

DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

Прототип цифрового голографического микроскопа для исследования морского планктона

А.П. Хурчак¹, А.И. Хурчак²

¹Морской гидрофизический институт Российской академии наук,
ул. Капитанская, 2, г. Севастополь 299011, Россия

²Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук,
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь 299011, Россия

Поступила 24.02.2025

Принята к печати 02.06.2025

Морской планктон – важнейший элемент водной экосистемы. Разработка современных и доступных инструментов для исследования планктонных организмов является актуальной задачей. Цель работы заключалась в создании прибора, который был бы максимально доступен и полезен исследователям морского планктона. Представлен прототип безлинзового микроскопа оригинальной конструкции, использующий метод цифровой голографической микроскопии для визуализации морского планктона. Сочетание корпуса, изготовленного по аддитивной технологии, минимума оптических и электронных компонент, возможности использования программного обеспечения с открытым кодом делает его хорошей альтернативой классическим световым микроскопам в задаче исследования планктонных организмов. Конструкция прибора предусматривает работу как со стандартными предметными стеклами, так и с проточной кюветой, что позволяет автоматизировать обработку проб и производить экспресс-анализ, сохранив при этом пробу для последующей консервации и тщательного анализа стандартными методами.

Ключевые слова: цифровая голографическая микроскопия, безлинзовый микроскоп, планктон

Адрес для переписки:

Хурчак А.И.

Институт биологии южных морей РАН,
пр-т Нахимова, 2, г. Севастополь 299011, Россия
e-mail: alenakhurchak@ibss-ras.ru

Address for correspondence:

Khurchak A.I.

Institute of Biology of the Southern Seas of the RAN,
Nakhimov Ave., 2, Sevastopol 299011, Russia
e-mail: alenakhurchak@ibss-ras.ru

Для цитирования:

А.П. Хурчак, А.И. Хурчак.
Прототип цифрового голографического микроскопа
для исследования морского планктона.
Приборы и методы измерений.
2025. Т. 16. № 3. С. 185–190.
DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

For citation:

Khurchak AP, Khurchak AI.
Prototype of a Digital Holographic Microscope for Studying Marine
Plankton.
Devices and Methods of Measurements.
2025;16(3):185–190. (In Russ.).
DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

Prototype of a Digital Holographic Microscope for Studying Marine Plankton

A.P. Khurchak¹, A.I. Khurchak²

¹*Marine Hydrophysical Institute of the Russian Academy of Sciences,
Kapitanskaya str., 2, Sevastopol 299011, Russia*

²*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences,
Nakhimov Ave., 2, Sevastopol 299011, Russia*

Received 24.02.2025

Accepted for publication 02.06.2025

Abstract

Marine plankton is a key component of aquatic ecosystems. Development of modern and accessible tools for studying planktonic organisms is a relevant and important task. Aim of the study was to develop a device that would be highly accessible and useful for researchers of marine plankton. A prototype of a lensless microscope with an original design that utilizes digital holographic microscopy to visualize marine plankton is presented. Combination of an FDM-manufactured frame, a minimal set of optical and electronic components, and the ability to use open-source software makes it a viable alternative to conventional microscopes for studying planktonic organisms. The device is designed to work with both standard microscope slides and a flow cell, enabling automated sample processing and rapid analysis while, preserving the sample for subsequent conservation and in-depth examination using standard methods.

Keywords: digital holographic microscopy, lensless microscope, plankton

Адрес для переписки:

Хурчак А.И.
Институт биологии южных морей РАН,
пр-т Нахимова, 2, г. Севастополь 299011, Россия
e-mail: alenakhurchak@ibss-ras.ru

Address for correspondence:

Khurchak A.I.
Institute of Biology of the Southern Seas of the RAN,
Nakhimov Ave., 2, Sevastopol 299011, Russia
e-mail: alenakhurchak@ibss-ras.ru

Для цитирования:

А.П. Хурчак, А.И. Хурчак.
Прототип цифрового голографического микроскопа
для исследования морского планктона.
Приборы и методы измерений.
2025. Т. 16. № 3. С. 185–190.
DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

For citation:

Khurchak AP, Khurchak AI.
Prototype of a Digital Holographic Microscope for Studying Marine
Plankton.
Devices and Methods of Measurements.
2025;16(3):185–190. (In Russ.).
DOI: 10.21122/2220-9506-2025-16-3-185-190

Введение

В настоящее время сохраняется тенденция к снижению массогабаритных характеристик оптических приборов. Зачастую, эта задача решается путём замещения или дополнения функционала физических оптических элементов виртуальными оптическими элементами в виде компьютерных программ. Таким образом, самые технически сложные процессы формирования и хранения изображений переносятся в компьютер. При реализации оптических приборов в такой «цифровой» концепции минимизируется использование дорогих материалов и их точная обработка, что выигрышно сказывается на стоимости и как следствие, доступности.

Описанная выше «цифровая» концепция широко распространена в задачах визуализации микрообъектов под общим названием цифровая голографическая микроскопия [1], а предложенная Габором [2], и самая простая оптическая схема не содержит оптических элементов между исследуемым микрообъектом и регистрирующим устройством. Принцип работы микроскопа, собранного по схеме Габора основан на регистрации интерференционной картины (голограммы), образованной интерференцией двух волн – предметной волной, рассеянной от микрообъекта, и когерентной с ней опорной волной от источника света. Далее из имеющейся в цифровом виде голограммы происходит восстановление изображения микрообъекта. Под восстановлением подразумевается расчёт комплексной амплитуды волны в плоскости микрообъекта из зарегистрированной в плоскости приёмника с помощью математической модели распространения волн, реализованной в виде компьютерной программы. Восстановленные изображения получают монохромными, что является главным недостатком метода цифровой голографической микроскопии. Однако есть и явные преимущества перед классической световой микроскопией: 1) голограммы содержат информацию о фазе, поэтому можно исследовать прозрачные микрообъекты без окрашивания; 2) постфокусировка позволяет исследовать подвижные живые объекты, в то время как в классической микроскопии объекты фиксируются формалином; 3) относительно большое поле зрения, зависящее от размера матричного фотоприёмника.

В морских исследованиях планктона зачастую применяются приборы, представляющие собой погружные герметичные микроскопы [3, 4]. Очевидно, что исследуемый объём на порядки меньше объёма водоёма. Ввиду малой концентрации биологических частиц, планктонные организмы попадают в поле зрения случайно и такие данные не дают достоверного представления о биоразнообразии или экологической обстановке в акватории. Разработанный нами прототип безлинзового голографического микроскопа предлагается как инструмент для экспресс-анализа проб воды. Предполагается, что пробы, отобранные планктонными сетями, могут быть исследованы с помощью нашего прибора и в дальнейшем законсервированы для изучения стандартными общепотребимыми методами.

Отдельно стоит упомянуть прибор, разработанный в Томском государственном университете под руководством В.В. Демина. Его особенность заключается в системе зеркал, которая позволяет увеличить путь опорного пучка и сохранить при этом компактные габариты всей конструкции. Теоретически, можно спрогнозировать минус такой оптической схемы – увеличивается вероятность попадания нескольких исследуемых частиц на одну ось, что влечет за собой проблему при численном восстановлении. Однако, многократно опробованная на практике конструкция доказала свою работоспособность. Подробнее об этом приборе и оригинальных голографических методах исследования планктона можно ознакомиться в серии работ [5–8].

Цель настоящей работы заключалась в разработке доступного инструмента для исследования планктона, адаптированного под морские исследования и позволяющего производить экспресс-анализ проб воды.

Прототипирование

Оптическая система микроскопа очень проста, собрана по осевой схеме [9]. Содержит когерентный источник света – лазерный диод 630 нм, матричный фотоприёмник – CMOS камера Ximea MQ013CG-E2. Для формирования сферического волнового фронта между источником и приёмником установлен пинхол 10 мкм. Расстояние от пинхола до плоскости

микропрепарата 20 мм, от микропрепарата до плоскости приёмника 10–20 мм.

Корпус состоит из четырех частей, соединяемых четырьмя винтами М4. Высота корпуса 65 мм, ширина и длина 43 мм. Предусмотрена также док станция с функцией электропитания лазера (рисунок 1).

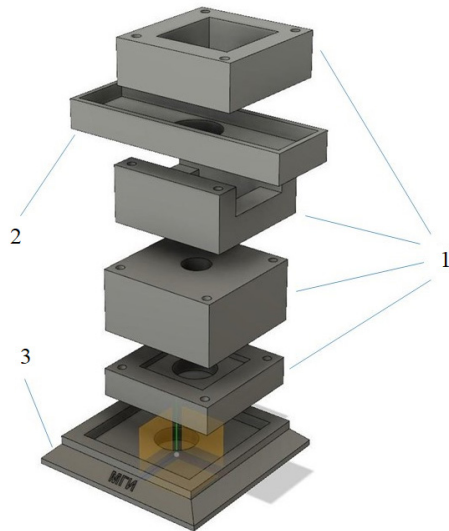


Рисунок 1 – 3D модель изготовленных частей микроскопа в разборе: 1 – части корпуса; 2 – лоток для предметного стекла (опционально меняется на проточную кювету); 3 – док-станция

Figure 1 – 3D model of the fabricated microscope parts in an exploded view: 1 – body components; 2 – slide tray (interchangeable with a flow cell); 3 – docking station

Корпус микроскопа удерживается в док-станции посредством магнитов, что очень удобно для фиксации микроскопа на судне в условиях качки. Питание и управление цифровой камерой осуществляется по интерфейсу USB (рисунок 2).

Предусмотрены два варианта работы с исследуемыми образцами (рисунок 3): 1) стандартный метод с нанесением образца на предметное стекло, для чего был изготовлен специальный держатель; 2) с проточной кюветой и шприцевым насосом. Все элементы изготовлены из PLA пластика на 3D-принтере. Небольшая масса прототипа призвана улучшить виброустойчивость голографического микроскопа как интерференционного устройства, что очень важно для работы в море на исследовательских судах.



Рисунок 2 – Внешний вид прототипа микроскопа

Figure 2 – Prototype of the microscope



Рисунок 3 – Слева – лоток для предметного стекла, справа – проточная кювета

Figure 3 – Left: slide tray; Right: flow cell

Восстановление изображений микрообъектов из голограмм

Для восстановления изображений из цифровых голограмм в настоящее время создано множество программ, многие из которых с открытым кодом. Мы использовали программу ImageJ [10] с программным модулем Numerical Propagation [11], т. к. она обладает богатым функционалом для анализа и обработки изображений и широко известна в профессиональной среде микробиологов.

Математически восстановление изображения в объектной плоскости из зарегистрированной голограммы в плоскости приёмника сводится к решению уравнения Кирхгофа [11]:

$$A'(x', y') = -\frac{i}{2\lambda} \iint_{\text{Screen}} A(x, y) \frac{\exp(ikp)}{p} [1 + \cos \chi] dx dy,$$

где $A'(x', y')$ – комплексная амплитуда в искомой точке (x', y') ; λ – длина волны; $A(x, y)$ – известная комплексная амплитуда в точке (x, y) ; k – волновое число; p – расстояние между точками (x, y) и (x', y') ; χ – угол между нормалью к объектной плоскости и направлением от точки (x, y) к точке (x', y') .

Следует отметить, что уравнение Кирхгофа не учитывает рассеяние, поглощение и неоднородность среды, в которой находятся исследуемые микрообъекты, что конечно является приближением и далеко от истины [12].

Подробнее о численных методах решения уравнения можно посмотреть в [4, 13]. Для оценки размеров частиц планктона, получаемых с помощью микроскопа, использовали эмпирический способ. Для этого производилась съёмка голограммы калибровочного слайда и восстанавливалось изображение шкалы высокой точности (рисунок 4).

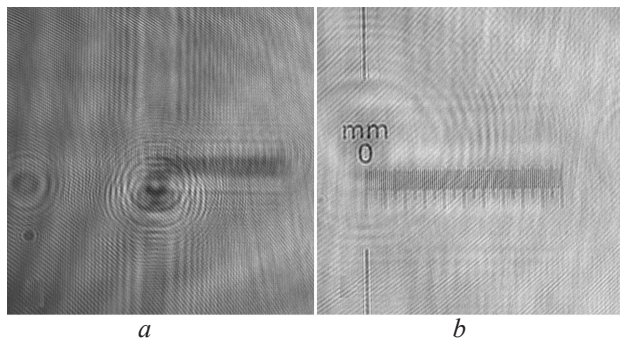


Рисунок 4 – Цифровая голограмма калибровочного слайда (a) и восстановленное изображение шкалы слайда (b)

Figure 4 – Digital hologram of the calibration slide (a) and reconstructed image of the slide scale (b)

Ниже представлены экспериментальные результаты по восстановлению изображений планктонных организмов, восстановленные из голограмм, полученных на прототипе цифрового голографического микроскопа (рисунок 5).

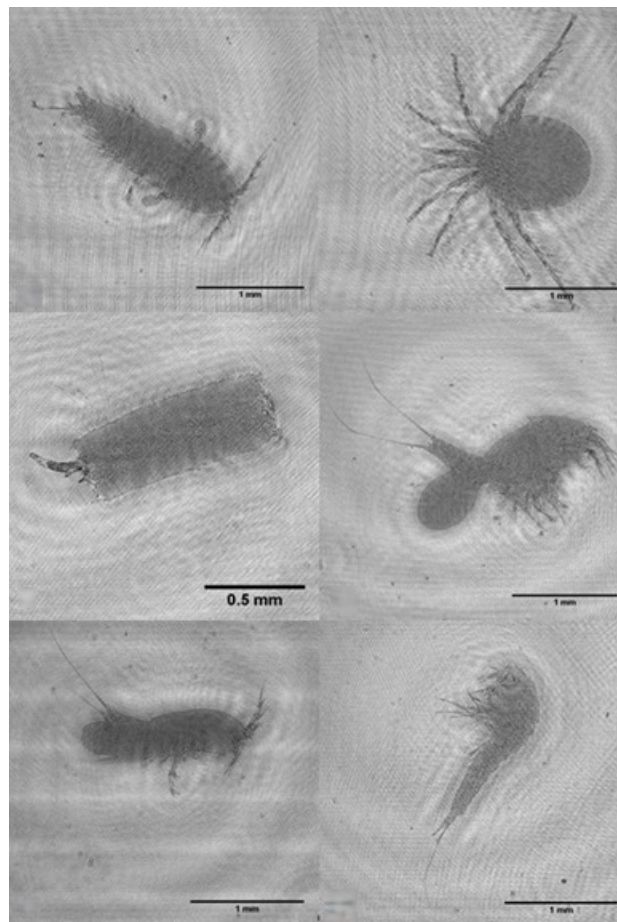


Рисунок 5 – Восстановленные изображения планктонных организмов

Figure 5 – Reconstructed images of planktonic organisms

Представленные выше изображения планктонных организмов это часть экспериментального материала, полученного на прототипе прибора для демонстрации возможностей. Определение видов организмов не входило в задачи данной работы.

Заключение

Разработан прототип цифрового голографического микроскопа для исследования планктона. Описан принцип его работы, устройство и метод изготовления. Предложен метод использования, позволяющий упростить и дополнить существующие способы исследования планктонных организмов. Представлены экспериментальные данные работы микроскопа по визуализации микроорганизмов. Новизна работы заключается в компоновке уже известных методов и материалов

в новый рабочий и доступный инструмент для исследования морского планктона.

Благодарности

Работа проведена в рамках государственных заданий FNNN-2024-0012 «Анализ, диагноз и оперативный прогноз состояния гидрофизических и гидрохимических полей морских акваторий на основе математического моделирования с использованием данных дистанционных и контактных методов измерений («Оперативная океанология»), FNNZ-2024-0035 «Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых моллюсков и физиологические основы её адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды».

Acknowledgments

The study was carried out within the framework of the state assignments FNNN-2024-0012 "Analysis, diagnosis and real-time forecast of the state of hydrophysical and hydrochemical fields of marine water areas based on mathematical modelling using data from remote and in situ methods of measurements" and FNNZ-2024-0035 "Mechanisms of immune system functioning in bivalve mollusks and physiological basis of its adaptation to abiotic, biotic, and anthropogenic environmental factors".

References

1. Kim MK. Digital Holographic Microscopy. Springer Series in Optical Sciences (2011). DOI: 10.1007/978-1-4419-7793-9
2. Gabor D. A New Microscopic Principle. Nature, 1948;161(4098):777-778. DOI: 10.1038/161777a0
3. Erickson JS, Hashemi N, Sullivan JM, Weidemann AD, Ligler FS. In Situ Phytoplankton Analysis: There's Plenty of Room at the Bottom. Analytical Chemistry. 2011;84(2):839-850. DOI: 10.1021/ac201623k
4. Ferraro P, Wax A, Zalevsky Z. Coherent Light Microscopy. Springer Series in Surface Sciences. 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-15813-1
5. Dyomin V, Polovtsev I, Davydova A, Kirillov N. Spectroscopic Aspects of Underwater Digital Holography of Plankton. Scientific Reports. 2025;(15):1884.
6. Dyomin VV. [et al.]. Plankton Concentration Model Consistent with Natural Events and Monitoring Series of Holographic Measurements. Journal of Marine Science and Engineering. 2025;(13):140.
7. Dyomin VV. [et al.]. Calibration for the magnification of a submersible digital holographic camera during the study of particles in natural conditions. Applied Optics. 2025;64(7):49-57.
8. Dyomin VV. [et al.]. Monitoring Bioindication of Plankton through the Analysis of the Fourier Spectra of the Underwater Digital Holographic Sensor Data. Sensors. 2024;24(7):2370.
9. Garcia-Sucerquia J. [et al.]. Digital in-line holographic microscopy. Applied Optics. 2006;45:836-850. DOI: 10.1364/ao.45.000836
10. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods. 2012;9:671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089
11. Piedrahita-Quintero P, Castañeda R, Garcia-Sucerquia J. Numerical wave propagation in ImageJ. Applied Optics. 2015;54(21):6410-5. DOI: 10.1364/AO.54.006410
12. Shybanov EB, Lee ME, Berthon J-F, Zibordi G. Intensification of light scattering as a result of mixing of pure waters with different densities. Physical Oceanography. 2011;21(4):254-260. DOI: 10.1007/s11110-011-9120-8
13. Latychevskaia T, Fink H.-W. Practical algorithms for simulation and reconstruction of digital in-line holograms. Applied Optics. 2015;54(9):2424. DOI: 10.1364/ao.54.002424