exobiological studies [48], particle tracking (from intracellular dynamics to the characterization of cell motility and migration) [49–51], and for 3D trajectory analysis in sperm samples [43,52,53]. Combination

with other well-established techniques in microscopy such as fluorescence [54,55] or tomography [56] is also possible. Hence, the proposed layout can improve previous developments in a vast range of biomedical applications.

In summary, we have reported on VZ-DIH; as a novel approach in DIHM where the system magnification and FOV is continuously changed without mechanical movement of any component in the layout but rather actively tailoring the wavefront curvature of the illumination beam. This is achieved by inserting an ETL prior to the focusing lens. Thus, an optical zoom function is achieved by activating the ETL allowing a magnification/FOV variation factors of 2.26 and $(2.26)^2$, respectively. Experimental results are provided by using a resolution test target to validate/calibrate the main system parameters and a biological sample to show its potential in biomedical imaging.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work has been funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FIS2017-89748-P), and by the National Science Center, Poland (OPUS 13 2017/25/B/S17/02049), Warsaw University of Technology statutory funds, Polish National Agency for Academic Exchange.

References

- [1] Greenbaum A, Luo W, Su T-W, Göröcs Z, Xue L, Isikman SO, et al. Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy. *Nat Methods* 2012;9:889–95. doi:10.1038/nmeth.2114.
- [2] Ozcan A, McLeod E. Lensless imaging and sensing. *Annu Rev Biomed Eng* 2016;18:77–102. doi:10.1146/annurev-bioeng-092515-010849.
- [3] McLeod E, Ozcan A. Unconventional methods of imaging: computational microscopy and compact implementations. *Rep Prog Phys* 2016;79:076001. doi:10.1088/0034-4885/79/7/076001.
- [4] Wu Y, Ozcan A. Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring. *Methods* 2018;136:4–16. doi:10.1016/j.ymeth.2017.08.013.
- [5] Gabor D. A new microscopic principle. *Nature* 1948;161:777–8. doi:10.1038/161777a0.
- [6] Rogers GL. XIV.—Experiments in diffraction microscopy. *Proc R Soc Edinb Sect Math Phys Sci* 1952;63:193–221. doi:10.1017/S0080454100007093.
- [7] Xu W, Jericho MH, Meinertzhagen IA, Kreuzer HJ. Digital in-line holography for biological applications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:11301–5. doi:10.1073/pnas.191361398.
- [8] Repetto L, Piano E, Pontiggia C. Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination. *Opt Lett* 2004;29:1132. doi:10.1364/OL.29.001132.
- [9] Jericho SK, Garcia-Sucerquia J, Xu W, Jericho MH, Kreuzer HJ. Submersible digital in-line holographic microscope. *Rev Sci Instrum* 2006;77:043706. doi:10.1063/1.2193827.
- [10] Frenzt Z, Kuehn S, Hekstra D, Leibler S. Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy. *Rev Sci Instrum* 2010;81:084301. doi:10.1063/1.3473937.
- [11] Ryle JP, McDonnell S, Sheridan JT. Lensless multispectral digital in-line holographic microscope. *J Biomed Opt* 2011;16:126004. doi:10.1117/1.3659681.
- [12] Garcia-Sucerquia J. Color lensless digital holographic microscopy with micrometer resolution. *Opt Lett* 2012;37:1724–6. doi:10.1364/OL.37.001724.
- [13] Sans M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Improved quantitative phase imaging in lensless microscopy by single-shot multi-wavelength illumination using a fast convergence algorithm. *Opt Express* 2015;23:21352. doi:10.1364/OE.23.021352.
- [14] Sans M, Picazo-Bueno JA, Granero L, García J, Micó V. Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on mishef microscopy. *Sci Rep* 2017;7:43291. doi:10.1038/srep43291.
- [15] Ozcan A, Demirci U. Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip. *Lab Chip* 2008;8:98–106. doi:10.1039/B713695A.
- [16] Seo S, Su T-W, Erlinger A, Ozcan A. Multi-color LUCAS: lensfree on-chip cytometry using tunable monochromatic illumination and digital noise reduction. *Cell Mol Bieng* 2008;1:146–56. doi:10.1007/s12195-008-0018-6.
- [17] Lee SA, Erath J, Zheng G, Ou X, Willems P, Eichinger D, et al. Imaging and identification of waterborne parasites using a chip-scale microscope. *PLoS ONE* 2014;9:e89712. doi:10.1371/journal.pone.0089712.
- [18] Kazemzadeh F, Wong A. Laser light-field fusion for wide-field lensfree on-chip phase contrast microscopy of nanoparticles. *Sci Rep* 2016;6. doi:10.1038/srep38981.

- [19] Momey F, Coutard J-G, Bordy T, Navarro F, Menneveau M, Dinten J-M, et al. Dynamics of cell and tissue growth acquired by means of extended field of view lensfree microscopy. *Biomed Opt Express* 2016;7:512. doi:10.1364/BOE.7.000512.
- [20] Kanka M, Riesenberger R, Kreuzer HJ. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images. *Opt Lett* 2009;34:1162. doi:10.1364/OL.34.001162.
- [21] Kanka M, Riesenberger R, Petruck P, Graulig C. High resolution (NA=08) in lensless in-line holographic microscopy with glass sample carriers. *Opt Lett* 2011;36:3651. doi:10.1364/OL.36.003651.
- [22] Sanz M, Picazo-Bueno JA, García J, Micó V. Dual-mode holographic microscopy imaging platform. *Lab Chip* 2018;18:1105-12. doi:10.1039/C7LC01304C.
- [23] Perraut F, Doménes M, Grateau H, Josso Q. Achieving magnification smaller than 1 in lensless microscopy by illumination with a convergent wavefront. *Opt Lett* 2016;41:5326. doi:10.1364/OL.41.005326.
- [24] Yang Y, Cheng Z-J, Zhao H-M, Yue Q-Y, Guo C-S. Quantitative phase imaging system with slightly-off-axis configuration and suitable for objects both larger and smaller than the size of the image sensor. *Opt Express* 2018;26:17199. doi:10.1364/OE.26.017199.
- [25] Grewe BF, Voigt FF, van 't Hoff M, Helmchen F. Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens. *Biomed Opt Express* 2011;2:2035. doi:10.1364/BOE.2.002035.
- [26] Fahrbach FO, Voigt FF, Schmid B, Helmchen F, Huisken J. Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens. *Opt Express* 2013;21:21010. doi:10.1364/OE.21.021010.
- [27] Zuo C, Chen Q, Qu W, Asundi A. High-speed transport-of-intensity phase microscopy with an electrically tunable lens. *Opt Express* 2013;21:24060. doi:10.1364/OE.21.024060.
- [28] Schubert R, Vollmer A, Ketelhut S, Kemper B. Enhanced quantitative phase imaging in self-interference digital holographic microscopy using an electrically focus tunable lens. *Biomed Opt Express* 2014;5:4213. doi:10.1364/BOE.5.004213.
- [29] Krauze W, Kuś A, Śladowski D, Skrzypek E, Kujawińska M. Reconstruction method for extended depth-of-field optical diffraction tomography. *Methods* 2018;136:40-9. doi:10.1016/j.ymeth.2017.10.005.
- [30] Lee DJ, Han K, Lee HJ, Weiner AM. Synthetic aperture microscopy based on referenceless phase retrieval with an electrically tunable lens. *Appl Opt* 2015;54:5346. doi:10.1364/AO.54.005346.
- [31] Deng D, Peng J, Qu W, Wu Y, Liu X, He W, et al. Simple and flexible phase compensation for digital holographic microscopy with electrically tunable lens. *Appl Opt* 2017;56:6007. doi:10.1364/AO.56.006007.
- [32] Bathe-Peters M, Annibale P, Lohse MJ. All-optical microscope autofocus based on an electrically tunable lens and a totally internally reflected ir laser. *Opt Express* 2018;26:2359. doi:10.1364/OE.26.002359.
- [33] Kreis T. *Handbook of holographic interferometry: optical and digital methods*. Wiley-VCH; 2005.
- [34] Takaki Y, Ohzu H. Fast numerical reconstruction technique for high-resolution hybrid holographic microscopy. *Appl Opt* 1999;38:2204. doi:10.1364/AO.38.002204.
- [35] Yaroslavsky LP. *Digital holography and digital image processing: principles, methods, algorithms*. Kluwer; 2003.
- [36] Trujillo CA, García-Sucerquia J. Automatic method for focusing biological specimens in digital lensless holographic microscopy. *Opt Lett* 2014;39:2569. doi:10.1364/OL.39.002569.
- [37] Dubois F, El Mallahi A, Dohet-Eraly J, Yourassowsky C. Refocus criterion for both phase and amplitude objects in digital holographic microscopy. *Opt Lett* 2014;39:4286. doi:10.1364/OL.39.004286.
- [38] Picazo-Bueno JA, Trusiak M, Micó V. Single-shot slightly off-axis digital holographic microscopy with add-on module based on beamsplitter cube. *Opt Express* 2019;27:5655. doi:10.1364/OE.27.005655.
- [39] Zhu H, Isikman SO, Mudanyali O, Greenbaum A, Ozcan A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab Chip* 2019;19:1351-6. doi:10.1039/c2lc40864c.
- [40] Allier C, Morel S, Vincent R, Ghenim L, Navarro F, Menneveau M, et al. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy: cell cultures by lens-free microscopy. *Cytometry A* 2017;91:433-42. doi:10.1002/cyto.a.23079.
- [41] Su T-W, Seo S, Erlinger A, Ozcan A. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:856-68. doi:10.1002/bit.22116.
- [42] Isikman SO, Bishara W, Sikora U, Yaglidere O, Yeah J, Ozcan A. Field-portable lens-free tomographic microscope. *Lab Chip* 2011;11:2222. doi:10.1039/c1lc20127a.
- [43] Sanz Martín, Picazo-Bueno José Ángel, Granero Luis, García Javier, Micó Vicente. Compact, cost-effective and field-portable microscope prototype based on mishelf microscopy. *Sci Rep* 2017;7:43291. doi:10.1038/srep43291.
- [44] Kesavan SV, Momey F, Cioni O, David-Watine B, Dubrulle N, Shorte S, et al. High-throughput monitoring of major cell functions by means of lensfree video microscopy. *Sci Rep* 2015;4. doi:10.1038/srep05942.
- [45] Jericho SK, García-Sucerquia J, Xu W, Jericho MH, Kreuzer HJ. Submersible digital in-line holographic microscope. *Rev Sci Instrum* 2006;77:043706. doi:10.1063/1.2193827.
- [46] Lee SA, Erath J, Zheng G, Ou X, Willems P, Eichinger D, et al. Imaging and identification of waterborne parasites using a chip-scale microscope. *PLoS ONE* 2014;9:e89712. doi:10.1371/journal.pone.0089712.
- [47] Bochdanský AB, Jericho MH, Herndl GJ. Development and deployment of a point-source digital inline holographic microscope for the study of plankton and particles to a depth of 6000 m: deep-sea holographic microscopy. *Limnol Oceanogr Methods* 2013;11:28-40. doi:10.4319/lom.2013.11.28.
- [48] Jericho SK, Klages P, Nadeau J, Dumas EM, Jericho MH, Kreuzer HJ. In-line digital holographic microscopy for terrestrial and exobiological research. *Planet Space Sci* 2010;58:701-5. doi:10.1016/j.pss.2009.07.012.
- [49] Xu W, Jericho MH, Kreuzer HJ, Meinertzhagen IA. Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. *Opt Lett* 2003;28:164. doi:10.1364/OL.28.000164.
- [50] Memmolo P, Miccio L, Paturzo M, Caprio GD, Coppola G, Netti PA, et al. Recent advances in holographic 3D particle tracking. *Adv Opt Photonics* 2015;7:713. doi:10.1364/AOP.7.000713.
- [51] Serabyn E, Liewer K, Lindensmith C, Wallace K, Nadeau J. Compact, lensless digital holographic microscope for remote microbiology. *Opt Express* 2016;24:28540. doi:10.1364/OE.24.028540.
- [52] Su T-W, Xue L, Ozcan A. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:16018-22. doi:10.1073/pnas.1212506109.
- [53] Su T-W, Choi I, Feng J, Huang K, McLeod E, Ozcan A. Sperm trajectories form chiral ribbons. *Sci Rep* 2013;3. doi:10.1038/srep01664.
- [54] Zhu H, Yaglidere O, Su T-W, Tseng D, Ozcan A. Cost-effective and compact wide-field fluorescent imaging on a cell-phone. *Lab Chip* 2011;11:315-22. doi:10.1039/C0LC00358A.
- [55] Kim J-H, Joo H-G, Kim T-H, Ju Y-G. A smartphone-based fluorescence microscope utilizing an external phone camera lens module. *BioChip J* 2015;9:285-92. doi:10.1007/s13206-015-9403-0.
- [56] Remacha C, Nickerson BS, Kreuzer HJ. Tomography by point source digital holographic microscopy. *Appl Opt* 2014;53:3520. doi:10.1364/AO.53.003520.

7. Bibliografía

1. D. Gabor, "A New Microscopic Principle," *Nature* 161(4098), 777–778 (1948).
2. D. Gabor, "Microscopy by Reconstructed Wavefronts," *Proc. R. Soc. Lond. A* 197, 454–487 (1949).
3. D. Gabor, "Microscopy by Reconstructed Wave Fronts: II," *Proc. Phys. Soc. Sect. B* 64(6), 449–469 (1951).
4. G. L. Rogers, "XIV.—Experiments in Diffraction Microscopy," *Proc. R. Soc. Edinb. Sect. Math. Phys. Sci.* 63(03), 193–221 (1952).
5. G. L. Rogers, "XVI.—Two Hologram Methods in Diffraction Microscopy," *Proc. R. Soc. Edinb. Sect. Math. Phys. Sci.* 64(2), 209–221 (1954).
6. W. L. BRAGG and G. L. ROGERS, "Elimination of the Unwanted Image in Diffraction Microscopy," *Nature* 167(4240), 190–191 (1951).
7. P. Kirkpatrick and H. M. A. El-Sum, "Image Formation by Reconstructed Wave Fronts I Physical Principles and Methods of Refinement*," *J. Opt. Soc. Am.* 46(10), 825 (1956).
8. A. V. Baez, "A Study in Diffraction Microscopy with Special Reference to X-Rays," *J. Opt. Soc. Am.* 42(10), 756 (1952).
9. G. W. Stroke, "LENSLESS FOURIER-TRANSFORM METHOD FOR OPTICAL HOLOGRAPHY," *Appl. Phys. Lett.* 6(10), 201–203 (1965).
10. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Reconstructed Wavefronts and Communication Theory*," *J. Opt. Soc. Am.* 52(10), 1123 (1962).
11. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Wavefront Reconstruction with Continuous-Tone Objects*," *J. Opt. Soc. Am.* 53(12), 1377 (1963).
12. E. N. Leith and J. Upatnieks, "Wavefront Reconstruction with Diffused Illumination and Three-Dimensional Objects*," *J. Opt. Soc. Am.* 54(11), 1295 (1964).
13. E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Spatial filtering for zero-order and twin-image elimination in digital off-axis holography," *Appl. Opt.* 39(23), 4070 (2000).
14. T. M. Kreis, "Suppression of the dc term in digital holography," *Opt. Eng.* 36(8), 2357 (1997).
15. Y. Takaki, H. Kawai, and H. Ohzu, "Hybrid holographic microscopy free of conjugate and zero-order images," *Appl. Opt.* 38(23), 4990 (1999).
16. W. K. Smothers, B. M. Monroe, A. M. Weber, and D. E. Keys, "Photopolymers for holography," in S. A. Benton, ed. (1990), pp. 20–29.
17. F. S. Chen, J. T. LaMacchia, and D. B. Fraser, "HOLOGRAPHIC STORAGE IN LITHIUM NIOBATE," *Appl. Phys. Lett.* 13(7), 223–225 (1968).

18. F. H. Mok, M. C. Tackitt, and H. M. Stoll, "Storage of 500 high-resolution holograms in a LiNbO₃ crystal," *Opt. Lett.* 16(8), 605 (1991).
19. R. L. Powell and K. A. Stetson, "Interferometric Vibration Analysis by Wavefront Reconstruction," *J. Opt. Soc. Am.* 55(12), 1593 (1965).
20. K. A. Stetson and R. L. Powell, "Interferometric Hologram Evaluation and Real-Time Vibration Analysis of Diffuse Objects," *J. Opt. Soc. Am.* 55(12), 1694 (1965).
21. R. F. Wuerker, "Holographic Interferometry," *Jpn. J. Appl. Phys.* 14(S1), 203 (1975).
22. T. H.J and P. G, "Digital Double-Pulse Holographic Interferometry for Vibration Analysis," *Shock Vib.* (2), 117–125 (1996).
23. A. J. Moore, D. P. Hand, J. S. Barton, and J. D. C. Jones, "Transient deformation measurement with electronic speckle pattern interferometry and a high-speed camera," *Appl. Opt.* 38(7), 1159 (1999).
24. D. Borza, "Stepped-Amplitude Modulation Interferometry A New Real-Time Mechanical Vibrations Measurement Technique," in *Interferometry in Speckle Light*, P. Jacquot and J.-M. Fournier, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 2000), pp. 305–310.
25. P. V. Farrell, G. S. Springer, and C. M. Vest, "Heterodyne holographic interferometry: concentration and temperature measurements in gas mixtures," *Appl. Opt.* 21(9), 1624 (1982).
26. X. Xiao and I. K. Puri, "Systematic approach based on holographic interferometry measurements to characterize the flame structure of partially premixed flames," *Appl. Opt.* 40(6), 731 (2001).
27. S. Sharma, G. Sheoran, and C. Shakher, "Digital holographic interferometry for measurement of temperature in axisymmetric flames," *Appl. Opt.* 51(16), 3228 (2012).
28. T. Matsumoto, R. Nagata, M. Saishin, T. Matsuda, and S. Nakao, "Measurement by holographic interferometry of the deformation of the eye accompanying changes in intraocular pressure," *Appl. Opt.* 17(22), 3538 (1978).
29. K. Takayama, "Application Of Holographic Interferometry To Shock Wave Research," in W. F. Fagan, ed. (1983), pp. 174–180.
30. J. K. Beamish, D. M. Gibson, G. H. Humberstone, R. H. Sumner, and S. M. Zivi, "Wind-tunnel diagnostics by holographic interferometry," *AIAA J.* 7(10), 2041–2043 (1969).
31. G. L. Bourdet and A. G. Orszag, "Absolute distance measurements by CO₂ laser multiwavelength interferometry," *Appl. Opt.* 18(2), 225 (1979).
32. P. L. M. Heydemann, "Determination and correction of quadrature fringe measurement errors in interferometers," *Appl. Opt.* 20(19), 3382 (1981).

33. A. Abou-Zeid, "Diode lasers for interferometry," *Precis. Eng.* 11(3), 139–144 (1989).
34. R. F. VANLIGTEN and H. OSTERBERG, "Holographic Microscopy," *Nature* 211(5046), 282–283 (1966).
35. D. Gabor and W. P. Goss, "Interference Microscope with Total Wavefront Reconstruction," *J. Opt. Soc. Am.* 56(7), 849 (1966).
36. B. R. Brown and A. W. Lohmann, "Complex Spatial Filtering with Binary Masks," *Appl. Opt.* 5(6), 967 (1966).
37. A. W. Lohmann and D. P. Paris, "Binary Fraunhofer Holograms, Generated by Computer," *Appl. Opt.* 6(10), 1739 (1967).
38. B. R. Brown and A. W. Lohmann, "Computer-generated Binary Holograms," *IBM J. Res. Dev.* 13(2), 160–168 (1969).
39. W. H. Lee, "Sampled Fourier Transform Hologram Generated by Computer," *Appl. Opt.* 9(3), 639 (1970).
40. C. K. Hsueh and A. A. Sawchuk, "Computer-generated double-phase holograms," *Appl. Opt.* 17(24), 3874 (1978).
41. J. Bucklew and N. Gallagher, "Detour phase error in the Lohmann hologram," *Appl. Opt.* 18(4), 575 (1979).
42. J. R. Fienup, "Iterative Method Applied To Image Reconstruction And To Computer-Generated Holograms," *Opt. Eng.* 19(3), (1980).
43. W. Freude, G. K. Grau, W. Liebler, and B. Wüppermann, "Computer-generated holograms with error compensation," *Appl. Opt.* 27(1), 138 (1988).
44. J. P. Allebach, N. C. Gallagher, and B. Liu, "Aliasing error in digital holography," *Appl. Opt.* 15(9), 2183 (1976).
45. J. W. Goodman and A. M. Silvestri, "Some Effects of Fourier-domain Phase Quantization," *IBM J. Res. Dev.* 14(5), 478–484 (1970).
46. W.-H. Lee, "Binary computer-generated holograms," *Appl. Opt.* 18(21), 3661 (1979).
47. M. A. Seldowitz, J. P. Allebach, and D. W. Sweeney, "Synthesis of digital holograms by direct binary search," *Appl. Opt.* 26(14), 2788 (1987).
48. A. G. Kirk and T. J. Hall, "Design of Binary Computer Generated Holograms by Simulated Annealing: Observation of Metastable States," *J. Mod. Opt.* 39(12), 2531–2539 (1992).
49. J. W. Goodman and R. W. Lawrence, "DIGITAL IMAGE FORMATION FROM ELECTRONICALLY DETECTED HOLOGRAMS," *Appl. Phys. Lett.* 11(3), 77–79 (1967).
50. U. Schnars and W. Jüptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction," *Appl. Opt.* 33(2), 179 (1994).

51. J. Pomarico, U. Schnars, H.-J. Hartmann, and W. Jüptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms: a new method for displaying light in flight," *Appl. Opt.* 34(35), 8095 (1995).
52. U. Schnars and W. P. O. Jüptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms," *Meas. Sci. Technol.* 13(9), R85–R101 (2002).
53. T.-W. Su, L. Xue, and A. Ozcan, "High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(40), 16018–16022 (2012).
54. H. Zhu, S. O. Isikman, O. Mudanyali, A. Greenbaum, and A. Ozcan, "Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics," *Lab Chip* 13(1), 51–67 (2013).
55. M. Lee, O. Yaglidere, and A. Ozcan, "Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography," *Biomed. Opt. Express* 2(9), 2721 (2011).
56. W. Bishara, H. Zhu, and A. Ozcan, "Holographic opto-fluidic microscopy," *Opt. Express* 18(26), 27499 (2010).
57. W. Bishara, H. Zhu, and A. Ozcan, "High-resolution Holographic Opto-fluidic Microscope On a Chip," in (OSA, 2011), p. CTuM4.
58. V. Bianco, M. Paturzo, V. Marchesano, I. Gallotta, E. Di Schiavi, and P. Ferraro, "Optofluidic holographic microscopy with custom field of view (FoV) using a linear array detector," *Lab. Chip* 15(9), 2117–2124 (2015).
59. J. P. Ryle, S. McDonnell, and J. T. Sheridan, "Lensless multispectral digital in-line holographic microscope," *J. Biomed. Opt.* 16(12), 126004 (2011).
60. J. Garcia-Sucerquia, "Color lensless digital holographic microscopy with micrometer resolution," *Opt. Lett.* 37(10), 1724 (2012).
61. O. Mendoza-Yero, A. Calabuig, E. Tajahuerce, J. Lancis, P. Andrés, and J. Garcia-Sucerquia, "Femtosecond digital lensless holographic microscopy to image biological samples," *Opt. Lett.* 38(17), 3205 (2013).
62. A. Graube, "Advances in Bleaching Methods for Photographically Recorded Holograms," *Appl. Opt.* 13(12), 2942 (1974).
63. F. Dubois and C. Yourassowsky, "Full off-axis red-green-blue digital holographic microscope with LED illumination," *Opt. Lett.* 37(12), 2190 (2012).
64. R. Guo, B. Yao, P. Gao, J. Min, M. Zhou, J. Han, X. Yu, X. Yu, M. Lei, S. Yan, Y. Yang, D. Dan, and T. Ye, "Off-axis digital holographic microscopy with LED illumination based on polarization filtering," *Appl. Opt.* 52(34), 8233 (2013).
65. W. Qu, O. C. Chee, Y. Yu, and A. Asundi, "Digital in-line holographic microscopy at 1310 nm with superluminescent light-emitting diode broadband source," in C. Quan, K. Qian, A. K. Asundi, and F. S. Chau, eds. (2009), p. 75226M.

66. B. Perucho and V. Micó, "Wavefront hologscopy: application of digital in-line holography for the inspection of engraved marks in progressive addition lenses," *J. Biomed. Opt.* 19(1), 016017 (2014).
67. Z. Frentz, S. Kuehn, D. Hekstra, and S. Leibler, "Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy," *Rev. Sci. Instrum.* 81(8), 084301 (2010).
68. G. Brooker, N. Siegel, J. Rosen, N. Hashimoto, M. Kurihara, and A. Tanabe, "In-line FINCH super resolution digital holographic fluorescence microscopy using a high efficiency transmission liquid crystal GRIN lens," *Opt. Lett.* 38(24), 5264 (2013).
69. E. Serabyn, K. Liewer, C. Lindensmith, K. Wallace, and J. Nadeau, "Compact, lensless digital holographic microscope for remote microbiology," *Opt. Express* 24(25), 28540 (2016).
70. V. R. Singh, A. Andrei, C. Gorecki, L. Nieradko, and A. Asundi, "Characterization of MEMS cantilevers using lensless digital holographic microscope," in C. Gorecki, A. K. Asundi, and W. Osten, eds. (2008), p. 69950F.
71. A. Greenbaum and A. Ozcan, "Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multi-height lensfree on-chip microscopy," *Opt. Express* 20(3), 3129 (2012).
72. B. Patino-Jurado, J. F. Botero-Cadavid, and J. I. Garcia-Sucerquia, "Optical Fiber Point-Source for Digital Lensless Holographic Microscopy," *J. Light. Technol.* 1–1 (2019).
73. M. Guizar-Sicairos and J. R. Fienup, "Understanding the twin-image problem in phase retrieval," *J. Opt. Soc. Am. A* 29(11), 2367 (2012).
74. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," *Opt. Lett.* 22(16), 1268 (1997).
75. T. Zhang and I. Yamaguchi, "Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography," *Opt. Lett.* 23(15), 1221 (1998).
76. V. Micó, J. García, Z. Zalevsky, and B. Javidi, "Phase-shifting Gabor holography," *Opt. Lett.* 34(10), 1492 (2009).
77. Y. Zhang, G. Pedrini, W. Osten, and H. J. Tiziani, "Whole optical wave field reconstruction from double or multi in-line holograms by phase retrieval algorithm," *Opt. Express* 11(24), 3234 (2003).
78. G. Pedrini, W. Osten, and Y. Zhang, "Wave-front reconstruction from a sequence of interferograms recorded at different planes," *Opt. Lett.* 30(8), 833 (2005).
79. P. Bao, F. Zhang, G. Pedrini, and W. Osten, "Phase retrieval using multiple illumination wavelengths," *Opt. Lett.* 33(4), 309 (2008).

80. P. Bao, G. Situ, G. Pedrini, and W. Osten, "Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths," *Appl. Opt.* 51(22), 5486 (2012).
81. L. Camacho, V. Micó, Z. Zalevsky, and J. García, "Quantitative phase microscopy using defocusing by means of a spatial light modulator," *Opt. Express* 18(7), 6755 (2010).
82. M. R. Teague, "Deterministic phase retrieval: a Green's function solution," *J. Opt. Soc. Am.* 73(11), 1434 (1983).
83. N. Streibl, "Phase imaging by the transport equation of intensity," *Opt. Commun.* 49(1), 6–10 (1984).
84. D. Paganin and K. A. Nugent, "Noninterferometric Phase Imaging with Partially Coherent Light," *Phys. Rev. Lett.* 80(12), 2586–2589 (1998).
85. M. Beleggia, M. A. Schofield, V. V. Volkov, and Y. Zhu, "On the transport of intensity technique for phase retrieval," *Ultramicroscopy* 102(1), 37–49 (2004).
86. L. Waller, S. S. Kou, C. J. R. Sheppard, and G. Barbastathis, "Phase from chromatic aberrations," *Opt. Express* 18(22), 22817 (2010).
87. D. W. E. Noom, D. E. Boonzajer Flaes, E. Labordus, K. S. E. Eikema, and S. Witte, "High-speed multi-wavelength Fresnel diffraction imaging," *Opt. Express* 22(25), 30504 (2014).
88. R. W. Gerchberg and W. O. Saxton, "A Practical Algorithm for the Determination of Phase from Image and Diffraction Plane Pictures," *Optik* 35(2), 237–246 (1972).
89. J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed (Roberts & Co, 2005).
90. F. Shen and A. Wang, "Fast-Fourier-transform based numerical integration method for the Rayleigh-Sommerfeld diffraction formula," *Appl. Opt.* 45(6), 1102 (2006).
91. S. Walles, "Magnification and Observation of a Holographic Interference Pattern," *Opt. Acta Int. J. Opt.* 13(3), 241–246 (1966).
92. R. W. Meier, "Magnification and Third-Order Aberrations in Holography*," *J. Opt. Soc. Am.* 55(8), 987 (1965).
93. Sony semiconductors, "Camera sensor IMX392 https://www.sony-semicon.co.jp/products_en/IS/sensor0/img/product/cmos/IMX392LLR_LQR_Flyer.pdf," (2018).
94. E. Cuche, F. Bevilacqua, and C. Depeursinge, "Digital holography for quantitative phase-contrast imaging," *Opt. Lett.* 24(5), 291 (1999).
95. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," *Opt. Lett.* 22(16), 1268 (1997).
96. I. Yamaguchi, J. Kato, S. Ohta, and J. Mizuno, "Image formation in phase-shifting digital holography and applications to microscopy," *Appl. Opt.* 40(34), 6177 (2001).

97. D. Zicha and G. A. Dunn, "An image processing system for cell behaviour studies in subconfluent cultures," *J. Microsc.* 179(1), 11–21 (1995).
98. D. Zicha, E. Genot, G. A. Dunn, and I. M. Kramer, "TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells," *J. Cell Sci.* 112 (Pt 4), 447–454 (1999).
99. S. Fürhapter, A. Jesacher, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte, "Spiral interferometry," *Opt. Lett.* 30(15), 1953 (2005).
100. S. Bernet, A. Jesacher, S. Fürhapter, C. Maurer, and M. Ritsch-Marte, "Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy," *Opt. Express* 14(9), 3792 (2006).
101. C. Maurer, A. Jesacher, S. Fürhapter, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte, "Upgrading a microscope with a spiral phase plate," *J. Microsc.* 230(1), 134–142 (2008).
102. A. Y. M. Ng, C. W. See, and M. G. Somekh, "Quantitative optical microscope with enhanced resolution using a pixelated liquid crystal spatial light modulator," *J. Microsc.* 214(3), 334–340 (2004).
103. G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics," *Opt. Lett.* 29(21), 2503 (2004).
104. G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Observation of dynamic subdomains in red blood cells," *J. Biomed. Opt.* 11(4), 040503 (2006).
105. N. Lue, W. Choi, G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, "Quantitative phase imaging of live cells using fast Fourier phase microscopy," *Appl. Opt.* 46(10), 1836 (2007).
106. T. Ikeda, G. Popescu, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Hilbert phase microscopy for investigating fast dynamics in transparent systems," *Opt. Lett.* 30(10), 1165 (2005).
107. G. Popescu, T. Ikeda, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy," *J. Biomed. Opt.* 10(6), 060503 (2005).
108. G. Popescu, T. Ikeda, K. Goda, C. A. Best-Popescu, M. Laposata, S. Manley, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, "Optical Measurement of Cell Membrane Tension," *Phys. Rev. Lett.* 97(21), (2006).
109. G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics," *Opt. Lett.* 31(6), 775 (2006).
110. Y. Park, G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Fresnel particle tracing in three dimensions using diffraction phase microscopy," *Opt. Lett.* 32(7), 811 (2007).

111. G. Popescu, Y. Park, R. R. Dasari, K. Badizadegan, and M. S. Feld, "Coherence properties of red blood cell membrane motions," *Phys. Rev. E* 76(3), (2007).
112. Y. Park, G. Popescu, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diffraction phase and fluorescence microscopy," *Opt. Express* 14(18), 8263 (2006).
113. N. Lue, W. Choi, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, and G. Popescu, "Confocal diffraction phase microscopy of live cells," *Opt. Lett.* 33(18), 2074 (2008).
114. H. Ding, Z. Wang, F. Nguyen, S. A. Boppart, and G. Popescu, "Fourier Transform Light Scattering of Inhomogeneous and Dynamic Structures," *Phys. Rev. Lett.* 101(23), (2008).
115. H. Ding, F. Nguyen, S. A. Boppart, and G. Popescu, "Optical properties of tissues quantified by Fourier-transform light scattering," *Opt. Lett.* 34(9), 1372 (2009).
116. H. Ding and G. Popescu, "Instantaneous Spatial Light Interference Microscopy," *Opt. Express* 18(2), 1569–1575 (2010).
117. J. R. Fienup, "Phase retrieval algorithms: a comparison," *Appl. Opt.* 21(15), 2758 (1982).
118. A. Barty, K. A. Nugent, D. Paganin, and A. Roberts, "Quantitative optical phase microscopy," *Opt. Lett.* 23(11), 817 (1998).
119. M. R. Teague, "Image formation in terms of the transport equation," *J. Opt. Soc. Am. A* 2(11), 2019 (1985).
120. A. Greenbaum, W. Luo, T.-W. Su, Z. Göröcs, L. Xue, S. O. Isikman, A. F. Coskun, O. Mudanyali, and A. Ozcan, "Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy," *Nat. Methods* 9(9), 889–895 (2012).
121. W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography for biological applications," *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(20), 11301–11305 (2001).
122. H. J. Kreuzer, "Holographic microscope and method of hologram reconstruction," U.S. patent US6411406B1 (June 25, 2002).
123. W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography of microspheres," *Appl. Opt.* 41(25), 5367 (2002).
124. L. Repetto, E. Piano, and C. Pontiggia, "Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination," *Opt. Lett.* 29(10), 1132 (2004).
125. S. K. Jericho, J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Submersible digital in-line holographic microscope," *Rev. Sci. Instrum.* 77(4), 043706 (2006).

126. J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "4-D imaging of fluid flow with digital in-line holographic microscopy," *Optik* 119(9), 419–423 (2008).
127. A. Ozcan and U. Demirci, "Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip," *Lab Chip* 8(1), 98–106 (2008).
128. S. Seo, T.-W. Su, A. Erlinger, and A. Ozcan, "Multi-color LUCAS: Lensfree On-chip Cytometry Using Tunable Monochromatic Illumination and Digital Noise Reduction," *Cell. Mol. Bioeng.* 1(2–3), 146–156 (2008).
129. T.-W. Su, S. O. Isikman, W. Bishara, D. Tseng, A. Erlinger, and A. Ozcan, "Multi-angle lensless digital holography for depth resolved imaging on a chip," *Opt. Express* 18(9), 9690 (2010).
130. T.-W. Su, I. Choi, J. Feng, K. Huang, E. McLeod, and A. Ozcan, "Sperm Trajectories Form Chiral Ribbons," *Sci. Rep.* 3(1), (2013).
131. S. A. Lee, J. Erath, G. Zheng, X. Ou, P. Willems, D. Eichinger, A. Rodriguez, and C. Yang, "Imaging and Identification of Waterborne Parasites Using a Chip-Scale Microscope," *PLoS ONE* 9(2), e89712 (2014).
132. F. Kazemzadeh and A. Wong, "Laser Light-field Fusion for Wide-field Lensfree On-chip Phase Contrast Microscopy of Nanoparticles," *Sci. Rep.* 6(1), (2016).
133. W. S. Haddad, D. Cullen, J. C. Solem, J. W. Longworth, A. McPherson, K. Boyer, and C. K. Rhodes, "Fourier-transform holographic microscope," *Appl. Opt.* 31(24), 4973 (1992).
134. E. Baudot, "Des Appareils Télégraphiques à Signaux Indépendants," *Ann. Télégraphiques* 4(1), 20–32 (1877).
135. J. D. Armitage and A. W. Lohmann, "Theta Modulation in Optics," *Appl. Opt.* 4(4), 399 (1965).
136. O. Bryngdahl and A. Lohmann, "Single-Sideband Holography," *J. Opt. Soc. Am.* 58(5), 620 (1968).
137. S. C. Som and R. A. Lessard, "Multiplex fourier transform holography," *Opt. Commun.* 2(3), 128–132 (1970).
138. S. C. Som and R. A. Lessard, "Holographic multiplexing by use of Fresnel holograms," *Opt. Commun.* 2(6), 259–262 (1970).
139. H. J. Caulfield, "Wavefront Multiplexing by Holography," *Appl. Opt.* 9(5), 1218 (1970).
140. H. J. Caulfield, "Space Division Multiplexed Holograms," *Appl. Opt.* 10(6), 1455 (1971).
141. S. D. Kakichashvili, "Method for phase polarization recording of holograms," *Sov. J. Quantum Electron.* 4(6), 795–798 (1974).
142. T. Todorov, L. Nikolova, and N. Tomova, "Polarization holography 1: A new high-efficiency organic material with reversible photoinduced birefringence," *Appl. Opt.* 23(23), 4309 (1984).

143. R. V. L. Hartley, "Transmission of Information," *Bell Syst. Tech. J.* 7(3), 535–563 (1928).
144. C. E. Shannon, "Communication in the Presence of Noise," *Proc. IRE* 37(1), 10–21 (1949).
145. G. Toraldo di Francia, "Resolving Power and Information," *J. Opt. Soc. Am.* 45(7), 497 (1955).
146. P. B. Fellgett and E. H. Linfoot, "On the Assessment of Optical Images," *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 247(931), 369–407 (1955).
147. J. L. Harris, "Diffraction and Resolving Power," *J. Opt. Soc. Am.* 54(7), 931 (1964).
148. W. Lukosz, "Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit," *J. Opt. Soc. Am.* 56(11), 1463 (1966).
149. W. Lukosz, "Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit II," *J. Opt. Soc. Am.* 57(7), 932 (1967).
150. I. J. Cox and C. J. R. Sheppard, "Information capacity and resolution in an optical system," *J. Opt. Soc. Am. A* 3(8), 1152 (1986).
151. A. Shemer, D. Mendlovic, Z. Zalevsky, J. Garcia, and P. Garcia Martinez, "Superresolving optical system with time multiplexing and computer decoding," *Appl. Opt.* 38(35), 7245 (1999).
152. V. Mico, Z. Zalevsky, and J. García, "Superresolution optical system by common-path interferometry," *Opt. Express* 14(12), 5168 (2006).
153. V. Micó, Z. Zalevsky, C. Ferreira, and J. García, "Superresolution digital holographic microscopy for three-dimensional samples," *Opt. Express* 16(23), 19260 (2008).
154. L. Granero, V. Micó, Z. Zalevsky, and J. García, "Synthetic aperture superresolved microscopy in digital lensless Fourier holography by time and angular multiplexing of the object information," *Appl. Opt.* 49(5), 845 (2010).
155. J. Á. Picazo-Bueno, Z. Zalevsky, J. García, and V. Micó, "Superresolved spatially multiplexed interferometric microscopy," *Opt. Lett.* 42(5), 927 (2017).
156. J. H. Massig, "Digital off-axis holography with a synthetic aperture," *Opt. Lett.* 27(24), 2179 (2002).
157. M. Paturzo, P. Memmolo, A. Tulino, A. Finizio, and P. Ferraro, "Investigation of angular multiplexing and de-multiplexing of digital holograms recorded in microscope configuration," *Opt. Express* 17(11), 8709 (2009).
158. V. Mico, C. Ferreira, Z. Zalevsky, and J. García, "Spatially-multiplexed interferometric microscopy (SMIM): converting a standard microscope into a holographic one," *Opt. Express* 22(12), 14929 (2014).
159. K. C. Kao and G. A. Hockham, "Dielectric-fibre surface waveguides for optical frequencies," *Proc. Inst. Electr. Eng.* 113(7), 1151–1158 (1966).

160. A. I. Kartashev, "Optical Systems with Enhanced Resolving Power," *Opt. Spectrosc.* 9, 204 (1960).
161. J. D. Armitage, A. Lohmann, and D. P. Paris, "Superresolution Image-Forming Systems for Objects with Restricted Lambda Dependence," *Jpn. J. Appl. Phys.* 3(S1), 273 (1964).
162. H. O. Bartelt, "Transmission of two-dimensional images by wavelength multiplexing," *Opt. Commun.* 28(1), 45–50 (1979).
163. A. A. Friesem, U. Levy, and Y. Silberberg, "Parallel transmission of images through single optical fibers," *Proc. IEEE* 71(2), 208–221 (1983).
164. E. G. Paek, C. E. Zah, K. W. Cheung, and L. Curtis, "All-optical image transmission through a single-mode fiber," *Opt. Lett.* 17(8), 613 (1992).
165. Z. Zalevsky, D. Mendlovic, and A. W. Lohmann, "IV Optical systems with improved resolving power," in *Progress in Optics* (Elsevier, 2000), 40, pp. 271–341.
166. J. Garcia, C. Ferreira, and J. J. Esteve-Taboada, "Image processing using spatial and wavelength multiplexing," in O. Iancu, A. Manea, and D. Cojoc, eds. (2003), pp. 16–25.
167. J. Á. Picazo-Bueno and V. Micó, "Opposed-view spatially multiplexed interferometric microscopy," *J. Opt.* 21(3), 035701 (2019).
168. J. J. Esteve-Taboada, P. Réfrégier, J. García, and C. Ferreira, "Target localization in the three-dimensional space by wavelength multiplexing," *Opt. Commun.* 202(1–3), 69–79 (2002).
169. A. Calabuig, V. Micó, J. Garcia, Z. Zalevsky, and C. Ferreira, "Single-exposure super-resolved interferometric microscopy by red–green–blue multiplexing," *Opt. Lett.* 36(6), 885 (2011).
170. A. Calabuig, J. Garcia, C. Ferreira, Z. Zalevsky, and V. Micó, "Resolution improvement by single-exposure superresolved interferometric microscopy with a monochrome sensor," *J. Opt. Soc. Am. A* 28(11), 2346 (2011).
171. L. Granero, C. Ferreira, Z. Zalevsky, J. García, and V. Micó, "Single-exposure super-resolved interferometric microscopy by RGB multiplexing in lensless configuration," *Opt. Lasers Eng.* 82, 104–112 (2016).